

Az *n*-butanol valamint a hideg előkezelés citológiai és strukturális hatásai kukorica portok kultúrában

Fábián Attila, Ambrus Helga, Jäger Katalin, Barnabás Beáta

MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Növényi Sejtbiológia Osztály, Martonvásár

Összefoglalás

A portok kultúrák androgén indukciós gyakoriságának növelése a növényi biotechnológia fontos célkitűzése. Segítségével nagyobb mennyiségű, magas genetikai variabilitást mutató dihaploid növény állhat a nemesítők rendelkezésére. Kukorica portok kultúrában lefolytatott kísérleteink során célunk volt, hogy felfedjük az indukció gyakoriságának növelésére gyakran alkalmazott hideg előkezelésnek, valamint az *n*-butanollal történő kémiai előkezelésnek a mikrosporák sejtváza, illetve szerkezetére gyakorolt hatásait annak érdekében, hogy jobban megértsük az androgenezis citológiai és strukturális hátterét.

Mind a hideg előkezelés, mind pedig az *n*-butanol kezelés megnövelte az androgén választ adó mikrosporák arányát. A legjelentősebb mikrospora indukciót azonban a két kezelés egyidejű alkalmazása váltotta ki.

A kezelések sejtváza gyakorolt hatásának vizsgálata érdekében a mikrotubulusokat az indirekt immunofluoreszcencia segítségével vizsgáltuk, az aktin fonalakat rodamin falloidin alkalmazásával jelöltük meg. A sejtek szerkezetében végbement változásokat szövettani módszerekkel követtük nyomon.

A hideg előkezelés megnövelte a mikrosporákban az aktin fonalak mennyiségét, de a mikrotubulus hálózatra nem volt hatással. Ezzel ellentétben az *n*-butanol alkalmazása a mikrotubulusok visszafordítható depolimerizációját váltotta ki, miközben az aktin fonalak mennyisége nem változott meg. Eredményeink támogatják azt a feltevést, miszerint a mikrosporák generatív fejlődése és az androgén fejlődési út közti átmenetet segíti a sejtváza átrendeződése, feltehetően a szimmetrikus osztódások elősegítése révén.

Kulcsszavak: kukorica, portok kultúra, hideg előkezelés, *n*-butanol, sejtváza

Bevezetés

A dihaploid (DH) növények előállítása a hagyományos nemesítés értékes eszköze. Segítségével csökkenthető az új, előnyös tulajdonságokkal rendelkező fajták létrehozásához szükséges idő. A magasabbrendű növények mikrosporái rendelkeznek azzal a képességgel, hogy gametofitikus fejlődési programjukat bizonyos körülmények között sporofitikus fejlődési útra tereljék. Ezt a folyamatot, melynek neve androgenezis, izolált mikrospora, illetve antéra kultúrákban célzottan váltják ki, annak érdekében, hogy egy lépésben jelentős mennyiségű, magas genetikai variabilitással rendelkező homozigóta növényeket nyerjenek (Reed *et al.* 2004). Több,

mint 200 fajból állítottak már elő dihaploid növényeket androgenezis segítségével (Dunwell 2010). Az androgenezis *in vitro* előidézésére középső-, vagy késői egysejtes fejlődési állapotú izolált mikrospórákat, illetve az azokat tartalmazó éretlen portokokat kultúrában nevelik (Maluszynski et al. 2003). Az első pollen mitózis (PM I) fontos mérföldkő a pollen fejlődése szempontjából. Bár *Brassica napus* esetében a kései kétmagvas állapotú pollen esetében is leírták az androgenetikus indukciót (Binarova et al. 1997), a legtöbb vizsgált fajban a fejlődő mikrospórák elvesztik totipotenciájukat az első pollen mitózist követően (Maraschin et al. 2005). A mikrospórák fejlődési programjának az embriogén útra terelése céljából sokféle kezelés alkalmazható, például magas vagy alacsony hőmérséklet, éheztetés, valamint kémiai anyagok felhasználása (például kolhicin, mannitol) (Shariatpanahi et al. 2006; Islam és Tutéja 2012; Zorinians et al. 2005). Az ezen kezelések által kiváltott stressz szükséges az androgén folyamatok megindulásához (Soriano et al. 2013). Kukorica mikrospóra és portok kultúrák esetében a címereket általában hideg előkezelésnek vetik alá, 7 °C-on tartva azokat 7-21 napig.

Az embriogén indukció első strukturális jele a citoplazma dedifferenciációja. A folyamat során a sejtszervecskék, lipidtestek, keményítőszemcsék és riboszómák száma lecsökken. A sejt váz a sejt alapvető összetevője, mely elengedhetetlen az androgenezis során végbemenő szerkezeti változások végrehajtásához. A növényi sejt váz egy dinamikus változó fonális rendszer, mely mikrotubulusokból (MT), aktin fonalakból és a hozzájuk kapcsolódó fehérjékből áll (Collings 2008, Petrášek és Schwarzerová 2009). Ez az összetett rendszer sokféle feladatot lát el: részt vesz a sejtek alakjának formálásában, meghatározza és fenntartja a sejt plazma polaritását, sejtalkotókat szállít, koordinálja a sejt osztódást (Kost és Chua 2002). Kevés információ áll azonban rendelkezésre a növényi sejt váznak az abiotikus stresszre adott válaszában betöltött szerepéről. Csupán a só- valamint ozmotikus stresszt (Wang et al. 2011), valamint a hőstresszt (Malerba et al. 2010) vizsgálták ebből a szempontból.

Egy alkohol, az *n*-butanol (vagy 1-butanol) alkalmazása megnövelte az embriogén mikrospórák arányát búza portok kultúrában (Soriano et al. 2008, Broughton 2011). Az *n*-butanol lecsökkenti egy jelátvitelben részt vevő foszfolipid, a foszfatidsav (FS) termelődését, mely a foszfolipáz D enzim (EC 3.1.4.4, PLD) aktivitásának eredménye (Liscovitch et al. 2000). A lecsökkent FS szint reverzibilis mikrotubulus depolimerizációt idézett elő *Arabidopsis* BY-2 sejt kultúrában (Dhonukshe et al. 2003, Hirase et al. 2006). Korábbi eredményeink szerint az *n*-butanol alkalmazása kukorica mikrospóra- és portok kultúrában megnöveli az androgén választ adó mikrospórák arányát (Földesiné Füredi et al. 2011, 2012). Annak érdekében, hogy összekapcsoljuk az *n*-butanol embriogenezist indukáló hatását a korábban kimutatott mikrotubulus depolimerizáló tulajdonságával, az *n*-butanollal kezelt kukorica mikrospórák sejt vázát fluoreszcens jelölés segítségével konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk meg. Ezen túl összehasonlítottuk a kukorica mikrospórák esetében legtöbbször alkalmazott hideg előkezelés és az *n*-butanol kezelés sejt vázra gyakorolt hatásait.

Vizsgálati anyag és módszer

Növényanyag és a növénynevelés körülményei

Az androgén portok kultúra alapanyagául az A18, egzotikus kínai alapanyagokból portokkultúra segítségével előállított, magas androgén indukciós gyakoriságú kukorica dihaploid vonal szolgált. A növényeket fitotroni klímakamrákban neveltük a kukorica neveléséhez kidolgozott Ny2 klímaprogram felhasználásával (Tischner *et al.* 1997).

Kezelés és mintavétel

A kezelések androgén indukcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához a késői egymagvas fejlődési állapotban lévő mikrospórákat tartalmazó éretlen portokokat 10 napos, 7 °C-os hőmérsékleten történő hidegkezelést követően módosított YP táptalajra helyeztük (Genovesi és Collins 1982), melyet kiegészítettünk 0,1 mg l⁻¹ 2,3,5-trijód-benzoosavval, 500 mg l⁻¹ kazein hidrolizátummal, valamint 120 g l⁻¹ szacharózzal (pH 5.8). Az *n*-butanol hatásának vizsgálatára a szert 0,2 % végkoncentrációban adtuk a kezelt portokok táptalajhoz, majd 6 óra múlva *n*-butanol mentes táptalajra helyeztük őket. A kontroll portokok esetében a kezelést nem alkalmaztuk. Kísérleteinket mind hideg előkezelt, mind pedig hideghatásnak ki nem tett portokok esetében elvégeztük, hogy a kétféle, embriogenezist indukáló előkezelés (hideg és *n*-butanol) hatása egymástól elkülöníthető legyen. Kezelésenként 1500 portokot 28 napon keresztül tartottunk az portok kultúrában sötétben, 29 °C-os hőmérsékleten. A huszonnyolcadik napon az androgén indukció mértéke és az embrió/kallusz arány sztereomikroszkóp segítségével került megállapításra.

Az *n*-butanol és a hideg előkezeléseknek az aktin és mikrotubulus sejtvázas elemekre kifejtett hatásának vizsgálatához mikrospórákat izoláltunk mechanikus módszerrel. A portokokat 1 ml YP tápfolyadékba helyeztük, majd óvatosan szétörzsöltük annak érdekében, hogy a mikrospórák a folyadékba kerüljenek. A szuszpenziót ezután 100 µm lyukméretű nylon szöveten szűrtük át a portokfal maradványok eltávolítására. Az *n*-butanollal kezelt portokokból 0,2% *n*-butanolt tartalmazó tápfolyadék felhasználásával történt az izolálás. A kezeletlen kontroll, a hidegkezelés, valamint az *n*-butanollal kezelt mikrospórákat ezután azonnal kémiai fixálásnak és sejtvázas jelölésnek vetettük alá. A sejtvázas *n*-butanollal való kezelést követő regenerációjának vizsgálatához az ágenssel kezelt mikrospórák egy részét két alkalommal mostuk YP táptalajjal az *n*-butanol eltávolítására. Harminc perccel az *n*-butanol eltávolítása után ezeket a mikrospórákat a többivel megegyező módon fixáltuk és jelöltük. A strukturális változások szövettani vizsgálatához minden kezelésből gyűjtöttünk portokokat a kultúra indítása utáni első, harmadik, hetedik és tizennegyedik napon.

Aktin és mikrotubulus jelölés

Az aktin fonalak jelölése *Lovy-Wheeler és munkatársai* (2005) alapján történt, kisebb módosításokkal. A mikroszpórákat 30 percig kémiai fixálásnak vetettük alá 100 mM PIPES, 5 mM MgSO₄, 0,5 mM CaCl₂, 7,5% szacharóz, 0,05% Triton X-100 és 2% paraformaldehid tartalmú pufferben, 9,0 pH mellett. Ezt a fenti puffer paraformaldehidet nem tartalmazó pH 7-es változatával történő mosás követte, majd az F-aktin fonalakat 6,6 µM rodamin falloidin (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) segítségével jelöltük 30 percen át. A mikrotubulusok jelölése indirekt immunfluoreszcencia alkalmazásával történt. A mikroszpórákat PEM pufferben rögzítettük (100 mM PIPES, 10 mM EGTA, 10 mM MgSO₄, 7,5% szacharóz pH 7,4), melyet 4 % paraformaldehiddel egészítettünk ki. A fixálási, emésztési és jelölési lépésekhez használt pufferekhez proteináz inhibitor koktélt adtunk (32 µg ml⁻¹ benzamidin HCl, 2 µg ml⁻¹ fenanthrolin monohidrát, 20 µg ml⁻¹ aprotinin, 20 µg ml⁻¹ leupeptin, 20 µg ml⁻¹ pepstatin, végkoncentrációk). A fixálást és PEM pufferrel való háromszori mosást követően a mikroszpóra fal részleges emésztését 90 percen át 10 mg ml⁻¹ β-glükuronidázt tartalmazó PEM pufferben szobahőmérsékleten végeztük (*Simmonds és Keller* 1999). A mikroszpórákat ezek után ülepítettük, majd 1% Triton X-100-ban szuszpendáltuk. A blokkolási, jelölési és mosási lépéseket 1% szarvasmarha szérum albumint tartalmazó PBS pufferben végeztük. Az elsődleges antitest egérben termeltetett monoklonális anti-α-tubulin antitest (Sigma T9026), míg a másodlagos egér ellen kecskében termeltetett FITC-jelölt IgG antitest (Sigma F0257) volt. Mindkét antitestet 1:200 hígításban 60 percen át alkalmaztuk szobahőmérsékleten. Az aktin- és mikrotubulus fonalakról Leica TCS SP8 konfokális lézser pásztázó mikroszkóppal (Leica, Németország) készítettünk felvételeket.

Szöveti vizsgálatok

A fejletlen mikroszpórákat tartalmazó portokokat 7,5% szacharózt és 4% glutáraldehidet tartalmazó PEM pufferben (pH 7,2) fixáltuk 4 órán keresztül szobahőmérsékleten, vákuum használatával. PEM pufferben való háromszori mosást követően emelkedő koncentrációjú alkohol sorban víztelenítettük, majd epoxi műgyantával itattuk át (*Spurr* 1969). A gyanta blokkokat 48 órán át 60 °C-on polimerizáltuk. A mintákból Ultracut E mikrotóm segítségével (Reichert-Jung GmbH, Heidelberg, Németország) félvékony (1 µm) metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezeken gyűjtöttünk, majd toluidin késsel festettük meg (0,5% toluidin kék 0,1% nátrium karbonát pufferben, pH 11,1). Az újonnan keletkező sejtfalak vizsgálata auramin-O festékkel történt (0,001% auramin-O 50 mM Tris-HCl pufferben, pH 7,5). A metszetek vizsgálata BX51 típusú fénymikroszkóppal (Olympus, Tokyo, Japan) történt, a méréseket az Image-Pro Plus 5.1 képanalizáló szoftverrel (Media Cybernetics Inc.–Bethesda, USA) végeztük.

A fluoreszcens jelek kvantitatív feldolgozása

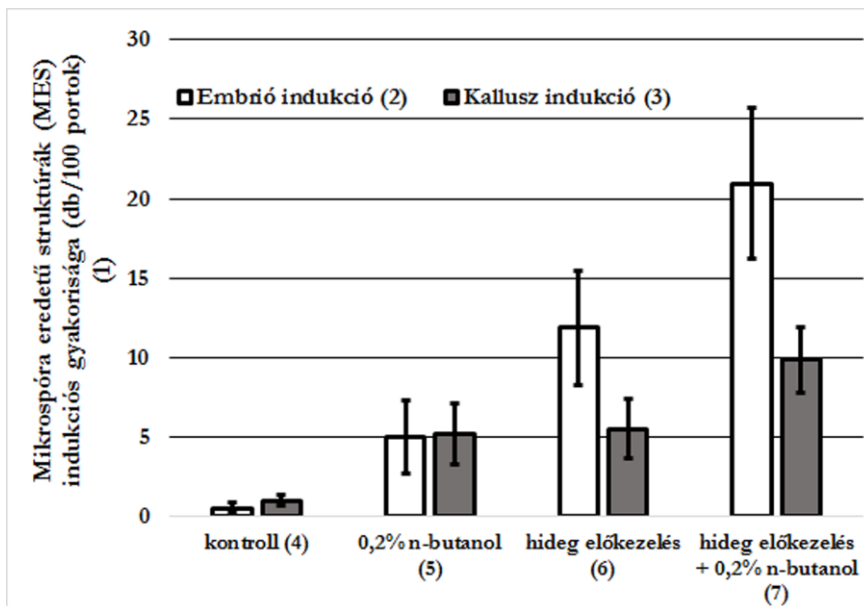
A hideg előkezelés valamint az *n*-butanol alkalmazását követő, a sejtvíz mennyiségében bekövetkezett változások számszerűsítésére *Higaki és munkatársai* (2010) módszerét alkalmaztuk, melyhez az ImageJ képfeldolgozó programot vettük

igénybe (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A sejtvez elemek mennyiségét a fenti cikkben szereplő paraméter ("Occupancy") használatával határoztuk meg, melyhez kezelésként 50 sejten végeztünk méréseket. Az adatok statisztikai értékelése az SPSS for Windows 10.0 programmal, varianciaanalízis alkalmazásával történt.

Vizsgálati eredmények

A különböző előkezelések hatása a mikrospóra indukcióra

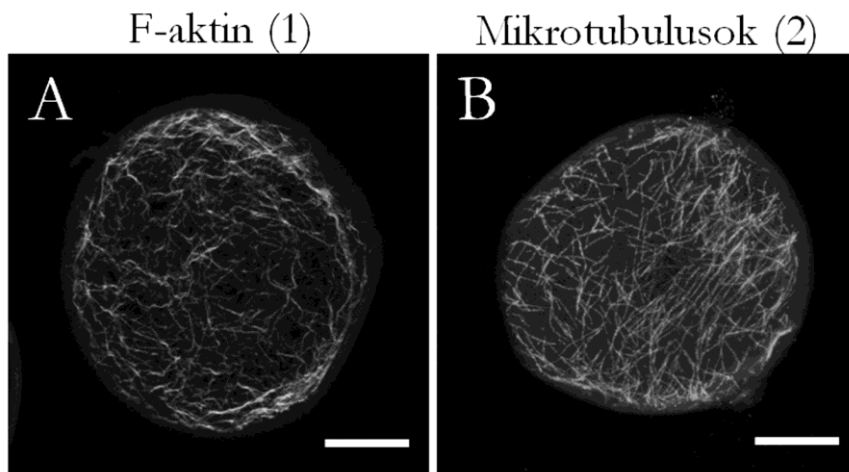
Az alkalmazott kezelések egymástól szignifikánsan eltérő mértékben idéztek elő mikrospóra indukciót (1. ábra). Az általunk alkalmazott magas androgén válaszadó képességű A-18 genotípus előkezelést nem kapott kontroll portokjaiban is előfordult embrió és kallusz indukció, bár alacsony gyakorisággal. Ebben az esetben körülbelül kétszeres mennyiségben keletkezett kallusz az embriókhoz képest. A 0,2 % *n*-butanol alkalmazása hideg előkezelés nélkül körülbelül hatszorosára emelte a válaszadó mikrospórák számát a kontrollhoz képest. Ez a kezelés megközelítőleg egyenlő arányban indukált kallusz- és embrió képződést. Az önmagában alkalmazott hideg előkezelés ennél is magasabb embrió kihozatalt idézett elő, míg a kombinációban alkalmazott hideg és *n*-butanol előkezelés eredményezte átlagosan a legtöbb, 20,95 embriót 100 antérára vetítve. Az embrió/kallusz arány a csak hidegkezelt illetve a hideg és *n*-butanollal kombináltan kezelt antéráknál hasonlóan magas volt, körülbelül kétszeres mennyiségű embriót eredményezve a kalluszokhoz képest.



1. ábra. A kukorica portokkultúrában alkalmazott különböző előkezelések hatása az embrió- és kallusz indukcióra.

A különböző előkezelések hatása a sejtvázra

Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végeztük el az egyes kezelések által a sejtvázra kifejtett hatások vizsgálatát (2. A, B ábra). Az önmagában alkalmazott hideg előkezelés jelentősen megemelte az F-aktin szálak mennyiségét (1. táblázat), melyet a rodamin falloidinnel megjelölt mikrospórákról készült felvételek fluoreszcens jeleinek kvantitatív elemzése is megerősített. Ezzel szemben a kortikális aktin hálózat egyenletes eloszlású szerkezete nem változott meg. A hideg előkezelés sem a mikrotubulusok mennyiségét, sem pedig a hálózat szerkezetét nem változtatta meg a kezeletlen kontrollhoz képest. A hideg előkezeléssel ellentétben a 0,2 %-os koncentrációban hat órán át *n*-butanollal kezelt mikrospórák aktin hálózatában semmiféle változást nem figyeltünk meg.



2. ábra. A kezeletlen kontroll kukorica mikrospórák sejtvázáinak szeveződése. (A): rodamin falloidinnel jelölt F-aktin fonalak, (B): indirekt immunfluoreszcens módszerrel jelölt mikrotubulusok. Bar: 10 μm .

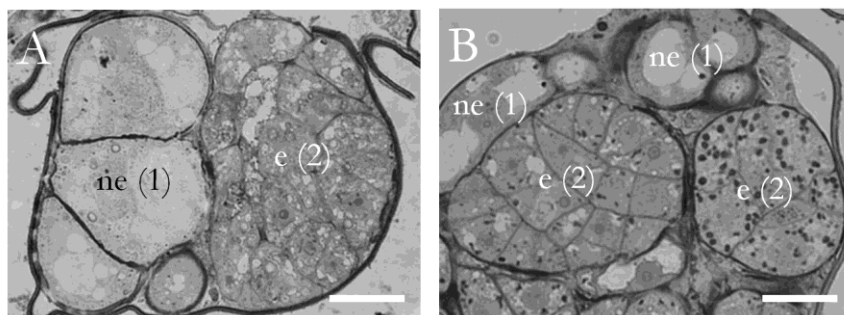
Ez a kezelés ugyanakkor a mikrotubulusok depolimerizációját idézte elő, ami a kortikális mikrotubulus hálózat teljes eltűnéséhez vezetett (1. táblázat), viszont sejtmagot és a pórust körülvevő sűrűbb MT hálózat nagyrészt érintetlen maradt. Ebből arra következtethetünk, hogy az *n*-butanol kezelés nem egyformán hat a sejtekben előforduló teljes MT hálózatra. Az *n*-butanol eltávolítását követően a kortikális mikrotubulus hálózat 30 perc alatt helyreállt. Ez a kémiai kezelés az aktin sejtvázat nem változtatta meg. A specifikusan jelölt sejtvázelemek fluoreszcens jeleinek számszerűsítése megerősítette, hogy a hideg előkezelés szelektíven növelte az F-aktin mennyiségét, míg az *n*-butanol kizárólag a kortikális mikrotubulusok reverzibilis depolimerizációját idézte elő (1. táblázat).

1. táblázat. A mikrspórák aktin és mikrotubulus sejtvázának mennyiségében a kezelések hatására bekövetkezett változások. Az oszlopokon belül az eltérő betűk az átlagértékek szignifikáns eltérését jelölik a $P \leq 0,0005$ valószínűségi szinten.

Kezelés (1)	Aktin mennyiség (Occupancy) (2)	Mikrotubulus mennyiség (Occupancy) (3)
kontroll (4)	3,54±1,91 ^a	7,26±0,92 ^a
0,2% <i>n</i> -butanol (B)(5)	3,93±1,92 ^a	1,71±0,85 ^b
hideg előkezelés (H)(6)	7,97±0,75 ^b	7,78±0,86 ^a
H+B (7)	8,31±0,3 ^b	1,99±1,44 ^b
H+B és 30 perces regeneráció (8)	7,79±0,44 ^b	6,23±0,92 ^c

A mikrspóra eredetű struktúrák korai fejlődése során lezajló szerkezeti változások

A különböző kezelésekből származó mikrspóra eredetű struktúrák (MES) korai fejlődését (3-14 nap) szövettani módszerekkel vizsgáltuk annak érdekében, hogy az *n*-butanol kezelés embriogenezisre gyakorolt hatásait feltárhassuk (3. ábra). Mivel a hideg előkezelés alapvető fontosságú a mikrspóra eredetű embriogenezis kiváltásában, kísérletünkben a hidegkezelte portokokat tekintettük kontrollnak. A hidegkezelte kontrollban illetve a hideg- majd *n*-butanol kezelt portokokban képződött struktúrákat a kultúra indítását követő harmadik, hetedik és tizennegedik napon vizsgáltuk. Eredményeink szerint az *n*-butanol kezelés lelassította a mikrspóra eredetű struktúrák fejlődését. Az *n*-butanollal kezelt indukálódott mikrspórák kevesebbszer osztódtak, mint a hidegkezelte kontroll mikrspórák.



3.ábra. Az *n*-butanollal kezelt kukorica portokkultúrában megjelenő mikroszpóra eredetű struktúrák (MES) morfológiája a kezelés 14. napján. Félvékony metszetek toluidin kézzel festve. (A): hidegkezelt kontroll. (B): *n*-butanollal kezelt MES-ek 14 nappal a kultúra indítását követően. e: embriogén sejtcsoport, ne: nem embriogén sejtcsoport. Bar: 10 µm.

Ebben az időszakban mind az *n*-butanollal kezelt, mind pedig a kontroll MES-ek két, eltérő szerveződésű egységből épültek fel, hasonlóan a Testillano és munkatársai (2002) által leírtakhoz. A kisebb, valószínűsíthetően embriogén egység kis, erőteljesen festődő sejtekből állt, míg a másik, nem embriogén (Testillano és mtsi által endospermium szerűként említett) egység nagy, erősen vakuolált sejteket tartalmazott. A kultúra indítását követő tizennegyedik napra a MES-ek túlnyomó része elérte a proembrió fejlődési állapotot, függetlenül az alkalmazott kezeléstől (3. A, B ábra). A fluorescens auramine-O festék alkalmazásával lehetővé vált az újonnan keletkező sejtfalak vizsgálata. Bár az auramin-O korábbi közlemények szerint az intakt pollenszemek külső sporopollenin rétegét festi (Lalonde *et al.* 1997; Nishikawa *et al.* 2005), kísérleteinkben a Spurr epoxi műgyantába ágyazott mikroszpórák metszetein specifikusan jelölte az intinét és az újonnan szintetizálódó a sejtfalak alapját képező középlemezeket. A jelölés felfedte, hogy az *n*-butanollal kezelt mikroszpórák esetében gyakori a nem szabályos (hullámos, vastag), illetve a hiányos sejtfalképződés, mely a kontroll mikroszpóráknál nem fordult elő.

Vizsgálati eredmények értékelése, megvitatása

Az n-butanol hatékonyan segíti a mikroszpóra eredetű embriogenezist

Míg az *n*-butanollal végzett hosszú távú kezelés gátló hatásának bizonyult (Gardiner *et al.* 2003, Motes *et al.* 2005), addig rövidebb időtartamú alkalmazása megnövelte az androgén indukció gyakoriságát búza (Soriano *et al.* 2008, Broughton 2011), kukorica (Földesiné Fűredi *et al.* 2011) és árpa (Castillo *et al.* 2014) izolált mikroszpóra valamint portok kultúrában. Amint azt árpában már bizonyították, az *n*-butanol hatása genotípus, illetve előkezelés függőséget mutathat (Castillo *et al.* 2014). Ezekben a kísérletekben az *n*-butanol megemelte a képződő embriók és zöld növények számát az alacsony válaszadó képességű fajtáknál, míg a közepes, illetve erős androgén választ adó genotípusoknál nem váltott ki hatást. Kísérleteinkben az *n*-butanol embrió szám emelkedést váltott ki önmagában és hideg előkezeléssel kombinálva, valamint megemelte az embrió/kallusz arányt. Ez megerősíti, hogy a mikroszpóra eredetű embriogenezis egy bonyolult, sok tényező által befolyásolt folyamat. Bár az *n*-butanol mikroszpóra eredetű embriogenezisre gyakorolt stimulatív hatását már több faj esetében leírták, eddig nem nyert megerősítést, hogy a megnövekedett embriószám kapcsolatban áll a vegyület által a sejtváz szerkezetében előidézett változásokkal. Vizsgálataink bebizonyították, hogy az *n*-butanol koncentráció, mely megnöveli az androgén indukció gyakoriságát kukorica portok kultúrában, egyszerűen a mikroszpórák kortikális mikrotubulus rendszerének gyökeres átalakulását is előidézi. Megállapítottuk, hogy az *n*-butanol mikrotubulus depolimerizáló hatása kukorica mikroszpórák esetében visszafordítható, a korábban

más sejt kultúrákban és vegetatív szervekben tapasztaltakhoz hasonlóan (Dhonukshe et al. 2003, Gardiner et al. 2003, Hirase et al. 2006).

Az n-butanol hatása a kortikális mikrotubulus hálózatra

Az *n*-butanol kezelés mikrotubulus hálózatra gyakorolt hatása nagyban hasonlít a kolhicin hatására, mely az általunk megfigyeltékhez hasonlóan a mikrotubulusok depolimerizációját váltotta ki. A kolhicin az *n*-butanollal ellentétben hatását magukon a mikrotubulusokon fejt ki az által, hogy a β -tubulin alegységekhez kötődve meggátolja azok polimerizációját. Az újonnan polimerizálódott mikrotubulusok hiányában a sejtek citoplazmájának polarizáltsága nem tartható fenn (Szegești és Doe 2007). Megfigyelték, hogy a kolhicin eltávolítását követően egy új, egyenletesen eloszló mikrotubulus hálózat alakult ki, mely lehetővé tette a szimmetrikus sejtosztódást. A kolhicin hidegkezelés nélkül, önmagában történő alkalmazása kukorica portok kultúrában a hidegkezeléshez hasonló mértékben váltott ki androgén indukciót (Obert és Barnabás 2004), ám az általunk alkalmazott *n*-butanollal ellentétben a hidegkezeléssel kombinálva nem emelte szignifikánsan a képződő embriók számát. A kolhicin, az általunk *n*-butanollal végzett korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Földesiné Füredi et al. 2012) jelentősen növelte a szimmetrikus sejtosztódások számát dohányban (Eady et al. 1995) és búzában (Szakács és Barnabás 1995) is. Eady és munkatársai (1995) a vegetatív sejtekre specifikus *lat52* promotor aktiválódását figyelték meg kolhicin segítségével indukált embriogén dohány mikroszporákban. Ez arra utal, hogy az osztódás szimmetriája megváltoztathatja a sejtek génkifejeződését, valamint változtathatja a mikroszporák fejlődési programját (Eady et al. 1995). Az említett szerzők feltételezése szerint a megváltozott szimmetria által kiváltott eltérő génkifejeződés hátterében a korábban egyenlőtlen eloszlást mutató génextpressziós faktorok és/vagy inhibitorok leánysejtekben történő újraeloszlása állhat. Bár hasonló hatást gyakorolnak a mikrotubulus sejt vázra, a kolhicin és az *n*-butanol eltérően hathatnak a mikroszporák androgén indukciójára. Az *n*-butanol esetében ugyanis a sejtosztódás szimmetriáján kívül más módokon is végbemehet az androgenezis segítése, hiszen a foszfátid sav mennyiségének csökkenése számos jelátviteli utat befolyásol a mikroszporákban. Kísérleteinkben az *n*-butanol alkalmazása hideg előkezelés nélkül is sikeresen indukálta embriók és kalluszok megjelenését a kultúrában. Az *n*-butanol és a hideg előkezelés kombinált alkalmazása következtében jelentősen megnőtt az indukálódó mikroszporák száma a csak hideg előkezelte portokokhoz viszonyítva. Ez az eredmény arra utal, hogy a sejt váz átrendeződése segíti a mikroszporákban a gametofitikus fejlődésről a sporofitikus útra történő átállást.

A hideg előkezelés megváltoztatja a kukorica mikroszporák aktin sejt váz rendszerét

A hipotézis, mely szerint a sejt váz fontos szerepet játszik az embriogén indukcióban, felveti a kérdést, vajon a hideg előkezelés, mely alapvetően szükséges kukoricában a hatékony androgenezishez, milyen változásokat eszközöl a sejt váz összetevőiben? Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végzett vizsgálataink

feltárták, hogy a hideg előkezelést követően csak az F-aktin hálózat mutatott változást, a mikrotubulus sejtváza nem. A tény, hogy a hideg előkezelés kiváltotta mind az aktin fonalak mennyiségének emelkedését, mind pedig hatékonyan indukálta az embriogenezist, arra utal, hogy az aktin sejtváza részt vesz a mikrospóra embriogenezis indukciójához szükséges sejtplazma újrendeződésben. Ezt az elgondolást támasztja alá *Sheaban és munkatársainak* (2004) eredményei, akik dohány protoplastokban kimutatták, hogy az aktin sejtváza a sejtisztervecskek elosztásában és újrendezésében alapvető szerepet játszik.

Az n-butanol kezelés hatására zavart szenved a sejtfa képződés

Szöveti vizsgálatunk során az *n*-butanol kezelés legszembetűnőbb hatása a rendellenes sejtfa kialakulása volt. Bár a középlemez, az új sejtfa kezdeménye csak a citokinézis fázisában jön létre, a fragmoplaszt, mely szükséges a középlemez létrehozásához, már a telofázisban jelen van. A fragmoplaszt hálózat két egymással párhuzamos mikrotubulus sorozatból áll, melyeknek pozitív polaritású végei a leendő sejtfa, tehát a későbbi sejtfa síkjában helyezkednek el. A fragmoplaszt szerepe, hogy a sejtplazmában újonnan szintetizálódott sejtfa anyagot tartalmazó vezikulákat a középlemez képződésének helyére szállítsa (*Liu et al.* 2011). Mivel a sejtfa kialakulásának pontos helye a fragmoplasztot alkotó mikrotubulusok pozitív végei által kerül kijelölésre, a telofázis során a mikrotubulusok elrendeződését vagy polimerizációját befolyásoló események nagy valószínűséggel megváltoztatják a képződő sejtfa helyét, illetve szerkezetét. A kolhicin alkalmazása rendellenes középlemez kialakulását idézte elő zab gyökerekben (*Holmsen és Hess* 1985), mely elágazó, hullámos sejtfa szintéziséhez vezetett. Kísérleteinkben az *n*-butanollal kezelt mintákban rendellenes és hiányos, befejezetlen sejtfa képződését figyeltük meg, melyek nagy mértékben hasonlóak a *Holmsen és Hess* (1985) által kolhicin kezelést követően észleltékhez. Ez is megerősíti a két kémiai anyag hasonló hatását a sejtosztódásra. Bár az *n*-butanol feltételezett sejtfa polaritás csökkentő hatásának az első pollen mitózist megelőzően kell hatását kifejtenie, várható, hogy azok a mikrospórák, melyek az *n*-butanol kezelés megkezdésekor már beléptek a mitózisba, mutathatnak rendellenes sejtfa képződést, hiszen ehhez csupán az szükséges, hogy a telofázis és a citokinézis idején a vegyület jelen legyen. Ezen túl, a kezelés végén az *n*-butanol kimosása az antéra falán keresztül egy lassú folyamat, mely egyenlőtlenül is végbe mehet, így nagymértékben eltérő lokális *n*-butanol koncentrációkhoz vezet.

Bár a szakirodalom szerint a sejtosztódás és a középlemez síkjának meghatározásában a mikrotubulus hálózatok játszanak elsődleges szerepet (*Rasmussen* 2013), bizonyított, hogy az aktin fonalak depolimerizációja a sejtosztódás során megváltoztatja az osztódási szimmetriát a vegetatív sejtekben és mikrospórákban (*Liu és Palevitz* 1992; *Eleftheriou és Palevitz* 1992) ami embriogenezishez vezet (*Gervais et al.* 2000). Összegezve a rendelkezésre álló adatokat, megállapítható, hogy a mikrotubulus és aktin hálózatok együttműködése a telofázis és a citokinézis során előfeltétele a sejtfa képződésének.

Vizsgálataink felfedték a hideg előkezelés és az *n*-butanol kukorica mikroszórák sejtvezára gyakorolt eltérő hatásait. További kutatások szükségesek azonban annak kiderítésére, hogy az *n*-butanol embriogenezis gyakoriságát emelő hatása kizárólag a sejtvez újraszervezése révén valósul meg, vagy szerepe van benne a foszfátsav függő jelátviteli utak megváltoztatásának is.

Köszönetnyilvánítás

A kutatásokat az OTKA 80260 számú pályázat támogatta. A Leica SP 8 konfokális lézer pásztázó mikroszkóp beszerzését a GENPROF IF-18/2012 Akadémiai Infrastrukturális Műszerpályázat tette lehetővé.

IRODALOM

- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H. G., and Campagne, M. M. L. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sex. Plant Reprod.* 10:200–208.
- Broughton, S. 2011. The application of *n*-butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Crop Pasture Sci.* 62:813–822.
- Castillo, A. M., Nielsen, N. H., Jensen, A., and Vallés, M. P. 2014. Effects of *n*-butanol on barley microspore embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11240-014-0451-2> [Accessed February 19, 2014].
- Collings, D. A. 2008. Crossed-Wires: Interactions and Cross-Talk Between the Microtubule and Microfilament Networks in Plants. In *Plant Microtubules*, Plant Cell Monographs, ed. Peter Nick. Springer Berlin Heidelberg, p. 47–79. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/7089_2007_146 [Accessed August 31, 2014].
- Dhonukshe, P., Laxalt, A. M., Goedhart, J., Gadella, T. W., and Munnik, T. 2003. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell Online.* 15:2666–2679.
- Dunwell, J. M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 8:377–424.
- Eady, C., Lindsey, K., and Twell, D. 1995. The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. *Plant Cell Online.* 7:65–74.
- Eleftheriou, E. P., and Palevitz, B. A. 1992. The effect of cytochalasin D on preprophase band organization in root tip cells of *Allium*. *J. Cell Sci.* 103:989–998.
- Földesiné Füredi, P. K., Ambrus, H., and Barnabás, B. 2012. Development of cultured microspores of maize in the presence of *n*-butanol and 2-aminoethanol. *Acta Agron. Hung.* 60:183–189.

- Földesiné Füredi, P. K., Ambrus, H., and Barnabás, B. 2011. The effect of n-butanol and 2-amino-ethanol on the in vitro androgenesis of maize. *Acta Biol Szeged*. 55:77–78.
- Gardiner, J., Collings, D. A., Harper, J. D. I., and Marc, J. 2003. The Effects of the Phospholipase D-Antagonist 1-Butanol on Seedling Development and Microtubule Organisation in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 44:687–696.
- Genovesi, A. D., and Collins, G. B. 1982. In Vitro Production of Haploid Plants of Corn via Anther Culture. *Crop Sci*. 22:1137.
- Gervais, C., Newcomb, W., and Simmonds, D. H. 2000. Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*. 213:194–202.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N., and Hasezawa, S. 2010. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in Arabidopsis guard cells. *Plant J*. 61:156–165.
- Hirase, A., Hamada, T., Itoh, T. J., Shimmen, T., and Sonobe, S. 2006. n-Butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro. *Plant Cell Physiol*. 47:1004–1009.
- Holmsen, J. D., and Hess, F. D. 1985. Comparison of the Disruption of Mitosis and Cell Plate Formation in Oat Roots by DCPA, Colchicine and Prophan. *J. Exp. Bot*. 36:1504–1513.
- Islam, S. M. S., and Tuteja, N. 2012. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci*. 182:134–144.
- Kost, B., and Chua, N.-H. 2002. The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell*. 108:9–12.
- Lalonde, S., Beebe, D. U., and Saini, H. S. 1997. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sex. Plant Reprod*. 10:40–48.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., and Tang, X. 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J*. 345:401–415.
- Liu, B., Hotta, T., Ho, C.-M. K., and Lee, Y.-R. J. 2011. Microtubule Organization in the Phragmoplast. In *The Plant Cytoskeleton*, Advances in Plant Biology, ed. Bo Liu. Springer New York, p. 207–225. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-0987-9_9 [Accessed August 31, 2014].
- Liu, B., and Palevitz, B. A. 1992. Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 23:252–264.
- Lovy-Wheeler, A., Wilsen, K. L., Baskin, T. I., and Hepler, P. K. 2005. Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta*. 221:95–104.
- Malerba, M., Crosti, P., and Cerana, R. 2010. Effect of heat stress on actin cytoskeleton and endoplasmic reticulum of tobacco BY-2 cultured cells and its inhibition by Co2+. *Protoplasma*. 239:23–30.
- Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., and Szarejko, I., eds. 2003. *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Maraschin, S. F., Priester, W. de, Spaink, H. P., and Wang, M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 56:1711–1726.
- Motes, C. M., Pechter, P., Yoo, C. M., Wang, Y.-S., Chapman, K. D., and Blancaflor, E. B. 2005. Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acylethanolamine, on in vivo cytoskeletal organization and Arabidopsis seedling growth. *Protoplasma.* 226:109–123.
- Nishikawa, S., Zinkl, G. M., Swanson, R. J., Maruyama, D., and Preuss, D. 2005. Callose (β -1,3 glucan) is essential for Arabidopsis pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* 5:22.
- Obert, B., and Barnabás, B. 2004. Colchicine Induced Embryogenesis in Maize. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77:283–285.
- Petrášek, J., and Schwarzerová, K. 2009. Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:728–734.
- Rasmussen, C. G., Wright, A. J., and Müller, S. 2013. The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *Plant J.* 75:258–269.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., and Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127:519–534.
- Sheahan, M. B., Rose, R. J., and McCurdy, D. W. 2004. Organelle inheritance in plant cell division: the actin cytoskeleton is required for unbiased inheritance of chloroplasts, mitochondria and endoplasmic reticulum in dividing protoplasts. *Plant J.* 37:379–390.
- Siegrist, S. E., and Doe, C. Q. 2007. Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev.* 21:483–496.
- Simmonds, D. H., and Keller, W. A. 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta.* 208:383–391.
- Soriano, M., Cistué, L., and Castillo, A. M. 2008. Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 27:805–811.
- Soriano, M., Li, H., and Boutilier, K. 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.* 26:181–196.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26:31–43.
- Szakács, É., and Barnabás, B. 1995. The effect of colchicine treatment on microspore division and microspore-derived embryo differentiation in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica.* 83:209–213.
- Testillano, P. S., Ramírez, C., Domenech, J., Coronado, M.-J., Vergne, P., Matthys-Rochon, E., et al. 2002. Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 46:1035–1048.
- Tischner, T., Koszegi, B., and Veisz, O. 1997. Climatic programs used in the Martonvasar phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron. Hung.* 45:85–104.

- Wang, C., Zhang, L.-J., and Huang, R.-D. 2011. Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* 6:29–31.
- Zorinians, S., Tashpulatov, A. S., Heberle-Bors, E., and Touraev, A. 2005. The Role of Stress in the Induction of Haploid Microspore Embryogenesis. In *Haploids in Crop Improvement II*, Biotechnology in Agriculture and Forestry, eds. Dr C. E. Don Palmer, Dr Wilfred A. Keller, and Professor Dr Ken J. Kasha. Springer Berlin Heidelberg, p. 35–52. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-26889-8_3 [Accessed August 21, 2014].

A szerzők levelezési címe

Fábián Attila – Ambrus Helga – Jäger Katalin – Barnabás Beáta

MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet
Martonvásár
Brunszvik u. 2.
H-2462

Email: fabian.attila@agrar.mta.hu