SZENT ISTVÁN EGYETEM

A KUKORICA OXIDATÍV STRESSZTŰRŐ KÉPESSÉGÉNEK NÖVELÉSE MIKROSPÓRÁK *IN VITRO* SZELEKCIÓJÁVAL

Doktori értekezés

MARGLNÉ AMBRUS HELGA MÁRTA

Martonvásár

2013

Doktori iskola: *Növénytudományi Doktori Iskola*

Vezetője: Dr. Helyes Lajos, az MTA doktora
egyetemi tanár, intézetigazgató
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Kertészeti Intézet

Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

Témavezetők: Dr. Barnabás Beáta, az MTA rendes tagja
tudományos osztályvezető, kutatóprofesszor
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

Dr. Darkó Éva *Ph.D*
tudományos főmunkatárs
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

.....…… ……

Dr. Barnabás Beáta — Dr. Darkó Éva
témavezető — témavezető

……

Dr. Helyes Lajos
iskolavezető

„…a természetet úgy módolhatod csak, ha ő ad módot,
és ha műveled, ez a művészet a természet maga,
s természetes…”

(Shakespeare: A vihar)

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK ……4

Alkalmazott rövidítések jegyzéke:.....7

1. BEVEZETÉS……9

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9

2. 1. Mikrospóra indukció, DH növények előállítása 9

2.1.1. A DH növények előállításának és felhasználásnak jelenősége a növénynemesítésben.....9

2.1.2. Gabonafélék (különös tekintettel a kukoricára) mikrospóráinak fejlődése természetes és mesterséges körülmények között 14

2.1.3. Az *in vitro* androgenezis hatékonyságát befolyásoló tényezők.....18

2.1.3.1. A genotípus hatása az androgén válaszadó képességre 18

2.1.3.2. A portok donornövények fiziológiai állapotát meghatározó környezeti tényezők 19

2.1.3.3. A mikrospóra fejlettségi állapot hatása az androgenezis kiváltására.....23

1.2.3.4. A portokok előkezelésének szerepe az androgenezis kiváltásában.....20

1.2.3.5. Tenyésztési körülmények; indukciós és regenerációs táptalajok.....21

2.1.4. Kromoszóma diploidizáció (kromoszóma szerelvény megkettőződése) lehetőségei.....24

2.2. Növénynemesítés eszköztára az abiotikus stressztűrő-képesség fokozására.....28

2.2.1. Hagyomásnyos kukoricanemesítésben alkalmazott markertechnikák 28

2.2.2. Géntechnológiai módszerek alkalmazása.....29

2.2.3. *In vitro* szelekciós módszerek 30

2.2.4. A haploid sejtszintű *in vitro* szelekció genetikai alapja 31

2. 3. Oxidatív stressz-folyamatok a növényben 32

2.3.1. Reaktív oxigén formák (ROF) típusai.....33

2.3.2. Reaktív oxigén formák (ROF) keletkezése a növényi sejtekben.....33

2.3.3. Reaktív oxigén formák (ROF) károsító hatásai.....34

2.3.4. Reaktív oxigén formák (ROF) jelátviteli szerepe.....35

2.3.5. Védekező mechanizmusok.....35

2.3.6. Oxidativ stresszt indukáló vegyületek 37

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 41

3.1. Mikrospóra eredetű növények előállítása és az *in vitro* szelekció 41

3.1.1. Donor növények nevelése 41

3.1.2. Portok kultúra és növényregenerálás 42

3.1.3. *In vitro* szelekció ... 46
3.1.4. Citológiai és szövettani vizsgálatok ... 46

3.2. DH_1 utódnövények előállítása, növényfiziológiai és biokémiai tesztelése ... 47
3.2.1. DH_1 utódok felnevelése ... 47
3.2.2. A növények kezelése ... 48
3.2.3. A klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérése ... 48
3.2.4. A klorofill (a+b) tartalom meghatározása ... 48
3.2.5. Az ionkiáramlás mérése ... 49
3.2.6. Rezisztencia faktorok számítása ... 49
3.2.7. Antioxidáns enzimek aktivitásának mérése ... 50
3.2.8. Toxikus oxigén formák *in situ* kimutatása ... 51
3.3. Csírázáskori hidegtűrési vizsgálatok ... 52
3.4. Hidegtűrési faktor számítása ... 53
3.5. Szántóföldi tesztek ... 53
3.6. Statisztikai értékelés ... 53

4. EREDMÉNYEK ... 55

4.1 Mikrospóra eredetű növények előállítása és szelekciója oxidatív stresszt indukáló vegyületek felhasználásával ... 55
4.1.1. A szelekciós ágensek hatása a mikrospórák androgenetikus fejlődésére a modell (A18) genotípus esetében ... 55
4.1.2. A szelekciós ágensek hatása a növényregenerációra és a fertilitásra. Az *in vitro* szelekció eredménye a modell (A18) genotípus esetében ... 61
4.1.3. Az *in vitro* szelekció hatása a portok válaszra, az embrió indukciós és regenerációs %-ra a hibridekben ... 64

4.2. Pq tartalmú táptalajról szelektált utódnövényeinek (DH_1 generáció) fiziológiai és biokémiai vizsgálata ... 66
4.2.1. Klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérése ... 66
4.2.2. Klorofill (a+b) tartalom változása Pq kezelés hatására az A 18 eredetű DH_1 növényekben ... 69
4.2.3. Az ionkiáramlás mérése Pq kezelés hatására ... 69
4.2.4. Az eredményekből számított rezisztencia faktorok ... 72
4.2.5. Toxikus oxigén formák kimutatása *in situ* festési eljárásokkal ... 72
4.2.6. Az antioxidáns enzimek aktivitása ... 74
4.2.7. A szelektált DH_1 vonalak csírázáskori hidegtűrési vizsgálata ... 77
4.2.8. Az eredményekből számított hidegtűrési faktor ... 83
4.2.9. A szelekció eredményének összegzése ... 84
4.2.10. Szántóföldi tesztek eredményei ... 86
4.2.11. Új tudományos eredmények: ... 87

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 89

5.1. Szelekciós ágensek mikrospórák egyedfejlődésére és a növényregenerációra gyakorolt hatása 89

5.2. Az *in vitro* szelektált vonalak DH_1 utódgenerációjának fiziológiai és biokémiai vizsgálatai 91

6. ÖSSZEFOGLALÁS 93

7. SUMMARY 95

8. MELLÉKLET 97

8.1. Irodalom jegyzék 97

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 133

Alkalmazott rövidítések jegyzéke:

2,4-D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
AFLP	amplifikált DNS fragmentum hossz polimorfizmus
AMP	amiprophos-metil
APX	aszkorbát peroxidáz
BA	benzil adenin
Cat	kataláz
DAB	’3,3’-diaminobenzidin
DH	doubled haploid, kettős (di) haploid
F_v/F_m	II. fotokémiai rendszer (PS II) optimális kvantum hatásfoka
GR	glutation reduktáz
GsT	glutation-s-traszferáz
IAA	indol-3-ecetsav
MD	menadion
MES	mikrospóra eredetű struktúra
MR	methionin egységnyi riboflavinnal alkalmazva
MS	mikrospóra (az ábra magyarázatokban)
NAA	naftil ecetsav
NBT	nitrotetrazólium-kék
NES	1-naftil-ecetsav
Pq	paraquat
PSI	fotoszitnézis I-es fotokémiai rendszere
PSII	fotoszitnézis II-es fotokémiai rendszere
RAPD	véletlenszerű amplifikált polimorf DNS
RFLP	restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus
ROF	reaktív oxigén formák
SCAR	ismert szekvenciáról amplifikált régió
SNP	egyszeri nukleotid polimorfizmus
SOD	szuperoxid dizmutáz
t-BHP	terc-buthilhidroperoxid
TIBA	2,3,5-trijód-benzoesav
TILLING	Targeting Induced Local Lesions in Genomes

1. BEVEZETÉS

Napjaink szélsőséges időjárási viszonyai: a korai hirtelen felmelegedés, májusi kánikula, aszályos ill. túl nedves nyarak, a túl későn beköszöntő tavasz, elhúzódó felmelegedés; valamint az egyre növekvő nyersanyag árak mellett, a növénynemesítőknek arra kell törekedniük, hogy minél nagyobb ökológiai plaszticitással rendelkező, abiotikus (pl. hideg és szárazság, stb.) vagy biotikus eredetű (patogének) stresszekkel szemben ellenálló nemesítési alapanyagot ill. hibridet állítsanak elő rövid időn belül.

A korszerű növénynemesítési műhelyeknek számos módszer áll rendelkezésére ahhoz, hogy nemesítési anyagaikban optimalizálják a génösszetételt és működést. Ezt szolgálják a hagyományos (a fenotípusos vagy molekuláris marker alapú szelekció) és korszerű géntechnológiai biotechnológiai nemesítési módszerek. Mivel a konvencionális nemesítés hosszú időt vesz igénybe, ennek a problémának az orvoslása a korszerű biotechnológiai eljárásokban rejlik, amelyek hatékonyan elősegíthetik a hibridek általános adaptációs képességének javítását.

Genetikailag módosított növények előállítása alkalmas lehet a növények stressz-toleranciájának fokozására, ámde ezen szervezetek elismerése és elfogadása még most sem tisztázott az Európai Unióban. Igen erős vita van az EU-n belül arról, hogy a GM fajták vetőmagja milyen feltételekkel állítható elő, hozható forgalomba. A vita elsősorban a vetőmag-előállítás feltételein és a GM vetőmagvakban jelen lévő genetikai módosítás tűréshatárán van, melyre az EU még nem alkotott rendeletet. Továbbá világszerte egyre nagyobb a társadalmi elutasítás a genetikailag módosított állat vagy növény eredetű élelmiszerekkel szemben.

Egy másik lehetséges mód a növények stressz-toleranciájának növelésére, a szövettenyészetek *in vitro* szelekciója. Számos abiotikus és biotikus stressz oxidatív úton, reaktív oxigén formák vagy azok származékainak generálása révén fejti ki növénykárosító hatását. Vizsgálatok igazolták, hogy oxidatív stresszt indukáló vegyület felhasználásával szomatikus eredetű szövettenyészetekből szelektált növények toleránsabbnak mutatkoztak hideggel és egyes patogén fertőzésekkel szemben, mint a kontroll növények. Ez a módszer elsősorban a kétszikű növényeknél működik. Az egyszikű növényeknél nehézkes szomatikus sejtekből kiindulva fertilis növényt előállítani. A haploid indukción alapuló növényregenerációs rendszer előnye, hogy a nemesítési idő 6-8 évvel is lecsökkenthető, hiszen már az első doubled (di) haploid vagy kettős haploid (későbbiekben DH), nemzedékben homozigóta utódokat állíthatunk elő, ami igen fontos a kukorica nemesítés esetében. A Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Központ Mezőgazdasági Intézet Növényi Sejtbiológiai Osztályán az elmúlt évek során kidolgoztak egy rutinszerűen

alkalmazható portoktenyésztési rendszert, amely lehetőséget biztosít a haploid szövettenyészetek *in vitro* szelekciójára.

Mindezek tudatában célul tűztük ki egy olyan új *in vitro* szelekciós technika kidolgozását és tesztelését, amely lehetővé teszi mikrospóra eredetű haploid szövettenyészetekből kiindulva DH, fertilis, oxidatív károsodást előidéző stresszekkel szemben ellenálló kukorica genotípusok előállítását.

Ennek megvalósítsa érdekében a Ph.D. dolgozatomban bemutatásra kerülő kísérletek céljai az alábbiak voltak:

1. **Oxidatív stresszekkel szemben ellenálló homozigóta DH kukorica vonalak előállítása *in vitro* mikrospóra szelekcióval, melyet reaktív oxigén formákat generáló vegyületek: paraquat (Pq), menadion (MD), metionin+riboflavin (MR), és a terc-butilhidroperoxid (*t*-BHP) segítségével idézünk elő. Mindeközben az alkalmazott szelekciós ágensek mikrospórák egyedfejlődésére gyakorolt hatásának vizsgálata citológiai és szövettani módszerekkel.**

2. **Az *in vitro* szelekció során előállított növények DH_1 utódgenerációjának tesztelése annak érdekében, hogy megállapítsuk valóban nagyobb toleranciával, rendelkeznek-e oxidatív stresszel szemben, mint a kontroll növények továbbá, hogy igazoljuk, hogy ez a tulajdonság megnyilvánul-e az utódgenerációban, azaz öröklődik-e. Ennek igazolására a szelektált növények DH_1 utódgenerációjának egyes fiziológiai, biokémiai és agronómiai sajátosságainak vizsgálata.**

3. **Sikeres szelekciós módszer kidolgozása esetén az agronómiailag fontos tulajdonságokkal bíró F_1 hibridek szelekcióba vonása és azok tesztelése, valamint csírázáskori hidegtűrésének vizsgálata.**

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. Mikrospóra indukció, DH növények előállítása

2.1.1. A DH növények előállításának és felhasználásnak jelenősége a növénynemesítésben

A heterózis nemesítésben a hibridek előállításának legfontosabb alapanyagai a homozigóta vonalak, melyek létrehozása hagyományos nemesítési módszerekkel több évet vesz igénybe.
A haploid növények előállításának előnyét már a XX. század elején felismerték. Blakeslee és mtsai. már az 1920-as években felvetették a haploid növények nemesítési célú felhasználásának lehetőségét, melynek alapján Chase (1952) a gyakorlatban alkalmazta a természetes úton indukálódott anyai eredetű haploidokat. A haploidok azonosításához egy dominánsan öröklődő antocián marker gént használt, amely antociános pigmentációt okozott az embrión és az endospermiumon, így lehetővé tette a haploid és diploid szemtermések vizuális úton történő elkülönítését. Ha a szemtermés korona része pigmentált volt, de az embrió nem, ez arra engedett következtetni, hogy az embrió nem a kettős megtermékenyítés eredményeképpen jött létre. Ebben az esetben az endospremium triploid, az embrió pedig haploid volt. A módszer széles körben mégsem terjedt el, mivel az anyai eredetű haploidok indukciója kicsi (0,1 %) volt. Napjainkba újra előtérbe került, mert a multinacionális cégek próbálják kiaknázni a technika előnyeit és ezzel extra profitot termelni. A technika előnye abban rejlik, hogy a haploid szemek vizuális úton könnyen kiválaszthatók, nemesítési szempontból széles körben felhasználható, ugyanis a legtöbb donor genotípus szemtermései nem pigmentáltak, így a dominánsan öröklődő markergének jelenléte könnyen megfigyelhető. Olyan gének (*Pl1* gén) is segítik a válogatást, amelyek a csíranövények kolepotiljában, vagy az elsődleges gyökérben fejeződnek ki és antociános színnel jelzik jelenlétüket segítve ezzel a nem haploid növények kiválogatását (Geiger, 2006). Hátránya viszont, hogy léteznek olyan inhibitor gének (*C1-I* gén, Coe és Sarkar, 1964), amelyek csökkenthetik az *R1-nj* gén (amely egy dominánsan öröklődő antocián markergén) működését, ami a szelekció során megtévesztő lehet (Geiger, 2009). Továbbá, míg az *in vitro* androgenezis esetében igen gyakran felléphet a kromoszómakészlet spontán megkettőződése, addig a partenogenezissel létrejött haploidoknak azt mesterséges úton kell megvalósítani, ami többletmunkát igényel és költséges.

A kromoszóma duplikációt mesterséges úton, kolhicin kezeléssel indukálják úgy, hogy a szemeket (Gayen et al., 1994; Eder és Chalyk, 2002), vagy a csíranövényeket (Zabirova et al., 1996*)* kezelik.

A monoploid azaz az anyai eredetű haploid módszer eddig publikált leghatékonyabb módszere az RWS indukáló vonallal végzett keresztezési kísérletből származott. Ennek átlagos haploidindukciós gyakorisága 8,3% volt (Röber et al., 2005), ami közel azonos az androgenetikus

haploid előállítás során elért növényregenerációs szinttel. Azonban e technika szabadalmi védettséget élvez, így csak kevesek számára hozzáférhető.

A nemesítés számára új lehetőségeket jelenthet a mikrospóra eredetű androgenetikus haploid, illetve kolhicin kezeléssel vagy spontán módon rediploidizált DH növények előállítása. A DH előállítási technikák alkalmazása lehetővé teszi a különböző génkombinációk homozigóta formában történő gyors rögzítését, mellyel jelentős idő- és munkaerő ráfordítás takarítható meg a nemesítési alapanyagok előállítása során. A nagy fertilitású és előnyös agronómiai tulajdonságokkal rendelkező DH vonalak közvetlenül felhasználhatók a heterózis nemesítésben, a speciális piaci igényeket kielégítő, jó általános adaptációs képességgel rendelkező hibridek előállítására (Heszky, 2003). Kukorica portokok tenyésztésével az 1970-es években, Kínában kezdtek el intenzíven foglalkozni (Anonymus Research Group 401, 1975; Miao et al., 1978; Ku et al., 1981; Ting et al., 1981). Néhány éven belül nagyszámú homozigóta vonalat sőt, az első kereskedelmi értékű hibrideket is Kínában (Kuo et al., 1985), majd az USA-ban (Bollon és Raquin, 1987) állították elő. Közel egy időben, Európában és Amerikában is intenzív kutatások folytak és ezek fókuszába került a kukorica portoktenyésztés (Nitsch, 1982; Genovesi és Collins, 1982; Pauk, 1985; Dieu és Beckert, 1986), de a hatékony tenyésztési módszer kidolgozásában lényeges akadályt jelentett az igen erős genotípus függőség. Jelenlegi ismereteink alapján, csak bizonyos genotípusok mikrospórái indukálódnak illetve képesek növényregenerációra (kallusz, valamint embrió fejlesztésével) (Pescitelli et al., 1994). A szakirodalomban szereplő portokválaszt adó genotípusok: Hsiao-pa-tang x Shui-pai (Miao et al., 1978), Batangbai (Ba-Tong-pai) (Cao és Leng, 1983), CH-13 (Nitsch et al., 1982), Sarhad Yellow (Pauk, 1985), lévén mind kínai eredetűek, nem tartoztak a nemesítési szempontból Európában jelentős genetikai anyagokhoz (Brettel et al., 1981; Genovesi és Collins, 1982; Pauk, 1985; Dieu és Beckert, 1986).

Az utóbbiakkal végzett kísérletekben csak nagyon kevés életképes, csírázóképes szemtermést sikerült előállítani. Genovesi és Collins (1982) eredményei szerint egy statisztikailag igazolt kísérletben a legjobb genotípus x táptalaj x hidegkezelés kombináció 18,3% portok indukciót illetve 19,2% növény regenerációt adott százezer leoltott portok esetében, ami végül két életképes öntermékenyített szemet eredményezett. Nitsch és mtsai. (1982) megfogalmazták azt a tényt, hogy ahhoz, hogy a portokkultúrából származó vonalak a gyakorlati nemesítés számára felhasználhatók legyenek, szükséges azok magas androgenetikus kapacitása, valamint elfogadható nemesítési értéke. Ebből kiindulva Petolio és Thomson (1987) négy kereskedelmi vonal diallél keresztezése alapján kereste a választ, hogy javítható-e a portokok válaszadó képessége. Azt tapasztalták, hogy a jó válaszadó képesség átörökítése a kis és nagy válaszadó képességű vonalak keresztezését követő szelekcióval oldható meg.

Cowen és mtsai. (1992) rekalcitráns vonalak androgén válaszadó képességének javítására irányuló kísérleteikben megpróbálták optimalizálni a tenyésztési körülményeket (táptalaj összetétel, donornövény felnevelése, és tenyésztési körülményeinek optimalizálása) de ez sem vezetett eredményre. A szakirodalomban fellelhető korábbi több éves tapasztalatok alapján Murigneux és mtsai. (1994) arra a következtetésre jutottak, hogy a kukorica androgenitása nagymértékben öröklődő tulajdonság, így az keresztezési módszerekkel átvihető kereskedelmi hibridekbe (Dieu és Beckert, 1986). Ezen szakirodalmi adatok alapján a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetének Növényi Sejtbiológiai Osztályán elkezdtek foglalkozni olyan DH vonalak előállításával, amelyek alkalmasak az *in vitro* haploid indukciós képesség kialakítására az utódokban, valamint az így létrehozott vonalak agronómiai tulajdonságait és kombinálódó képességeit is vizsgálták (Kovács et al., 1992; Orosz és Barnabás, 1997 a,b; Barnabás et al., 1998; Barnabás és Szundy, 1998; Obert et al., 1998; Barnabás et al., 1999; Kovács et al., 1999; Barnabás, 2003; Barnabás et al., 2003; Barnabás, 2005).

A fenti irodalmak a portok kultúrás kísérletek eredményeiről számoltak be, azonban intenzív kutatásokat kezdtek az izolált mikrospóra eredetű DH növények előállítása érdekében, nemcsak a kukorica, hanem más fajok esetében is. A módszer előnye, hogy a mikrospórákat izoláljuk, így azok szomatikus sejtek és szövetek nélkül indukálódnak, ezáltal nem kell más sejtek és szövetek indukciójával számolni (Oleszczuk et al., 2004), valamint az embriógenezis folyamata sokkal könnyebben tanulmányozható (Indrianto et al., 2001). Az izolált mikrospóra tenyészeteken végzett sejtszintű megfigyelések hozzájárulhatnak a tenyésztési körülmények további fejlesztéséhez (Kim et al., 2008), továbbá lehetőséget adnak pollen transzformációs vizsgálatok végzésére, mivel célszerű objektumai lehetnek a genetikai transzformációnak, valamint lehetővé teszik az androgenezis szabályozó gének pontosabb vizsgálatát (Touraev et al., 2001; Jähne et al., 1994; Bolik és Koop, 1991). A technika hátránya azonban, hogy a portokból izolálni kell a mikrospórákat *in vitro* körülmények között, amelyek utána sokkal érzékenyebben reagálnak a környezeti hatásokra (táptalaj, hőmérséklet, fertőzések) ezáltal nehezebben és kisebb hatékonysággal lehet tenyészteni, mint a portokban lévő mikrospórákat és sok esetben további dajkasejt kultúrára van szükség, ami rendkívül megnehezíti a tenyésztést. Mindezen nehézségek ellenére (bár a portok kultúrás kísérletekhez képest lényegesen alacsonyabb indukciót elérve) azonban több laboratóriumban sikeresen állítottak elő izolált mikrospóra tenyészetekből fertilis DH kukorica növényeket (Coumas et al., 1989; Gaillard et al., 1991; Genovesi és Yingling, 1994; Pesticelli et al., 1994; Szarka et al., 1999; 2001; Szarka, 2002; Obert et al., 2005).

A mikrospórák embriogén fejlődése révén mára már a mezőgazdasági szempontból legfontosabb fajok többségéből sikerült haploid ill. DH növényeket előállítani. A DH technikát 259 növényfaj esetén alkalmazták sikeresen, 229 faj esetén portok és mikrospóra kultúrát, 30 faj esetén távoli

keresztezést használva (Maluszynski et al., 2003a). Jelenlegi ismereteink alapján 207 DH eredetű fajta van köztermesztésben. Ezek közül 95 árpa-, 47 repce-, 21 búza-, 8 spárga-, 8 paprika-, 7 rizs-, 6 dohány-, 5 tojásgyümölcs-, 4 triticale-, 3 sárgadinnye- és 2 szareptai mustár fajta (Thomas et al., 2003).

A legjelentősebb hazai eredményeket a dohány (Heszky, 1974), a rizs (Heszky és Pauk, 1976), a búza (Bedő et al., 1988; Pauk et al., 1988), a kukorica (Mórocz, 1991; Szarka et al., 1999), az árpa (Monostori és Pauk, 1995), a paprika (Mitykó et al., 1995), a szőlő (Mozsár és Viczián, 1996) és a tritikálé (Karsai és Bedő, 1997; Monostori et al., 1998) esetében érték el.

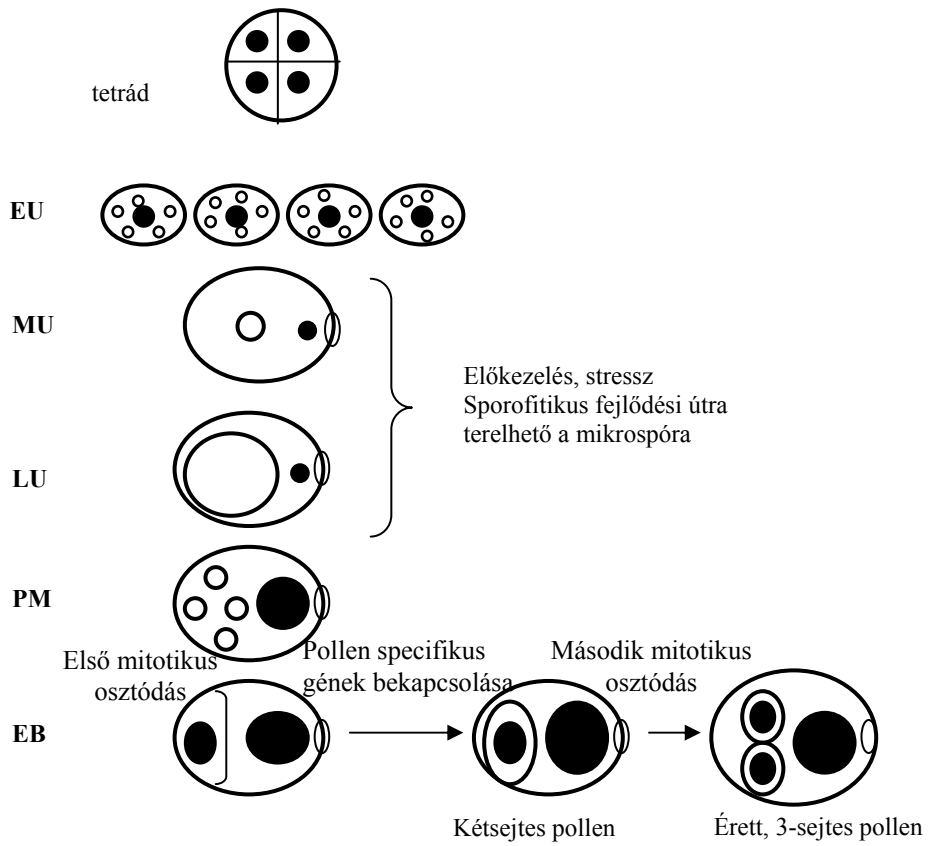
Az első androgenetikus DH eredetű fajta a Heszky László és Simonné Kiss Ibolya által előállított Dama rizsfajta volt, mely 1992-ben kapott állami minősítést (Heszky et al., 1991; 1996).

A szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht.-ben nemesített GK Délibáb 1992-ben Európában a második, a világon a negyedik minősített DH eredetű búzafajta volt (Pauk et al., 1995). A GK Szindbád, GK Ambitus és a GK Tündér fajtákat Szegeden (Pauk et al., 1995; Lőkös-Tóth et al., 1997), míg az MTA ATK Mezőgazdasági Intézetében, Martonvásáron az Mv Szigma és az Mv Madrigál fajtákat állították elő (Bedő et al., 1996). Valamint a szegedi intézetben 3 DH eredetű fűszerpaprika F1 hibridet: Sláger F1, Boleró F1 és Délibáb F1, is előállítottak (Lantos et al., 2011).

2.1.2. Gabonafélék (különös tekintettel a kukoricára) mikrospóráinak fejlődése természetes és mesterséges körülmények között

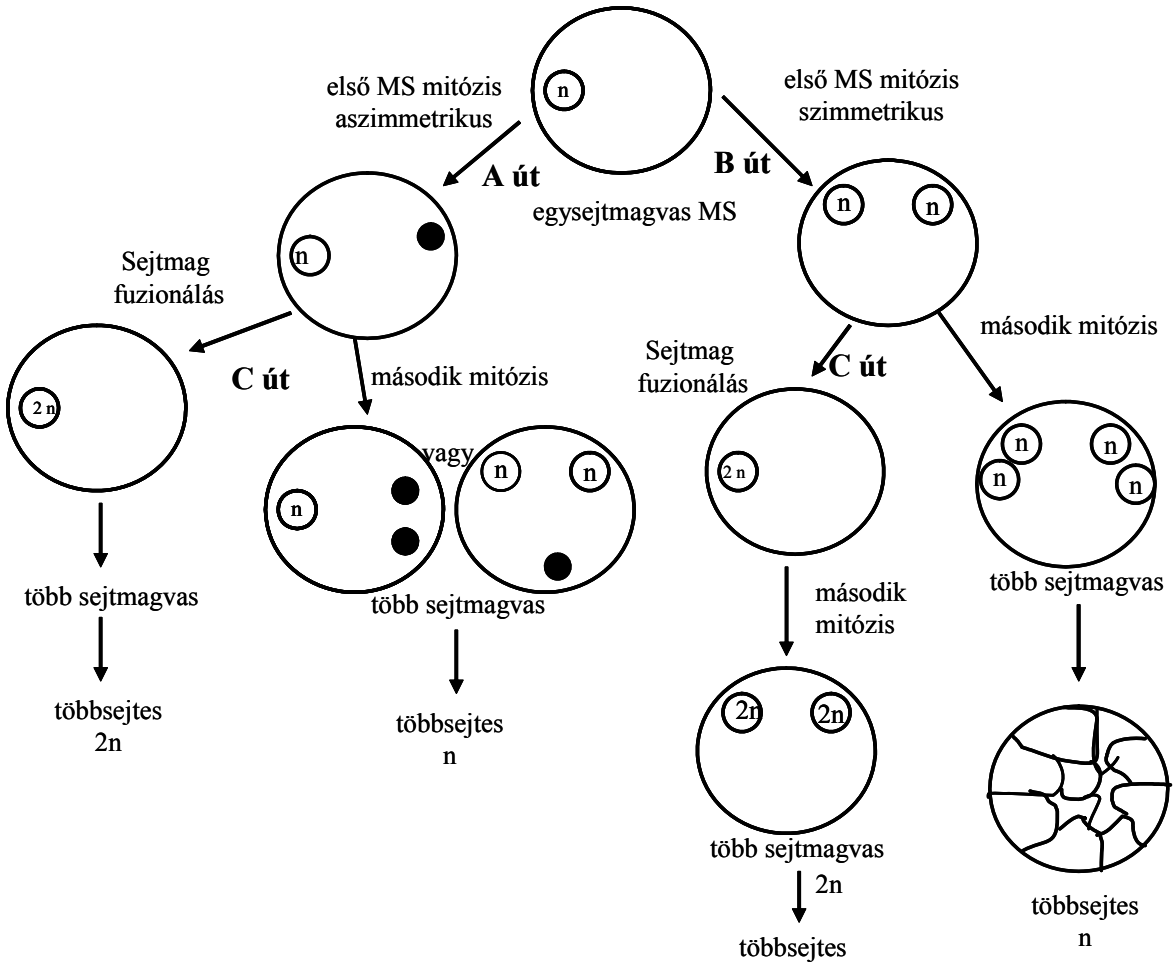
A magasabb rendű növények törzsfejlődése során redukálódott hím ivaros nemzedéket a portokban differenciálódott pollenszem képviseli, melynek feladata a hím ivarsejtek létrehozása és általuk az apai genetikai információ átadása a megtermékenyítés során. A pollen fejlődése a portok 4 lokulamentumában történik. A pollenzsákok belsejét kitöltő acrheosporium szövetből kialakuló mikrospóra anyasejtek meiotikus osztódásával létrejött tetrádokból kiszabaduló haploid sejtek a mikrospórák (Shivanna és Johri, 1985). A függetlenné vált mikrospórák érési folyamaton mennek keresztül (1. ábra). A tetrádból kiszabaduló mikrospórák nagy központi sejtmaggal rendelkeznek (1. ábra), amely kiteszi a sejt egyharmadát ez az ún. korai egysejtmagvas (early-uninucleate vagy EU) állapot. Erre az állapotra jellemző, hogy a citoplazma organellumban igen gazdag, és számos apró vakuolumot tartalmaz. A továbbiakban a mikrospóra mérete jelentősen megnő, míg a sejtmag anyaga kondenzálódik és a pólus közelében helyezkedik el, ez az ún. középső egysejtmagvas (mid-uninucleate MU) fejlődési állapot (1. ábra MU). Ezt követően a vakuólum intenzív növekedés következtében a sejtmag a pólussal ellentétes oldalra tolódik és a mikrospóra belsejét egy nagy központi vakuólum tölti ki, melyet egy vékony citoplazma réteg vesz körül, ez az ún. kései egysejtmagvas (late-uninucleate LU) állapot (1. ábra LU). A továbbiakban a sejtmag megnő, a citoplazmában tartaléktápanyagok (keményítőt tartalmazó amiloplasztiszok, fehérje és lipidtestek)

halmozódnak fel a vakuólumban oldott anyagokból és a mikrospóra felkészül az első mikrospóra mitózisra ez az ún. pre-mitotikus (pre-mitotic, PM) állapot (1. ábra PM). Az első mikrospóra mitózis egy különleges osztódás, melynek eredménye két morfológiailag és funkcionálisan is különböző sejt, a vegetatív és a generatív sejt (EB early binucleate). A vegetatív sejt magja nagyobb és a benne lévő DNS kevésbé kondenzált állapotú, mint a generatív setjté. Ebben a fejlődési fázisban csak a sejtmembrán választja el a két sejtet egymástól (1. ábra EB), majd később a generatív sejt egy kallóz sejtfalat szintetizál, ami az intinéhez kapcsolódik (1. ábra, kétsejtes pollen). Az első mikrospóra mitózis bekapcsolja az ún. pollen specifikus géneket, amellyel kezdetét veszi a kétsejtes pollen állapot (Hanson et al., 1989; Mascarenhas, 1990). A gabonafélék esetében hamarosan bekövetkezik a második mitotikus (1. ábra) osztódás, melynek során a generatív sejtből kialakul a két hím gaméta. Ez az ún. háromsejtes (1. ábra, érett pollen) állapot jelenti a pollen érési állapotának befejezését, a gabonafélék esetében ebben az állapotban szóródik ki az érett pollen a portokból. A kukoricánál ezt a folyamatot részleteiben Pescitelli és Petolino (1988) vizsgálta.



1. ábra: MS-ák gametofitikus fejlődési útjának sematikus ábrája. Tetrád állapotból kiszabaduló MS-ák, EU korai egysejtmagvas MS-ák, MU középső egysejtmagvas MS, LU késői egysejtmagvas MS (ami ha nem természetes körülmények között fejlődik, illetve ha stressz éri akkor a fejlődése a sporofitikus útra terelhető), PM pre-mitotikus állapot (az első mikrospóra mitózis megelőző állapot), EB korai kétsejtes pollen, (pollenspecifikus gének bekapcsolása) kétsejtes pollen, érett 3 sejtes pollen.

Általános tapasztalatok szerint, ha a mikrospórákat a fejlődésük korai szakaszában stressz éri, akkor azok *in vitro* körülmények között a sporofitikus fejlődési útra térhetnek át (Szakács és Barnabás, 1988; Touraev et al., 1997). Az *in vitro* androgenezis folyamatát több kutató tanulmányozta (Sunderland és Wicks, 1971; Sunderland és Dunwell, 1974; Sunderland és Dunwell, 1977; Raghavan 1978). A részletes citológiai vizsgálatok feltárták a tenyésztett mikrospórákban lejátszódó osztódási folyamatok sajátosságait. A mikrospóra fejlődésének lehetséges osztódási útjait a 2. ábrán mutatom be.



2. ábra: MS sporofitikus fejlődése, Shim és mtsai. (2006) alapján. A kiinduló egysejtmagvas MS-ból az első MS mitózis után a fejlődés többféle úton történhet. A út: aszimmetrikus vagy egyenlőtlen osztódás, B út: szimmetrikus vagy egyenlő osztódás, C út: A vagy B úton történő osztódást követően az utódsejtek fuzionálása. Vegetatív sejtet attól függően, hogy haploid vagy diploid n ill. 2n áttetsző körben jelöltem a generatív sejtet pedig sötét pöttyel jelöltem.

A sporofitikus fejlődési útra terelt mikrospórákban intenzív mag- és sejtosztódás indul meg (Sunderland és Evans, 1980; Hu és Kasha, 1999; Hause és Hause, 1996; Barnabás et al., 2001; Indrianto és mtsai, 2001). Az előkezelést követően néhány napon belül a kései egysejtmagvas mikrospórák osztódnak (Barnabás et al., 1987; Sunderland és Evans, 1980; Barnabás et al., 1999), ami a következőképpen alakulhat. Az osztódási utaknak két alaptípusát különböztetjük meg annak megfelelően, hogy az egymagvas mikrospóra egyenlő vagy egyenlőtlen úton osztódik (2. ábra). Az

aszimmetrikus (egyenlőtlen) sejtmagosztódás (A út, 2. ábra) vegetatív és generatív sejt magot eredményez, de a továbbiakban csak a vegetatív sejtmag osztódik tovább és az így kialakuló soksejtmagvas pollenszem kizárólag a vegetatív sejtmag utódokat tartalmaz. A folyamat során az osztódásokat nem minden esetben követi azonnal a sejtfalak kialakulása, így soksejtmagvas illetve soksejtes pollenszemeket egyaránt megkülönböztethetünk. Előfordulhat az is, hogy az aszimmetrikus osztódást követően a generatív sejtmag/sejt azonnal vagy néhány osztódás után degenerálódik. A tenyésztett mikrospóra sejtmagjának szimmetrikus osztódásakor (B út, 2. ábra) azonos értékű utódsejtek keletkeznek. A C út során (2. ábra) az első aszimmetrikus vagy szimmetrikus (A vagy B út) sejtmagosztódást követően az utód sejtmagvak fuzionálnak és az így létrejött diploid sejtmag, osztódik tovább. Raghavan (1978) egy nagyon ritkán előforduló D utat is leírt, melyben a mikrospóra első sejtmag osztódása egyenlőtlen, de ezt követően a generatív sejtmag osztódik tovább és a vegetatív sejtmag eliminálódik, így a soksejtesmagvas vagy soksejtes pollenszem a generatív utódsejtekből épül fel. A gabonafélék esetében mindhárom (A, B, C) osztódási út előfordul, és ezeken az utakon 2-8 nap alatt fejlődnek ki a soksejtes pollenszemek, majd további 3-6 nap kell ahhoz, hogy a mikrospóra külső fala az exine felhasadjon. Az exine felhasadása után a mikrospóra fő tömegét adó nagyobb méretű sejtekből szabályos embriók, embriószerű struktúrák illetve a kukoricára leginkább jellemző kalluszok fejlődnek. A tenyésztés 4-5 hetétől kezdve (kukorica esetében a tenyésztés 8-10 hetében) az embriók kicsíráznak, vagy a kalluszok organogenezisével haploid vagy DH növények fejlődnek (Indrianto et al., 2001, Maraschin et al., 2005b; Bakos, 2007).

Saját megfigyeléseink szerint genotípustól függően az A vagy a B osztódási út a jellemző (Szakács és Barnabás, 1988). A szerzők összefüggést véltek felfedezni a mikrospóra osztódási szimmetriája és a folyamat eredményeképpen létrejött struktúra (embrió vagy kallusz) között a vizsgált búza genotípusok esetében ahol, döntően szimmetrikusan osztódott a mikrospóra, a folyamat végén az embriók megjelenése dominált, az aszimmetrikus osztódások eredményeképpen pedig a kallusz fejlődés volt jellemző. A kukorica *in vitro* androgenezise során a mikrospórák első osztódási típusa nagyrészt aszimmetrikus és az androgenetikus fejlődési útra lépett struktúrákból zömmel kallusz fejlődik ki (Barnabás et al., 1987; Barnabás et al., 1999; Barnabás, 2003). A tenyésztett kukorica mikrospórák aszimmetrikus osztódását még a citoszkeleton alkotóelemeire ható vegyületek pl. kolhicin, *n*-butanol, 2-aminoetanol sem képesek szignifikánsan megváltoztatni (Barnabás et al., 1999; Kovács et al., 1999; Földesiné Füredi et al., 2012).

A kukorica embrió eredetű kalluszvonalak regenerációs képességét vizsgálva Armstrong és Green (1985) I, II, és NE (nem embriogén) kallusz típust különböztetett meg. A fehér kompakt I típust a magas regenerációs képességű halványsárga törékeny II típust megelőző formaként írja le. A II típus kalluszosító táptalajról regenerációs táptalajra oltva nagy számú regeneránst eredményezett.

Jäger és mtsai. (2005a,b) a kukorica korai indukciós fázisában kialakult mikrospóra eredetű struktúrák morfológiai bélyegeinek és regenerációs képességének összefüggését vizsgálták. A struktúrákat 4 típusba sorolták: fehér kompakt, fehér áttetsző, sárga kompakt és sárga áttetsző. Meghatározták azok regenerációs gyakoriságát, a belőlük regenerálódott növények ploidszintjét és számát. Míg a tenyészetekben a fehér áttetsző struktúra fejlődött a legnagyobb gyakorisággal (azonban a legkisebb regenerációs gyakorisággal bírt), a legnagyobb regenerációs gyakorisága a fehér kompakt típusú struktúrának volt, ami túlnyomórészt dihaploid volt.
Azonban az *in vitro* androgenezis hatékonyságát számos tényező befolyásolja (Keller és Armstrong, 1978). Ezek közül az egyik legfontosabb a genotípus.

2.1.3. Az *in vitro* androgenezis hatékonyságát befolyásoló tényezők

2.1.3.1. A genotípus hatása az androgén válaszadó képességre

A kukorica esetében az *in vitro* embriogenezis és a növényregenerációs képesség genetikai háttere mind a mai napig kevéssé ismert. A molekuláris térképezési és a QTL analízisből származó eredmények arra engednek következtetni, hogy a haploid indukciós képesség genetikai szabályozásában egy vagy néhány gén játszhat szerepet (Cowen et al., 1992; Muringneux et al., 1994; Beaumont et al., 1995; Röber et al., 2005).

A portok válasz genetikai hátterének tisztázására Cowen és mtsai (1992) 98 S_1 193/39 x B73 kukorica vonalak keresztezéséből származó családot vizsgáltak meg RFLP markerekkel. Eredményeik alapján a gyakori portokválasz két fő recesszív, episztatikus (a 3. kromoszóma hosszú karjának végén, illetve a 9. kromoszóma centromeronja körül elhelyezkedő), és két további kisebb jelentőségű gén hatására vezethető vissza. A vizsgált genotípus körben mért portok reakciót 57 %-ban ez a négy gén határozta meg, melyek közül három kölcsönhatásban volt és homozigóta állapotban mutatta a legnagyobb hatást. Barret és mtsai. (2004) c-DNS-AFLP módszerrel négy gént határoztak meg, amelyek nagy androgén kapacitás hátterében állhatnak. Mindezek a kutatások azt mutatják, hogy ezen a területen még további vizsgálatok szükségesek.

A genotípus függőség a *Poaceae* családba tartozó fajok (különösen a kukorica) portokkultúráinak sikerességét leginkább befolyásoló tényező (Genovesi és Yingling, 1994; Raghavan, 1997). A nemesítési gyakorlat számára hasznosítható eredményeket eddig szinte kizárólag kínai genetikai anyagokat tartalmazó genotípusok portokkultúráival értek el.

Számos kísérlet fókuszában álltak az összehasonlító genotípus vizsgálatok. Ting és mtsai. (1981) összehasonlító portok tenyésztési kísérletben a Dan-San 91, a King Hwang 13 hibridet valamint a Stock 6 vonalat használták. A három genotípus közül a Da-San 91 hibrid tűnt ki kimagasló haploid indukciós kapacitásával. Brettel és mtsai. (1981) 13 különböző (kínai, magyar és egyéb nemzetközi) genotípus portokjainak válaszadó képességét hasonlították össze. A vizsgált 13

genotípusból 4 adott portokválaszt, növényt regenerálni azonban csak a Seneca 60 genotípusból sikerült. Genovesi és Collins (1982) kísérleteikben azt tapasztalták, hogy a vizsgálatban szereplő nem kínai eredetű genotípusok igen alacsony indukciós képességgel rendelkeztek (A 188, W22, Alexho, Black Mexican Sweet, B73*Mo 17), egymás közötti keresztezéssel ez a képesség csekély mértékben javítható volt.

Barloy és mtsai. (1989) 8 francia, kínai és amerikai eredetű spontán DH kukorica vonal (előállításukhoz nem használtak antimitotikus szereket) összehasonlítását végezték el, annak érdekében, hogy megállapítsák azok portoktenyésztésre való alkalmasságát. Kísérleteikben a portok eredetű embriogén tenyészetek aránya 0 és 31% között volt.

Az androgén válaszadó képesség keresztezéssel átvihető a rekalcitráns vonalakba (Petolino és Thomson 1987; Petolino et al., 1988; Barnabás et al., 1999).

Spitkó és mtsai. (2006) több genotípus keresztezését és reciprok keresztezését vizsgálták, megfigyelték a portok választ, a növényregenerációt és a fertilis növények számának alakulását. Valamint egyes esetekben kimutatták a reciprok keresztezések pozitív hatásait, de szignifikáns különbséget nem tudtak igazolni.

Brisibe és mtsai. (2000) búza esetében nem találtak összefüggést a mikrospórákból kialakult kalluszok morfotípusai és a mikrospórák eredete azaz a genotípus között.

Az adott genotípus portokjainak válaszadó képességét pozitív, ill. negatív irányban befolyásolhatja a donornövények fiziológiai állapota (Nitsch et al., 1982; Wassom et al., 2001).

2.1.3.2. A portok donornövények fiziológiai állapotát meghatározó környezeti tényezők

Általános tapasztalat szerint a portokdonor növények felnevelési körülményei (szabadföld, üvegház, fitotron) is hatással vannak a bennük fejlődő mikrospórák androgenetikus válaszadó képességére. A környezeti tényezők közül a fény spektrális intenzitása és összetétele, a megvilágítás hossza, a növénynevelési hőmérséklet, valamint a növények tápanyag és víz ellátottsága nagy mértétben befolyásolja a donornövények fitnessét (Barnabás et al., 1987; Genovesi, 1990).

Az üvegházban, vagy fitotronban felnevelt növények mikrospórái általában kevésbé indukálhatók, mint a szántóföldön nevelt növényekről származó mikrospórák (Lazar et al., 1984; Dieu és Beckert, 1986). A növénynevelési körülményeken kívül az évjárat és a vetésidő hatása is számottevő hatást gyakorol. Genovesi (1990) a hőmérséklet napi ingadozásának tulajdonította az eltérő vetésidőben mutatkozó különbségeket, amelyek az izolált portok minőségére gyakoroltak negatív hatást.

Spitkó és mtsai. (2010) négy év átlagában vizsgálták a 4-4 vetésidőben elvetett kukorica portok indukcióját, és azt tapasztalták, hogy nemcsak a vetésidő de az évjáratok is jelentős mértékben hatnak a portokválaszra. Kísérleteikben azt tapasztalták, hogy magyarországi viszonyok között a vetést május 10-ig be kell fejezni, mert az utána vetett genotípusok portok válaszadó képessége jelentős mértékben romlott.

A lehetőleg optimális fiziológiai állapotú növényben fejlődő mikrospórák fejlettségi állapota is lényegesen befolyásolja a portok indukcióját.

2.1.3.3. A mikrospóra fejlettségi állapot hatása az androgenezis kiváltására

Ahogy azt már az előzőekben ismertettem, a portoktenyésztés hatékonysága szempontjából kritikus tényező, hogy a portokokban lévő mikrospórák túlnyomó része milyen fejlettségi állapotban van, az androgenetikus fejlődési útra való átkapcsolás szempontjából. A témával foglalkozó szerzők (Wenzel és Foroughi-Wehr, 1984; Petolino és Jones, 1986; Wheatly et al., 1986; Barnabás et al., 1987; Coumans et al., 1989; Gaillard et al., 1991; Mitchell és Petolino, 1991; Mejza et al., 1993; Hansen és Andersen, 1998a,b; Hu és Kasha, 1999; Pena-Valdivia és Rodrigez-Gracia, 1999; Indrianto et al., 1999, 2001; Zheng et al., 2001, 2002; Liu et al., 2002; Szarka, 2002; Jäger, 2005; Letarte et al., 2006; Bakos, 2007; Lantos, 2009; Spitkó, 2010) véleménye abban megegyezik, hogy a vizsgált gabonaféléknél a koraitól a kései egysejtmagvas mikrospóra fejlődési állapotnál fiatalabb és idősebb mikrospórák nem alkalmasak az androgenezis indukciójára.

Tapasztalt kutatók könnyen párhuzamot tudnak vonni a kalász illetve a címer morfológiai jegyei és a portokokban lévő mikrospórák fejlettségi állapota között (Chang és Neuffer 1989).

A mikrospórák genetikai programjának sporofitikus fejlődési útra történő átkapcsolását kiváltó legfőbb tényezőnek a stresszt tekintik (Szakács és Barnabás, 1988; Touraev et al., 1997). A stresszhatások egy – még csak részben feltárt – szignál transzdukciós folyamatot indítanak el, mely lehetővé teszi a sporofitikus fejlődési irányt (Touraev et al., 1997, 2001; Maraschin et al., 2005a).

1.2.3.4. A portokok előkezelésének szerepe az androgenezis kiváltásában

A fiatal virágzatok, portokok előkezeléseként a szakirodalmi adatok alapján leggyakrabban hideg és magas hőmérsékleti kezelést ill. ozmotikus sokkot alkalmaznak. A hőmérséklet stressz egyrészt a mikrospóra citoszkeleton szerkezetében idéz elő változásokat, elősegítve ezáltal a későbbi szimmetrikus sejtmagosztódást ezen kívül az alacsony és a magas hőmérséklet egyaránt megváltoztatja a génexpressziós viszonyokat elősegítve az előzetesen determinált genetikai program átkapcsolását (Smỳkal, 2000; Shariatpanahi et al., 2006). Maga az *in vitro* környezet is stressztényezőnek tekinthető erre utal az a saját tapasztalat, hogy bizonyos búza genotípusok esetében a kalászok előzetes hidegkezelése nélkül is magas haploid indukciót lehet elérni. A kukorica *in vitro* androgenezisének indukciójához szükség van a fiatal címerek hidegkezelésére. Általában a 7-14 napig tartó 7-8 °C-on történő hidegkezelés bizonyult hatékonynak (Petolino és Jones, 1986; Coumans et al., 1989; Pescitelli et al., 1990, Barnabás, 2003). Pauk (1985) kedvező hatást ért el az éretlen kukorica portokok folyékony N_6 táptalajon 8° C –on sötétben történő 14 napos előkezelésével.

Vergne és mtsai. (1993) megfigyelték, hogy a DH5 x DH7 kukorica hibrid 7 napig 7 C°-on hidegkezelt címerében lévő portokokban egy 32 kDa fehérje (MAR32) halmozódott fel, melynek mennyisége korrelációt mutatott mikrospóra indukció mértékével. Azonban korábbi munkájukból (Vergne et al., 1990) kiderült, hogy ez a fehjérje nincs meg a DH7 genotípusban, de a DH5-tel alkotott hibridben megnyilvánul, így a portokválaszban heterózis hatást figyeltek meg.

Az *in vitro* androgenezis szempontjából igen fontos tényező az indukciós és növényregenerációs táptalajok összetétele, illetve az egyéb tenyésztési körülmények.

1.2.3.5. Tenyésztési körülmények; indukciós és regenerációs táptalajok

Az *in vitro* androgenezis folyamata két fő szakaszra tagolható:

- a **mikrospóra indukcióra** melynek során az eredeti genetikai programjuktól eltérített mikrospórákból sorozatos osztódásokon révén embriók vagy kalluszok fejlődnek, és a
- **növénydifferenciálódásra**, melynek eredménye képpen a kalluszokból illetve embriókból haploid/DH növények regenerálhatók.

Általánosan elmondható, hogy a két folyamathoz alkalmazott táptalajok (indukciós és regenerációs) összetétele eltér egymástól.

Indukciós táptalajok, indukciós fázis:

A mikrospóra indukcióhoz a gabonafélék esetében használt táptalajok, lehetnek szilárd ill. folyékony halmazállapotúak, melynek legfőbb összetevői a makro és mikro elemek, a szerves nitrogén valamint szénforrások, a vitaminok, a hormonok és egyéb természetes kiegészítők.

A táptalaj ozmotikus potenciálja egy nagyon fontos faktor a mikrospórák androgenetikus fejlődésében. Az egyszikű növények általában magasabb ozmotikus koncentrációt igényelnek az indukcióhoz, mint a kétszikű növények.

Az indukciós táptalajok fontos alkotóelemei a szénforrás és egyben ozmoregulátor szerepet betöltő cukrok (Sopory, 1979). Portoktenyészetek esetében a szacharóz mellett mono- és egyéb oligoszacharidokat is alkalmaznak. A szén forrásként illetve ozmotikumként szolgáló cukrok típusa is eltérő lehet a különböző gabonafajok esetében. Búza és az árpa esetében a maltózt és a glükózt találták hatékonyabbnak az embriogenezis indukálásához, illetve a növényregeneráláshoz (Hunter 1988; Finnie et al., 1989; Chu et al., 1990; Orshinsky et al., 1990). A szacharóz is jelentős szerepet tölt be a mikrospórák embriogén fejlődésében (Hamaoka et al., 1991). Kukorica portoktenyésztéshez használt táptalajok esetében is a leggyakrabban használt cukor a szacharóz, amit változó koncentrációban alkalmaztak: 6%-os (Nitsch et al., 1982), 9%-os (Tsay et al., 1986), 12%-os (Ku et al., 1981) és 15%-os (Ting et al., 1981). A legnagyobb indukciós arányt a 12%-os szacharóz tartalmú táptalajok esetében figyelték meg (Miao et al., 1978; Dieu és Beckert, 1986; Genovesi, 1990).

A portokkultúrák indukciós táptalajainak fontos alkotói a szerves nitrogénforrások. Ehhez leggyakrabban a laktalbumin hidrolizátumot (Ku et al., 1981), a kazein hidrolizátumot (Miao et al., 1978), az aminosavak közül pedig az L-aszparagint, a prolint és a glicint (Olsen, 1987) alkalmaznak.

A leggyakrabban használt vitaminok a tiamin (B_1), a nikotinsav-amid (B_3), és a piridoxin (B_6), valamint a vitaminszerű hatással bíró mio-inozitol.

A kétszikű növények pollen indukciójának kiváltásához nem feltétlenül szükséges külső hormonpótlás, azt sokkal inkább környezeti stressz, az alkalmazott előkezelés váltja ki (Touraev és Heberle-Bors, 1999). Ezzel szemben a gabonafélék portokkultúráiban általánosan alkalmaznak szintetikus auxinokat és citokinineket a környezeti stressz által kiváltott embriogenezis megerősítésére. Ezen hormonok indukcióban betöltött pontos szerepe mindmáig ismeretlen.

A kukorica mikrospórák androgenetikus fejlődésének elősegítésére a szakirodalmi adatok szerint különböző növekedés-serkentő anyagokat alkalmaznak. Az erre vonatkozó szakirodalmi adatok alapján nehéz egységes képet formálni. Egyes szerzők a citokininek szerepét emelik ki, míg mások az auxin típusú növekedés szabályozó vegyületekét, sőt gyakran az auxin antagonista TIBA-t (2,3,5-trijód-benzoesavat) találják hatásosnak (Genovesi és Collins, 1982), vagy összetett hormonadást (2,4-D, NES, BA) alkalmaznak (Ting et al., 1981). Ennek az egyet nem értésnek a feltételezett oka az, hogy igen keveset tudunk a genotípus a növénynevelési körülmények és a portokok endogén auxin tartalmának összefüggéseiről, illetve az előkezelések és az endogén hormonok kölcsönhatásairól.

Portokkultúrában kezdetben MS táptalajt használtak (Murashige és Skoog, 1962), amit később auxinokkal (elsősorban 2,4-D-vel) egészítettek ki. Igazi áttörést a Chu et al., (1975) által létrehozott N_6 táptalaj jelentette, amit különböző módosítással elterjedten használtak. Chu és mtsai. (1975) eredetileg rizs portoktenyésztésének céljából alakították ki ezt a nitrogénforrások hatásának tanulmányozására kifejlesztett táptalajt.

Az auxinok az indukciós fázisban fontosak, és befolyásolják a mikrospóra eredetű struktúrák későbbi regenerációját. A mikrospórák indukciója és később zöld növénnyé fejlődése szempontjából a legkedvezőbb hatású auxinoknak a fenil-ecetsav és a naftil-ecetsav bizonyultak (Ziauddin et al., 1992; Castillo et al., 2000). A mikrospóra indukció kiváltásához szükséges 2,4-D mennyiségéről ellentmondóak az irodalmi adatok. Kuo és mtsai. (1994) magas auxin koncentrációt alkalmazva a kukorica embrióindukció növekedését figyelték meg. A citokininek elsősorban az embriószerű struktúrák növénnyé fejlődésében játszanak fontos szerepet. Így a regenerációs táptalajhoz adott citokininek bizonyos esetekben jelentősen javítják a növényregeneráció hatékonyságát (Pauk et al., 1991). Az abszcizinsav a sporofitikus fejlődés megindításában segíthet,

mivel növeli a stresszkezelést túlélő mikrospórák számát, és akadályozza a mikrospórák pollenné fejlődését (Hoekstra et al., 1997; Van Bergen et al., 1999).

Több kísérletben megfigyelték, hogy kukorica esetén az endogén hormontartalom elegendő volt a mikrospóra eredetű struktúrák kialakulásának kiváltásához, és külső hormonpótlásra nem volt szükség (Nitsch, 1981; Tsay et al., 1986; Rashid, 1988). A hormonszükséglet valószínűleg szintén genotípus függő (Mandal és Gupta, 1995; Gosal et al., 1997; Rakoczy-Trojanowska et al., 1997) és azt a donor növények felnevelési körülményei is befolyásolhatják (Ferrie et al., 1995).
Az eddigi kutatások alapján az a konszenzus körvonalazódik, hogy a legkisebb, még optimális hormonkoncentrációkat alkalmazzák (Monostori et al., 2003; Zheng, 2003).

Az indukciós táptalaj nélkülözhetetlen összetevője az aktív szén, melynek az a szerepe, hogy a portokokból felszabaduló toxikus bomlásterméket megköti, és ezáltal pozitívan hat a mikrospórák androgenetikus fejlődésére (Weatherhead et al., 1978; Genovesi és Collins, 1982; Johansson 1983). A táptalajba adagolt és autoklávozással sterilizált aktív szén megnövelte a szövettenyésztés hatékonyságát (Büter et al., 1993). Alkalmazásának hátránya azonban az, hogy egyéb táptalaj alkotókat is megköt, így megakadályozza, hogy a növények felvegyék azokat (van Winkle et al., 2003). A folyékony táptalajok esetében nem használnak aktív szenet, a táptalaj hetenkénti frissítésével érik el, hogy a toxikus anyagok ne halmozódjanak fel, ez azonban jelentősen megnöveli mind a fertőzések lehetőségét, mind pedig a munkaigényt.

A gabonafélék portoktenyésztésének hőskorában alkalmaztak természetes tápanyag kiegészítőket. A két leggyakrabban használt természetes táptalaj kiegészítő a kókusztej és a burgonyagumó kivonat. A kókusztej elsősorban a sejtosztódásra és az embriófejlődésre hat pozitívan (van Overbeek et al., 1941). A burgonyagumó kivonatot búza portok kultúrában alkalmazták, ám a W14-s táptalaj megjelenésével a szerepe jelentős mértékben csökkent. Hormonszerű hatásuk miatt alkalmazzák őket a szövettenyésztésben használt táptalajokhoz, növelve azok hatékonyságát. A mikroanalitikai technikák fejlődésével napjainkban már beazonosítható ezeknek az anyagoknak az összetevői. Az egyéb természetes táptalaj kiegészítők nem feltétlenül szükségesek a szövettenyésztés során, az embriogenezis indukálásához, és a növények regenerálásához, azonban a növekedés és a fejlődés intenzitására valamint annak időtartamára hatnak (Maróti, 1976).

A táptalajokat kezdetben agarral, majd agarózzal, napjainkban pedig szintetikus Gerlit®-tel szilárdítják.

A kukoricánál az indukciós táptalajok esetében az N_6 és a YP táptalaj, valamint azok módosítási alkalmazzák: az N_6 (Miao et al, 1978; Brettel et al, 1981; Nitsch et al, 1982;), a YP (Ku et al, 1981; Nitsch et al, 1982; Genovesi és Collins, 1982; Pauk, 1985; Petolino és Jones, 1986; Dieu és Beckert, 1986; Barnabás, 2003), a Zheng 14 (Ting et al, 1981; Dieu és Beckert 1986).

Az indukciós táptalajon a kukorica portokok tenyésztése 28 napig, 29 °C-on sötétben történik (Anyag és Módszer 2. ábra), ezalatt a leoltott portokok indukálódnak és kialakulnak az embriók illetve a kallusz szerű struktúrák (Barnabás, 2003). Majd a kialakult struktúrák átkerülnek a regenerációs táptalajra (Barnabás, 2003).

Regenerációs táptalajok, növénydifferenciálódás és növénynevelés:

A regenerációs táptalajban is megtalálhatók azok a nélkülözhetetlen makro és mikro elemek szerves nitrogén források és vitaminok, mint ami az indukciós táptalajokban. Kukorica esetében leggyakrabban használt táptalajok az N_6 módosított változatai, amik már csökkentett hormon összetevőkkel és cukortartalommal rendelkeznek, és nem tartalmaznak aktív szenet (Barnabás, 2003) (Anyag és Módszer 2. táblázat). Hormonokat tekintve, az auxin gátolhatja az embriók fejlődését, ezért a növényregenerációs fázisban szükséges annak csökkentése valamint a gyökérképződés elősegítésére gibberelinsav alkalmazása is hatékony lehet. Az előzőekben már említettük a citokininek növényregenerációra gyakorolt kedvező hatását.

A növény regenerációs szakasz már fényen, 26 °C-on történik (Barnabás, 2003). A regenerációs táptalajra helyezett embriók embriogenezis, a kalluszszerű struktúrák pedig organogenezis útján fejlődnek haploid vagy DH növénnyé. A regenerációs táptalajon Petri csészében a kis növények addig vannak, amíg megfelelő hajtással és gyökérrel nem rendelkeznek. Ezek után nagyobb edénybe (kis üvegben) hormonmentes és csökkentett cukortartalmú (2%) táptalajra kerülnek. Hozzásegítve ezzel őket a földlabdába való adaptálásra. A kis növények kiültetés utáni időszak a növénynevelés egyik legkritikusabb pontja így a növények felnevelése vagy növénynevelő kamrában vagy üvegházban történik. A növények nem rendelkeznek a kellő vastagságú kutikula réteggel és nagyon nehéz adaptálni őket a növénynevelő kamra környezeti viszonyaihoz. Ennek érdekében a kukorica portokkultúrával foglalkozó kutatók kidolgoztak egy adaptálási módszert miszerint a növényeket kis fóliasátorba teszik és napi többszöri szellőztetéssel szoktatják őket a növénynevelő kamra levegőjéhez és páratartalmához, majd egy-két hét után leveszik a fóliát (Kovács et al., 1999; Spitkó 2010, személyes tapasztalat). A növények hím és nővirágait még virágzás előtt izolálják, majd önbeporzással előállítják a DH_0 szemeket.
Az általunk használt protokoll alapján a portokkultúra lépéseit az Anyag és Módszer 2. ábráján mutatom be.

2.1.4. Kromoszóma diploidizáció (kromoszóma szerelvény megkettőződése) lehetőségei

Elméletileg az *in vitro* androgenezis során a haploid mikrospórákból haploid növények jönnek létre. A gyakorlatban azonban ennél sokkal tarkább a kép. A különböző növényfajok és azon belül a genotípusoktól függően eltérő mértékben a tenyésztési folyamat során a sejtekben

spontán kromoszóma duplikáció történhet. A spontán kromoszóma megkettőződés általában endomitózis, endoreduplikáció, ill. sejtmagfúzió eredménye lehet a portoktenyésztés korai szakaszában (Sunderland et al., 1974; Keller és Armstrong, 1978; Barnabás et al., 1999). A tenyésztés során minél később következik be a kromoszómaszerelvény megkettőződése, annál valószínűbb, hogy a növény, amit regenerálunk mixoploid vagy kimerikus szerkezetű lesz.

A szakirodalmi adatok szerint a kukorica esetében a spontán kromoszóma reduplikáció a többi gabonafélékhez képest jóval alacsonyabb, csak 20% körüli (Martin és Widholm, 1996), és erősen genotípus függő (Wan et al., 1989; Barnabás et al., 1999). Számos agronómiailag fontos fajnál a spontán reduplikáció mértéke eltérő, az árpa esetében 70-90% (Subrahamanyam és Kasha, 1975), a termesztett búzánál 25-70 % között változik (Hu, 1978; Maluszynski et al., 2003 a, b), a rizsnél 50-60% (Chen és Li, 1978), a rozs esetében pedig 50-90% körül alakul (Maluszynski et al., 2003 a, b).

A dihaploid módszer gyakorlati alkalmazásánál előnyös tulajdonságnak számít, ha egy genotípus a nagy *in vitro* androgenetikus képesség mellett, nagy spontán kromoszóma duplikációs képességgel is rendelkezik, így nagy számú stabil DH utód hozható létre belőle. Amennyiben a kísérletben felhasznált genotípus spontán reduplikációs hajlama alacsony, akkor a folyamat eredménye képpen létrejött haploid növények kromoszóma készletének megduplázására antimitotikus szereket alkalmaznak. A leghatásosabb szernek a kolhicin bizonyult, így leggyakrabban ezt használják a kromoszómakészlet megduplázásához (Jensen, 1974). A kolhicin az őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) érett magjának alkaloidja (*colchici semen*). A mitózis metafázisában (Levan, 1938) lévő sejtekben a magorsó kialakulásának gátlásával fejti ki hatását, így a kromoszómák magi pólusokra való vándorlása nem következik be, ez pedig megkettőződött kromoszóma készlettel rendelkező sejteket eredményez. A legelterjedtebb genom duplikációs eljárás a fiatal növények gyökerének néhány órás alacsony hőmérsékleten történő kolchicin (0,04%) kezelése (Metz és mtsai 1988). Mivel a kolhicin erős sejtméreg számolni kell a sejtekre gyakorolt toxikus hatással. A kezelés után általában a növények egy része elpusztul. Előfordulhat az is, hogy a tenyészőcsúcs sejtjei közül nem mindegyik duplázza meg a kromoszóma készletét, így később a generatív fejlődés során részleges sterilitás léphet fel. A kukorica különösen érzékenyen reagál a fiatal növénykorban alkalmazott kolhicin kezelésre, ennek következtében címer illetve csőfejlődési rendellenességek és a fertilitás nagymértékű csökkenése tapasztalható.

Barnabás és mtsai. (1991) elsőként számoltak be egysejtmagvas búza mikrospórák kolhicin kezeléséről portok tenyészetekben. Az indukciós fázisban adagolva nemcsak a genomduplikációt növelte meg, hanem szignifikánsan csökkentette az albínó növények gyakoriságát is.

Az első ígéretes eredmény publikálása után, számos laboratórium kezdett hasonló kísérletekbe. Más agronómiailag fontos faj esetében is hasonló eredmények születtek. Több faj esetében sikerült az egysejtmagvas mikrospórák kromoszóma készletének duplikációja, a leoltást követő, relatíve kis

koncentrációjú kolhicin alkalmazásával (Alemanno és Guiderdoni 1994; Barcelo et al., 1994; Möllers et al., 1994; Navarro-Alvarez et al., 1994). A továbbiakban csak a kukoricával kapcsolatos kutatások szakirodalmi adatokat mutatom be.

Saisingtong és mtsai. (1996) a portokok hideg (14 °C) és kolhicin kezelését a tenyésztés indukciós fázisában alkalmazták. Az indukciós táptalajhoz különböző koncentrációban (0; 5; 10; 100; 250; 500 és 1000 mg/l) adagolt kolhicin hatását vizsgálták naponta a tenyésztés első 7 napján. Az 1-3 napos 250 mg/l és a 7 napos 5 mg/l kolhicin kezelés megnövelte az embriószerű struktúrák arányát, a növényregenerációs gyakoriság a kontrollhoz hasonló értékeket mutatott, így a kezelések hatására több növényt tudtak előállítani. A 4-7 napig tartó 50-1000 mg/l kolhicin kezelés esetében csökkenést tapasztaltak az embrió-szerű struktúrák számában, és sem negatív, sem pozitív hatást nem tapasztaltak a növényregeneráció esetében. Optimális hatást a 7 napos 250 mg/l kolhicin esetében értek el, amikor is azt tapasztalták, hogy a kezelés hatására 50%-kal megnőtt DH növények száma. A kísérletsorozatok alapján azt a következtetést vonták le, hogy bár a módszer gyakorlati szempontból ígéretesnek tűnik, további hatékony eljárások fejlesztésére van szűkség.

Antoine-Michard és Beckert (1997) különböző rokonsági körbe tartozó F_1 hibrideket vizsgáltak. Két különböző koncentrációjú (625 és 1250µM) kolhicint alkalmazott kezelésképpen egy illetve két hétig sötétben 7 °C-on tenyésztett portokokon. Megállapították, hogy az alkalmazott kolhicin nem befolyásolta a portokok androgén kapacitását, viszont mindkét kezelés esetében lényegesen megnövelte a DH növények számát a kontrollhoz viszonyítva.

Barnabás és mtsai. (1999) kísérleteikben a hidegkezelés követően az indukciós táptalajoz keverve alkalmazták a kolhicint 0,02 és 0,03% koncentrációban a tenyésztett mikrospórák első mitózisának lezajlásáig 3 napig 29 °C-on sötétben. Ezután a portokokat kolhicin mentes indukciós táptalajra helyezték. A tenyésztés során a 2. és 5. napon mintát vettek és citológiai vizsgálatokkal nyomon követték az osztódási szimmetria alakulását a kolhicin kezelés hatására. A kezelés nem gyakorolt sem negatív sem pedig pozitív hatást a válaszadó portokokra. Kolhicin hatására kis mértékben, de nem szignifikánsan növekedett a szimmetrikus osztódások száma a kontrollhoz képest mindhárom hibrid esetében. A kallusz:embrió arányának vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy a kezelés hatására növekedett az embrió-szerű struktúrák aránya, de ez sem volt szignifikáns eredmény. Még az alacsonyabb kolhicin koncentráció esetében is azt tapasztalták, hogy a kezelés hatására megnövekedett a fertilis növények száma és a magkötés, de nem tapasztaltak (a szövettenyésztésre jellemző) abnormális virágfejlődést. A 0,03%-os kolhicin kezelés esetében pedig szignifikáns növekedést találtak a fertilis növények számában és a magkötési adatoknál.

Kovács és mtsai. (1999) nagy androgén kapacitással bíró F1 hibridet vizsgáltak. Az indukciós táptalajba raktak 0,02 és 0,03% kolhicint és 3 napig inkubálták, majd kolhicin mentes indukciós táptalajra oltották a portokokat, a tenyésztés 29 °C-on sötétben történt. A kezelés nem befolyásolta

statisztikailag megbízhatóan sem a válaszadó portokok számát, sem pedig a haploid indukciós képességet. Az osztódási szimmetriaviszonyok tekintetében sem tapasztaltak szignifikáns különbséget a kontroll és a kétféle kolhicin koncentráció között, valamint az indukálódott struktúrák döntő része is kallusz volt a kezelésektől függetlenül. Azt statisztikai adatokkal nem tudták alátámasztani, hogy a kolhicin alkalmazása elősegítheti a direkt embriógenezis gyakoriságát, azonban azt sikerült bebizonyítaniuk, hogy jelentős mértékben megnöveli a fertilis növények számát a kontrollhoz képest. Sőt a magkötés tekintetében szignifikánsan különbséget igazoltak. A kezelések hatására több szemet kaptak a regeneráns növényeken és csökkent a „tassel seed" jelleg. Megállapításuk szerint a módszer alkalmas lehet közvetlen nemesítési felhasználásra. Az alkalmazott 0,02-0,03%-os kolhicin kezelés nem befolyásolta a regenerációs képességet, ami megegyezett mások tapasztalatával is (Barcelo et al., 1994).

Obert és Barnabás (2004) tovább fejlesztette a módszert és nem csak a kolhicin hatását vizsgálták, hanem hormont (TIBA: 2,3,5-trijód-benzoesav) is alkalmaztak a táptalajban. Egy jó haploid indukciós képességgel rendelkező hibridet alkalmaztak kísérletsorozataik során és megfigyelték a portok válaszadó képességét, a haploid indukciót, az embrió ill. kallusz-szerű struktúrák arányát és a növényregenerációt a hideg előkezelés, TIBA (0,1 mg/l) és kolhicin (0,02%) jelenlétében, hiányában, valamint ezek különböző kombinációjában. A legnagyobb növényregenerációt akkor kapták, amikor mindhárom faktor jelen volt a tenyésztés során.

Bár szakirodalmi adatok alapján a kromoszóma kettőződés elérése céljából a kolhicin a leghatásosabb antimitotikus ágens, egyéb vegyületek használata is fellelhető a szakirodalomban.

Wan és mtsai. (1991), négy a kolhicin hatásmechanizmusával nagyjából megegyező herbicidet vizsgáltak annak érdekében, hogy megállapítsák azok hatékonyságát a kromoszóma diploidizáció tekintetében. Portok eredetű kalluszokat kezeltek különböző koncentrációban 2-3 napig amiprophos-metillel (AMP), pronamiddal, oryzalinnal és trifluralinnal. Kísérletsorozataik alapján azt a következtetést vonták le, hogy az AMP és a pronamid alkalmas lehet a kolhicin kezelés kiváltására, azonban kis mértékű negatív hatást tapasztaltak a kallusz növekedésre, a növényregenerációra következésképpen a regenerálódott növényekre. Az oryzalin volt a leghatásosabb a kromoszóma duplikációra, azonban a trifluralinal együtt olyan negatív hatást gyakoroltak a kallusz regenerációra, hogy azt a következtetést vonták le, hogy nem helyettesíthetik a kolhicint.

2.2. Növénynemesítés eszköztára az abiotikus stressztűrő-képesség fokozására

A nemesítők egyik célja a nagy ökológiai plaszticitással rendelkező abiotikus (hideg, szárazság, hő) és biotikus (patogén gombák) környezeti stresszekkel szemben ellenálló fajták és hibridek előállítása, és mielőbbi termesztésbe vonása. Mivel ismert, hogy számos biotikus ill.

abiotikus stressz oxidatív úton (reaktív oxigénformák, vagy azok származékainak felhalmozódásával) fejti ki növénykárosító hatását, a növények általános adaptációs képességének növelésére irányuló törekvések gyakran fokuszálnak az oxidatív stressz-tolerancia fokozására. A továbbiakban azokat az eredményeket ismertetem, melyek célja olyan növények előállítása, szelekciója, melyek a különböző biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni tolerancia fokozását célozzák meg.

Általános tapasztalatok szerint a szelekció konvencionális nemesítéssel, transzformációval ill. szövettenyészetekben alkalmazott *in vitro* szelekcióval oldható meg. A konvencionális nemesítés esetében egy egy tulajdonságra történő szelekció után keresztezéssel viszik be a kívánt tulajdonságot, géntechnológiai alkalmazások esetében egy-egy gén bevitele és ennek hatására valamely antioxidáns enzim, vagy vegyület túltermelése, míg az *in vitro* szelekció esetében az egész sejt általános adaptációs képességének egyidejű megnövekedése váltja ki a stressz-toleranciát.

2.2.1. Hagyomásnyos kukoricanemesítésben alkalmazott markertechnikák

A konvencionális növénynemesítés során a kedvező génkombinációkat, öröklődő variációkat a fenotípusos bélyegek alapján a nemesítő megtalálja, szelekcióval kiemeli és keresztezéssel új genotípust állít elő belőlük. Hazai növénynemesítő műhelyek számos hideg és szárazságtűrő hibridet állítottak elő hagyományos nemesítéssel. Az egyik legfontosabb oxidatív módon ható abiotikus stressz a hideg, amely hazánkban a kukorica kezedti fejlődési fázisában gyakran fellép. A hideggel szembeni tűrőképesség kialakításánál nagyon fontos a vonalak és a hibridek keléskori hidegtűrésének és korai fejlődési erélyének az ismerete. A fajtaleírásokból kiragadott példaként az alábbi hibridek rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal: Dekabl DKC6323, DKC 3705, Mv277, Mv521. A magas hőmérséklettel párosuló vízhiány leggyakrabban a kukorica virágzásakor lép fel hazánkban. Az aszálytűrő hibridek fontos tulajdonsága a virágás idején a nagy pollentermelő képesség és a hím és nővirágzás összehangoltsága, valamint a levél elszáradásának lassú üteme. Kiváló aszálytűrő hibridként ismert például a PR38A79, Szegedi TC367, az Mv Hunor és az Mv Tarján.

A nemesítési alapanyagokban meglévő genetikai variabilitásra fenotípusos szinten morfológiai tulajdonságok, illetve izoenzim, vagy tartalékfehérje mintázatok alapján lehet következtetni. Genotípusos szinten pedig a különböző DNS markerekkel (RFLP, RADP, SCAR, SSR, AFLP) kapott mintázat monomorf vagy polimorf jellege a mérvadó. A molekuláris marker alapú szelekció eredményei felkeltették a klasszikus kukoricanemesítéssel foglalkozó kutatók érdeklődését (Pelemand és Van Der Voort, 2003, Ribaut és Rabot, 2007). A molekuláris növénynemesítés célja olyan közvetlen DNS szintű változások előidézése, melyek célirányosan javítják a növény agronómiai szempontból fontos tulajdonságait, vagy új tulajdonságok

kifejlesztését teszik lehetővé. Azáltal, hogy a fenotípusosan vizsgálható tulajdonságokat nem fedik el, vagy befolyásolják a környezeti tényezők, a molekuláris nemesítés sokkal hatékonyabb lehet a növény- és populációszinten végzett klasszikus szelekciónál (Bedő et al., 2007). A molekuláris markerszelekciós technikák azonban igen költségesek, idő- és munkaigényesek nagyszámú nemesítési anyag tesztelése esetén. Előrelépést jelenthet a kukoricanemesítésben is az ún. SNP (single nucleotid polimorphism) felhasználása, mivel egy genomban igen nagy gyakorisággal fordul elő (Edwards és Mogg, 2001). A génműködés szabályozásán alapuló géncsendesítés, vagy az ún. RNS silencing valamint a TILLING- technika szintén gyakorlati előnyt adó lehetőségek. A korszerű biotechnológiai, géntechnológiai módszerek felhasználásával a kívánt új genotípus előállításához szükséges idő lerövidíthető, bizonyos gének frekvenciája megnövelhető, egy nemzedék alatt genetikailag homozigóta utódok állítatók elő. A klasszikus és a molekuláris növénynemesítés módszerei azonban nem kizárják, hanem kiegészítik egymást.

2.2.2. Géntechnológiai módszerek alkalmazása

Transzgénikus technikával sikeresen állítottak elő abiotikus stresszekkel szemben ellenálló növényeket, melyeket az alábbiakban sorolok fel:

- fokozott oxidatív stressztűrő képességgel rendelkező Pq toleráns cukorrépát (Tertivanidis et al., 2004),
- dohányt (Slooten et al., 1995; Kwon et al., 2002),
- kukoricát (Van Breusegem et al., 1999),
- oxidatív stressztűrő képpességű dohányt (Deák et al., 1999),
- Pq, *t*-BHP és só toleráns szőlőt (Zok et al., 2010),
- Pq, só és szárazságtűrő rizst (Zhao és Zhang, 2006; Prashant et al., 2008),
- Pq, H_2O_2, nehézfém toleráns nádképű csenkeszt (*Festuca arundinacea* L.) (Lee et al., 2007)
- Pq és kadmium toleráns burgonyát (Eltayeb et al., 2010),
- Pq, H_2O_2, alacsony hőmérséklettel és szárazsággal szemben toleráns lúdfüvet (*Arabidopsis thaliana* L.) (Gaber et al., 2006),
- só és hő toleráns dohányt (Roxas et al., 2000),
- vízhiány okozta stressztoleráns dohányt (Yan et al., 2003),
- kadmium toleráns dohányt (Guan et al., 2009)
- só és alacsony hőmérséklet által előidézett stressztoleráns rizst (Matsumara et al., 2002; Moriwaki et al., 2008),
- só és szárazság toleráns dohányt (Badawi et al., 2004),
- szárazságtűrő és télálló lucernát (McKerise et al., 1996),
- fotooxidatív stressz toleráns búzát (Melchiorre et al., 2009).

A stressztolerancia fokozódását a legtöbb esetben valamilyen antioxidáns enzim génjének beépítésével érték el. A géntechnológiailag módosított növények (GMO) vitatott megítélése, ill. Magyarországra vonatkozó termesztési tilalma miatt ezt a kérdést részleteiben nem kívánomk elemezni.

2.2.3. *In vitro* szelekciós módszerek

Az *in vitro* szelekciós módszerek egy alternatív megoldást nyújthatnak az abiotikus stresszekkel szemben ellenálló növények előállítására. Számos növényfaj esetében az *in vitro* szelekció módszere széleskörben alkalmazott nemesítési módszer úgy a biotikus, mind az abiotikus stressztolerancia fokozására. Az ún. szomaklónális variabilitás kiaknázásának alapja az *in vitro* környezet hatására a tenyésztett sejtekben fellépő genetikai megváltozás (mutáció, kromoszóma átrendeződések és rekombinációk, megváltozott DNS metiláció, transzpozon aktiváció, gén amplifikáció). Ez lehetővé teszi, hogy *in vitro* szelekcióval olyan növényeket állítsunk elő, melyek ellenállónak bizonyulnak az alkalmazott szelekciós ágenssel szemben.

Elsőként Furusawa és mtsai. (1984) szelektáltak szomatikus eredetű szövettenyészetek felhasználásával Pq-toleráns dohánynövényeket. Később kimutatták, hogy ezen növények ellenállóbbak voltak a biotikus stresszekkel, valamint egyes abiotikus pl. hideg, hő és a $HgCl_2$ által előidézett) stresszekkel szemben is (Barna et al., 1993). Kiderült, hogy ezeknek a ROF-kal szemben rezisztens dohánynövények antioxidáns kapacitása sokkal nagyobb, mint a kontroll növényeké (Gullner et al., 1991, 1995; Barna et al., 1993). Burgonya szomatikus eredetű szövettenyészeteiből is eredményesen szelektáltak oxidatív stresszeket jól tűrő növényeket Pq felhasználásával (Király, 2002). *In vitro* szelekció segítségével számos, só (Lu et al., 2007; Querios et al., 2007), szárazság (Sabbah és Tal, 1990; Hasissou és Bouharmont, 1994; Purushothan et al., 1998) és nehézfémekkel (Cu, Pb, Zn, Mn) (Tanaka et al., 1988; Rout et al., 2007) szemben ellenálló növényt állítottak már elő (Rai et al. 2011). A továbbiakban Darkó és Barnabás (2012) összefoglaló munkája alapján táblázatos formában mutatom be azokat az eredményeket, melyekben igazolták, hogy az *in vitro* szelekció során a fokozott abiotikus stressztolerancia kialakulása antioxidáns enzimaktivitás megnövekedésével jár együtt.

1. táblázat: Oxidatív stressztoleráns növények előállítás *in vitro* szelekcióval, különböző fajok esetében.

Szelekciós ágens	Növényi objektum	Növényi faj	Stressz tolerancia	Szerzők
Pb	embriogén kallusz	kukorica	Oxidatív stressz, APX és GR növekedés	Zacchini et al., 2003
Zn, Mn	szomatikus eredetű kallusz	repce	Zn, Mn tolerancia POD és Kat csökkenés	Rout et al., 1999
γ-sugárzás, NaCl	sejt aggregátum	édes burgonya	Sótűrés SOD növekedés	He et al., 2009
NaCl	kallusz szuszpenzió	csillagpázsit	Só és szárazság tűrés	Lu et al., 2007
		burgonya	Só tűrés megnövekedett aszkorbinsav tartalom	Queirós et al., 2007
Pq	szomatikus és organogenetikus kallusz	dohány	Pq, SO_2,$HgCl_2$, fagy és hőstressz tolerancia	Tanaka et al., 1988
Cu			Réz tolerancia POD és Cat növekedés	Rout and Sahoo, 2007
NaCl			NaCl tolerancia POD és Cat növekedés	Rout et al., 2008
Hydroxy-prolin	kallusz	búza	fagytűrés	Tanatu és Dörffling, 1991
PEG	kallusz		Szárazság tűrés SOD növekedés	Abdelsamad et al., 2007
Na-benzonát és Pq	kallusz		Szárazság SOD, GR és POD növekedés	Li, 1998
Pq	kallusz	szürke nyár	Pq megnövekedett GsT, GR, LOX	Bittsánszky et al., 2009
		dohány	Pq, hideg, hő, $HgCl_2$	Barna et al., 1993
		burgonya	Pq, hideg	Király, 2002

A bemutatott szakirodalmak egyértelműen igazolják, hogy az *in vitro* szelekció alkalmas oxidatív stressz-toleráns növények előállítására. De vajon működik-e ez a rendszer haploid mikrospórákon is?

2.2.4. A haploid sejtszintű *in vitro* szelekció genetikai alapja

A haploid hím gametofiton fejlődése során végbemenő génexpressziós változások a gabonafélék esetében már az 1980-as évek eleje óta foglalkoztatták a kutatókat. A génexpressziós változásokat a kornak megfelelő molekuláris biológiai vizsgálatokkal közelítették meg és próbálták bizonyítani (Tanksley et al., 1981; Singh et al., 1985; Stinson és Mascarenhas, 1985; Sari Gorla et al., 1986; Stinson et al., 1987; Vergne és Dumas, 1988; Ottaviano et al., 1988; Raghavan, 1989; Acevedo és Scandalios, 1990; Frova, 1990). A molekuláris genetikai vizsgálatok arra az eredményre vezettek, hogy a zárvatermő növények haploid életciklusában expresszálódó gének mintegy 70%-a (közöttük az abiotikus stressztűrő képességéért felelős gének) a sporofitikus egyedfejlődési szakaszban is megnyilvánulnak (Tanksley et al., 1981; Willing és and Mascarenhas, 1984; Sari Gorla et al., 1986; Ottaviano et al., 1988; Acevedo és Scandalios, 1990; Frova, 1990). Ezek között számos struktúrgént, cukor-keményítő bioszintézisben szerepet játszó gént, hormon bioszintézisért, proteolízisért, valamint több stressztűrésért felelős gént (pl. MnSOD, APX génjei)

azonosítottak (Kermin et al., 2003; Imin et al., 2004; Hochholdinger et al., 2006; Hosp et al., 2006; Joosen et al., 2007; Cordewener et al., 2009; Takač et al., 2011). Ezek az eredmények alátámasztják a mikrospóra szintű szelekció lehetőségét. Mivel egy portokban néhány 100-tól több ezer mikrospóra található, a szoma- és gametoklonális variabilitás miatt a szelekciós bázis lényegesen megnövelhető. A módszer gyakorlatban történő kipróbálásának egyik kritériuma a mikrospórákból *in vitro* regenerálható növények mennyisége. A hatékony portoktenyésztési metodikák lehetőséget teremtettek a mikrospóra szelekciós módszer kipróbálásra. Sikeresen állítottak elő portoktenyészetben végzett *in vitro* szelekcióval: fuzárium toleráns búza növényeket (Fadel és Wenzel 1993), fagytoleráns búzát (Kovács és Barnabás 1997), hideg toleráns rizst (Gupta et al., 1996), só toleráns rizst (Lee et al., 2003), tritikálé x búza F_2 növényekből Al toleráns vonalakat (Karsai et al., 1994), Al toleráns búza törzseket (Barnabás et al., 2000). Az előzőekben idézett publikációkban a szerzők igazolták az *in vitro* szelekció hatását, de részleteiben nem vizsgálták a hátterében álló fiziológiai és biokémiai változásokat. Erre az Al és az alacsony pH toleráns búza esetében néhány évvel később (Darkó et al., 2004) került sor. Bármennyire is sikeres az *in vitro* szelekció, a szövettenyésztés okozta genetikai instabilitás (Bednarket et al., 2007) miatt szükséges az utódgenerációk tesztelése annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a szerzett tulajdonság öröklődik-e.

A jelen dolgozatomban összegezzük azokat az eredményeket, melyek során igazoljuk, hogy oxidatív stressztoleráns kukorica DH vonalak is előállíthatók mikrospórák *in vitro* szelekciójával, valamint fiziológiai és biokémiai vizsgálatokkal bizonyítjuk, hogy az oxidatív stressztűrő képesség az utódgenerációkban is megnyilvánul.

2. 3. Oxidatív stressz-folyamatok a növényben

Eltekintve a klasszikus Selye János (1936; 1978) megalkotta stresszelmélet ismertetésétől, minden olyan körülményt, vagy anyagot, ami kedvezőtlen hatással van a növények anyagcseréjére, növekedésére, vagy fejlődésére stressznek tekintünk (Lichtenthaler, 1996). A növényeket érő stresszhatások (pl. erős fényintenzitás, szélsőséges hőmérsékletek, szárazság, só- vagy nehézfém-szennyezés, sebzés, rovarrágás vagy -nedvszívogatás, vírus-, baktérium- vagy gombafertőzés) következtében lényeges anyagcsere változások jönnek létre. Ezek egy része a stressz nélkül is meglévő anyagcsere-utak, -kapcsolódások, -szabályozások módosulását, más részük új gének aktiválását követő alternatív biokémiai folyamatok sorát jelenti. Szinte valamennyi típusú (biotikus, vagy abiotikus) stressz esetében az egyik legjellegzetesebb válasz a reaktív oxigénformák (ROF) képződése, és a sejten belüli oxidatív mikrokörnyezet kialakulása.

Korábban a ROF megjelenésére a növényekben egyértelműen, mint károsító tényezőre gondoltak. Mára már tudjuk, hogy jelenlétük igen szabályozott és fontos szerepet töltenek be

számos (elsősorban a H_2O_2) jelátviteli útban, génexpressziós folyamatokat szabályoznak (Halliwell 2006; Foyer és Noctor 2009). Ugyanakkor a túlzott mértékű felhalmozódásuk károsítja a makromolekulákat: nukleinsavakat, lipideket, fehérjéket, szénhidrátokat (Foyer et al. 1994), valamint fehérje oxidációt, lipid peroxidációt, nukleinsav és pigment károsodást okoznak. A ROF növényekben ill. a stresszválaszok során betöltött komplex szerepét számos összefoglaló, könyv, ill. könyvfejezet ismerteti (Asada, 2006; Karuppanapandian et al., 2011; Sharma et al., 2012). A továbbiakban csupán azokat a szempontokat szeretném kiemelni, melyeket fontosak a dolgozat szempontjából.

2.3.1. Reaktív oxigén formák (ROF) típusai

Az élő szervezetekre gyakorolt hatásukat tekintve a molekuláris oxigénből, általában fémionok katalizálta folyamatokban keletkező gyökök a legjelentősebbek (Candeas, 1989). A leggyakrabban előforduló ROF a növényekben a hidrogén peroxid (H_2O_2), szuperoxid gyök, hidroxil gyök, szinglet oxigén, ill. különböző származékaik, mint pl. a lipidperoxidok.

A molekuláris oxigén két párosítatlan, párhuzamos spinű elektronnal rendelkezik. Gerjesztési energia hatására a molekuláris oxigénből szinglet oxigén ($^1O_2$) keletkezik. Ez vizes közegben körülbelül 4 µs ideig van jelen, majd átadja gerjesztési energiáját és endoperoxidokat vagy hidroperoxidokat hoz létre (Knox és Dodge, 1985).

Egy elektron felvételével a molekuláris oxigénből szuperoxid-aniongyök (O_2^{-}) jön létre. Ez közepesen reakcióképes, rövid féléletidejű (2-4µs) ROF, mely nem jut át a sejtmembránon. Jó redukáló és gyenge oxidálószer. Sok autooxidációs reakcióban keletkezik (Ederva, 2005).

A szuperoxid gyök, H_2O_2-dá alakulhat további elektronfelvétellel. A H_2O_2 közepes reakcióképességű, 1 µs féléletidejű molekula. Enyhén oxidál, de nagy a diffúziós távolsága, képes membránokon keresztül is diffundálni. Lipidekkel reagálva hidrogén atomok elvonásával lipid autooxidációt indíthat el (Vranová et al., 2002).

A legreaktívabb oxigénforma a hidroxil-gyök, amely a Haber-Weiss vagy Fenton reakció során fémkatalizátor jelenlétében H_2O_2 keletkezik. Szuperoxid gyök jelenlétében a fémionok redukálódnak, így képesek katalizálni a H_2O_2 átalakulását hidroxil-gyökké. Mivel a sejtek nem rendelkeznek olyan enzimmel, amely képes a hidoxil-gyököt eliminálni, ezért fontos, hogy mennyisége a sejtekben ne legyen sok, mert az sejthalálhoz vezet (Grant és Loake, 2000).

2.3.2. Reaktív oxigén formák (ROF) keletkezése a növényi sejtekben

A ROF képződhetnek a kloroplasztiszokban, mitokondriumokban, peroxiszómákban, a sejtmembránhoz ill. sejtfalhoz kötött enzimatikus folyamatok révén, valamint a citoplazmában is. A kloroplasztisz a legfontosabb helye a ROF képződésének a növényekben. A plasztiszban működő oxigénfejlesztő komplex működése következtében az oxigén magas koncentrációjú jelenléte

biztosított. Az elektrontranszport folyamatok zavara (az elektrontraszport komponensek redukált állapota a fényenergia hasznosítás csökkenése (triplett állapotú klorofill molekulák képződése)), valamint fokozott fotorespiráció következtében szuperoxid és hidroxil gyökök, szinglet oxigén és H_2O_2 képződése figyelhető meg (Edreva 2005). A mitokondriális elektrontranszport láncban környezeti stresszhatások következtében szintén végbemehetnek olyan mellékreakciók, melyek ROF-at eredményeznek. A mitokondriális ROF produkciója azonban sokkal kisebb, mint a kloroplasztiszokban előforduló, valamint fokozott fotorespiráció következtében.

A különböző helyeken lokalizált (pl. peroxiszómák, sejtfal, sejtmembrán) oxidázok és peroxidázok reakciótermékeként, is keletkeznek ROF. Például: a peroxiszómákban, a fotorespirációban szerepet játszó glikolát-oxidáz, vagy a membránkötött NADPH-oxidáz, és sejtfalhoz kötött peroxidázok katalizálta reakcióban (Mittler, 2002; Edreva, 2005).

2.3.3. Reaktív oxigén formák (ROF) károsító hatásai

A ROF túlzott felszaporodása a sejtekben oxidatív károsodást indukál. A szabad gyökök és azok származékai minden molekula csoportot képesek károsítani: nukleinsavakat, lipideket, fehérjéket és szénhidrátokat (Foyer et al., 1994). A fehérjéket alkotó aminosavak oxidációja a legtöbb esetben funkcióváltozást eredményez, ami megnyilvánul pl. enzimek katalitikus helyének változása esetén az enzimek aktivitásának módosulásában, vagy a diszulfid híd kötések átalakulásai révén a fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezetének megváltozásában. A lipideket alkotó telítetlen kettős kötések oxidációja lipidperoxidációt idéz elő, mely láncreakciószerűen drasztikus membránkárosodást idéz elő a sejtekben. Ez érinti gyakorlatilag az összes membránt, beleértve a kloroplasztisz tilakoid membránjait, mitokondriális krisztákat, a tonopaszt membránt és a sejtmembránt is. Mindezek károsodása visszafordíthatatlan membrán áteresztőképesség-növekedéssel járnak, mely végső soron a sejt ionegyensúlyának felborulásához, ill. sejthalálhoz vezet. Ebben a vakuólum sejtmembránjának (tonoplaszt) „lyukacsossá” válása is fontos szerepet játszik. A vakuólum rengeteg mérgező fenol vegyületet tartalmaz, és lipid peroxidáció során ezek az anyagok a citoplazmába ömlenek, ahol további mérgező anyagok keletkeznek, ami a citoplazma gyors pusztulásához vezet (Tausz 2001). A sejthalál jól jellemezhető az ionkiáramlás mérésével. A módszer az oldatok vezetőképességének változásán alapul (Mittler et al., 1996).

A szintén sok telítetlen kettős kötést tartalmazó fotoszintetikus pigmentek is igen érzékenyek a reaktív oxigén gyökökre. Oxidációjuk klorofill tartalom csökkenést (bleaching) eredményez.

A kloroplasztisz igen érzékeny a ROF okozta károsodásra. A plasztisz fehérjék, lipidek és fotoszintetikus pigmentek károsodásai a fotoszintetikus apparátus gyors funkcióvesztését idézik elő, ami érinti a PS II működését is (Song et al., 2006; Krieger-Liszkay et al., 2011). A PS II

aktivitásának megváltozása jól jellemezhető klorofill *a* fluoreszcencia mérésének módszerével. E módszert széles körben alkalmazzák a fotoszintetikus apparátus működésének jellemzésére (Krause és Weiss 1991, van Kooten és Snel, 1990). Stressz körülmények között, beleértve az oxidatív károsodást is, a fotoszintetikus működést jellemző paraméterek (pl. az Fv/Fm paraméter) megváltozása jól jellemzi az adott növény stresszérzékenységét. (Genty és Meyer, 1994; Baker et al., 2001; Nebdal és Whitmarsh, 2004; Ralph et al., 2005).

Mindezek mellett természetesen számos egyéb károsodás is létrejön a növényekben ROF túlzott mértékű képződése során, de mivel a dolgozatomban főként a fentebb említett folyamatokat vizsgáltuk, a többire most nem térnék ki.

2.3.4. Reaktív oxigén formák (ROF) jelátviteli szerepe

A ROF-nak sejtkárosító hatásuk mellet szerepük lehet antioxidáns és más védekező mechanizmusok beindításában (Prasad et al., 1994; Grant és Loake, 2000; Shao et al., 2008). A sejtekben a ROF mennyiségét összetett antioxidáns védekező mechanizmusok szabályozzák. Egyrészt megakadályozzák a ROF felhalmozódását, másrészt a kis koncentrációváltozások szabályozását teszik lehetővé.

Kimutatták a ROF szerepét számos jelátviteli útban (Foyer et al., 1997; van Brensegem et al., 2001; Neill et al., 2002). Külsőleg adott abszcizinsav hatására megnő a H_2O_2 mennyisége, így a különböző abszcizinsav-hatások közvetítésében szerepet játszhat a H_2O_2 (pl: Kat1 expresszió, vagy a sztómazáródási indukció).

Az ózon-indukált sejthalált H_2O_2 felhalmozódás előzi meg dohány, paradicsom és nyír fajokban, míg *Arabidipsis*, *Rumex és Malva* fajok esetében a felhalmozódó reaktív oxigénforma a szuperoxid-gyök (Wohlgemuth et al., 2002). Szójabab esetében a sejthalál indukciójában a NO és a H_2O_2 aránya volt a döntő (Overmyer et al., 2003).

A hidrogén-peroxid különböző stresszhatások következtében aktiválódó jelátviteli utak közös komponense, így szerepe lehet a kereszttolerancia kialakulásában (Pastori és Foyer, 2002). Kereszttoleranciáról akkor beszélünk, hogyha egy bizonyos stresszre tolerancia alakul ki a növényben, és további, egyéb stresszorral szemben is nagyobb ellenálló-képességet mutat (Shaaltiel et al., 1988; Pastori és Foyer, 2002).

2.3.5. Védekező mechanizmusok

Az oxidatív stressz kifejezés olyan sejtállapotra vonatkozik, amelyben a ROF koncentrációja megemelkedik. Kialakulásához az oxidatív körülményeket kiváltó mechanizmusok, feltételek (biotikus vagy abiotikus stresszorok) felerősödése, valamint az ROF-kat elimináló antioxidáns védelmi rendszer működése közötti finom egyensúly felborulása szükséges (Cadenas 1989; Scandalios, 1990; Smirnoff, 1998; Apel és Hirt 2004; Diaz-Vivancos et al., 2006). A sejtszintű

stresszválasz lényegében ezen elemek aktivitásának megváltozása. Stressz hatására nem egy új védekező rendszer alakul ki, hanem egy már meglévő rendszer aktivitása változik meg. Amikor stressz hatására felbomlik az egészséges sejtben fennálló reaktív oxigéngyökök és az antioxidánsok közötti egyensúly a ROF túlsúlyba kerünek, ami sejthalált indít be (Király 2002).

Az antioxidáns védekezőrendszert enzimatikus és nem eznimatikus komponensekre különíthetjük el (Foyer et al., 1994; Noctor és Foyer, 1998; Meneguzzo et al., 1999). A nem enzimatikus rendszert antioxidáns tulajdonságú vegyületek alkotják, melyek lehetnek vízoldhatók, mint például a glutation (GSH, γ-glutamil-ciszteinil-glicin) és az aszkorbinsav, illetve a lipidoldhatók, mint például az α-tokoferol, vagy a β-karotin. Az enzimatikus elemek közül számos a ROF átalakítását végzi, míg az aszkorbát-peroxidáz (APX) és a glutation-reduktáz (GR) az előbbi vegyületek reakcióit, regenerációját katalizálva vesz részt a reaktív oxigénformák eliminálásában. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) közvetlenül a szuperoxid-aniongyök, míg a kataláz (Cat) hidrogén-peroxid semlegesítésében vesz részt (Dat et al., 2000).

Szuperoxid dizmutáz (SOD)

A szuperoxid-dizmutázok fém-tartalmú enzimek. Minden aerob szervezetben megtalálhatók, növényekben a fém kofaktor alapján három típust azonosítottak: Cu/Zn-SOD, elsősorban a citoszolban de a kloroplasztisz sztrómájában és a peroxiszómákban is megtalálható; Mn-SOD, mitokondriumban és a peroxiómákban, Fe-SOD, kloroplasztiszban azonosították, de nem minden esetben (Bowler et al., 1992, 1994; Bueno et al., 1995). Az enzimek a szuperoxid gyök dizmutációját katalizálják. Ennek során a szuperoxid gyökből H_2O_2 képződik.

Aszkorbát-glutation ciklus

A kloroplasztiszban nincs kataláz aktivitás, így az ott keletkező H_2O_2-t az ún. aszkorbát-glutation ciklus semlegesíti. A folyamat első lépéseként a keletkezett H_2O_2 a kloroplasztiszok sztrómájában lokalizált APX vízzé redukálja miközben az aszkorbinsavból monodehidro-aszkorbinsav keletkezik. A monodehidro-aszkorbinsav egyrészt spontán aszkorbinsavvá és dehidroaszkorbinsavval diszproporcionálódik, másrészt a NADPH-függő monodehidro-aszkorbinsav-reduktáz segítségével közvetlenül aszkorbinsavvá alakulhat. A diszproporció során keletkezett dehidroaszkorbinsav redukcióját a dehidroaszkorbinsav-reduktáz végzi redukált glutation (GSH) hidrogénjeinek kárára. Az így keletkezett oxidált glutation (GSSG) redukcióját a GR enzim végzi NADPH felhasználásával (Smith et al., 1988; Inzé és Van Montagu, 1995).

A rendszer enzimei és szubsztátjai más sejtkompartmentekben is megtalálhatók (Klaphcek et al., 1990). Az APX izoenzim aktivitást mutattak ki a kloroplasztiszon kívül a citoplazmában és az apoplasztban. Az enzim alacsony pH optimuma arra enged következtetni, hogy a sejt savas részeiben működik leghatékonyabban, így pl. a vakuólumban, illetve az apoplasztikus térben

(Asada, 1992). Bár a GR aktivitás fő helye a kloroplasztiszban van (Bielawska és Joy, 1986), GR aktivitást azonosítottak mitokondriumban és a citoszólban is (Foyer et al., 1991). A GR szerepe nem csupán a H_2O_2 detoxifikációjában rejlik, hanem a GSH:GSSG arány módosításával részt vesz a sejt redox állapotának kialakításában, ami központi jelentőségű a génexpressziós szintű védekező folyamatok szabályozásában (Szalai et al., 2009; Potters et al., 2010; Foyer és Noctor, 2011).

Kataláz

A kataláz az egyik legjelentősebb H_2O_2 semlegesítő enzim. A H_2O_2 vízzé és oxigénné történő átalakítását katalizálja. A növényekben a peroxiszómákban, a glioxiszómákban és − kukorica esetében − a mitokondriumokban található meg (Salin, 1987; Scandalios, 1990; Willekens et al., 1997).

Glutation-S-traszferáz

A GsT nem tekinthető antioxidáns enzimnek, mivel közvetlenül nem reagál a szabad gyökökkel. Fő feladata, hogy az elektrofil és hidrofil komponenseket kapcsolja a glutationhoz, így segít a sejt méregtelenítésében. Több izoformáját azonosították (Mauch és Dudler, 1993). Aktivitása több esetben nőtt herbicidek ill. herbicidek hatását semlegesítő vegyületek hatására (Dean et al., 1990), öregedés ill. etilén kezelés hatására (Meyer et al., 1991) továbbá auxin kezelés esetében (Takahasi és Nagata, 1992).

Ezen enzimek aktivitásainak megváltozása mutatható ki számos abiotikus (pl. hideg, szárazság, só, herbicidek, nehézfémek) stressz során (Smith et al., 1989; Mitusko et al., 1991; Foyer et al., 1991; Kocsy et al., 2000, 2001; Pál et al. 2005; Szalai és Janda, 2009). Vizsgálatok sora igazolta, hogy a különböző stressztűrésű növényekben az antioxidáns enzimek aktivitásai különbözőek (Kocsy et al., 2001; Gill és Tuteja, 2010).

2.3.6. Oxidativ stresszt indukáló vegyületek

A továbbiakban röviden ismertetném azokat a ROF-kat képző vegyületeket és hatásukat, melyeket a munkánk során felhasználtunk.

Paraquat (Pq)

A Pq-tal oxidatív stresszt lehet előidézni, ezért a kutatók széles körben alkalmazzák a laboratóriumi stressz-vizsgálatoknál.

A Pq (1,1'-Dymethyl-4,4'-bipyridinium vagy N,N'-dimethyl-L,L'-dipyridylium; vagy methyl vilogen): $[C_{12}H_{14}N_2]^{2+}$) egy totális (nem szelektív) kontakt hatású gyomirtó szer. Elsősorban növényekre hat, de toxikus az emberre, állatra és egyéb más nem fotoszintetizáló organizmusra is

(Preston, 1994; Li, 1998). Bár emberre is rendkívül veszélyes, mégis több országban használták és még jelenleg is használják gyomirtó szerként. Fitotoxikus hatása annak tulajdonítható, hogy alacsony redoxipotenciálú ágens lévén a fotoszintetikus elektrontraszport láncban a PSI redukáló oldalán az FeS_x az elektront átvéve a természetes elektrontranszport útról eltéríti és azt molekuláris oxigénre juttatva szuperoxid anion gyököket generál (Bowyer és Camilleri, 1985; Kunert és Dodge, 1989; Fujii, 1990). A szuperoxid gyök és a belőle keletkező, további ROF felelősek közvetlenül a fitotoxikus hatásaiért (Babbs et al., 1989), miközben ezek a molekulák képződnek a Pq visszaalakul eredeti állapotába. Ennek következtében hiába működik az elektron átadó lánc, a NADPH redukció és a fotofoszforiláció nem megy végbe, a Calvin-ciklus enzimei gátlódnak (Dodge, 1994).
A reakció folyamatos ismétlődése oxidatív stresszt idéz elő a levelekben, ami klorofill degradációt, membrán-károsodást, és végül a levelek elszáradását okozza. A paraquat fény hiányában is toxikus, de ennek hatásmechanizmusa még nem ismert. Feltételezhető, hogy fény hiányában a Pq másodlagos hatása érvényesül, azaz a mitokondriális I. és II.: komplex szolgál elektron donorként a szuperoxid gyök képződéséhez (Cochemé és Murphy, 2008).

Metionin egységnyi riboflavinnal (MR)

A metionint a molekuláris oxigén elektrondonor tulajdonsága miatt használták néhány kísérletben. Kimutatták, hogy metionon kezelés hatására riboflavin (fényérzékenységet okozó anyag) jelenlétében történő megvilágítás mellett ROF halmozódnak fel, együttes alkalmazásuk során alapvetően befolyásolják a fotoszintézist, H_2O_2 generálnak (Bray et al., 1993).

Menadion (MD)

A menadion szuperoxidokat generál. Főként a citoplazmatikus folyamatokra gyakorol drasztikus hatást, továbbá sejtmag-degradációt is okoz a sejtciklus-szabályozás gátlása által (Thor et al., 1982; Prasad et al., 1994; Reichheld et al., 1999).

terc-butil hidroperoxid (t-BHP)

A *t*-BHP egy lipid hidroperoxid, ami a telítetlen lipidmolekulák autooxidációját indukálja (Bouvier et al., 1998). Mivel a szerves butilhidroperoxid erősen hidrofób, könnyen áthatol a membránokon, és elsősorban a lipofil molekulákat (telítetlen zsírsavak, kettős kötésű pigmentek, klorofillok, karotenoidok) károsítja. Ennek következtében a membránok, ill. telítetlen membránhoz kapcsolódó molekulák degradálódnak. Ezáltal a *t*-BHP nagymértékben képes károsítani a tilakoid membránrendszert, valamint hatására jelentős mértékben csökken a klorofill (a+b) és a karotinoid tartalom (Bouvier et al., 1998).

Ezek a vegyületek a sejtek redox rendszereit alapvetően befolyásolják egyrészt a fotoszintézis folyamatainak megváltoztatása révén (Pq, MR), másrészt a sejtciklus szabályozás befolyásolása által (MD) illetve sejtmembránok lipid alkotórészének károsításával (*t*-BHP). A Pq-on kívül nem találtunk szakirodalmi adatokat arra vonatkozóan, hogy a fentiekben felsorolt vegyületek milyen toxikus hatást gyakorolnak az in *vitro* tenyésztett növényi sejtekre, illetve azok alkotórészeire. Egyáltalán nem találtunk szakirodalmi adatokat, hogy ezeket a szelekciós ágenseket használták volna *in vitro* mikrospóra szelekcióra.

Mindezen szakirodalmi adatok idokolták a dolgozatom célkitűzéseit, és a célok elérése érdekében az Anyag és Módszer fejezetben bemutatásra kerülő kísérleteket végeztük el.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Mikrospóra eredetű növények előállítása és az *in vitro* szelekció

3.1.1. Donor növények nevelése

A kísérletek alapanyagául egy kínai eredetű, jó haploid indukciós képességgel (ez több év átlagában ~50% portok válaszadó képességet jelent amit saját tapasztalatból tudunk) rendelkező F_1 hibrid (A18) szolgált, melynek szülőpartnerei is portok kultúrából származó, egzotikus eredetű kukorica DH vonalak (DH240xDH314). Azért ezt a hibridet választottuk úgynevezett modell genotípusnak, mert megbízhatóan jó haploid indukciós és növényregenerációs eredményeket ad, valamint nagy a spontán rediplidizációs képessége (nagy spontán rediploidizációs képesség ~43% Jäger et al., 2005a,b), ami azt jelenti, hogy a kromoszóma duplikálódásához nem feltétlenül szükséges antimitotikus szereket (pl. kolhicin) alkalmazni. A modellkísérletet követően, jó agronómiai tulajdonságokkal rendelkező F_1 hibrideket vontunk be a szelekciós kísérletekbe, melyek a következők voltak:

- DH109xOh43
- DH105xHMv5405
- DH109xSR88
- HMv5405xDH105
- DH109xHMv5405
- DH141xGL62
- DH62xGL62

Az F_1 hibridek szülőkomponenseinek eredete és a nemesítésben való felhasználása:

- A DH109 genotípus 100%-ban egzotikus eredetű. A Chi 592 kínai eredetű vonal „per se” szelekcióval kiválasztott közvetlen DH leszármazottja.
- A DH 105 jó androgén kapacitással bír, jól örökíti az androgén válaszadó képességet. Szülőkomponensei: SR88xChi592.
- A DH62 szülőkomponensei: DH105xHMv5405.
- DH141szölőkomponensei: (HMV5405xDH109)xHMv5405.
- Az SR88 egy szulfonilurea rezisztenciára szelektált vonal.
- Az Oh43 egy régi (1949-ben bejegyzett, G.H. Stringfield által, az Ohioi Kísérleti Állomáson állították elő (Troyer, 1999)) de a nemesítésben napjainkban is gyakaran felhasznált beltenyésztéses vonal amelyet szomatikus (éretlen embrió eredetű) szövettenyésztésben is alkalmaznak.

- A HMv5405 egy martonvásári elit beltenyésztéses vonal, amely szövettenyésztésre nem jól reagál, több martonvásári kereskedelemben lévő hibrid szülőkomponense. Az 1990 évek közepén állították elő, kimagasló értékű Iodent rokonsági körhöz tartozik. Napjainkban is használják számos kereskedelmi értékű hibrid előállításában.
- A GL62 vonal kitűnő kombinálódó képességgel rendelkezik; egyedisége, hogy hordozza a Lfy1 (leafy) gént ami a csőízesülés feletti többlevelűségért felelős gén, így gyakran szerepel martonvásári silóhibridekben.

A donornövények magjait Conviron TCL típusú csíráztató szekrényben (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Kanada) 26 °C-on Petri csészében (10 mag/csésze) szűrőpapíron, steril vízben csíráztattuk. Öt nap múlva a növénykéket 20 literes vödrökbe ültettük (virágföld:Vegasca:homok 3:1:1 arányú keverékébe), és növénynevelő kamrában (Conviron GB-48) neveltük a következő klimatikus feltételek mellett: 18/15 °C-os nappali/éjszakai hőmérséklet, 16 órás 200 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ fotoszintetikusan aktív sugárzás (PAR), 80%-os relatív páratartalom. A hőmérsékletet 2 hetente 2-2 °C-kal emeltük, amíg el nem érte a 22/20 °C-ot. A világítást Tungsram izzók biztosították. A portok kultúrához szükséges címerek begyűjtése a címerhányás előtt kezdődött, amikor a virágzat már jól kitapintható volt a 3 felső levélen keresztül (3. ábra:1 kép). Ez a csírázástól kb. 75±4 napra következett be. Ebben a fenológiai fázisban a portokok már középső stádiumú egysejtmagvas mikrospórákat tartalmaztak, amit kármin-ecetsavas festéssel (Alexander, 1969) ellenőriztünk. A fiatal címereket a borító leveleikkel együtt alumínium fóliába csomagoltuk, és a sporofitikus fejlődés indukciójához sötétben 7 napig 7 °C-on történő előkezelésnek vetettük alá.

3.1.2. Portok kultúra és növényregenerálás

A portok tenyésztést a Sejtbiológiai Osztályon korábban kidolgozott, Barnabás (2003) által leírt protokoll szerint végeztük, lépéseit a 3. ábrán mutatom be. Röviden, a hideg előkezelést követően, minden címerág közepéből 1-3 izolált portokból gyorspreparátumot készítettünk és fénymikroszkóp alatt újra meghatároztuk a mikrospórák fejlettségi állapotát. Tenyésztésre csak azokat a címerágakat használtuk fel, melyek középső vagy kései egysejtmagvas mikrospórákat tartalmaztak. A kiválogatott címerágakat 70%-os etanollal mostuk, kereskedelmi hypo 20%-os oldatával - detergens (Tween 20) hozzáadásával - sterilizáltuk 20 percig, ezután háromszor mostuk steril vízzel. Az felhasznált táptalajokat autoklávozással sterilizáltuk 20 percig, 121 °C-on. A portokokat aszeptikus körülmények között, módosított Yu Pei (Genovesi és Collins, 1982; Barnabás, 2003) (2. táblázat, 3. ábra: 5. kép) táptalajra helyeztük, 4 Petri csészénként 500 db-ot. A portok tenyészeteket sötétben 29 °C-on 80%-os relatív páratartalom mellett inkubáltuk kb. 1

hónapig. Az indukálódott embrió- (3. ábra: 6. kép) ill. kallusz-szerű (3. ábra: 7. kép) struktúrákat megszámoltuk, és módosított N_6 regenerációs táptalajra (Chu, 1978; Barnabás, 2003) (2. táblázat és 3. ábra: 8. kép) helyeztük őket. Az áthelyezett struktúrákat 26 °C-on 16 órás megvilágítás mellett 50 μmol m^2 s^{-1} PAR fényintenzitáson tenyésztettük tovább, mindaddig, amíg megfelelő (0,5 cm) gyökérrel és hajtással nem rendelkeztek. Ezután a növénykéket átraktuk 2%-os cukrot tartalmazó hormonmentes N_6O_1 táptalajra (3. ábra: 9. kép) (Barnabás, 2003) 0,2 l üvegekbe, és addig neveltük, amíg megerősödtek. A legalább 5 cm-es hajtással és megfelelően fejlett gyökérzettel rendelkező növénykéket 5 cm átmérőjű tápkockába ültettük (Jiffy Products International AS Ltd., 2. ábra: 10. kép), és fóliával takartuk le. Ez a növénynevelés legkritikusabb lépése, mert könnyen kipusztulhatnak a növények. Naponta többszöri szellőztetéssel adaptáltuk a növényeket a klímakamrában lévő 70%-os relatív páratartalomhoz, ami kb. 3 hetet vett igénybe. Az adaptációs szakasz után növénynevelő kamrában neveltük fel a növényeket a kukoricaneveléshez használt „BK” növénynevelő programon (Tischner et al., 1997). Megfigyeltük a növények fejlődését, virágzását, és öntermékenyítettük őket (3. ábra: 11. kép). Csak azokat tekintettük fertilisnek, amelyek saját önbeporzásból legalább egy szemet produkáltak (3. ábra: 12. kép).

2. táblázat: A portok kultúrában felhasznált táptalajok:

	mYP	N_6	N_6 O_1
	mg/l	mg/l	mg/l
KNO_3	2500	2830	2830
NH_4NO_3	165	-	-
$(NH_4)_2 \cdot SO_4$	-	463	463
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	176	166	166
KH_2PO_4	510	400	400
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	158	158
	ml/l	ml/l	ml/l
$FeNa_2EDTA$	10	10	10
N_6 vitaminok+glicin	-	10	10
MS mikroelemek (Murashige és Skoog, 1962)	10	10	10
	mg/l	mg/l	mg/l
L-aszpragin	150	-	-
Myo-innozitol	100	-	-
Thiamine-HCL	0,5	-	-
2,3,5- TIBA	0,1	-	
IAA	-	-	1
Kinetin	-	0,5	2
NAA	-	1	-
Casein	500	500	500
	g/l	g/l	g/l
Szacharóz	120	40	20
Aktív szén	5	-	-
Gerlit	2	-	-
Agar	-	6	6
pH	5,8	5,8	5,8

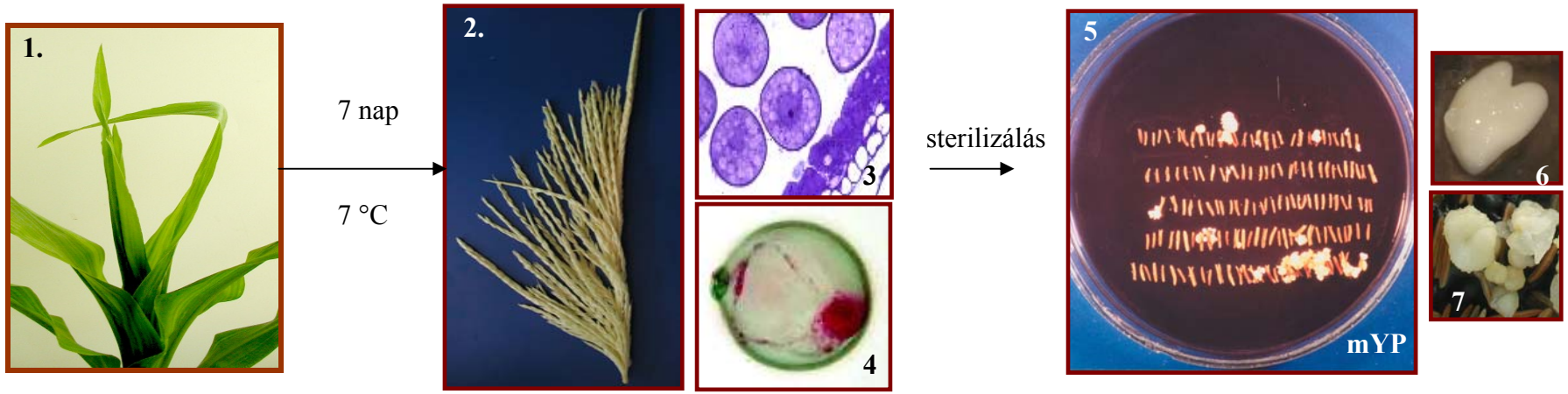
mYP: Genovesi és Collins, (1982) által leírt YP táptalaj alapján módosított táptalaj (Barnabás, 2003)

N_6: Chu (1978) által leírt táptalaj

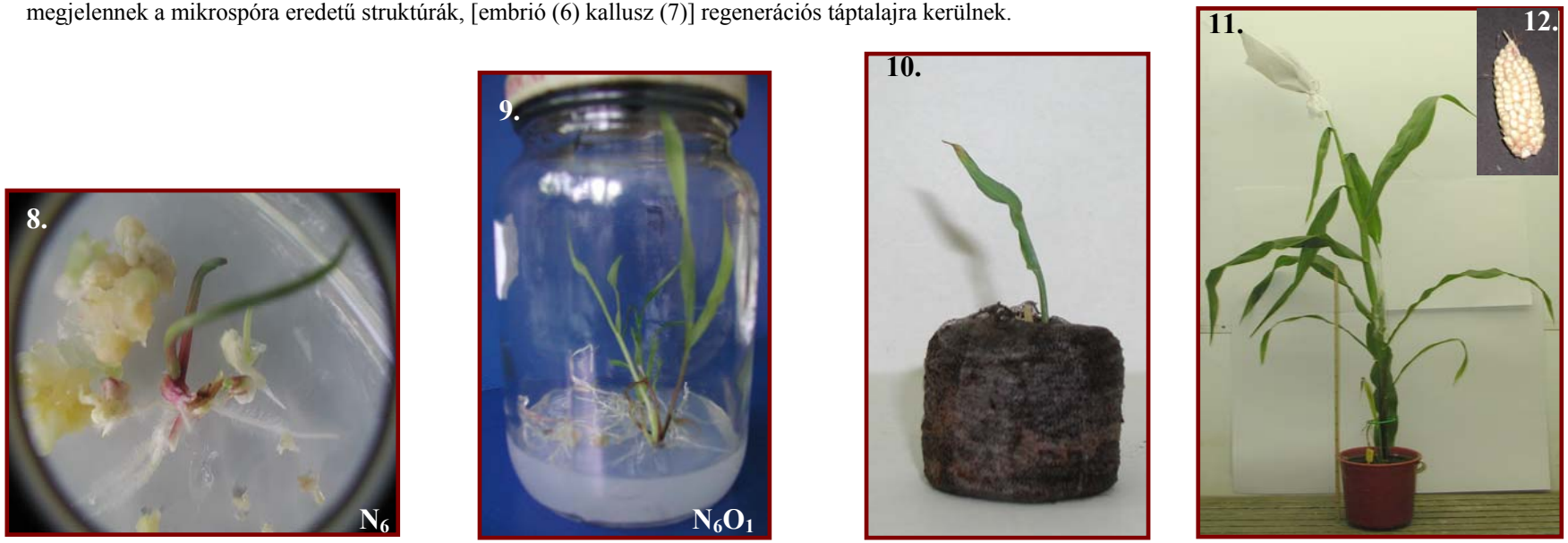
N_6O_1: hormonmentes és 2 %-os cukrot tartalmazó N_6 táptalaj (Barnabás, 2003)

Az indukciós és regenerációs válaszok jellemzéséhez az alábbi mutatókat figyeltük meg és számoltuk ki:

- Portok válasz: leoltott portokok közül hány százalékán találunk MES-t.
- Embrió indukció: 100 leoltott portokról képződött MES száma (darabban adjuk meg).
- Növény regenerációs %: a képződött MES hány százalékából fejlődött kisnövény.
- Embrió : Kallusz arányának alakulása. Ahol embrió: kompakt MES (3. ábra: 6. kép), kallusz: morzsalékos MES (3. ábra: 7. kép).



3. ábra 1-7: Indukciós fázis (1-7): A címer begyűjtésével kezdődik (1.), amit 7 napig 7 °C-on az előkezelés követ (2). Ezalatt a MS elérik a kései egysejtmagvas állapotot (3, 4). Sterilizálást követően a portokok indukciós táptalajra kerülnek (mYP) (5). A portokok sötétben, 29 °C-on, 80%-os relatív páratartalom mellett 4 hétig inkubálódnak, majd amikor megjelennek a mikrospóra eredetű struktúrák, [embrió (6) kallusz (7)] regenerációs táptalajra kerülnek.



3. ábra 8-12: Regenerációs és növénynevelési fázis (8-12). Ebben a fázisban a MES-ák regenerációs táptalajra(N_6) kerülnek (8). A tenyésztés fényen, 26 °C-on, 70%-os relatív páratartalom mellett történik. Amikor a növénykék hajtással és gyökérzettel rendelkeznek, csökkentett cukor és hormon tartalmú táptalajt(N_6O_1) tartalmazó üvegbe kerülnek (9). Amikor megfelelő hajtással és gyökérrel rendelkeznek a növények tápkockába (10), majd vödörbe kerülnek és növénynevelő kamrába (11) öntermékenyítéssel létrejön a DH_0 cső (12).

3.1.3. *In vitro* szelekció

Az *in vitro* szelekció megvalósításához különböző koncentrációban alkalmaztunk ROF-at generáló vegyületeket mind az indukciós, mind pedig a regenerációs táptalajban (Ambrus et al., 2006).

Ezek a következők voltak:

- paraquat (methyl viologen, Sigma M-2254) 0,5, 1, 5 és 10 µM koncentrációban (Pq),
- L-metionin (Reanal) megegyező mennyiségű riboflavinnal kombinálva (Sigma R-4500) 1, 10, 50 és 100 µM koncentrációban (MR),
- menadion (Sigma M-5625) 10, 50, 100, és 1000 µM koncentrációban (MD),
- *tert*-butyl hydroperoxid (Merck S2676045) 100, 1000, és 10000 µM koncentrációban (*t*-BHP).

A szelekciós ágenseket steril szűrőn (Millipore filter 0,45 µm átmérőjű) keresztül adagoltuk a már kihűlt, de még folyékony állagú táptalajhoz. A MD 96% etanolban, míg a riboflavint 1 M NaOH-ban oldottuk fel. A MR tartalmú táptalajra oltott portok tenyészeteket fényen inkubáltuk. Kezelésenként 5000-8000 portokot oltottunk táptalajra (3. táblázat).

3.1.4. Citológiai és szövettani vizsgálatok

A citológiai és szövettani vizsgálatokat 7 ill. 30 napos portok kultúrából származó mikrospórákon ill. mikrospóra eredetű embrió- vagy kallusz-szerű struktúrákon (MES) végeztük. Minden kezelésből 15-15 portokot vizsgáltunk, és a festéseknél mintánként 10 véletlenül kiválasztott látóteret értékeltünk. A vizsgálatokat Olympus BX 51-es kutató mikroszkóppal végeztük, és Olympus Camedia C-3030 digitális fényképezőgéppel rögzítettük az eredményeket.

A mikrospórák életképességét fluoreszcein diacetát (FDA, Serva 21575) festéssel (Widholm, 1972) állapítottuk meg. A portokokat tárgylemezre helyeztük, és 200 µl 0,3 M mannitol oldatban maceráltuk. A festéshez az FDA törzsoldatból (2 mg/ml 100%-os aceton) 10 µl-t 1 ml 0,3 M mannitol oldatba tettünk, majd ebből egy cseppet adtunk a mikrospórákhoz, és fedőlemezzel letakartuk.

A sejtmagok és az embriófejlődés vizsgálatát 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) festéssel végeztük (Vergne et al., 1978). A festés során 100 µl 0,1%-os Triton X-100 tartalmú 1 µg/ml DAPI oldatot adtunk a mannitolban lévő mikrospórákhoz, majd fedőlemezzel letakartuk. Megfigyeltük, hogy a kukorica mikrospóráinak festéséhez 5-10 perc festési idő szükséges. Mindkét festési eljáráshoz a fent említett kutató mikroszkópot használtuk.

A szövettani vizsgálatokhoz a 30 napos portok kultúrából származó struktúrákat műgyantába ágyaztuk. Ehhez a Spurr, (1969) által leírt protokoll szerint a mintákat 2,5%-os

glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,2) 2 napig 4 °C-on fixáltuk, majd 2x 40 percig mostuk 0,1 M foszfát pufferben, ezután 5%-os ozmium tetra-oxidban fixáltuk, majd 2 x 40 perc foszfát pufferes mosás után a víztelenítési procedúra következett szobahőmérsékleten: 25%-os etanol (30 perc), 50%-os etanol (30 perc), 70%-os etanol (egy éjszakán át), 90%-os etanol (30 perc), 96%-os etanol (30 perc), 100%-os etanol (2 x 30 perc). Ezután a gyantába való beágyazást 4°C-on végeztük: Spurr gyanta és alkohol 1:3 arányú elegyében 16 órán át, Spurr gyanta és alkohol 1:1 arányú elegyében 16 órán át, majd Spurr gyanta és alkohol 3:1 arányú elegyében 16 órán át. Végül tiszta Spurr gyantában 3 napig tároltuk a mintákat, majd minden egyes mintát felcímkézve szilikon mintatartóba raktunk, és 2 napig 60-70 °C-on szárítószekrényben polimerizáltunk.

A minták félvékony (1,0 μm) metszését Reichert-Jung Ultracut E ultra mikrotómmal (Leica Mikrosysteme, Bensheim, Germany) végeztük. A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a metszeteket 0,5%-os toluidin kék oldattal festettük. A festéshez a metszetekre Toluidin kék oldatot (Sárkány és Szalai, 1957) cseppentettünk, majd metszetmelegítőn 20 másodpercig melegítettük a mintát, végül desztillált vízzel lemostuk a festéket. A metszeteket száradás után DEPEX-szel fedtük le és a fent említett fénymikroszkóppal vizsgáltuk, majd digitális fényképezőgéppel dokumentáltuk.

3.2. DH_1 utódnövények előállítása, növényfiziológiai és biokémiai tesztelése

3.2.1. DH_1 utódok felnevelése

A fitotronban felnevelt DH_0 növények öntermékenyítésével előállított szemtermését a fent említett módon csíráztattuk és növénynevelő kamrában neveltük fel a DH_1 növényeket a fiziológiai vizsgálatokhoz (ld. 3.1.1.). Vizsgálatainkat a már teljesen kifejlődött, de még az öregedés jeleit nem mutató leveleken a 4. ábrán bemutatott fenológiai fázisban végeztük, és a virágzás előtt befejeztük.

4. ábra: A fiziológiai vizsgálatokhoz felhasznált növények.

A fiziológiai és biokémiai tesztekbe bevont genotípusok az alábbi táptalajról származtak:

A18 hibrid esetében:

- 0,5 µM Pq: P1, P3, P4, P6, P7, P10, (továbbá P8, P9, P11, P13 amelyek magjai nem csíráztak ki, ezért ezeket nem tudtuk tesztelni).
- 1 µM Pq: P2, P5, P12, P14 és P15.

H1 hibrid esetében:

- 0,5 µM Pq: P1, P3, P4, P6, P7, P10, P12, P13, P14, P15.
- 1 µM Pq: P2, P5, P8, P9, P11, P16.

H2 hibrid esetében:

- 0,5 µM Pq: P3, P5, P7.
- 1 µM Pq: H1, H2, H4, H6.

H3esetében:

- 0,5 µM Pq: H1, H2, H4, H6.
- 1 µM Pq: H3, H5.

3.2.2. A növények kezelése

A növények oxidatív stressz-toleranciáját úsztatásos kísérletekben vizsgáltuk. Ehhez a növényekből 1,3 cm átmérőjű levélkorongokat vágtunk ki dugófúróval, melyeket 50 µM Pq tartalmú Tris-HCl (50 mM, pH 7,6) oldatokban (1 ml/levélkorong) úsztattuk. A kontroll kezelés nem tartalmazta a Pq-ot. A leveleket kontroll ill. Pq-ot tartalmazó oldattal való infiltrálás után 4 ill. 24 óráig úsztattuk 400 µmol m^{-2} s^{-1} PAR megvilágítás mellett (Darkó et al., 2009). Az így kezelt leveleket használtuk a fiziológiai és biokémiai mérésekhez.

3.2.3. A klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérése

A levelek klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paramétereit PAM 2000 fluoriméterrel (Walz, Effeltrich, Germany) mértük. A levélkorongokat 4 órán keresztül úsztattuk a 50 µM koncentrációjú Pq tartalmú pufferben (ld. 3.2.2.), majd 30 perces sötétadaptálás után először meghatároztuk a levelek minimális fluoreszcencia értékét (F_0), majd a maximális fluoreszcencia (F_m) mérése következett, amelynek gerjesztése 2000 µmol m^{-2} s^{-1} PAR értéket meghaladó 1,0 s időtartamú fehér fény felvillanásával történt. A mért paraméterekből meghatároztuk a II. fotokémiai rendszer (PS II) optimális kvantum hatásfokát (F_v/F_m), ahol $F_v/F_m = (F_m-F_0)/F_m$ (van Kooten és Snel 1990).

3.2.4. A klorofill (a+b) tartalom meghatározása

A minták 24 órás kezelése után spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk klorofill (a+b) tartalmukat (Lichtenthaler, 1987). Minden kísérlethez 3-3 levélkorongot használtunk, amelyeknek

megmértük a tömegét, majd 2,5 ml 80%-os acetonnal extraháltuk a pigmenteket. A mintákat 3000 fordulat/perc fordulatszámon 5 percig 4 °C-ra hűtött HARRIER 18/80R centrifugában centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, az üledékhez 2,5 ml 80%-os acetont adtunk, és centrifugáltuk a fentiek szerint. A felülúszókat összegyűjtöttük, és 80%-os acetonnal feltöltöttük 10 ml végtérfogatra. Ezeket a lépéseket sötétített helységben végeztük, a mintákat végig sötétben, jégen tároltuk, és a feltárást követő 1 órán belül lemértük. A méréseket Cary-100 UV-Vis spektrofotométerrel (Varian, Mulgrave, Australia) végeztük, 646,8, 663,2 és 750,0 nm hullámhosszokon. A kapott eredményekből a klorofill (a+b) tartalmat μg/g friss tömegre vonatkoztatva határoztuk meg (Lichtenthaler, 1987).

3.2.5. Az ionkiáramlás mérése

Az ionkiáramlás meghatározása a levélkorongok 24 órán keresztül történő úsztatása után az oldat ionvezető képességének mérésével történt. A vizsgálatokhoz 30-30 levélkorongot (30-30 ml) oldatot használtunk kezelésenként. Az oldat ionvezető képességét Automatic Saeed Analyser ASA610 (Agro Sciences, USA) típusú konduktométerrel mértük meg (Darkó et al., 2009).

3.2.6. Rezisztencia faktorok számítása

Az adatok könnyebb értékelhetősége és a DH vonalak jobb összehasonlíthatósága érdekében a fiziológiai mérések eredményeiből rezisztencia faktort (Rf) számítottunk.

Viszonyításként a nem szelektált DH genotípust használtuk, melynek Rf értéke 1. Az ennél magasabb Rf érték azt mutatja, hogy az adott (szelektált) vonal nagyobb toleranciával rendelkezik a Pq okozta oxidatív stresszel szemben a viszgált paraméter tekintetében, mint a nem szelektált DH genotípus. Minél nagyobb ez az érték, annál nagyobb az adott vonal oxidatív stressz-toleranciája.

Klorofill *a* fluoreszcencia indukciós paraméter rezisztencia faktorának meghatározása az alábbi képlet alapján történt:

$$Rf_{Fv/Fm} = P_x[(Fv/Fm)_{Pq}/ (Fv/Fm)_P]/ DH[(Fv/Fm)_{Pq}/ (Fv/Fm)_P]$$

Ahol Fv/Fm = a PS II optimális kvantumhatásfoka, [$(F_{max}-F_0)/F_{max}$ lásd: 3.2.3. pont]

DH = nem szelektált (kontroll) DH vonal,

P_x = Pq -tal szelektált genotípusok,

P = úsztatásos kísérletben pufferben mért érték,

Pq = Pq tartalmú oldatban mért jellemző értékek.

Vagyis a Pq tartalmú oldatban kezelt levélkorongokon mért Fv/Fm paraméter értékét osztottuk a kontroll (pufferben) körülmények között tartott levélkorongokon mért Fv/Fm értékével. A rezisztencia faktrort az egyes Pq-tal szelektált genotípusok, ill. a nem szelektált DH (kontroll) genotípus így számolt eredményeinek hányadosa adja.

A klorofill tartalom eredményei alapján számolt rezisztencia faktor meghatározása az alábbi képlet alapján történt:

$$Rf_{Klo} = DH(Klo_P - Klo_{Pq})/P_x(Klo_P - Klo_{Pq}),$$

Ahol Klo = a levélkorongok klorofill (a+b) tartalma (μg/g friss súlyban).

Az ionkiáramlás mérésének eredményei alapján számolt rezisztencia faktor meghatározása az alábbi képlet alapján történt:

$$Rf_{ionvez} = DH(ionvez_{Pq} - ionvez_P)/P_x(ionvez_{Pq} - ionvez_P),$$

Ahol ionvez. = az oldat ionvezető képessége, melybe a levélkorongokat helyeztük.

Az utóbbi két esetben a képletek további értelmezése és rövidítései az Fv/Fm leírásánál megegyezők (lásd fent).

3.2.7. Antioxidáns enzimek aktivitásának mérése

Kontroll és Pq kezelt levélkorongokon megmértük egyes antioxidáns enzimek aktivitását. Ezek a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a glutation reduktáz (GR), a glutation-S-transzferáz (GST), az aszkorbát peroxidáz (APX), és a kataláz (Cat) enzimek voltak. Négy órás úsztatásos kezelés (ld. 3.2.2.) után a levélkorongokat dörzsmozsárban eldörzsöltük 1:5 (mg minta/ml puffer) arányban alkalmazott preparáló pufferrel (100 mM Na-K foszfát puffer, pH 7,5, 0,2 mM dietiléntriaminpentaecetsav, 4%-os polyvinylpolypyrrolidon, Sigma P-6755). A homogenátumot Eppendorf™ csövekbe töltöttük, majd 15000 fordulat/perc fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk 4 °C-ra hűtött HARRIER 18/80R centrifugában. A felülúszót pipetta segítségével egy másik eppendorfba raktuk, és a mérésekhez a továbbiakban ezt használtuk. A mérések alatt a mintákat jégen tartottuk. A méréseket pedig szobahőmérsékleten végeztük.

A SOD (EC 1.15.1.1.) enzim aktivitását spektrofotometriásan határoztuk meg Paoletti és Mocali (1990) módszerének módosításával. A kontroll reakció minden esetben 800 μl trietanolamin–dietanolamin puffert (100-100 mM, cc. HCl-dal beállított pH 7,4), 4 μl NADH-t (7,5 mM), 25 μl EDTA-$MnCl_2$-oldatot (100 mM EDTA és 50 mM $MnCl_2$) és 100 μl növényi kivonatot tartalmazott. Az abszorbanciát 340 nm-en 5 percig mértük, majd 100 μl 10 mM 33 merkaptoetanol-oldatot adtunk a küvettákba. Az abszorbancia csökkenését további 20 percen keresztül mértük. Kalibrációs görbét SOD-oldattal (Sigma-Aldrich) állítottunk elő.

A GR (EC 1.6.4.2) aktivitását Smith és mtsai., (1988) szerint határoztuk meg: a 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesav) (DTNB) szubsztrát redukcióját 412 nm-en 2 percig mértük, melyet az enzimműködés során keletkezett redukált glutation (GSH) okozott. Az 1 ml végtérfogatú reakcióelegy a következőket tartalmazta: 100 mM Na-K foszfát puffert (pH 7,5), 0,2 mM dietiléntriaminpentaecetsavat (Sigma D-6518), 0,75 mM DTNB-t (Sigma D-8130), 0,1 mM NADPH-t (Fluka 93220), és 0,5 mM oxidált glutationt (GSSG, Fluka 49740). A reakciót 50 μl

növényi kivonattal indítottuk, és Cary-100 UV-Vis spektrofotométerrel (Varian, Mulgrave, Australia) mértük.

A GST (EC 2.5.1.18) aktivitását Habig és mtsai., (1974) szerint határoztuk meg. Az enzim aktivitását 340 nm-en 2 percig mértük. A reakcióelegy végtérfogata 500 µl volt, és tartalma 100 mM Na-K foszfát pufferben (pH 7,5) 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzidin (CDNB, Sigma 138630) és 5 mM GSH (Fluka 49750) volt. A reakciót 10 µl növényi mintával indítottuk.

Az APX (EC 1.11.1.11) meghatározása Nakano és Asada, (1987) leírása alapján történt, a növényi minta feltárásánál a puffer 2 mM aszkorbinsavat is tartalmazott (Uotila, 1995). A reakcióelegy végtérfogata 2 ml volt, és 50 mM Na-K foszfát pufferben (pH 7,5) 0,5 mM aszkorbinsavat, 0,1 mM hidrogénperoxidot és 50 µl növényi mintát tartalmazott. A reakciót a hidrogénperoxiddal indítottuk és szobahőmérsékleten 290 nm-en 2 percig mértük.

A Cat (EC 1.11.1.6) meghatározása Aebig, (1983) leírása alapján történt, a hidrogénperoxid fogyását követve nyomon. A reakcióelegy végtérfogata 3 ml volt, és 100 mM Na-K foszfát pufferben (pH 7,5) 10 mM hidrogénperoxidot és 60 µl növényi mintát tartalmazott. A reakciót a hidrogénperoxiddal indítottuk és szobahőmérsékleten 240 nm-en 2 percig mértük.

3.2.8. Toxikus oxigén formák *in situ* kimutatása

Az oxidatív stressz hatására felszabaduló toxikus oxigén formák, szinglet oxigén, szuperoxid gyök ill. hidrogénperoxid kimutathatók *in situ* festési eljárásokkal. Ehhez a levélkorongokat 24 óra megvilágítás mellett úsztatásos kísérletekben kezeltük (ld. 3.2.2.), majd *in situ* festési eljárásokkal mutattuk ki a felhalmozódott ROF-at.

A szuperoxid gyökök felhalmozódása jól láthatóvá tehető nitrotetrazólium-kékkel (NBT, Sigma 6876) való festéssel, ugyanis a világossárga NBT festék kék színű formazán csapadékot képez a szuperoxid gyökkel reagálva (Fryer et al., 2002). A leveleket 6 mM NBT-vel infiltráltuk, majd 8 órát festettük. Amikor a kék csapadék megjelent, kivontuk a klorofillt a levelekből annak érdekében, hogy ne zavarja a detektálást. Ehhez tejsav:glicerin:etanol (1:1:4) arányú elegyében infiltráltuk a levélkorongokat, majd 5 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyeztük (Fryer et al., 2002).

A H_2O_2 jelenlétét DAB (3,3'-diaminobenzidin; Sigma D-8001) festéssel mutattuk ki (Fryer et al., 2002). A stressz hatására felszabaduló H_2O_2 egy barnás színű polimerizációs terméket képez 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB, Sigma D-8001) (Thordal-Christensen et al., 1997). A kezelt levélkorongokat 5 mM DAB (pH 3,8) oldatban infiltráltuk, majd 2 óra festést követően, amikor már megjelent a sötétbarna csapadék, a jobb detektálhatóság érdekében a fent említett módon kivontuk a levelekből a klorofillt.

A megfigyelést Olympus BX 51-es kutatómikroszkóppal végeztük, és digitális fényképezőgéppel rögzítettük.

3.3. Csírázáskori hidegtűrési vizsgálatok

A csírázáskori hidegtesztet (ún. ’cold-teszt’) Hercegh, (1978), Marton, (1992) és Marton és Kőszegi, (1997) által leírtak szerint végeztük, steril körülmények között. A fitotronból származó DH_1 magokat először 70%-os etanollal mostuk, majd steril vízzel öblítettük. Ezután 30 percig rázattuk a kereskedelmi hypo 20%-os oldatában (benne 0,1%-os Tween 20), ezután háromszor öblítettük steril vízzel. A fertőtlenítésre azért volt szükség, mert a hideg hatására nagyon elhúzódott a csírázás, ami fertőzéssel járt együtt. A magokat nedves szűrőpapírt tartalmazó Petri csészékben (4x10 mag) csíráztattuk (5. ábra) két hőmérsékleten: 22 °C-on és hidegben, 8 °C-on fényen. Megfigyeltük a csírázáshoz szükséges időt (a kísérlet elindításától a magvak csírázásáig eltelt napok száma), a csírázási %-ot (a kikelt magok százalékos aránya a csírázásra lerakott magokra vonatkoztatva) mindkét hőmérsékleten. A kapott eredményekből Herczegh (1978) szerint, meghatároztuk a vonalak csírázási indexét (CsI) (a maximális kelési százalék és a csírázásig eltelt napok számának hányadosa).

Csírázási index= maximális kelési százalék / a csírázásig eltelt napok száma.

5. ábra: Kukorica magok csíráztatása.

3.4. Hidegtűrési faktor számítása

Hasonlóképpen az Pq indukálta oxidatív stressz kezelésekhez, az DH vonalak jobb összehasonlíthatósága és az adatok könnyebb értékelhetősége érdekében a hidegkezelés eredményeiből hidegtűrési faktort számítottunk. Ehhez a csírázási index (CsI) értékeit használtuk:

$$\text{Hidegtűrési faktor} = Px\ (CsI_{T8\,°C} / CsI_{T22\,°C}) / DH\ (CsI_{T8\,°C} / CsI_{T22\,°C})$$

Ahol:

DH = nem szelektált (kontroll) DH vonal,

P_x = Pq szelektált genotípusok.

3.5. Szántóföldi tesztek

A kísérleteket három ismétlésben véletlen blokk-elrendezésben vetettük el a „Tükrösi" tenyészkertben. A kísérleti terület tápanyagban gazdag, rendszeresen istálló- és műtrágyázott, valamint gyomirtással jó kultúr állapotban tartott erdőmaradványos csernozjom volt. A kísérleteket kézi vetése vetőpuskával történt 2006. május 02-án, 2007. április 27-én és 2008. április 30-án. A vizsgált genotípusokat a tenyészkertben optimális termesztési körülmények között (80x26 cm, sor és tőtávolságra, 4,8 növény/m^2) neveltük. A talajművelési (mélyszántás, kombinátorozás, hengerezés), növényápolási (öntözés, talajlazítás) és növényvédelmi (gyomirtás, inszekticides kezelés) munkák a tenyészkerti kísérletek és nemesítési programok részletes előírásai szerint történtek, melyet az MTA ATK MGI Kukoricanemesítési Osztály munkatársai végeztek el. A kísérlet alapanyagául szolgáló kukoricaszemeket fitotronban állítottuk elő és 4 °C-on tároltuk, minden évben ugyanabból a mintából származó szemeket vetettük el.

A szántóföldi vizsgálatok során felvételeztük a csírázási százalékot, a növénymagasságot, az 50%-os hím- és nővirágzást (vetéstől a virágzásig eltelt napok számával kifejezve), a termékenyülési százalékot (a tényleges és potenciális termékenyülés aránya), valamint a szemszámot.

3.6. Statisztikai értékelés

A legtöbb esetben az adatok kiértékelése (átlag, szórás) excel (2007) program segítségével történt. A kezelés hatását szignifikánsnak tekintettünk, amennyiben a szórások (kontroll és kezelt növény között) nem voltak átfedők. A genotípusok közötti különbségek elemzésére t-próbát alkalmaztuk (ezeket jelöltük * ill **-gal). Ahol szükséges volt (antioxidáns enzimek hatásának elemzése), az adatok statisztikai értékeléséhez variancia analízist (Tukey post hoc test, (Statistica, 6.1. statsoft) alkalmaztunk.

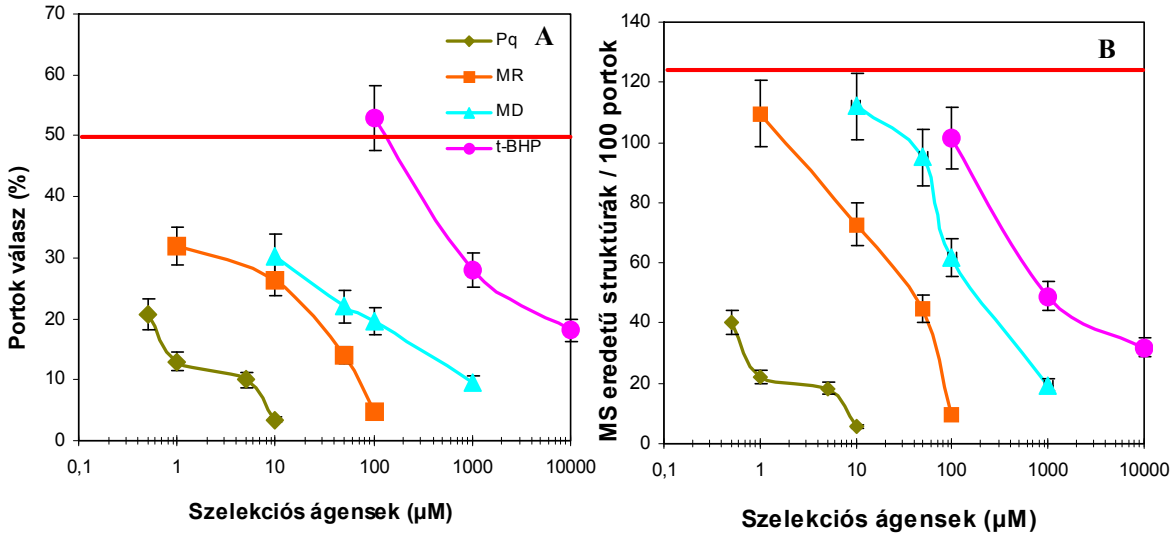
4. EREDMÉNYEK

4.1 Mikrospóra eredetű növények előállítása és szelekciója oxidatív stresszt indukáló vegyületek felhasználásával

Az egyes szelekciós ágenseknek a mikrospórák sporofitikus fejlődésére gyakorolt hatását a mikrospórák életképességének, a képződött struktúrák számának, típusának (megjelenési formájának) változásán keresztül, valamint citológiai és szövettani vizsgálatokkal követtük nyomon. Meghatároztuk továbbá a növények regenerációs képességét, s az önmegtermékenyítéssel előállított fertilis növények számát. Eredményeinket a következőkben összesítjük.

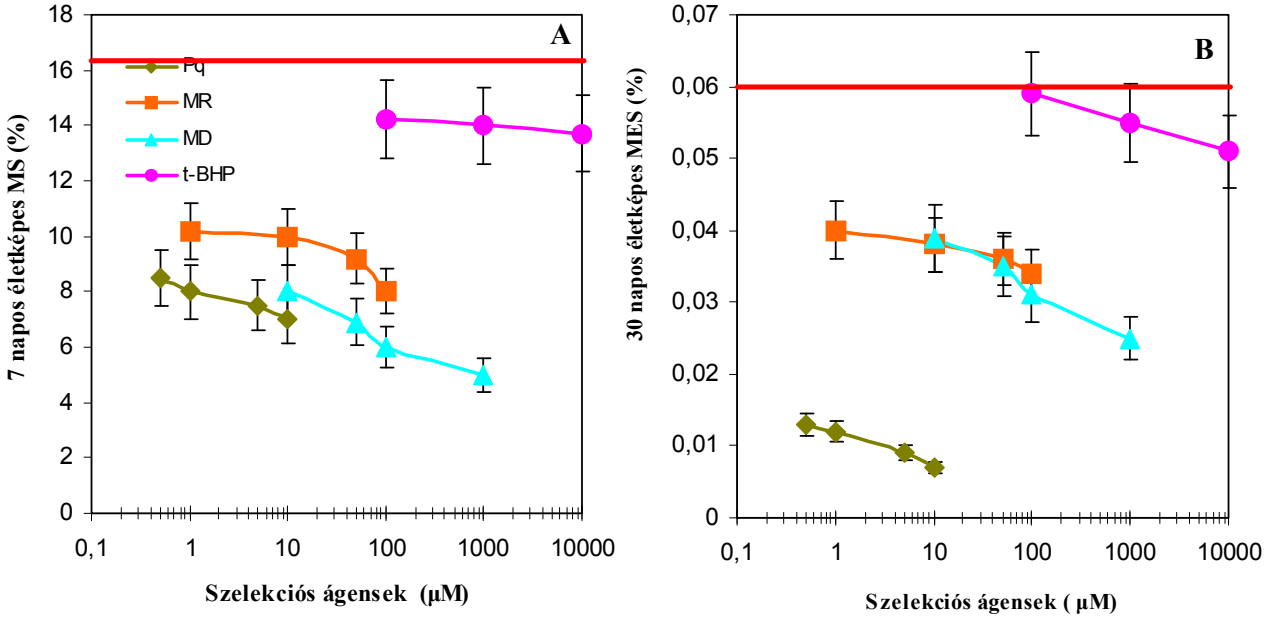
4.1.1. A szelekciós ágensek hatása a mikrospórák androgenetikus fejlődésére a modell (A18) genotípus esetében

Kísérleteinkben a kontroll (a 6. ábrán piros vonal jelöli), azaz szelekciós ágenst nem tartalmazó táptalajon alkalmazott portok kultúrás tenyészetekben a portokok mintegy 50%-án megfigyelhető volt különböző kallusz és embriószerű struktúrák megjelenése (6. A ábra, portok válasz %). Mivel egy portokon akár több mikrospóra eredetű struktúra (MES) is kifejlődhet, a MES gyakorisága akár 100% felett is lehet. A kontroll esetben ez meghaladta a 124%-ot (piros vonal, 6. B ábra). Ezzel a szemben a különböző szelekciós ágensek jelentős mértékben csökkentették úgy a portok választ (%), mint a MES számát (6. A és B ábra). Legdrasztikusabb hatást a Pq fejlette ki a mikrospóra indukcióra. Már igen kis koncentrációban (0,5-10 μM) is jelentős mértékben gátolta portokokban kifejlődő struktúrák megjelenését. A MR és MD ettől magasabb (1-100 μM, ill. 10-1000 μM) koncentráció tartományban okozott csökkenést. A legnagyobb koncentrációban (1000-10000 μM) a *t*-BHP-t kellett alkalmaznunk ahhoz, hogy a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabb portok választ érjünk el, remélve ezzel a sikeres szelekciót. Sőt a legkisebb alkalmazott koncentráció (100 μM) esetében sem a portokválaszokban, sem a mikrospóra eredetű struktúrák számában nem volt szignifikáns különbség a szelekciós ágenst nem tartalmazó kultúrákhoz képest.



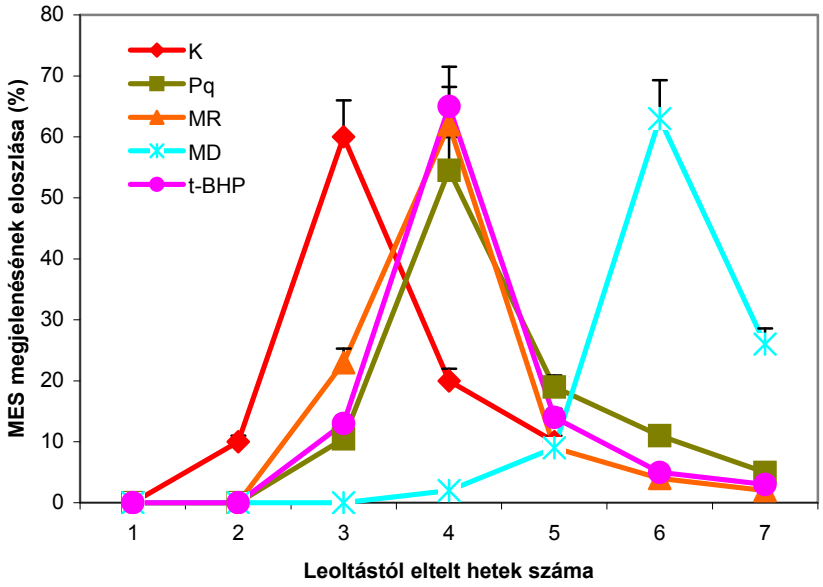
6. ábra: Különböző koncentrációjú szelekciós ágensek hatása az A18 kukorica portok válasz (A) és a MES indukciójának (B) gyakoriságára. A szelekciós ágenst nem tartalmazó kontrollok vonatkozó értékeit (50±5% ill. 124±5%) piros vonal jelöli.

FDA festés segítségével 7 és 30 napos portok kultúrából származó struktúrákban meghatároztuk az életképes mikrospórák és MES számát. A szelekciós ágensek minden esetben csökkentették mind a 7 (7. A ábra) illetve mind a 30 (7. B ábra) napos portok kultúrából származó struktúrák életképességét. A koncentráció növekedésével csökkent az életképes mikrospórák ill. MES száma (7. A és B ábra). A legtoxikusabb szelekciós ágensnek ezen vizsgálataiknál is a Pq bizonyult. A legnagyobb koncentrációban a *t*-BHP-t kellett alkalmaznunk az életképesség csökkenéséhez, a kontroll adatokat piros vonallal jelöltük (7. A és B ábra).



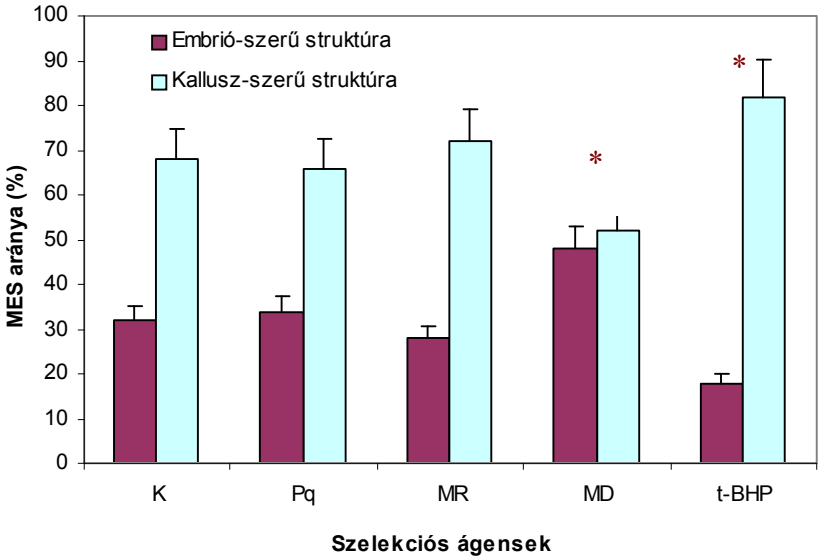
7. ábra: Különböző koncentrációban alkalmazott szelekciós ágenseket tartalmazó táptalajra oltott, 7 (A) és 30 (B) napos portok kultúrából származó A18 mikrospórák (MS) ill. mikrospóra eredetű struktúrák (MES) életképessége (meghatározása FDA festéssel történt). A szelekciós ágenst nem tartalmazó kontrollok vonatkozó értékeit (16,6±5% ill. 0,062±5%) piros vonal jelöli.

Megfigyeltük továbbá, hogy a szelekciós ágensek hatással voltak az embrió- és kallusz-szerű struktúrák megjelenési idejére is (8. ábra). A kontroll táptalajon a MES mintegy 60%-a a leoltást követő 3. héten jelent meg. Ettől 1 héttel később, azaz az inkubáció 4. hetében jelent meg a Pq, a MR és a *t*-BHP tartalmú táptalajon a MES szintén megközelítőleg 60%-a. A legnagyobb különbséget a kontrollhoz képest a MD tartalmú táptalaj esetében tapasztaltuk: itt a MES túlnyomó része csak az inkubáció 6. hetében jelent meg, ami 3 hetes késést jelentett a kontrollhoz képest (8. ábra továbbá ez a késés jól megfigyelhető az 10. D és I ábrán).



8. ábra: Mikrospóra eredetű struktúrák (MES) megjelenésének eloszlása az A18 kukoricában a portok leoltásától eltelt idő függvényében.

Tapasztalataink szerint egyes ROF hatással voltak a képződő MES megjelenési formáinak (embriószerű és kallusz-szerű struktúrák) kialakulására is. Kontroll azaz nem szelekciós körülmények között az A18 kukorica hibrid esetében az embriószerű és kallusz-szerű struktúrák átlagosan ~30:70 arányban fordultak elő. A Pq és a MR ettől lényeges eltérést nem okozott, de a *t*-BHP és a MD kezelés hatására ez az arány statisztikailag igazolhatóan jelentős mértékben eltért. Megfigyeltük, hogy *t*-BHP hatására a kallusz-szerű struktúrák aránya (82%), míg MD hatására az embrió-szerű struktúrák aránya (48%) növekedett meg szignifikánsan a kontrollhoz képest (9. ábra).

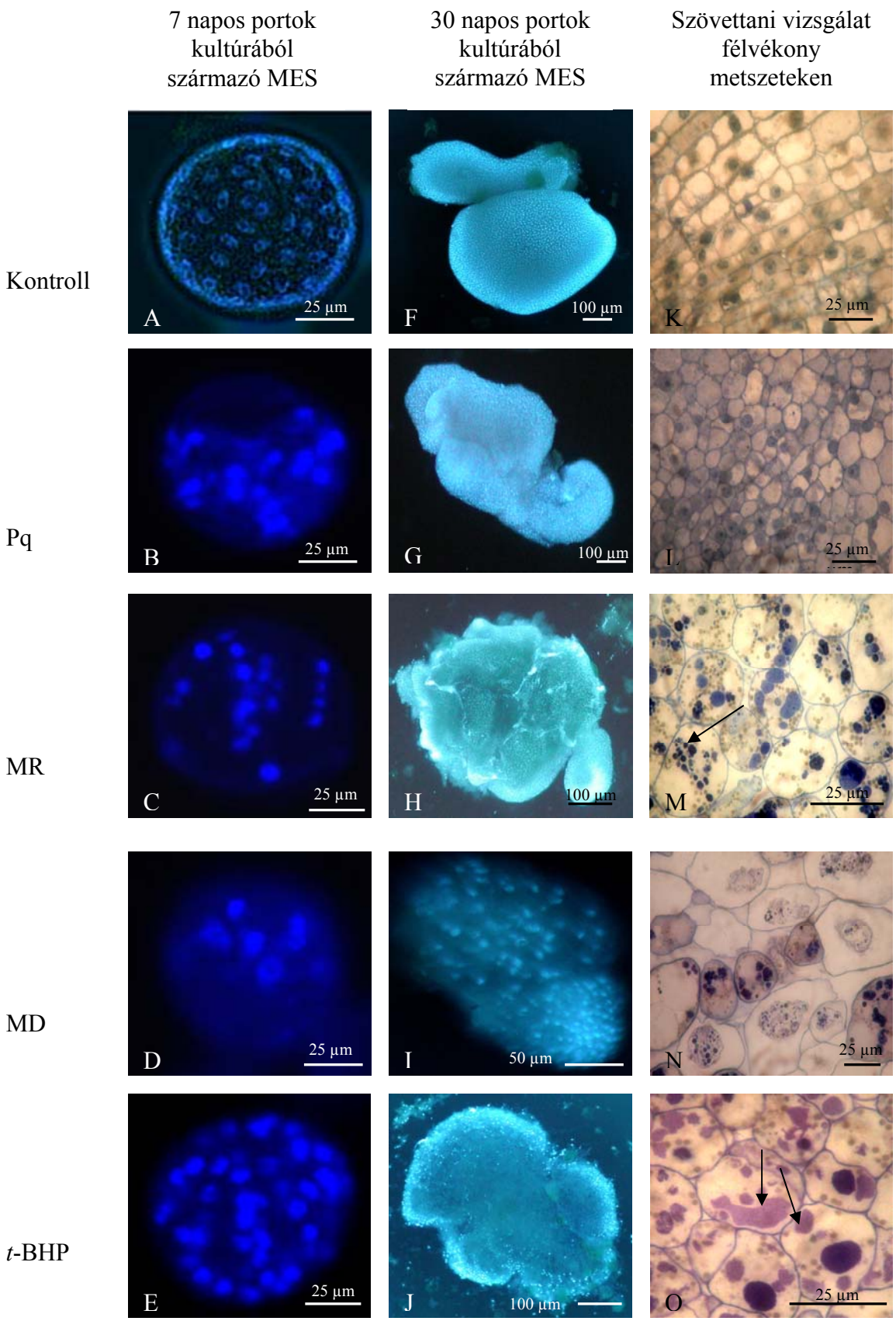


9. ábra: Mikrospóra eredetű struktúrák (MES) típusainak gyakorisága (átlag ± 5%) a teljes inkubációs idő (7 hét) végén szelekciós ágensenként az összes koncentrációt összevonva. A szignifikáns (p<0,01) különbséget * jelöli.

Ezen eredményeinket jól szemléltetik, illetve kiegészítik a citológiai és szövettani vizsgálataink. A kontroll, szelekciós ágenst nem tartalmazó indukciós táptalajról származó portoktenyészetekben 7 nappal a portokok leoltása után szépen fejlett több sejtes mikrospórákat figyeltünk meg (10. ábra A). A legtöbb szelekciós ágens erőteljes kromoszóma kondenzációt és degenerált sejtmagok képződését idézte elő a mikrospórákban, ami különböző mértékű sejtdegradációkhoz vezetett (10. ábra Pq (B), MR (C), MD (D) és *t*-BHP (E)). A tenyésztés későbbi szakaszában (30 nap elteltével) a portokokban, ill. azok felületén, számos MES-t találtunk mindenféle abnormális elváltozás nélkül (10. F ábra, itt egy ikerembriót látunk) a kontroll esetében. A Pq és a MD sejtelhalást is indukált a mikrospórák további fejlődése során, ezáltal gyakoribbá váltak az amorf rendellenes embriók (10. G és I ábra). A 10. ábrán is jól látható, hogy a MD késleltette az embriószerű struktúrák megjelenését (10. I ábra), melyek sokkal fejletlenebbek voltak a többi struktúrához képest, megerősítve ezzel a korábbi megfigyelést (8. ábra). A 10. J. ábra pedig egy tipikus *t*-BHP tartalmú táptalajon nevelkedett kalluszt mutat, melyen jól látszik a nem szabályos kallusz struktúra. A 30 napos portoktenyészetekből származó minták fél-vékony metszeteinek tanulmányozásakor a kontroll esetében már szövet differenciálódást tapasztaltunk (10. K. ábra).

Ezzel szemben a kezeléseknél a struktúrák nem voltak olyan fejlettek, mint a kontroll esetében, ami ugyancsak alátámasztja a 8. ábra megfigyeléseit, miszerint a szelekciós ágensek hatására egy vagy három héttel később jelentek meg a MS eredetű struktúrák. Pq kezelés hatására heterogén sejtpopulációt tapasztaltunk, ami jellemző volt a legtöbb mintára (10. L. ábra). Az MR, tartalmú táptalajról származó kalluszok toluidin kékes festése után lipidcseppek felhalmozódását figyeltük meg (10. M. ábra, nyíllal jelölve). Az MD kezelés hatására nagy sejtmagokat ill. erősen festődő foltokat láthattunk (10. N. ábra), míg a *t*-BHP kezelés következtében számos nagy kiterjedésű,

toluidin kékkel erősen festődő membránnal körülhatárolt sejtorganellumok jelentek meg a sejtekben (10. O. ábra, nyíllal jelölve).

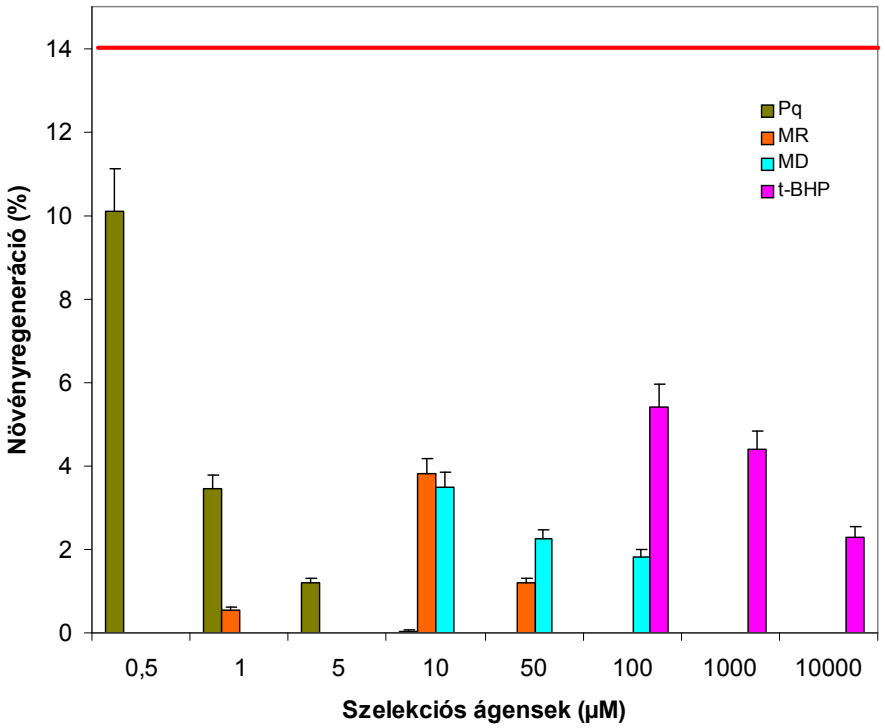


10. ábra: Szelekciós ágenseket tartalmazó A18 portok kultúrából származó 7 napos MS-ák (A-E) és 30 napos MES (F-J) citológiai vizsgálata DAPI festéssel, valamint 30 napos portok kultúrából származó struktúrák szövettani vizsgálata (K-O) félvékony metszeteken, Toluidin kék festéssel. A, F és K: kontroll táptalajról; B, G és L: 1 µM Pq tartalmú táptalajról; C, H és M: 10 µM MR. tartalmú táptalajról; D, I és N: 0,1 mM MD tartalmú táptalajról; és E, J és O: 10 mM *t*-BHP tartalmú táptalajról .

4.1.2. A szelekciós ágensek hatása a növényregenerációra és a fertilitásra. Az *in vitro* szelekció eredménye a modell (A18) genotípus esetében

A mikrospóra eredetű struktúrákat (MES) a megjelenésük után regenerációs táptalajra helyeztük és meghatároztuk a növényregenerációs képességet kontroll körülmények között, illetve a szelekció hatására. A szelekciós ágenst nem tartalmazó táptalajról származó MES-ák növényregenerációs képessége átlagosan 14% volt. (11. ábra piros vonal és 3. táblázat). Az alkalmazott szelekciós ágensek összes koncentrációjánál a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt a regenerációs százalék. Közülük a legnagyobb regenerációs százalékot a Pq 0,5 µM kezelés esetében tapasztaltunk és a koncentráció növekedésével a növényregeneráció csökkent. Ez elmondható a többi szelekciós ágens esetében is, ahogy növekedett az alkalmazott koncentráció, úgy csökkent a növényregenerációs százalék. Azonban, megfigyeltük, hogy az MR 1µM kezelés esetében a növényregenerációs százalék alacsonyabb volt mint a 10 µM kezelés esetében.

A Pq 10 µM, MR 100 µM és MD 1000µM kezelések esetében a növényregenerációs százalék az ábrázolhatóság határán volt (ezek voltak a legnagyobb koncentrációk az adott kezelés estében).



11. ábra: Különböző koncentrációjú szelekciós ágensek hatása az A18 kukorica növényregenerációs gyakoriságára. A szelekciós ágenst nem tartalmazó kontroll értékét (14%±5 %) piros vonallal jelöltük.

A regenerálódott növények egy része még gondos nevelés ellenére is elpusztult, a megmaradók egy része pedig nem volt fertilis. Azt, hogy a regenerálódott növényből mennyi fertilis DH növényt sikerült előállítanunk a 3. táblázatban mutatom be. A Pq kezelés esetében az

alkalmazott négyféle koncentráció (0,5; 1; 5; 10 µM) közül csak a két legkisebb koncentráció esetében sikerült fertilis növényt előállítani (3. táblázat).

A MR kezelésnél 10 µM koncentráció bizonyult a fertilis növény előállítás szempontjából a legsikeresebbnek. A MD kezelésnél az alkalmazott négy koncentráció közül is csak egy esetben (100 µM) tudtunk fertilis növényt előállítani. A *t*-BHP kezelésnél az összes alkalmazott koncentrációnál sikerült növényt előállítanunk. Ebben az esetben a növények számában megmutatkozik az alkalmazott koncentráció hatása: a legkisebb (100 µM) koncentrációnál sikerült a legtöbb (8 db), az 1000 µM koncentrációnál 2 db fertilis növényt regeneráltunk, míg a legmagasabb koncentráció esetében bár sikerült növényt regenerálnunk, azonban azok nem voltak fertilisek.

Az *in vitro* szelekciós technika sikeres kidolgozása illetve, hogy sikerült fertilis DH növényeket regenerálni *in vitro* szelekciós környezetből, alapot adott arra, hogy szélesebb genetikai bázison is kipróbáljuk az *in vitro* szelekciót. Éppen ezért agronómiailag fontos tulajdonságokkal bíró hibrideket vontunk a kísérleteinkbe, melynek eredményeit a következőkben ismertetem.

3. táblázat: Az A18 kukorica *in vitro* portoktenyésztésének eredménye a szelekciós ágensek és az alkalmazott koncentrációk függvényében.

Kezelés	Koncentráció (µM)	Tenyésztett portok (db)	Portok válasz (%)	MES/100 leoltott portok (db)	Növény regeneráció (%)	Kiültetett növényke (db)	Fertilis növény (db)	Magkötés (db/cső)
Kontroll	-	8000	50,0±2,5	124,0±6,2**	14,0±0,7	140*±7	28#±1,4	50-120
Pq	**0,5**	**7000**	**20,8±1,04****	**40,2±2,01****	**10,1±0,5***	**154±7,7**	**10±0,5***	**8-95**
	1	**7000**	**13,0±0,65****	**22,3±1,11****	**3,5±0,17****	**43±2,15****	**5±0,25****	**3-167**
	5	7000	10,0±0,5**	18,4±0,92**	1,2±0,06**	0±0**	0±0**	-
	10	7000	3,5±0,17**	5,6±0,28**	0,05±0**	0±0**	0±0**	-
MR	1	5000	32,0±1,6**	109,0±5,54	0,5±0,02**	9±0,45**	0±0**	-
	10	**5000**	**30,0±1,5****	**72,8±3,64***	**3,8±0,19****	**69±3,45****	**10±0,5****	**1-146**
	50	5000	14,0±0,7**	45,0±2,25**	1,2±0,06**	6±0,3**	0±0**	-
	100	5000	5,0±0,25**	9,6±0,48**	0,01±0**	0±0**	0±0**	-
MD	10	5000	30,2±1,5**	11,0±0,55**	3,5±0,17**	7±0,5**	0±0**	-
	50	5000	22,0±1,1**	95,0±4,74*	2,3±0,11**	22±1,1**	0±0**	-
	100	**5000**	**19,6±0,98****	**62,0±3,1****	**1,8±0,09****	**29±1,45****	**3±0,15****	**2-53**
	1000	5000	9,6±0,48**	19,5±0,97**	0,01±0**	1±0,05**	0±0**	-
t-BHP	**100**	**5000**	**52,6±2,63****	**102,0±5,1**	**5,4±0,27****	**54±3,7****	**8±0,4****	**6-95**
	1000	**5000**	**28,0±1,4****	**49,0±2,45****	**4,4±0,22****	**21±1,05****	**2±0,1****	**1-120**
	10000	5000	18,0±0,9**	32,0±1,6**	2,3±0,11**	12±0,6**	0±0**	-

A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

kiválasztott növény (a fitotroni klímakamra mérete és költségigénye miatt nem az összes kontroll táptalajról regenerált növényt neveltük fel)

4.1.3. Az in vitro szelekció hatása a portok válaszra, az embrió indukciós és regenerációs %-ra a hibridekben

A modell (A18) genotípuson végzett kísérletek tapasztalatai alapján az *in vitro* szelekciót megvalósítottuk agronómiai szempontból fontos hibridek bevonásával is. Ennek első lépéseként meg kellett határozni azon lehetséges hibridek körét, melyek alkalmasak ezekhez a vizsgálatokhoz. Megvizsgáltuk 7 db F_1 hibrid haploid indukciós képességét. A kísérlet eredményeit a 4. táblázatban mutatom be. Kiderült, hogy a jó agronómiai tulajdonságokkal bíró F_1 hibridek, több mint a fele alig adott portokválaszt és csak 3 hibrid esetében sikerült fertilis növényt regenerálni.

4. táblázat: A portoktenyésztés során felhasznált F_1 hibridek portokválasza, embrió indukciója, növényregenerációja, valamint a fertilis növény kihozatalának eredményei kontroll körülmények között.

Hibridek	Tenyésztett portok (db)	Portok válasz (%)	Embrió indukció (%)	Növény regeneráció (%)	Fertilis növény (db)
A18	8000	50,0±2,5	124,0±6,2	14,0±0,4	**28**
DH109xOH43	2000	5,0±0,25**	8,0±0,04**	1,5±0,07**	0±0**
DH105xHMv5405	2000	4,2±0,21**	9,2±0,46**	2,3±0,11**	0±0**
DH109xSR88	2000	4,8±0,24**	6,0±0,3**	0,5±0,02**	0±0**
HMv5405xDH105	2000	10,0±0,5**	12,0±0,6**	2,5±0,12**	0±0**
DH109xHMv5405	2000	42,1±2,1	99,0±4,95	10,0±0,5*	**15±0,75***
DH141xGL62	2000	48,7±2,4	98,3±4,91	13,0±0,65	**7±0,35***
DH62xGL62	2000	45,2±2,26	99,2±4,96	12,9±0,64	**10±0,5***

A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

Az A18 hibridhez hasonló portok választ három (DH109xHMv5405, DH141xGL62 és DH62xGL62) F_1 hibrid esetében tapasztaltunk. Ezen hibridek embrió indukciója és növényregenerációs %-a is megközelítette az A18 hibrid esetében tapasztaltakat. Fertilis növényt is csak az előbb említett F_1 hibridek esetében sikerült regenerálni. A várakozással ellentétben azonban nem sikerült növényt regenerálni az egyébként jó haploid indukciós képességgel rendelkező DH105xHMv5405 és DH109xSR88 hibridek esetében, ami az évjárat hatással magyarázható. Az a tény, hogy az A18 hibrid esetében sokkal több növényt sikerült regenerálni a lerakott portokok számával magyarázható.

Ezután már csak azokat a hibrideket vontuk be a szelekcióba, amelyeknél az előkísérletben sikerült fertilis DH növényt előállítani kontroll körülmények között és csak azon koncentrációkat használtuk, amelyeket az A18 hibrid esetében sikeresen alkalmaztunk. Az eredményeket az 5. táblázatban mutatom be. Mind a három (Pq, MR, *t*-BHP) szelekciós ágens alkalmazása során sikerült fertilis növényt előállítani mindhárom hibrid esetében (5. táblázat).

5.táblázat: A szelekciós ágensek hatására adott portok válasz, embrió indukció, növényregeneráció, valamint az előállított fertilis növények száma a különböző hibridek esetében.

Hibridek	Paraméter	Pq		MR	*t*-BHP	
		0.5 μM	1.0 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
A18	Portok válasz %	20,8±1,04	13,0±0,65	30,0±1,5	52,6±2,63	28,0±1,4
	Embrió indukció (%)	40,2±2,01	22,3±1,11	73,0±3,8	102,0±5,1	49,0±2,45
	Regeneráció (%)	10,1±0,5	3,4±0,17	3,8±0,19	5,4±0,27	4,4±0,22
	Fertilis növény (db)	**10±0,5**	**5±0,25**	**10±0,5**	**8±0,4**	**2±0,1**
H1 hibrid DH109x HMv5405	Portok válasz%	21,0±1,05	19,7±0,98	34,0±1,7	21,3±1,06	0±0
	Embrió indukció (%)	45,0±2,25	34,0±1,7	57,3±1,86	46,0±2,3	0±0
	Regeneráció (%)	6,6±0,33	5,8±0,29	0,3±0	7,3±0,36	0±0
	Fertilis növény (db)	**9±0,45**	**7±0,35**	**1±0,05**	**2±0,1**	**0±0**
H2 hibrid DH141x GL62	Portok válasz%	26,2±1,31	19,8±0,99	33,0±1,65	18,4±0,92	0,7±0,03
	Embrió indukció (%)	42,3±2,11	25,3±1,26	68,0±3,4	59,8±2,99	0,8±0,04
	Regeneráció (%)	7,5±0,37	4,4±0,22	8,2±0,45	11,0±0,55	0±0
	Fertilis növény (db)	**4±0,2**	**3±0,15**	**4±0,2**	**6±0,3**	**0±0**
H3 hibrid DH62x GL62	Portok válasz%	33,0±0,16	28,3±1,41	20,8±1,04	31,0±1,55	9,4±0,2
	Embrió indukció (%)	64,0±3,25	62,3±3,11	50,6±2,53	64,2±3,21	19,9±0,99
	Regeneráció (%)	11,2±0,56	6,8±0,34	9,0±0,45	8,9±0,44	5,4±0,27
	Fertilis növény (db)	**4±0,2**	**2±0,1**	**2±0,1**	**2±0,1**	**1±0,05**

A szelekció során az A18 hibridhez hasonlóan az összes szelekciós ágens csökkentette a portokválaszt, az embrió indukciót, a regenerációs képességet valamint a fertilis DH növények számát a kontrollhoz képest mindhárom hibrid esetében. Pq és MR tartalmú táptalajról mindhárom hibridnél sikerült fertilis növényt regenerálni. Azonban *t*-BHP alkalmazásakor csak az alacsonyabb koncentráción tudtunk fertilis növényeket regenerálni mindhárom hibridnél. Magasabb *t*-BHP koncentrációnál a H1 és H2 hibridnél egyáltalán nem sikerült növényt regenerálni és a H3 hibrid esetében is csak 1 db fertilis DH növényt kaptunk.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy oxidatív stresszt indukáló vegyületek alkalmazásával in vitro mikrospóra szelekcióval sikeresen állítottunk elő fertilis DH kukorica növényeket, az A18 modell genotípus esetében. A tenyésztés során elvégzett citológiai és szövettani vizsgálatok segítettek képet formálni arról, hogy a szelekciós ágensek milyen hatással vannak a mikrospórák egyedfejlődésére, továbbá ezen szerek lehetséges hatásmechanizmusáról. A szelekciót megvalósítottuk nemcsak modell genotípuson, hanem agronómiailag értékes vonalak F_1 hibridjein is.

A szelekció eredményessége az utódnövények fiziológiai tulajdonságainak (stressztűrő képességének) vizsgálatával meghatározható. A továbbiakban ezekről a vizsgálatokról lesz szó.

4.2. Pq tartalmú táptalajról szelektált utódnövényeinek (DH_1 generáció) fiziológiai és biokémiai vizsgálata

A fiziológiai vizsgálatok eredményei közül csak a Pq tartalmú táptalajról szelektált genotípusok tesztjeinek eredményeit mutatom be, mivel ezen genotípusokat vizsgáltuk széles körben.

Azt hogy melyik hibrid DH_1 utódján milyen vizsgálatokat végeztünk el, a 6. táblázatban foglaltam össze:

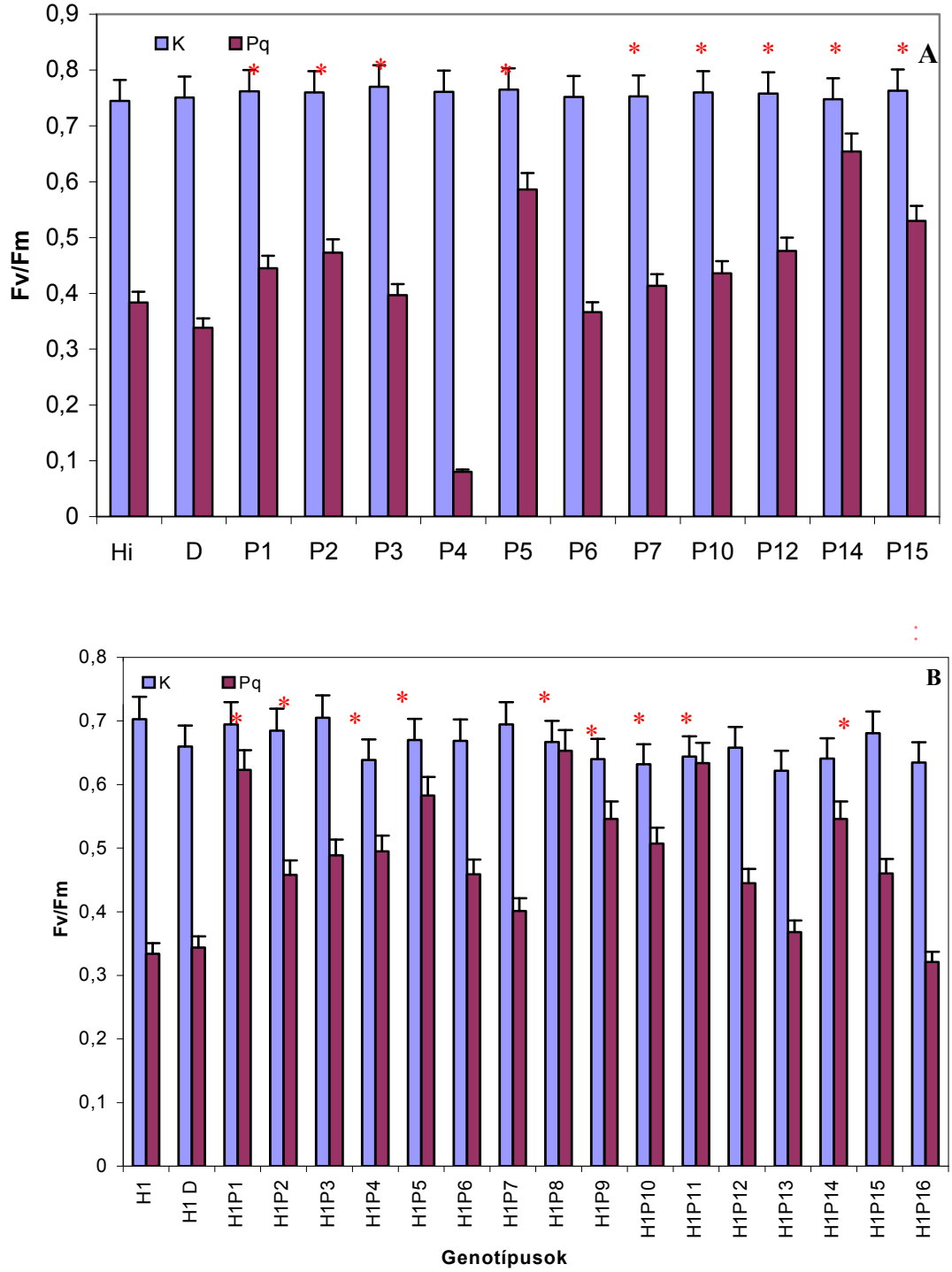
6. táblázat: A vizsgált tulajdonságok a tesztelt hibrideknél

		A18	H1	H2	H3
Pq hatására	klorofill *a* fluoreszcencia indukció	+	+	+	+
	ionkiáramlás változását	+	+	+	+
	Klorofill (a+b) tartalom	+	-	-	-
	antioxidáns enzimek aktivitásának változását	+	-	-	-
	toxikus oxigénformák felhalmozódásának *in situ* kimutatását	+	-	-	-
Hideg hatására	csírázási %	+	+	+	+

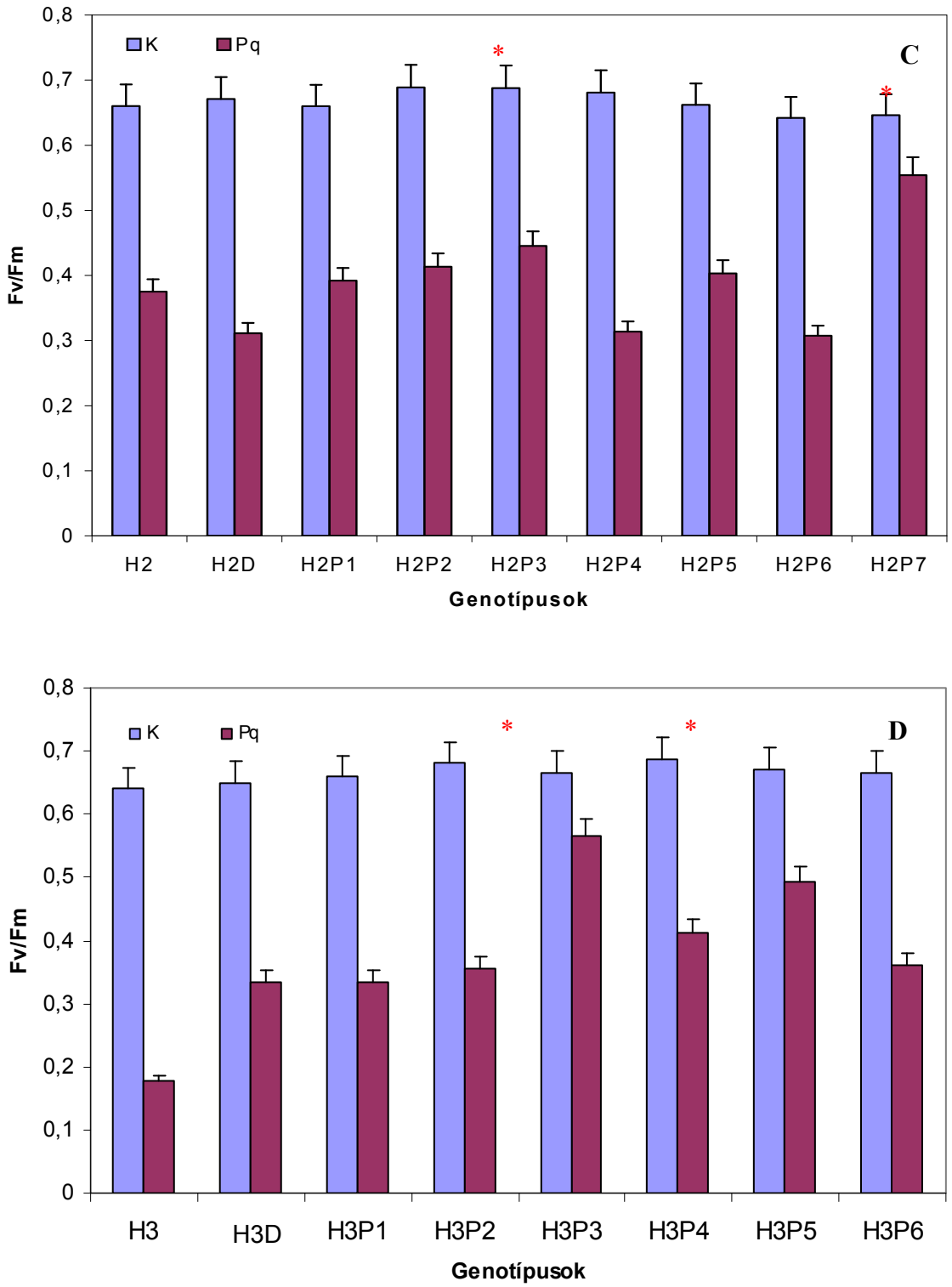
4.2.1. Klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérése

A paraquat (Pq) elsődleges hatóhelye a kloroplasztiszban található. A Pq hatására a PSI akceptor oldalán képződő toxikus oxigén formák károsítják a fotoszintetikus apparátus szerkezetét, ami fotoszintetikus aktivitás csökkenéshez vezet. Ez a csökkenés gyorsan detektálható a klorofill *a* fluoreszcencia módszerével, az Fv/Fm fluoreszcencia paraméter segítségével. Az eredményeket a 12. A, B, C és D ábrán mutatom be. Az ábrán jól látszik, hogy több szelektált genotípusnál Pq hatására kisebb mértékben csökkent az Fv/Fm paraméter, mint a nem szelektált kontroll genotípus esetében. Az A18 eredetű Pq szelektált DH_1 utódok esetében 9 vonalnál (P1, P2, P3, P5, P7, P10, P12, P14, P15) a nem szelektált DH vonalhoz képest szignifikánsan kisebb mértékben csökkent a fotoszintetikus aktivitás (12. A ábra).

A H1 jelzésű hibridből származó Pq szelektált DH_1 utódjainál 9 (H1P1, H1P2, H1P4, H1P5, H1P8, H1P9, H1P10, H1P11, H1P14) (12. B ábra), a H2 jelzésű hibridnél kettő (H2P3, H2P7)(12. C ábra) és a H3 jelzésű hibridnél is kettő (H3P3, és H3P5) (12. D ábra) Pq szelektált DH_1 genotípusnak szignifikánsan kisebb mértékben csökkent a fotoszintetikus aktivitása, mint az azonos hibridből származó a nem szelektált DH vonalakénak (kontroll).



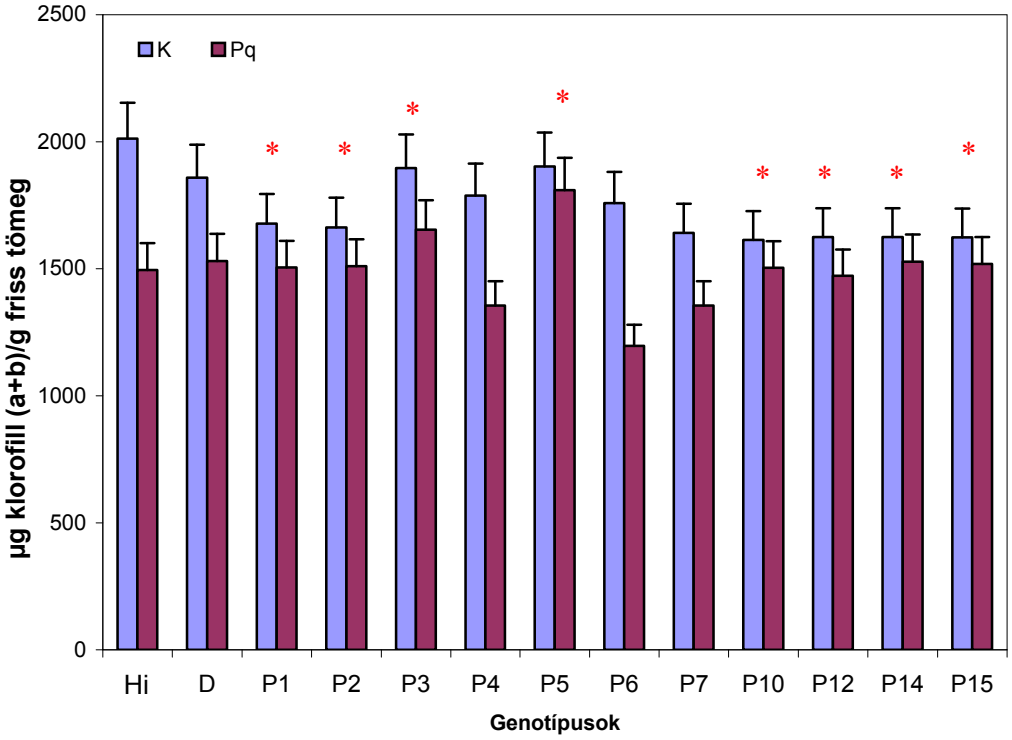
12. ábra: Az Fv/Fm paraméter változása Pq kezelés hatására Pq tartamú táptalajon szelektált DH vonalakban. K = kontroll, Pq-ot nem tartalmazó puffer, Pq 50µM Pq tartalmú puffer. A18 kukorica (A) Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P1-15 = A18 eredetű Pq szelektált DH vonalak. H1 = a kiindulási (HMv5405xDH109) hibrid, H1D = nem szelektált DH genotípus, H1P1-16 = Pq szelektált DH vonalak. H2 = a kiinduló (DH141xGl62) hibrid, H2D = nem szelektált DH genotípus, H2P1-7 = Pq szelektált DH vonalak. H3 = a kiinduló (DH62xGL62) hibrid, H3D = nem szelektált DH genotípus, H3P1-6 = Pq szelektált DH vonalak. A szignifikáns különbséget * jelöli.



12. ábra: Az Fv/Fm paraméter változása Pq kezelés hatására Pq tartamú táptalajon szelektált DH vonalakban. K = kontroll, Pq-ot nem tartalmazó puffer, Pq 50µM Pq tartalmú puffer. A18 kukorica (A) Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P1-15 = A18 eredetű Pq DH vonalak. H1 = a kiindulási (HMv5405xDH109) hibrid, H1D = nem szelektált DH genotípus, H1P1-16 = Pq szelektált DH vonalak. H2 = a kiinduló (DH141xGl62) hibrid, H2D = nem szelektált DH genotípus, H2P1-7 = Pq szelektált DH vonalak. H3 = a kiinduló (DH62xGL62) hibrid, H3D = nem szelektált DH genotípus, H3P1-6 = Pq szelektált DH vonalak. A szignifikáns különbséget * jelöli.

4.2.2. Klorofill (a+b) tartalom változása Pq kezelés hatására az A 18 eredetű DH_1 növényekben

A Pq hatására képződő toxikus oxigén származékok könnyen reagálnak az olyan kettőskötésű molekulákkal, mint például a klorofill. Így a Pq nagyobb mértékű fitotoxikus hatása nyomon követhető a klorofill (a+b) lebomlásának megfigyelésével, vagyis a klorofill tartalom mérésével. Vizsgálataink eredményeit a 13. ábrán mutatom be. Megfigyeltük, hogy a Pq kezelés hatására a nem szelektált DH_1 vonal és a hibrid esetében a klorofill tartalom csökkenése 25% körüli volt. A Pq szelektált vonalak DH_1 utódjai közül a P1, P2, P3, P5, P10, P12, P14 és P15 jelű genotípusok kezelés utáni klorofill tartalma alig 5-10%-kal csökkent, ami arra utal, hogy ezekben a Pq hatása nem volt olyan fitotoxikus, mint a többi genotípus esetében. Találtunk azonban olyan vonalakat is (P4 és P6), melyek kezelés hatására hasonló klorofill csökkenést mutattak, mint a nem szelektált DH genotípus.

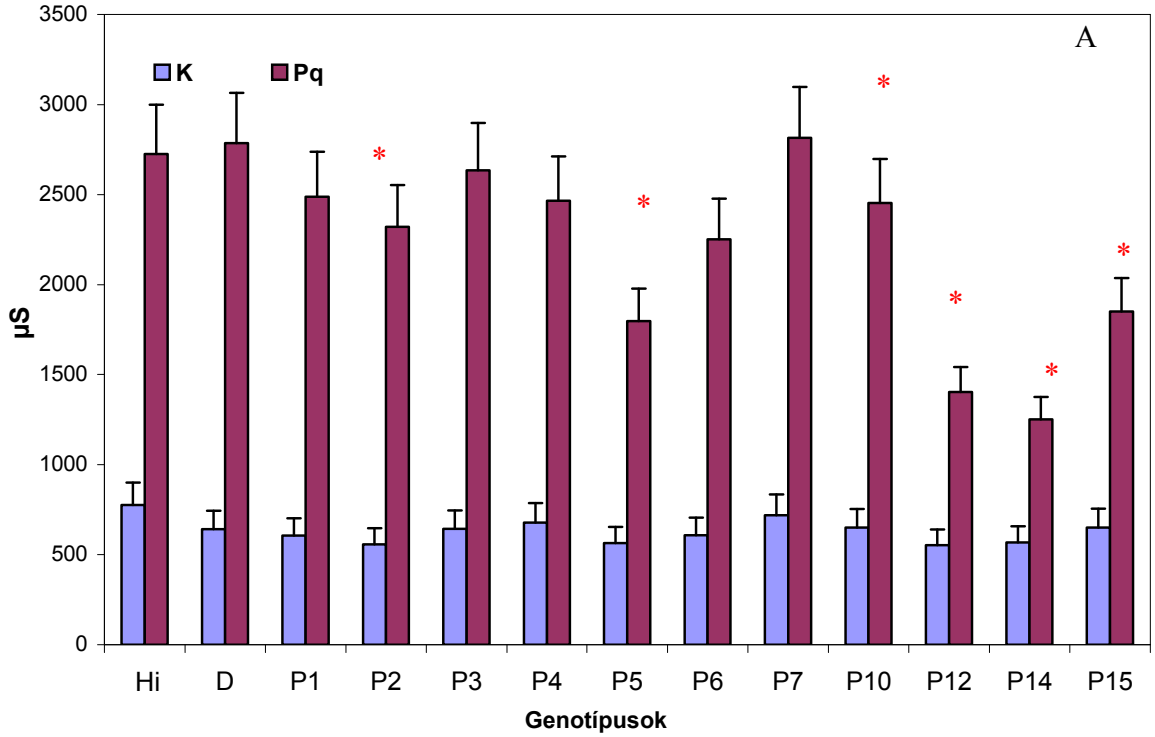


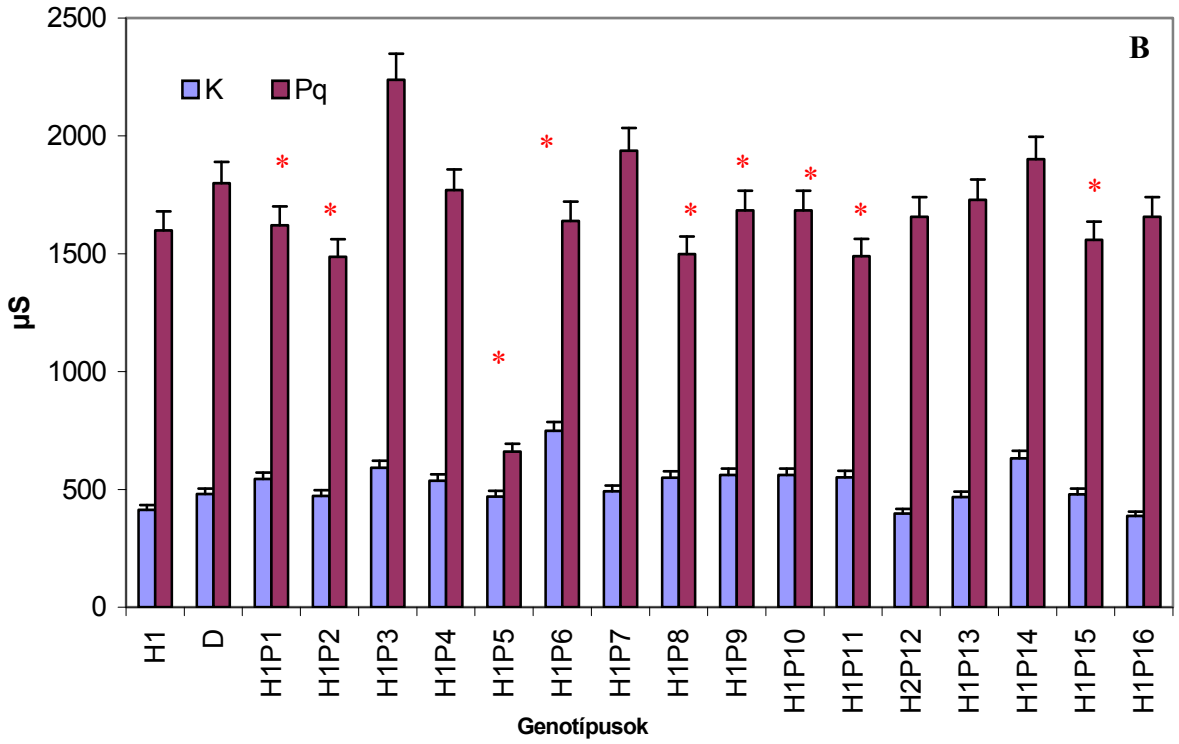
13. ábra: Az A18 kukorica klorofill (a+b) tartalom változása Pq kezelés hatására Pq szelektált DH vonalakban. K = kontroll, Pq-ot nem tartalmazó puffer, Pq 50µM Pq tartalmú puffer. Hi = a kiinduló A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P1-15 = A18 eredetű Pq szelektált DH_1 vonalak. A szignifikáns különbséget * jelöli.

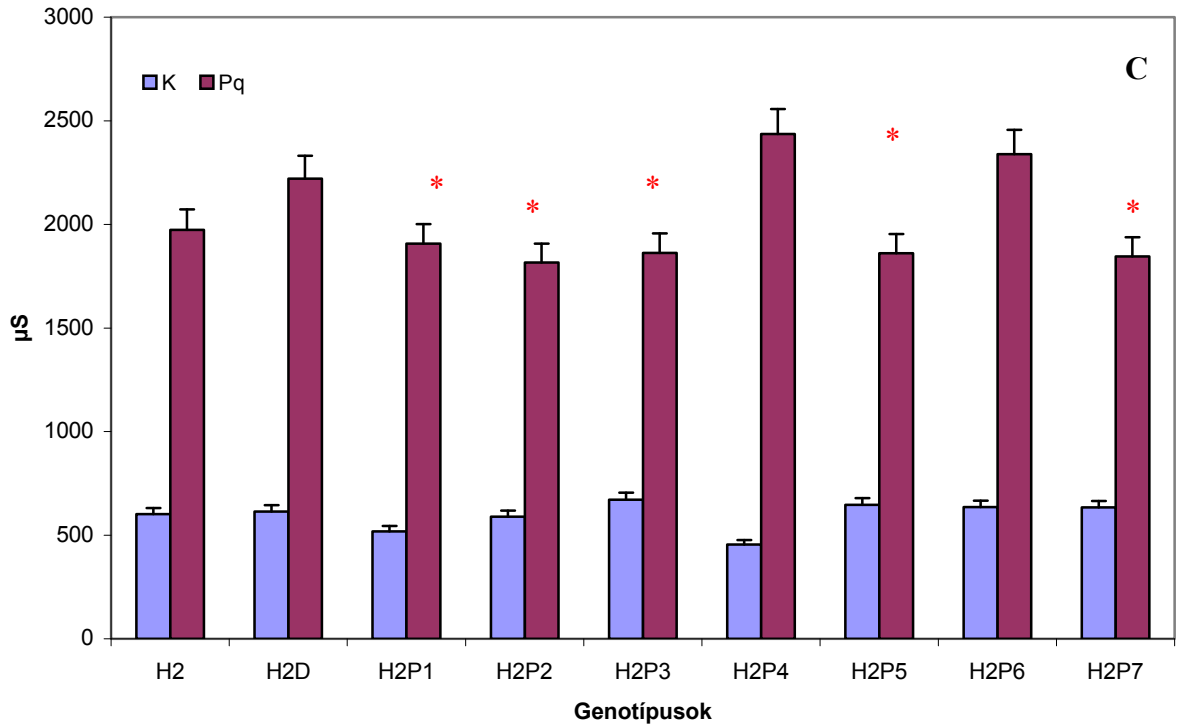
4.2.3. Az ionkiáramlás mérése Pq kezelés hatására

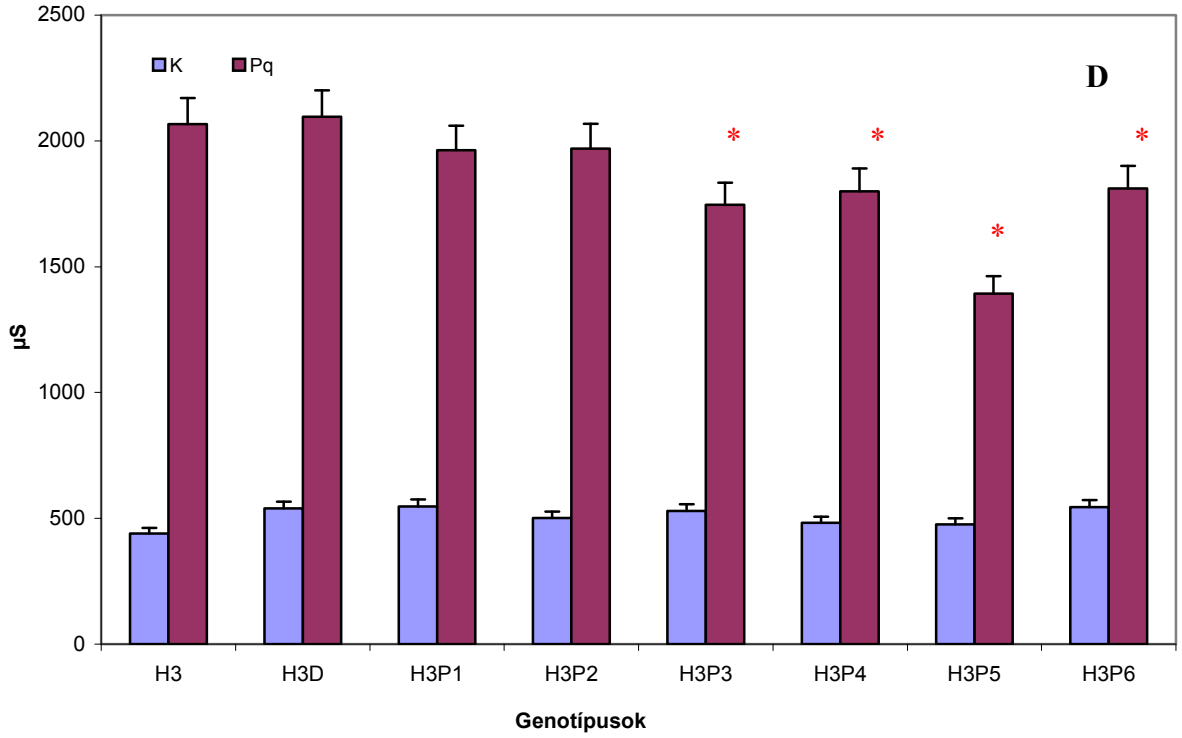
A Pq hatására képződő ROF fitotoxikus hatására a sejt membrán integritása felborul, a sejtnedv kiáramlik, amit ionvezető-képesség mérésével detektálhatunk. Az ionkiáramlás mérésének eredményeit a 14. A, B, C és D ábrán szemléltetem. Az A18 eredetű kukorica Pq szelektált DH_1 utódjainál 6 esetben (P2, P5, P10, P12, P14 és P15) (14. A ábra), a H1 hibrid DH_1 utódjainál 9

(H1P1, H1P2, H1P5, H1P6, H1P8, H1P9, H1P10, H1P11 és H1P15) (14. B ábra), a H2 jelzésű hibrid DH_1 utódjainál öt (H2P1, H2P2, H2P3, H2P5, H2P7)(14. C ábra) és a H3 jelzésű hibrid DH_1 utódjainál négy ((H3P3, H3P4, H3P5 és H3P6) (14. D ábra)) vonal esetében kevésbé nőtt meg Pq hatására az ionkiáramlás mértéke, mint a megfelelő hibridből származó a nem szelektált DH genotípusoknál.









14. ábra: Az ionkiáralmás eredményei Pq kezelés hatására szelektált DH vonalakban.
K = kontroll, Pq-ot nem tartalmazó puffer, Pq 50µM Pq tartalmazó puffer. A18 kukorica (A) Hi = a kiinduló A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P1-15 = A18 eredetű Pq szelektált DH vonalak. H1 = a kiinduló (HMv5405xDH109) hibrid, H1D = nem szelektált DH genotípus, H1P1-16 = Pq szelektált DH vonalak. H2 = a kiinduló (DH141xGl62) hibrid, H2D = nem szelektált DH genotípus, H2P1-7 = Pq szelektált DH vonalak. H3 = a kiinduló (DH62xGL62) hibrid, H3D = nem szelektált DH genotípus, H3P1-6 = Pq szelektált DH vonalak. A szignifikáns különbséget * jelöli.

4.2.4. Az eredményekből számított rezisztencia faktorok

A fent bemutatott eredmények egyszerűbb áttekinthetősége érdekében rezisztencia faktort számoltunk (ld. Anyag és Módszer, 43-44. old.). Ez azt mutatja, hogy az adott DH vonal hányszor tűri jobban a Pq fitotoxikus hatását a megadott paraméter alapján. Viszonyítási alapnak a nem szelektált DH vonalat használtuk, ezért annak az Rf értéke minden esetben 1. A 7. táblázatban az A18 kukorica eredetű Pq szelektált DH_1 genotípusok rezisztencia faktorait míg a 8. táblázatban a többi hibrid Pq szelektált DH_1 genotípusainak rezisztencia faktorait mutatom be.

7. táblázat: A18 kukorica (Hi), nem szelektál DH_1 vonal (D) és Pq szelektált (P1-15) DH_1 vonalak rezisztencia faktorai

	Hi	D	P1	**P2**	P3	P4	**P5**	P6	P7	**P10**	**P12**	**P14**	**P15**
$Rf_{Fv/Fm}$	1,1	1,0	**1,7***	**2,4***	**1,5***	0,4	**7,1****	0,9	**1,7***	**1,6***	**2,1***	**10,5****	**4,9****
Rf_{klo}	0,8	1,0	**2,0***	**2,2***	**1,6***	0,8	**4,1****	0,6	1,2	**3,0***	**2,2***	**3,4****	**3,4****
Rf_{ionvez}	1,1	1,0	1,1	**1,2**	1,1	1,2	**1,8***	1,3	1,0	**1,2**	**2,5****	**3,4****	**1,8***

$Rf_{Fv/Fm}$ = a klorofill *a* fluoreszcencia indukció eredményeiből számolt rezisztencia faktor. Rf_{klo} = a klorofill (a+b) tartalom eredményeiből számított rezisztencia faktor. $Rf_{ionvez.}$ = az ionkiáramlás eredményeiből számított rezisztencia faktor.
A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

Az A18 hibrid Pq szelektált DH_1 utódainak vizsgálata azt mutatta, hogy az Fv/Fm paraméterből számolt rezisztencia faktor alapján 9 genotípus, a klorofill tartalom változása alapján 8 és az ionkiáramlás mérése alapján számolt rezisztencia faktorok esetében szintén 8 genotípus szignifikánsan nagyobb értéket mutatott, mint a nem szelektált DH vonal. Ezek közül 6 (P2, P5, P10, P12, P14, P15) olyan genotípust sikerült szelektálnunk, ami mindhárom vizsgált tulajdonság esetében szignifikánsan nagyobb értéket mutatott a nem szelektált DH vonalhoz képest.

A H1 hibrid Pq szelektált DH_1 utódainak értékelésekor azt tapasztaltuk, hogy az Fv/Fm paraméterből számolt rezisztencia faktor alapján 9 genotípus, az ionkiáramlás rezisztencia faktora alapján szintén 9 genotípus szignifikánsan nagyobb értéket mutatott, mint a nem szelektált DH vonal. Ezek közül 7 genotípus (H1P1, H1P2, H1P5, H1P8, H1P9, H1P10, H1P11) esetében mindkét tulajdonságra nézve szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktor értékeket számoltunk a mért adatok alapján (8. táblázat).

A H2 hibrid Pq szelektált DH_1 utódjainak vizsgálatakor az Fv/Fm paraméter rezisztencia faktora 2 genotípusnál, az ionkiáramlás rezisztencia faktora 5 genotípusnál szignifikánsan nagyobb értéket mutatott, mint a nem szelektált DH vonal. Kettő (H2P3, H2P7) genotípusnál mindkét mért tulajdonság tekintetében nagyobb rezisztencia faktort határoztunk meg (8. táblázat).

A H3 hibrid Pq szelektált DH_1 utódjainak eredményeiből számolt rezisztencia faktor tanulmányozásakor azt tapasztaltuk, hogy az Fv/Fm paraméter tekintetében 2 és az ionkiáramlás tekintetében pedig 4 olyan genotípust találtunk amelyeknek a rezisztencia faktora magasabb volt a nem szelektált DH vonalénál. Két (H3P3, H3P5) genotípusnak volt szignifikánsan nagyobb a rezisztencia faktora mindkét mért tulajdonság esetében a nem szelektált DH genotípushoz viszonyítva.

8. táblázat: Hibridek rezisztencia faktorai

Genotípus	H1	H1D	**H1P1**	**H1P2**	H1P3	H1P4	**H1P5**	H1P6	H1P7
$RF_{Fv/Fm}$	0,8	1,0	**3,8****	**1,5***	1,1	1,6*	**3,2***	1,2	0,9
RF_{ionvez}	1,1	1,0	**1,2***	**1,3***	0,8	1,1	**6,9****	1,5*	0,9
Genotípus	**H1P8**	**H1P9**	**H1P10**	**H1P11**	H1P12	H1P13	H1P14	H1P15	H1P16
$RF_{Fv/Fm}$	**12,6****	**2,8****	**2,1***	**15,9****	1,1	0,9	2,7**	1,4	0,9
RF_{ionvez}	**1,4***	**1,2**	**1,2***	**1,4***	1,0	1,1	1,1	1,2	1,1
Genotípus	H2	H2D	H2P1	H2P2	**H2P3**	H2P4	H2P5	H2P6	**H2P7**
$RF_{Fv/Fm}$	1,2	1,0	1,3	1,3	**1,5***	1,0	1,4	1,1	**3,9****
RF_{ionvez}	1,1	1,0	1,2*	1,3*	**1,3***	0,8	1,3*	0,9	**1,3***
Genotípus	H3	H3D	H3P1	H3P2	**H3P3**	H3P4	**H3P5**	H3P6	
$RF_{Fv/Fm}$	0,7	1,0	1,0	1,0	**3,1****	1,2	**1,8***	1,0	
RF_{ionvez}	0,9	1,0	1,1	1,1	**1,3***	1,2*	**1,7***	1,2*	

H1 = a kiinduló (HMv5405xDH109) hibrid, H1D = nem szelektált DH genotípus, H1P1-16 = Pq szelektált DH vonalak. H2 = a kiinduló (DH141xGl62) hibrid, H2D = nem szelektált DH genotípus, H2P1-7 = Pq szelektált DH vonalak. H3 = a kiinduló (DH62xGL62) hibrid, H3D = nem szelektált DH genotípus, H3P1-6 = Pq szelektált DH vonalak. $Rf_{Fv/Fm}$ = a klorofill *a* fluoreszcencia indukció eredményeiből számolt rezisztencia faktor. Rf_{ionvez} = az ionkiáramlás eredményeiből számított rezisztencia faktor. A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

Az adatok értékelésekor azonban meg kell említenünk azt a tényt, hogy a nem szelektált DH genotípusok közül egy-egy véletlen szerűen kiválasztott DH vonalat használtunk. A vizsgálatokhoz kontrollált körülményen nevelt növények szükségesek. Mivel a kukorica igen nagy helyigényű növény és a növénynevelő kamara költsége igen magas, ezért nem tudtuk a teljes hasadó haploid vonal-származékot letesztelni. Azonban irodalmi adatok szerint, amint ezt Touraev és mtsai. (2001) összefoglalójukban kifejtik, hogy a mikrospórákból származó DH vonalak összessége reprezentálja a kiindulási hibrid genetikai variabilitását, vagyis a végtelen számú (teoretikusan előállítható) nem szelektált DH vonal ezen tulajdonságainak átlaga kiadja a kiindulási hibrid genetikai variabilitását. Annak elkerülésére, hogy igen nagyszámú nem szelektált DH vonalat kelljen használnunk, a kísérletekbe bevontuk a kiindulási hibrideket is. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a kiindulási hibridek és a hozzá tartozó nem szelektált DH vonalak rezisztencia farkotainak értékei szignifikánsan nem térnek el.

Összefoglalva a fiziológiai mérések és az abból számolt rezisztencia faktorok eredményeit az alábbi megállapításokat tettük: Összesen 17 olyan genotípust szelektáltunk, amelyeknek a rezisztencia faktora a mért tulajdonságok tekintetében szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollként használt nem szelektált DH genotípusoké, ami azt jelenti, hogy nagyobb toleranciával rendelkeznek a Pq okozta oxidatív stresszel szemben, mint a nem szelektált DH kontroll genotípusok vagy a kiindulási hibridek. Ezen genotípusok a Pq által indukált oxidatív stresszel szemben ellenállóbbak, mint a nem szelektált DH kontroll genptípusok és a kiinduló hibridek.

További vizsgálatokat végeztünk az A18 kukoricából származó azon genotípusokon (a kiindulási hibrid és a nem szelektált DH vonalon kívül), amelyek a rezisztencia faktorok alapján szignifikánsan nagyobb toleranciát mutattak a Pq okozta oxidatív stresszel szemben, mint a nem szelektált DH vonal. Ezek a P2, P5, P10, P12, P14 és P15 jelzésű DH vonalak voltak.

4.2.5. Toxikus oxigén formák kimutatása *in situ* festési eljárásokkal

A ROF képződésének mennyiségét *in situ* festési eljárással is nyomon követtük. A Pq kezelés hatására felhalmozódó szuperoxid gyököket NBT festéssel mutattuk ki. A 15. ábrán jól látható, hogy míg a Hi és a D festett levélkorongokon nagyon sok kékes elszíneződés található, addig a szelektált vonalakon kevesebb, ill. alig látható a kékes elszíneződés, ami azt jelenti, hogy ezekben a genotípusokban Pq hatására kevesebb szuperoxid gyök halmozódott fel, ami a Pq-tal szembeni nagyobb toleranciára utal.

Pq kezelt NBT festett levélkorongok

Hi D P2 P5 P12 P14 P15

Pq kezelt DAB festett levélkorongok

Hi D P2 P5 P12 P14 P15

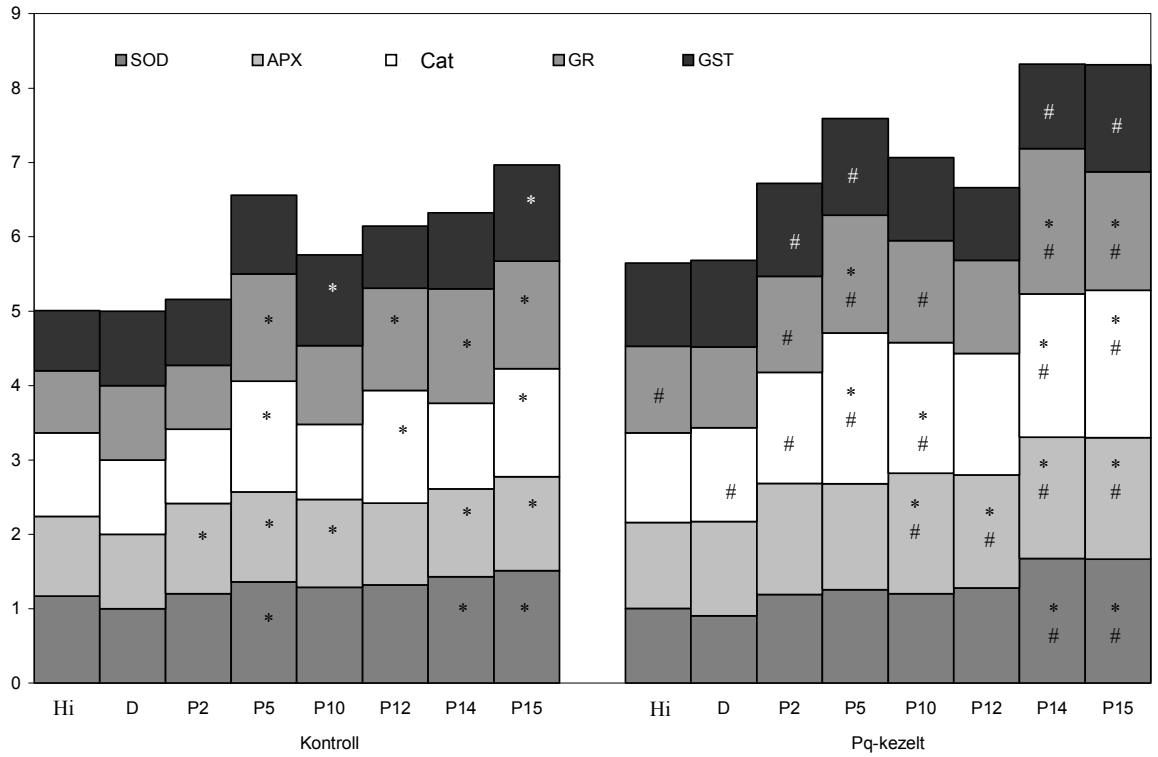
15. ábra: Szuperoxid gyök és hidrogén peroxid kimutatása levélkorongokon NBT és DAB festéssel, 10 µM Pq kezelést követően. Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P2-P15 = Pq szelektált DH vonalak.

Ugyanezt tapasztaltuk, amikor a Pq hatására felhalmozódott hidrogén peroxidot mutattuk ki DAB festéssel. Míg a kontroll genotípusoknál (Hi és D) szinte az egész levél barnás elszíneződésű volt, a Pq szelektált vonalakban ez csak foltokban volt látható.

Bár az eredmények kvalitatívek azonban látványosan és meggyőzően támasztják alá azt a következtetést, hogy a Pq tartalmazó táptalajról szelektált vonalakban kevésbé halmozódnak fel a toxikus oxigénformák, mint a kontroll genotípusokban (azaz a nem szelektált DH vonal és a kiinduló hibrid), ami a nagyobb oxidatív stressz toleranciával magyarázható. Ezek az eredmények megerősítik a fiziológiai vizsgálatok eredményeit.

4.2.6. Az antioxidáns enzimek aktivitása

A kisebb ROF felhalmozódás egy magasabb antioxidáns kapacitás következménye is lehet. Ezért megvizsgáltuk számos szuperoxid dizmutáz (SOD), aszkorbinsav peroxidáz (APX), kataláz (Cat), glutation-reduktáz (GR), antioxidáns enzim és a méregtelenítésben fontos szerepet játszó glutation-S-tarnszferáz (GST) enzim aktivitását. Az enzimaktivitás eredményeit csak azon genotípusok esetében mutatom be (16. ábra), amelyek a fiziológiai vizsgálatok alapján nagyobb oxidatív stressz toleranciával rendelkeztek a Pq szemben, mint a nem szelektált DH vonal. Az összehasonlításhoz a nem szelektált DH vonalat (D), valamint a hibridet (Hi) használtuk.



16. ábra: Szelekciós ágenst nem tartalmazó (kontroll) és $5*10^{-5}$M Pq tartalmú pufferben úsztatott levélkorongokon mért antioxidáns enzimek relatív aktivitásai. 1-nek tekintettük D vonal kontroll körülmények között mért aktivitásait. Ezek a következők voltak: GR: 0.437 µM GSSG/g FW min; GsT: 4.09 µM GSH / g FW min ; APX: 3.55 µM ASC/ g FW min ; Cat: 41.1 µM H_2O_2/ g FW min; SOD: 9.2 EU/ g FW. Ehhez viszonyítva adtuk meg mind az egyes vonalak, mind a kezelések hatásait. Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P2-P15 = Pq szelektált DH vonalak. * jelzi a D-től (azaz amikor a nem szelektált vonalhoz hasonítottuk) szignifikánsan magasabb aktivitásokat; # jelzi az adott genotípusnak a kontrollhoz (Pq-mentes pufferben úsztatott levélkorongokhoz) képest magasabb aktivitását.

A GR esetében az alapaktivitás (kontroll, Pq mentes pufferben úsztatott mintákon mértve) a P5, P12, P14 és P15 genotípusoknál szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem szelektált DH (D) növényé. Pq hatására a GR aktivitás megemelkedett a legtöbb vonal (kivéve D és P12) és az A18 hibrid (Hi) esetében is. A P5, P14 és P15 szelektált vonalak magasabb GR aktivitása Pq kezelt mintákban is megmaradt.

A GsT tekintetében az alapaktivitás a P10 és P15 vonalak esetében volt magasabb volt, mint a nem szelektált DH genotípusé (D), míg a P2 és P12 vonal és az A18 hibridé (Hi) kissé alacsonyabb volt, Pq hatására a P2, P5, P14 és P15 vonalnál tapasztaltunk aktivitás növekedést.

A SOD alapaktivitása a P5, P14 és P15 szelektált DH vonalakban szignifikánsan magasabb volt, mint a nem szelektált DH (D) genotípusban. Pq kezelés szignifikáns enzimindukciót csak a P14 és P15 genotípusok esetében idézett elő. Ezen genotípusokban a nem szelektált DH-hoz képesti magasabb SOD aktivitás Pq kezelést követően is megmaradt.

Az APX mérését követően azt tapasztaltuk, hogy az enzim alapaktivitása a legtöbb Pq szelektált vonalnál (kiv. P12) magasabb volt, mint a nem szelektált DH vonalban (D) és a hibridben. Pq kezelés hatására az enzim aktivitása általában megnőtt, de a Pq szelektált vonalakban ez anövekedés kifejezettebb volt, mint a nem szelektált DH (D) genotípusban. Mindezek eredményeképpen az APX aktivitás a P10, P12, P14 és P15 mintákban szignifikánsan magasabb volt Pq kezelést követően is, mint a nem szelektált DH-é (D) és a hibridé. Az A-18 hibrid (Hi) esetében az aktivitás alig változott.

A Cat alapaktivitása a P5, P12 és P15 vonal esetében volt szignifikánsan magasabb, mint a nem szelektált DH vonalban (D). Pq hatására a legtöbb DH vonal esetében jelentős mértékben megnőtt az enzimaktivitás (a P12-nél eleve magas volt), míg a hibrid esetében nem tapasztaltunk aktivitás változást. Ez azt eredményezte, hogy Pq kezelt mintákon P5, P10, P14 és P15 Pq szelektált DH vonalak aktivitásai szignifikánsan meghaladták, a nem szelektált vonalban mért értékeket.

Összes vizsgált antioxidáns enzim aktivitását tekintve elmondható, hogy a szelektált vonalak közül a P5, P12, P14, és P15 vonalak antioxidáns kapacitása meghaladta a nem szelektált DH és hibrid növény antioxidáns kapacitását, és Pq kezelés hatására is jelentősebb aktivitást mutattak az előzőekhez képest.

4.2.7. A szelektált DH_1 vonalak csírázáskori hidegtűrési vizsgálata

A csírázáskori hidegtűrési vizsgálatokba az A18 hibrid esetében a nem szelektált DH vonalon kívül csak azokat a szelektált genotípusokat vontuk be, amelyek a Pq tolerancia vizsgálatainál a nem szelektált DH vonalhoz képest nagyobb toleranciával rendelkeztek, a hibridek Pq szelektált utódjainak esetében az összes genotípust teszteltük, mert a Pq okozta oxidatív stressz vizsgálatakor csak a legfontosabb teszteket végeztük el.

Megfigyeltük a csírázást, a csírázási %-ot, a csírázáshoz szükséges időt kontroll hőmérsékleten és hideg kezelés hatására, valamit meghatároztuk a csírázási indexeket. A mért és számolt eredményeket a 9, 10, 11 és 12 táblázatokban mutatom be.

Az eredményekből (9. táblázat) kiderül, hogy a csírázás mértéke igen változó volt az egyes vonalak között, ami az *in vitro* szelekciós technika következménye lehet. Szobahőmérsékleten a P5, P10, és P14 vonal csírázási %-a haladta meg a nem szelektált DH genotípusét. Továbbá a legtöbb szelektált DH genotípusnak (kivéve P2, P12) kevesebb idő kellett a csírázáshoz, mint a nem szelektált DH vonalnak. Az eredményekből az is kiderül, hogy a kiindulási A-18 hibrid kontroll hőmérsékleten a legjobban teljesített, a hibridhatásnak köszönhetően. A hidegen történő csíráztatás esetében jelentős csökkenést tapasztaltunk a szobahőmérséklethez képest. A P5, P10 és P14 vonalak csírázási %-a nem csökkent jelentős mértékben a hideg hatására, míg a többi vonalé, köztük a nem szelektált DH genotípusé igen. A kontroll körülmények között jó csírázóképességgel rendelkező A18 hibrid csírázóképessége is jelentős mértékben lecsökkent, ami utalhat egzotikus eredetére. A csírázáshoz szükséges idő természetesen megnőtt a hidegen történő csíráztatáskor, de a P5, P10 és P14 vonalnak kevesebb időre volt szüksége, mint a nem szelektált DH genotípusnak. A szoba ill. alalcsony hőmérsékeleten meghatározott csírázási indexek alapján úgy tűnik, hogy a Pq szelektált vonalakban (P5, P10, P14, P15) a szelekció javított a DH növények csírázóképességen.

9. táblázat: A hideg hatása a csírázásra, az A18 hibrid és az abból származó DH_1 genotípusok esetében.

	Csírázási % T_{22}°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index T_{22}°C	Csírázási % T_8°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index T_8°C
Hi	98±4,75	3,5±0,15	28,0±1,4**	53±2,65	13±0,65	4,0±0,2*
D	50±2,5	6,0±0,3	8,3±0,41	15±0,75	15±0,75	1,0±0,05
P2	45±2,25	7,0±0,35	6,4±0,32	12±0,6	16±0,8	0,75±0,03
P5	90±4,5	3,5±0,15	25,7±1,85**	85±4,25	13±0,65	6,5±0,32**
P10	75±3,75	4,0±0,2	18,7±0,93**	60±3	14±0,7	4,3±0,21*
P12	38±1,9	6,0±0,3	6,3±0,31	10±0,5	17±0,85	0,6±0,03
P14	95±4,75	4,0±0,2	23,7±1,18**	90±4,5	13±0,65	6,9±0,34**
P15	50±2,5	5,0±0,25	10,0±0,5	20±1,2	18±0,9	1,1±0,05

Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH_1 genotípus, P2-P15 = Pq szelektált DH_1 vonalak. A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

A H1 hibrid és a belőle szelektált DH_1 vonalak eredményeit a 10. táblázatban mutatom be. A szobahőmérsékleten történő csíráztatás eredményei egyöntetűek, egyetlen genotípust (H1P3) találtunk, melynek nem volt megfelelő a csírázása. A csírázáshoz szükséges idő esetében, több olyan genotípus (H1P1, H1P3, H1P10, H1P12) volt, amelynek szignifikánsan több idő kellett a csírázáshoz, mint a nem szelektált DH ill. a többi genotípusnak. Ennek megfelelően a csírázási index átlagosan 34,4±4,9 volt, (kivéve H1P3 = 5,2±0,26 és H1P10 = 19,6±0,98). Hideg kezelés hatására, hasonlóan a korábbiakhoz, a csírázási % lecsökkent és a csírázáshoz szükséges idő megnövekedett a legtöbb szelektált DH vonal esetében. A hidegben történő csírázás tekintetében azt tapasztaltuk, hogy számos olyan genotípus van, amely a nem szelektált DH genotípushoz képest szignifikánsan nagyobb csírázási %-kal rendelkezik. A H1 hibridből 13 Pq szelektált genotípus (H1P2, H1P4, H1P5, H1P6, H1P7, H1P8, H1P9, H1P10, H1P11, H1P12, H1P13, H1P14, H1P15, H1P16) hidegben mért csírázási %-a meghaladta úgy a kiindulási hibrid, mind pedig a kontrollnak válsztott nem szelektált DH vonal csírázási %-át. Azonban 3 genotípust találtunk amelyek (H1P1, H1P3, H1P12) elmaradtak a nem szelektált DH vonaltól. Ebből a H1P12 jelölésű genotípus egyáltalán nem csírázott ki. A csírázáshoz szükséges idő tekintetében a nem szelektált DH vonalhoz képest szignifikánsan több időre volt szüksége a H1P3 és H1P6 ill. a H1P16 jelölésű genotípusoknak, azonban az összes többi genotípusnak kevesebb (vagy megegyező) idő kellett a hidegben történő csírázáshoz, így azok csírázási indexe is szignifikánsan nagyobb volt, mint a kiindulási hibridnek valamit a nem szelektált DH genotípusnak.

10. táblázat: A hideg hatása a csírázásra a H1 (HMv5405xDH109) hibrid és az abból származó DH_1 genotípusok esetében.

	Csírázási % T_{22}°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index (CsI) T_{22}°C	Csírázási % T_8°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index (CsI) T_8°C
H1	100±0	3,2±0,16	32,2±1,61	10±0,5	18,3±0,91	0,5±0,02*
H1D	94±4,7	3,1±0,15	30,3±1,51	25±1,25	16,6±0,83	1,5±0,07
H1P1	100±0	3,7±0,18	27,0±1,35	10±05	15,5±0,77	0,6±0,03
H1P2	100±0	3,1±0,15	32,2±1,61	80±4	14,0±0,85	5,7±0,28**
H1P3	20±1	3,8±0,19	5,2±0,26**	5±0,25	22,0±1,1	0,2±0,01**
H1P4	100±0	2,8±0,14	35,7±1,78*	60±3	13,5±0,67	4,4±0,22**
H1P5	100±0	2,3±0,11	43,5±2,17**	65±3,25	13,5±0,67	4,8±0,24**
H1P6	90±4,5	2,9±0,14	31,0±1,55	90±4,5	20,2±1,01	4,5±0,22**
H1P7	95±4,75	2,6±0,13	36,5±1,82*	90±4,5	14,2±0,86	6,3±0,31**
H1P8	100±0	3,2±0,16	31,2±1,56	85±4,25	16,9±0,84	5,0±0,25**
H1P9	100±0	3,2±0,16	31,2±1,56	100±0	16,9±0,84	5,9±0,29**
H1P10	100±0	5,1±0,25	19,6±0,98**	70±3,5	11,7±0,58	6,0±0,3**
H1P11	100±0	3,0±0,15	33,3±1,66	70±3,5	14,7±0,73	4,8±0,24**
H1P12	100±0	3,4±0,17	29,4±1,47	0±0	0±0	0±0**
H1P13	100±0	2,6±0,13	38,5±1,92*	100±0	13,6±0,68	7,3±0,36**
H1P14	100±0	2,3±0,11	43,5±2,17**	90±4,5	15,9±0,79	5,7±0,28**
H1P15	100±0	2,8±0,14	35,7±1,78*	55±2,75	15,0±0,75	3,7±0,18*
H1P16	100±0	2,5±0,12	40,0±2*	60±3	17,7±0,88	3,4±0,17*

H1 = a kiindulási (HMv5405xDH109) hibrid, H1D = nem szelektált DH_1 genotípus, H1P1-16 = Pq szelektált DH_1 vonalak. A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

A H2 hibrid és a belőle szelektált DH_1 vonalak eredményeit a 11. táblázat szemlélteti. A szobahőmérsékleten történő csírázásnál a csírázási % eredményei hasonló képpen alakultak, mint a korábban említett genotípusoknál, viszont a H2 hibridnek volt a legkevesebb időre szűksége a csírázáshoz és a nem szelektált DH genotípus csírázáshoz szükséges idejét egyik szelektált vonal sem haladta meg. A hidegben történő csíráztatás eredményei már nagyobb szórást mutattak. A hibrid a nem szelektált DH és a H2P4 genotípus csírázási %-a jelentősen lecsökkent. A csírázáshoz szükséges idő a legnagyobb mértékben a hibrid csírázásánál nőtt meg, de a nem szelektált DH vonalhoz képest több időre volt szüksége a H2P4 és H2P5 genotípusoknak. A hidegkezelés hatására a kiindulási hibridnek és a H2P4 genotípusnak szignifikánsan alacsonyabb, míg a többi szeletált genotípusnak szignifikánsan nagyobb volt csírázási indexe a nem szelektált DH vonalhoz képest.

11. táblázat: A hideg hatása a csírázásra a H2 (DH141xGL62) hibrid és az abból származó DH_1genotípusok esetében.

	Csírázási % T_{22}°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index T_{22}°C	Csírázási % T_8°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index T_8°C
H2	100±0	2,5±0,12	40,0±2*	15±0,75	21,4±1,07	0,7±0,03*
H2D	100±0	3,5±0,17	28,6±1,43	60±0,3	15,3±0,76	3,9±0,19
H2P1	100±0	3,1±0,15	32,3±1,61	95±4,75	13,9±0,69	6,8±0,34*
H2P2	95±4,75	3,0±0,15	31,7±1,58	95±4,75	11,2±0,56	8,5±0,42**
H2P3	100±0	2,6±0,13	38,5±1,92*	90±4,5	11,4±0,57	7,9±0,39**
H2P4	100±0	2,7±0,13	37,0±1,85*	30±1,5	18,7±0,93	1,6±0,08*
H2P5	100±0	3,4±0,17	29,4±1,47	80±4	16,0±0,8	5,0±0,25*
H2P6	100±0	3,3±0,16	30,3±1,51	100±0	14,7±0,73	6,8±0,34*
H2P7	100±0	3,4±0,17	29,4±1,47	100±0	14,3±0,7	7,0±0,35*

H2 = a kiindulási (DH141xGL62) hibrid, H2D = nem szelektált DH_1 genotípus, H2P1-7 = Pq szelektált DH_1 vonalak.
A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

A H3 hibrid és a belőle szelektált DH_1 vonalak eredményeit a 12. táblázatban mutatom be. A szobahőmérsékleten gyakorlatilag itt is 100%-os volt a csírázás mértéke. Nem szelektált DH (H3D) és a H3P2 genotípusoknak volt szüksége a legrövidebb csírázási időre (2,5±0,12 nap). Három (H3P4-6) genotípusoknak azonban, még a hibridnél is több időre volt szüksége a csírázáshoz. A kiindulási hibridnek (H3) és a H3P4-6 genotípusoknak szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a többi genotípusnak szignifikánsan nem tért el csírázási indexe a nem szelektált DH genotípusétól.

Hideg kezelés hatására történő csírázás tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a hibrid és a nem szelektált DH genotípus csírázása csökkent le a legnagyobb mértékben, majd H3P2, H3P4 és H3P6 jelzésű genotípusoknak. A többi genotípus csírázási %-a nem változott lényegesen a szobahőmérséklethez képest. A hidegben történő csírázáshoz szükséges idő esetében 4 (H3P1, H3P3, H3P5, H3P6) genotípusnak szignifikánsan kevesebb időre volt szüksége a nem szelektált DH vonalhoz képest, így ezen vonalak csírázási indexe is szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem szelektált DH genotípusé.

12. táblázat: A hideg hatása a csírázásra a H3 (DH62xGL62) hibrid és az abból származó DH_1genotípusok esetében.

	Csírázási % T_{22}°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index T_{22}°C	Csírázási % T_8°C	Csírázáshoz szükséges idő (nap)	Csírázási index T_8°C
H3	100±0	3,2±0,16	31,2±1,56*	80±4	14,0±0,7	5,7±0,28
H3D	100±0	2,5±0,12	40,0±2	80±4	15,0±0,75	5,3±0,26
H3P1	100±0	2,6±0,13	38,5±1,92	100±0	12,9±0,64	7,7±0,38*
H3P2	100±0	2,5±0,12	40,0±2	90±4,5	15,5±0,77	5,8±0,29
H3P3	100±0	2,9±0,14	34,5±1,72	100±0	14,3±0,71	7,0±0,35*
H3P4	95±4,75	3,7±0,18	24,3±1,21**	85±4,25	18,0±0,9	4,7±0,23
H3P5	100±0	3,5±0,17	28,6±1,43*	100±0	13,1±0,65	7,6±0,38*
H3P6	100±0	3,6±0,18	27,8±1,39*	95±4,72	13,9±0,695	6,8±0,34*

H3 = a kiindulási (DH62xGL62) hibrid, H3D = nem szelektált DH_1 genotípus, H3P1-6 = Pq szelektált DH vonalak. A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli.

4.2.8. Az eredményekből számított hidegtűrési faktor

A fent bemutatott eredményekből a rezisztencia faktorhoz hasonló viszonyszámot határoztunk meg. Ez az értékszám azt mutatja, hogy az adott Pq szelektált DH vonal hányszor jobb csírázási képességgel rendelkezik, mint a nem szelektált DH vonal. A hidegtűrési faktort (HF) a csírázási indexek adatai alapján határoztuk meg (a 3.4 fejezetben megadott képlet alapján) és értékeit a 13. táblázatban mutatom be.

13. táblázat: Az egyes genotípusok hidegtűrési faktorai

Genotípus	Hi	D	P2	**P5**	**P10**	P12	**P14**	P15	
HF	1,1	1,0	0,9	**2,1***	**1,9***	0,7	**2,4***	1,0	
Genotípus	H1	H1D	H1P1	**H1P2**	H1P3	**H1P4**	**H1P5**	**H1P6**	**H1P7**
HF	0,3	1,0	0,5	**3,6****	0,9	**2,5****	**2,2****	**2,9****	**3,5****
Genotípus	**H1P8**	**H1P9**	**H1P10**	**H1P11**	H1P12	**H1P13**	**H1P14**	**H1P15**	**H1P16**
HF	**3,2****	**3,8****	**6,1****	**2,9***	0	**3,8****	**2,6****	**2,0***	**1,7***
Genotípus	H2	H2D	**H2P1**	**H2P2**	**H2P3**	H2P4	H2P5	**H2P6**	**H2P7**
HF	0,1	1,0	**1,5***	**2,0***	**1,5***	0,3	1,3	**1,6***	**1,7***
Genotípus	H3	H3D	**H3P1**	H3P2	**H3P3**	**H3P4**	**H3P5**	**H3P6**	
HF	1,3	1,0	**1,5***	1,1	**1,6***	**1,5***	**2,0***	**1,9***	

HF= Hidegtűrési faktor. HF= lásd:Anyag és Módszer fejezet. Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH_1 genotípus, P2-P15 = Pq szelektált DH_1 vonalak. H1 = a kiindulási (HMv5405xDH109) hibrid, H1D = nem szelektált DH_1 genotípus, H1P1-16 = Pq szelektált DH_1 vonalak. H2 = a kiindulási (DH141xGL62) hibrid, H2D = nem szelektált DH_1 genotípus, H2P1-7 = Pq szelektált DH_1 vonalak. H3 = a kiindulási (DH62xGL62) hibrid, H3D = nem szelektált DH_1 genotípus, H3P1-6 = Pq szelektált DH vonalak. A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli

Az A18 eredetű Pq szelektált vonalak esetében három vonalnál (P5, P10, P14) nagyobb hidegtűrési faktort tapasztaltunk, mint a nem szelektált DH genotípus és a kiindulási A18 hibrid (Hi), ami azt mutatja, hogy a hideg kevésbé hat hátrányosan a csírázásukra. A többi hibrid esetében a H1 hibrid eredetű Pq szelektált vonalaknál 13 (H1P2, H1P4-11 és H1P13-16), a H2 hibrid eredetű Pq szelektált vonalainál 5 (H2P1-3, H2P6-7) és a H3 hibrid Pq szeletált vonalainál 5 (H3P1, H3P3-6) genotípus szignifikánsan nagyobb hidegtűrési faktorral rendelkezik, mint a kontrollként használt nem szelektált DH genotípus, ami előnyös lehet a korai csírázáskor, ill. a későn beköszöntő tavasz idején.

Összességében elmondhatjuk, hogy a vizsgált 35 db paraquat tartalmú táptalajról szelektált vonal közül 26 rendelkezik szignifikánsan nagyobb hidegtűrési faktorral, mint a kontrollként használt nem szelektát DH genotípusok. Ez azt mutatja, hogy ezen genotípusok toleránsabbak a hideg okozta oxidatív stresszel szemben csíranövény korban.

4.2.9. A szelekció eredményének összegzése

Összefoglalva a vizsgált vonalak fiziológia és biokémiai tesztjeinek eredményeit elmondhatjuk, hogy az A18 hibridből 6 olyan DH vonalat sikerült *in vitro* szelektálnunk, melyek Pq kezelés hatására mindhárom paraméter (az Fv/Fm, klorofill (a+b) tartalom és az ionvezető képesség) alapján számolva nagyobb rezisztencia faktorral rendelkeztek. A legnagyobb és az összes vizsgált tulajdonságban a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorral rendelkező vonalakat a 1,0 µM Pq tartalmú táptalajról szelektált vonalak DH_1 utódgenerációjában találtuk.

Kimutattuk továbbá, hogy a rezisztens DH_1 növényekben a toxikus oxigén formák (szuperoxid gyök, H_2O_2) felhalmozódása kisebb mértékű, mint az A18 hibrid és a nem szelektált DH_1 vonalban.

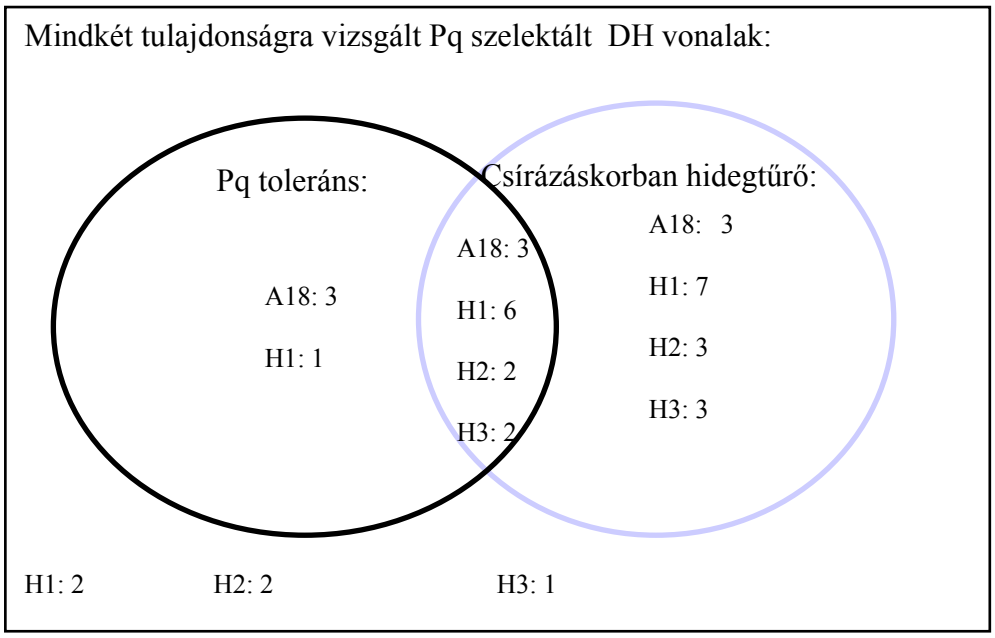
Az antioxidáns enzimek tekintetében elmondhatjuk, hogy azok alapaktivitása számos Pq szelektált DH_1 vonalban megnövekedett a nem szelektált DH_1 genotípushoz, valamint a Hi hibridhez képest. Az *in vitro* szelekcióval előállított vonalak többségénél az alapaktivitáson túl a Pq okozta oxidatív stressz hatására, szignifikánsan megnövekedett az antioxidáns enzimek aktivitása.

Tesztjeink eredményeihez hozzávéve a csírázáskori hidegtolerancia index eredményeit, megállapítható, hogy azok a vonalak csíráztak jobban alacsony hőmérsékleten, amelyek (P5 , P10 és P14) az összes vizsgált tulajdonság esetében nagy rezisztencia faktorral rendelkeztek, illetve amelyeknél az antioxidáns enzimek fokozott aktivitást mutattak.

A többi hibrid összes adatát összevetve azt tapasztaltuk, hogy azon genotípusok, amelyek a Pq okozta stresszel szemben nagyobb rezisztencia faktorral rendelkeztek, mint a nem szelektált DH genotípus, azoknak a csírázáskori hidegtűrései is szignifikánsan jobbak voltak. Ezt a H1 hibridnél 6, a H2 hibridnél 2 és a H3 hibridnél 2 vonalnál tapasztaltuk, amelyek szintén a magasabb Pq koncentrációjú táptalajról származtak.

Összességében tehát elmondható, hogy több szelektált genotípus esetében kereszttolrancia alakult ki. Az eredmények összesítése alapján készítettem el a 17. összefoglaló ábrát. A mindkét tulajdonságra megvizsgált szelektált DH vonalból 17 db toleránsabbnak bizonyult a Pq okozta oxidatív stresszel szemben, 26 db toleránsabb volt a csírázáskori hidegstresszel szemben. Ezek közül 13 db mind a Pq-tal, mind pedig a csírázáskori hideggel szemben is toleránsnak bizonyult a kontroll genotípusokhoz viszonyítva.

In vitro szelektált vonalak Pq tolerancia és csírázáskori hidegtűrés vizsgálata (35 vonal)



17. ábra: *In vitro* mikrospóra szelekcióval előállított vonalak fiziológiai és biokémiai tesztelése (35 db) A18: kiinduló hibrid Pq szelektált DH_1 utódjai. H1 = a kiindulási (HMv5405xDH109) hibrid Pq szelektált DH_1 utódjai. H2 = az eredeti (DH141xGL62) hibrid Pq szelektált DH_1 utódjai. H3 = az eredeti (DH62xGl62) hibrid Pq szelektált DH_1 utódjai.

Az, hogy az A18 eredetű vonalak milyen egyéb agronómiai tulajdonságokkal rendelkeznek, szántóföldi vizsgálatokkal teszteltük és a következőkben mutatom be.

4.2.10. Szántóföldi tesztek eredményei

A szelektált DH vonalakat szántóföldön is teszteltük, azért, hogy megfigyeljük miként hatott a szelekció a növények agronómiai tulajdonságaira. Ennek érdekében három évben (2006-2008) Martonvásáron kisparcellás kísérletekben vizsgáltuk Pq szelektált A18 kukorica növényeket. Három év (2006, 2007 és 2008) átlagos adataihoz (14. táblázat) a szántóföldi tesztelések során felvételeztük a kelési százalékot, a növénymagasságot, az 50%-os hím- és nővirágzást (vetéstől a virágzásig eltelt napok számával kifejezve), a termékenyülési százalékot (a tényleges és potenciális termékenyülés aránya), valamint a szemszámot.

14. táblázat: A kelési százalék, növénymagasság, hím- és nővirágzás, termékenyülési gyakoriság, valamint a szemszám szántóföldi értékei 3 év (2006, 2007 és 2008) átlagában.

	Kelési %	Növénymagasság (cm)	Hímvirágzás (nap)	Nővirágzás (nap)	Termékenyülési %	Szemszám (db/cső)
Hi	80±8**	168±15**	78,8±2,0*	81,4±2,0*	81±12**	521±68**
D	54±6	114±4	85,3±2,2	87,2±2,1	43±10	143±15
P2	35±10**	105±5	84,1±2,1	85,0±1,7	42±8	120±26
P5	71±7**	125±4*	81,8±2,0*	83,7±2,0*	43±7	118±17
P10	79±5**	140±4*	82,9±1,9*	84,3±1,9*	44±7	135±22
P12	77±6**	138±5*	83,6±1,7	84,1±1,8*	45±10	137±23
P14	81±7**	134±4*	80,5±2,0*	81,6±1,9*	58±11*	134±23
P15	65±7*	118±5	84,4±2,0	86,1±1,8	41±10	74±18*

Hi = a kiindulási A18 hibrid, D = nem szelektált DH genotípus, P2-15 = Pq szelektált DH vonalak. A szignifikáns ($p<0,05$ és 0,01) különbséget * ill. ** jelöli

Az adatok alapján elmondhatjuk, hogy a Pq szelektált vonalak kelési képessége a P2 (ami statisztikailag igazolhatóan kisebb volt) genotípust kivéve minden esetben szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem szelektált DH genotípusé (D). Ez a szelekció pozitív hatásának tulajdonítható, hiszen a szövettenyésztés számos esetben csökkenti a csírázóképességet. A növénymagasság tulajdonság tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a P2 genotípus alacsonyabb volt, mint a kontroll, a P10, P12 és P14 Pq szelektált vonalnál szignifikánsan magasabb értéket mértünk. A legmagasabb a P10 genotípus volt, de az összes szelektált vonal lemaradt a hibrid eredményeitől, amely nem meglepő, hiszen ezek a vonalak homogén genetikai alapanyagnak tekinthetők.

A hím és nővirágzás tekintetében is ezt a tendenciát tapasztaltuk. A legkorábban (a vetéstől a virágzásig eltelt napok száma) a hibrid virágzott (mind a hím, mind a nővirágzás tekintetében). A P5, P10 és P14 Pq szelektált vonalakban úgy a címerek, mind a bibe előbb virágoztak, mint a nem

szelektált DH-nál. A P12 genotípusnál a bibe statisztikailag igazolhatóan előbb virágzott, mint a nem szelektált DH vonal nővirágai. A kontrollnál tapasztalt hím virágzás esetében ~85 nap és a nővirágzás esetében ~87 nap, nemesítési szempontból igen hosszú tenyészidőnek számít. A szelekció ezt pozitívan befolyásolta, ami nemesítési szempontból nagyon jelentős, hiszen így könnyebben beilleszthetők a keresztezési programba.

A termékenyülési százalék tulajdonság tekintetében szignifikáns különbséget csak a P14 Pq szelektált vonalnál és a kiindulási hibridnél figyeltünk meg, a nem szelektált DH (D) vonalhoz viszonyítva, így e tulajdonságban a szelekciónak nem volt pozitív hatása.

A szemszám tulajdonság esetében azt tapasztaltuk, hogy az összes Pq szelektált genotípus lemaradt a nem szelektált DH vonaltól, és a kiindulási hibrid szignifikánsan nagyobb értéket mutatott. A szelektált genotípusok között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk kivéve a P15 genotípus esetében, ami jelentősen kevesebb szemet produkált.

A vizsgált tulajdonságok tekintetében elmondhatjuk, hogy a szelekció nem rontotta a fontosabb agronómiai jellegeket, továbbá nemesítési szempontból jelentős javulást értünk el a virágzási idő tulajdonság tekintetében.

4.2.11. Új tudományos eredmények:

- **Elsőként alkalmaztunk oxidatív stresszt indukáló vegyületeket *in vitro* mikrospóra tenyészetekben, és írtuk le ezen vegyületek kukorica mikrospórák egyedfejlődésére valamint a differenciálódó struktúrák finom szerkezetére gyakorolt hatását.**
- **Elsőként állítottunk elő oxidatív stresszt indukáló vegyületek alkalmazásával *in vitro* mikrospóra szelekcióval fertilis DH kukorica növényeket, valamint előállítottuk azok DH_1 utódgenerációját.**
- **Fiziológiai és biokémiai tesztekkel kimutattuk, hogy a Pq szelektált DH növények közül számos nagyobb toleranciával rendelkezik a toxikus oxigén formákat generáló Pq-tal szemben, mint a kontroll növények.**
- **Bebizonyítottuk, hogy az *in vitro* mikrospóra szelekció során kialakult oxidatív stressz-tolerancia öröklődik.**

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Szelekciós ágensek mikrospórák egyedfejlődésére és a növényregenerációra gyakorolt hatása

Az *in vitro* mikrospóra szelekció kidolgozása és alkalmazása során a szelekciós ágensek mikrospórákra gyakorolt hatásának vizsgálatakor számos tulajdonságot vizsgáltunk. Eredményeinkből az alábbi megállapításokat, javaslatokat és felmerülő kérdéseket tettem.

Megállapítottuk, hogy a kezeletlen kontrollhoz képest a tenyésztett mikrospórákban lejátszódó osztódási folyamatokat lelassították az alkalmazott szelekciós ágensek. A legdrasztikusabb hatást a menadion (MD) fejtette ki (Ambrus et al., 2005), összhangban a mások által tett megállapítással, hogy a MD befolyásolja a sejtosztódási folyamatokat (Thor et al., 1982, Prasad et al., 1994; Reichheld et al., 1999). Megfigyelésünket a szövettani vizsgálatok is alátámasztották. A mikrospórákból differenciálódó struktúrák sejtmagjainak többsége morfológiai abnoralitást (sejtmag fragmentáció, lízis) mutatott. Valamennyi kezelés esetében nagymértékű lipidfelhalmozódás volt megfigyelhető a mikrospórákból formálódó struktúrák sejtjeiben. Az általános tapasztalatok szerint ez a sejteket ért, erős stresszhatást jelzi.

Az alkalmazott stresszorok koncentrációjuk függvényében kisebb-nagyobb mértékben csökkentették a mikrospóra eredetű struktúrák életképességét. A legdrasztikusabb hatást a Pq fejtette ki, amely még a legalacsonyabb (0,5 μM) koncentrációban is a felére csökkentette a struktúrák életképességét a tenyésztés 7 napján.

A kontroll kezelés esetében az embriószerű és kalluszszerű struktúrák megjelenési aránya a szakirodalmi adatokkal összhangban volt (Kovács et al., 1999), azonban a kontrollhoz képest szignifikánsan megnövekedett az embrioidok aránya a MD kezelés hatására, míg a *t*-BHP kezelés hatására a kallusz szerű struktúrák aránya növekedett. A MD feltehetően a citoszkeletonra gyakorolt hatásának eredménye képpen megnövelte a szimmetrikus osztódások számát, a szakirodalomból ismeretes, hogy az embrioidok kialakulása jellemző a szimmetrikus sejtosztódás követően.

Eddigi vizsgálatainkból kiderült, hogy az alkalmazott ágensek eddig mások által feltárt hatásai az *in vitro* tenyésztett mikrospórákból fejlődő struktúrák sejtjeiben is megnyilvánulnak (lipidfelhalmozódás, abnormális sejtmagok). Mivel a mikrospórák kloroplasztiszokat nem tartalmaznak, a fotoszintetikus apparátusra gyakorolt destruktív hatások ebben az esetben szerkezeti szinten nem voltak vizsgálhatók. Így feltételezhető, hogy a mikrospórákban is a Pq másodlagos hatása érvényesül, azaz a mitokondriális I. és II: komplex szolgál elektron donorként a szuperoxid gyök képződéséhez (Cochemé és Murphy, 2008). Ennek feltárása azonban további vizsgálatokat igényel. Feltételezhetjük, hogy az elpusztult struktúrák nem rendelkeztek megfelelő detoxikáló mechanizmussal. Mivel az ultrastruktúrális vizsgálatokkal járó nehézségek miatt nem tudtunk

minden részletre kiterjedő megfigyeléseket tenni ezért ezeket a vizsgálatainkat célszerű tovább folytatni még teljesebb kép kialakítása érdekében.

A regenerációs százalék alakulásának tekintetében azt tapasztaltuk, hogy majdnem az összes szelekciós ágens esetében az alkalmazott koncentráció növekedésével csökkent ez a tulajdonság. Azonban az MR 1 illetve 10 μM kezelések szintje közötti a regenerációs százalék, az általános tendenciával szemben ellentétesen alakult. Valószínűnek tartjuk, hogy az 1 μM MR tartalmazó táptalajról származó kalluszok zöme abba a csoportba tartozhatott amelyet Jäger és mtsai (2005) az alacsony gyakorisággal regenerálódó típusba sorolt.

A koncentrációnként leoltott mintegy 5000-8000 portokból mindegyik szelekciós ágens használatával sikerült fertilis növényeket előállítani, de a MD kezelés esetében ez kis hatékonyságú volt. A fertilitásra vonatkozó eredményeinek értékelésénél azonban meg kell jegyeznünk, hogy a DH előállítás során a növényregenerálás az egyik legnehezebb feladat (Ezt a problémát kukoricával foglalkozó kollégákkal is megvitattuk nemzetközi konferenciákon, feltételezésünket személyes közlések alapján állítjuk). A kis növények leveleinek még nem alakult ki a kutikula rétege és nagyon nehéz adaptálni őket a normál ill. a növénynevelő kamra környezeti feltételeihez. Még ha sikerült is a növényeket felnevelni, sok esetben találkoztunk proterandia ill. protiginia jelenséggel, ami azt jelenti, hogy vagy a nő vagy a hím virágzás késett annyit, hogy nem tudtuk az öntermékenyítést megvalósítani. A módszer javítása érdekében javasoljuk az ilyen eredetű problémák kivédését korai kolhicin kezeléssel, ugyanis szakirodalmi adatok alátámasztják, hogy az alacsony koncentrációjú, rövid ideig tartó az indukció elején alkalmazott kolhicin kezelés hatására a virágzási problémák megszűntek (Barnabás et al., 1999; Kovács et al., 1999).

A MD kezelés esetében előállított növények alacsony száma, a várakozással ellentétes eredményt adott. Miután megállapítottuk, hogy a szelekciós ágens megnövelte az embriószerű struktúrák arányát a tenyészetekben arra számítottunk, hogy több növényt sikerül regenerálnunk. A MD sejtciklus szabályozásra gyakorolt hatásának köszönhetően a kialakult embriók nem voltak funkció képesek, a regenerációs táptalajra való áthelyezés után nem csíráztak ki. Érdekesnek találjuk az MD szimmetrikus sejtosztódásra gyakorolt hatását és javasoljuk ennek további citológiai és molekuláris biológiai vizsgálatát kukoricán és más gabonaféléken is.

A kapott eredmények alapján azonban felmerülhet a kérdés, hogy az alkalmazott szelekciós eljárás során indukálhatók-e mutációk? A kezelésnek kitett F_2 mikrospórák számát (kb. 10 millió/kezelés) tekintve ez is elképzelhető, de leginkább a genetikai hasadásból eredő variabilitás, széles szelekciós bázis lehet az alapja az oxidatív stressztűrő képességre történt sikeres szelekciónak. Ezt az a tény is megerősíti, hogy a disszertációban közölt kísérletek folytatása során bebizonyosodott, hogy a megemelkedett oxidatív stressztolerancia a további DH nemzedékekben (DH_{1-5}) is stabilan öröklődött.

Ami gátat szab annak, hogy e jól működő technika szélesebb körben elterjedjen az a genotípus függés, vagyis a könnyen elérhető indukálható genotípusok kis száma, ezért nagyon fontosnak tartjuk az *in vitro* androgenezis genetikai hátterének további molekuláris genetikai vizsgálatát.

5.2. Az *in vitro* szelektált vonalak DH_1 utódgenerációjának fiziológiai és biokémiai vizsgálatai

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a Pq szelektált vonalak DH_1 utódjai valóban nagyobb oxidatív stressztoleranciával rendelkeznek-e, mint a kontroll DH genotípus különböző fiziológiai és biokémiai teszteket végeztünk el.

Megállapítottuk, hogy az A18 eredetű Pq szelektált vonalak közül 6 vonal szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorral rendelkezett a vizsgált tulajdonságok ((Fv/Fm, ionvezető képesség klorofill (a+b) tartalom)) esetében, mint a kontroll genotípus, ami azt mutatja, hogy ezekben a genotípusokban a Pq okozta toxikus hatás, kisebb mértékű volt, mint a kontroll növényben. Ezzel párhuzamosan *in situ* festési eljárással kimutattuk, hogy ezekben a genotípusokban az oxigén gyökök felhalmozódása is kisebb mértékű volt. A Pq szelektált levelekben kevesebb toxikus oxigén forma halmozódott fel Pq kezelés hatására ezért kevésbé festődtek a levelek.

Megállapítottuk továbbá, hogy a magasabb koncentrációjú Pq-ot tartalmazó táptalajról származó vonalak (DH_1 utódgenerációja) rendelkeztek a legmagasabb rezisztencia faktorral. Ez azt jelentheti, hogy minél nagyobb a szelekciós nyomás (letális koncentráción belül), annál nagyobb toleranciát érhetünk el.

Egyes antioxidáns enzimek vizsgálatával megállapítottuk, hogy a szelektált vonalakban számos antioxidáns enzim aktivitása magasabb volt úgy alapállapotban, mind Pq indukálta oxidatív stressz körülmények között. Ugyanakkor az egyes vonalak antioxidáns kapacitása eltérő volt, ami az egyedi gén kombinációval rendelkező mikrospórák szelekciójának következménye is lehet. Az is megállapítható volt, hogy a magas rezisztencia faktorral rendelkező genotípusokban, mint pl. P5, P14 és P15 több enzim alap illetve Pq-indukált aktivitása is magasabb volt. Ez előnyt jelenthet a különböző ROF elleni komplex védekezés során.

Meghatároztuk a szelektált vonalak csírázáskori hidegtűrési indexét. Szántóföldi körülmények között a kukorica csírázásakor gyakran előfordul hazánkban alacsony hőmérséklet: ennek hatására elhúzódik a csírázás, a kelés hiányos lesz, továbbá a kártevők és a patogén gombák könnyebben károsítják a csírákat, illetve a fiatal növényeket. A vizsgált genotípusok kontroll és hideg hőmérsékleten történő csíráztatásából kapott eredmények nem tértek el a szakirodalomban fellelhető adatoktól (Marton és Kőszegi, 1997). Megállapítottuk, hogy a nagy rezisztencia faktorral rendelkező vonalak nagy hideg tolerancia indexel rendelkeznek(P5, P10, A15, H1P2, H1P5, H1P8, H1P9, H1P10, H1P11, H2P3, H2P7, H3P3, H3P5). Azonban volt néhány olyan genotípus is, melyik

a többi vizsgálat esetében nagyobb rezisztencia faktorral rendelkezett, de a hidegtűrési faktora igen alacsony volt (P2, P12, P15, H1P1), illetve fordítva, míg oxidatív stressztűrése nem volt kiemelkedő, hidegtűrése meghaladta a kontroll DH vonalét (H1P4, H1P6, H1P7, H1P12, H1P15, H1P16, H2P6, H3P1, H3P4, H3P6). Hasonló eredményt kaptunk fiatalkori hidegtűrés vizsgálatánál is (Ambruset al., 2008; Darkó et al., 2011), de mivel ezek az adatok csak az A18 hibrid esetén ismertek, jelen dolgozatban ezeket az eredményeket nem tárgyaljuk. Megemlítem továbbá, hogy munkatársaim, más stresszfaktorok (szárazság, patogén fertőzés) vizsgálatával is igazolták, hogy az oxidatív stressztolerancia fokozása mikrospórák *in vitro* szelekciójával keresztolerancia kialakulását eredményezheti, mely előnyt jelenthet más abiotikus stresszekkel szemben is. Ez hasznos agronómiai tulajdonság lehet akár a vetés/kelés körüli hideg, vagy a korán beköszöntő szárazság elkerülésében. Ennek igazolásához azonban a több éven keresztül történő szántóföldi tesztelés elengedhetetlen.

Mindezen vizsgálatok eredményei rámutattak arra, hogy sikeresen megvalósítható a mikrospórák *in vitro* szelekciója reaktív oxigén gyököket indukáló vegyületek felhasználásával, belőlük fertilis DH oxidatív stresszekkel szemben ellenálló növények állíthatók elő. A kidolgozott technika nemcsak modell genotípuson működik, hanem alkalmazható nemesítési szempontból jelentős genotípusok *in vitro* szelekciójára is. Ezáltal jó adaptációs képességgel rendelkező értékes nemesítési alapanyagok állíthatók elő.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kukorica hazánkban az egyik legnagyobb területen termesztett gabonafaj, amely főként állati takarmányként igen fontos szerepet játszik a mezőgazdasági termékek piacán. A modern kukoricanemesítő műhelyek ezért, egyre inkább alkalmazzák a klasszikus módszerek mellett mindazokat a korszerű biotechnológiai eljárásokat, melyek hatékonyan elősegíthetik a hibridek hideg- és szárazságtűrésének, betegségekkel és kártevőkkel szembeni ellenálló-képességének a javítását. Számos abiotikus, ill. biotikus stressz oxidatív úton, reaktív oxigénformák generálása révén fejti ki növénykárosító hatását. Számos kísérlet bizonyítja, hogy az oxidatív stressz-toleranciáért felelős gének a növények sporofitikus és gametofitikus életciklusa során egyaránt aktiválódnak Ez a genetikai átfedés megteremti a mikrospóra eredetű haploid szövettenyészetek felhasználásának lehetőségét *in vitro* szelekcióra, az oxidatív stresszekkel szembeni ellenálló képesség fokozására.

Munkánk során célul tűztük ki, egy olyan új *in vitro* szelekciós technika kidolgozását, amely lehetővé teszi mikrospóra eredetű haploid szövettenyészetekből kiindulva oxidatív károsodást előidéző stresszekkel szemben ellenálló fertilis, DH kukorica genotípusok előállítását, valamint az így előállított vonalak tesztelését növényfiziológia és biokémiai módszerekkel annak érdekében, hogy megállapítsuk valóban nagyobb oxidatív stressztoleranciával rendelkeznek-e, mint a kontroll növények.

Kísérleteinkben egy jó haploid indukciós képességgel rendelkező saját előállítású modell F_1 hibridet (A18) használtunk, majd a későbbiekben fontos agronómiai tulajdonságokkal rendelkező H1, H2, H3 jelzésű hibrideket is vizsgáltunk. Az *in vitro* mikrospóra szelekciót mind az indukciós, mind pedig a regenerációs fázisban különböző koncentrációban alkalmazott reaktív oxigén formákat generáló vegyületeket (paraquat, metionin+riboflavin, menadion és terc-butilhidroperoxid) felhasználásával valósítottuk meg. Megvizsgáltuk ezen vegyületek hatását a portok válaszadó képességére, a képződött mikrospóra eredetű struktúrák számára, a növényregenerációra és az így előállított fertilis DH növények számára. Citológiai és szövettani vizsgálatokkal nyomon követtük a szelekciós ágensek hatását a mikrospórák egyedfejlődésére. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az összes szelekciós ágens csökkentette a portokok indukcióját, az embrió ill. kallusz szerű struktúrák, valamint a fertilis DH növények számát. Egyes szelekciós ágensek sejt degradációt és kromoszóma kondenzációt okoztak. Az A18 genotípuson kívül mind a 3 F_1 hibrid (H1, H2, H3) mikrospóráiból sikerült növényeket regenerálni. A regenerálódott DH

növényeket öntermékenyítettük, az így kapott szemeket elültettük és a belőlük csírázó DH_1 növényeket fiziológiai és biokémiai vizsgálatoknak vetettük alá. Ezek a következők voltak: klorofill *a* fluoreszcencia indukció és ionkiáramlás mérése, klorofill (a+b) tartalom meghatározása antioxidáns enzim aktivitás mérése, toxikus oxigénformák *in situ* kimutatása, és csírázáskori hidegtűrési vizsgálatok.

Kísérleteinkbe 11 db A18 eredetű, 16 db H1 hibrid eredetű, 7 db H2 hibrid eredetű, 6 db H3 hibrid eredetű paraquat tartalmú táptalajról származó DH vonalat vontunk be, kontrollként a szelekciós ágenst nem tartalmazó táptalajról regenerált DH vonalakat használtuk. Elvégeztük ezen növények Pq toleranciájának tesztelését növényfiziológiai és biokémiai vizsgálatokkal, valamint a kapott eredményekből kiszámoltuk a vonalak rezisztencia faktorát. A fiziológiai tesztek alapján 6 db A18 eredetű vonal szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorral rendelkezett a Pq-tal szemben, mint a nem szelektált DH genotípus. *In situ* festéssel (DAB, NBT) megnéztük, hogy ezen vonalak leveleiben Pq hatására mennyi toxikus oxigén forma halmozódik fel. Megállapítottuk, hogy mind a szuperoxid gyök, mind pedig a H_2O_2 sokkal kisebb mennyiségben volt jelen a Pq szelektált DH vonalak leveleiben, mint a nem szelektált DH vonal levelében. Hasonló vizsgálatokkal kimutattuk, hogy 7 db H1 hibrid eredetű, 2 db H2 hibrid eredetű és 2 db H3 hibrid eredetű Pq szelektált vonalnak szignifikánsan nagyobb volt a Pq-tal szembeni rezisztencia faktora, mint a nem szelektál DH vonalaké. Ez arra enged következtetni, hogy ezek a vonalak Pq okozta oxidatív stresszekkel szemben toleránsabbak, mint a nem szelektált DH genotípusok. Megvizsgáltuk a hideg (mint oxidatív úton ható stressz) csírázásra gyakorolt hatását. Azt tapasztaltuk, hogy 3 db A18 eredetű vonal szignifikánsan nagyobb hidegtűrési faktorral rendelkezett, mint a nem szelektált DH genotípus. Ezeknek a vonalaknak a Pq okozta fiziológiai vizsgálatok alapján kapott rezisztencia faktoraik is szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a nem szelektált DH vonalé. A többi hibridből származó vonal esetében a Pq indukálta fiziológiai hatások alapján a nagy rezisztencia faktorral rendelkező vonalak egy részének a hidegtűrési faktora is nagyobb volt, mint a nem szelektált DH vonalakénak. Mindez azt jelenti, hogy ezek a vonalak nemcsak a Pq okozta stresszel, hanem egyéb oxidatív úton ható (pl. hideg) stresszel szemben is toleránsabbnak bizonyultak, mint a nem szelektált DH genotípusok.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy *in vitro* mikrospóra szelekcióval oxidatív stressztoleráns DH növények állíthatók elő.

7. SUMMARY

In Hungary maize is one of the crops grown on the largest area, and plays an extremely important role on the market for agricultural products, mainly as livestock feed. Modern maize breeding workshops therefore make increasing use of up-to-date biotechnological techniques in addition to classical methods, as these effectively promote improvements in the chilling and drought tolerance of the hybrids and their resistance to diseases and pests. Numerous abiotic and biotic stress factors exert their damaging effects on plants in an oxidative manner, by generating reactive oxygen species. Many experiments have proved that the genes responsible for oxidative stress tolerance are activated during both the sporophytic and gametophytic phases of the plant life cycle. This genetic overlapping makes it possible to utilise haploid tissue cultures of microspore origin for *in vitro* selection aimed at enhancing resistance to oxidative stress factors.

The aim of the present work was to elaborate a new *in vitro* selection technique starting from haploid tissue cultures of microspore origin to develop fertile DH maize genotypes resistant to stress factors that induce oxidative damage, and to test these lines using plant physiological and biochemical methods in order to determine whether they really have greater oxidative stress tolerance than the control plants.

A model F_1 hybrid genotype (A18) developed in Martonvásár, having good haploid induction ability, was used throughout the experiments, while tests were also made on three hybrids with important agronomic traits (H1, H2, H3). *In vitro* microspore selection was performed by applying various concentrations of compounds generating reactive oxygen species (paraquat, methionine+riboflavin, menadione and *tert*-butyl hydroperoxide) in both the induction and regeneration phases. The effect of these compounds was examined on the responsiveness of the anthers, the number of microspore-derived structures formed, plant regeneration, and the number of fertile DH plants produced. Cytological and histological analyses were performed to monitor the effect of the selection agents on microspore development. The results showed that all the selection agents reduced anther induction and the number of embryo-like or callus-like structures and of fertile DH plants. Some of the selection agents caused cell degradation and chromosome condensation. Plants were successfully regenerated not only from the A18 genotype, but also from the three F_1 hybrids (H1, H2, H3). The regenerated DH plants were self-pollinated and the DH_1 plants obtained from the seeds were subjected to physiological and biochemical analyses: the measurement of chlorophyll *a* fluorescence induction and ion leakage, the determination of the chlorophyll (a+b) content, the measurement of antioxidant enzyme activity, the *in situ* detection of toxic oxygen species and cold tests to determine chilling tolerance at germination.

Eleven lines originating from the A18 hybrid, 16 from H1, seven from H2 and six from H3, all selected on medium containing paraquat, were included in the physiological and biochemical analyses, together with DH lines regenerated from medium containing no selection agent, as a control. The data obtained were used to calculate resistance factors. The results of the physiological tests indicated that, in terms of Pq resistance, six lines of A18 origin had significantly greater resistance factors than the non-selected DH genotype. *In situ* staining (DAB, NBT) was used to detect the quantity of toxic oxygen species accumulated in the leaves of these lines in response to Pq and it was found that much smaller quantities of both superoxide radical and H_2O_2 were present in the leaves of Pq-selected DH lines than in those of the non-selected DH line. Similar analyses revealed that six lines of H1 origin, two of H2 origin and two of H3 origin had significantly higher Pq resistance factors than the non-selected DH lines, suggesting that these lines were significantly more tolerant of oxidative stress induced by Pq than the non-selected DH genotypes. The effect of cold (as a stress factor acting in an oxidative manner) on germination was also examined and three lines of A18 origin were found to have significantly greater chilling tolerance than the non-selected DH genotype. The resistance factors calculated for these lines on the basis of physiological analyses were also higher than those of the non-selected DH line. In the case of lines originating from the other hybrids, some of the lines with high resistance factors for physiological traits also had a higher chilling tolerance index than the non-selected DH lines, indicating that these lines were not only more tolerant of Pq-induced stress than the non-selected DH genotypes, but also of other stress factors that exert their effect in an oxidative manner (e.g. cold).

The results proved that *in vitro* microspore selection was a feasible technique for producing DH plants tolerant of oxidative stress.

8. MELLÉKLET

8.1. Irodalom jegyzék

ABDELSAMAD A., EL-SAYED A. AND IBRAHIM AF. (2007): Development of drought tolerant double haploid wheat using biochemical genetic markers on *in vitro* culture. *J. Appl. Sci. Res.,* 3, 1589-1599.

AEBIG H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.,* 105, 121-126.

ACEVEDO A. AND SCANDALIOS JG. (1990): Expression of the catalase and superoxide dismutase genes in mature pollen in maize. *Theor. Appl. Genet.,* 80, 705-711.

ALEMANNO L. AND GUIDERDONI E. (1994): Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-mediated media. *Plant Cell Rep.,* 13, 432-436.

ALEXANDER MP. (1969): Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol.*, 44, 117-122.

AMBRUS H., DARKÓ É., KIRÁLY Z., BARNABÁS B. (2005): Effects of ROS progenitors on sporophytic development of maize microspores. *Acta Biol. Szeged.,* 49, 25-28.

AMBRUS H., DARKÓ É., SZABÓ L., BAKOS F., KIRÁLY Z., BARNABÁS B. (2006): *In vitro* microspore selection in maize anther culture with oxidatve-stress stimulators. *Protoplasma*, 228, 87-94.

AMBRUS H., DULAI S., KIRÁLY Z., BARNABÁS B. DARKÓ É. (2008): Paraquat and cold tolerance in doubled haploid maize. *Acta Biol. Szeged.,* 52, 147-151.

ANONYMOUS, 401 RESEARCH GROUP (1975): Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays*. *Acta Genet. Sin.,* 2, 143.

ANTOINE-MICHARD S. AND BECKERT M. (1997): Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.,* 48, 203-207.

APEL K. AND HIRT H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.,* 55, 373-99.

ARMSTRONG C.L. AND GREEN, C.E. (1985): Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta,* 164, 207-214.

ASADA K. (1992): Ascorbate-peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.,* 85, 235-241.

ASADA (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.,* 141, 391-396.

BABBS C.F., PHAM J.A., COOLBAUGH R.C. (1989): Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.,* 90, 1267-1270.

BADAWI G.H., YAMAUCHI Y., SHIMADA E., SASAKI R., KAWANO N., TANAKA K., TANAKA K. (2004): Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (Nicotiana tabacum) chloroplasts. *Plant Sci.,* 166: 919-928.

BAKER N.R., OXBOROUGH K., LAWSON T., MORISON J.I.L. (2001): High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *J. Exp. Bot.,* 52, 615-621.

BAKOS F. (2007): *In vitro* embriófejlődés a gabonafélék gametofitikus sejtvonalaiból. Doktori értekezés. Martonvásár. 128.

BARCELO P., CABRERA A., HAGLE C., LÖRZ H. (1994): Production of doubled-haploid plants from tritordeum anther culture. *Theor. Appl. Genet.,* 87, 741-745.

BARLOY D., DENIS L., BECKERT M. (1989): Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. *Maydica,* 34, 303-308.

BARNA B., ÁDÁM A., KIRÁLY Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Natur wissenschaften,* 80, 420-422.

BARNABÁS B., FRANSZ P.F., SCHEL J.H.N. (1987): Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.,* 6, 212-215.

BARNABÁS B., PFAHLER P.L., KOVACS G., (1991): Direct effect of the colchicin on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (Triticum aestivum L). *Theor. Appl. Genet.,* 81, 113-118.

BARNABÁS B. ÉS SZUNDY T. (1998): Dihaploid vonalak előállításának perspektívái és felhasználásuk a kukoricanemesítésben. *Martonvásár* 98/1: 16-17

BARNABÁS B., OROSZ Á., OBERT B., KOVÁCS G. (1998): Comparison of anther culture characteristics and spontaneous genome doubling in androgenic plants using maize (*Zea mays* L.) hybrids with varying DH line parentage. *Acta Agron. Hung.,* 46, 217-224.

BARNABÁS B., OBERT B., KOVÁCS G. (1999): Colchicine, an efficient genome doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep*., 18, 858-862.

BARNABÁS, B., KOVÁCS, G., HEGEDŰS, A., ERDEI, S. AND HORVÁTH, G. (2000): Regeneration of doubled haploid plants from *in vitro* selected microspores to improve aluminium tolerance in wheat. *J. Plant Physiol.,* 156, 217-222.

BARNABÁS, B., SZAKÁCS, É., KARSAI, I. AND BEDŐ, Z. (2001): *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica,* 119, 211-216.

BARNABÁS B. (2003): Anther culture of maize (*Zea mays* L.). Malusinszky, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (Szerk.) In: Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic Press, Dordrecht , pp. 103-108.

BARNABÁS B., MARTON L.CS., PINTÉR J., SZUNDY T. (2003): Az *in vitro* haploid indukciós képesség bevitele elit kukoricavonalakba keresztezéssel. Nagy János (Szerk.), In: *Kukorica hibridek adaptációs képességének és termésbiztonságának javítása*. Debrecen. p. 4-9.

BARNABÁS B. (2005): Nemesítésű értékű dihaploid (dh) növények előállítása. Nagy János (Szerk.), In: *Kukorica hibridek adaptációs képességének és termésbiztonságának javítása.* Debrecen. p. 54-73.

BARRET P., BRINKMAN M., DUFOUR P., MURIGNEUX A. (2004): Identification of candidate genes for *in vitro* androgenesis induction in maize. *Theor. Appl. Genet.,* 109, 1660-1668.

BEAUMONT V.H., ROCHEFORD T.R., WIDHOLM J.M. (1995): Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). *Genome*, 38, 968-975.

BEDNAREK P.T., ORŁOWSKA R., KOEBNER R.M.D. AND ZIMNY J. (2007): Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (Hordeum vulgare L.). *BMC Plant Biol.,* 7, 10.

BEDŐ Z., KARSAI I., BALLA L. AND BARNABÁS, B. (1988): *Some possibilities of efficient haploid production in wheat.* In: Miller, T.E. and Koebner, R.M.D. (szerk.) Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium, Cambridge, 13-19 July, 1988. pp. 1043-1046.

BEDŐ Z., KARSAI I., LÁNG L., VIDA G. (1996): Current Plant Science and biotechnology in agriculture. In: Mohan Jain, S., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (Szerk.) *In vitro haploid production in higher plants.* Vol. 2, 93-109. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/ Boston/ London.

BEDŐ, Z., LÁNG, L., RAKSZEGI, M. (2007): Géntechnológia a növénynemesítés eszköztárában. *Magyar Tudomány*, 2007/4, 418.

BIELAWSKI W. AND JOY K.W. (1986): Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of peas. *Phytochem.,* 25, 2261-2265.

BITTSÁNSZKY A., GYULAI G., GULLNER G., KISS J., SZABÓ Z., KÁTAY G., HESZKY L. AND KÖMÍVES T. (2009): *In vitro* breeding of grey poplar (Populus × canescens) for phytoremediation purposes. *J. Chem. Techn. and Biotechn.,* 84, 890-894.

BLAKESLEE A.F., BELLING J., FARNHAM M.E., BEGNER A.D. (1922): A haploid mutant in *Datura stramonium*. *Sci.,* 55: 646-647.

BOLIK M. AND KOOP H.U. (1991): Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. *Protoplasma,* 162, 61-68.

BOLLOM H. AND RAQUIN C. (1987): Haplomethods: a tool for crop improvement. *Nestlé Research News* 1986/87, Nestlec Ltd. Jean Genoud S.A. Le Mount Lusanne pp. 81-90.

BOUVIER F., BACKHAUS R.A., CAMARA B. (1998): Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol.Chem.,* 273, 30651-30659.

BOWLER C., VAN MONTAGU M. AND INZÉ D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* 43,83-116.

BOWLER C., VAN CAMP W., VAN MONTAGU M. AND INZÉ D. (1994): Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.,* 13(3), 199-2108.

BOWYER J.R. AND CAMILLERI P. (1985): Spin-trap study of the reactions of ferredoxin with reduced oxygen species in pea chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta- Bioenergetic*, 808, 235-242.

BRAY D.F., BAGU R.J., NAKAMURA K. (1993): Ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii* following exposure to paraquat: comparison of wild type and a paraquat-resistant mutant. *Can J. Bot.,* 71, 174-182.

BRETTEL R.I.S., THOMAS E., WERNICKE W. (1981): Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica*, 26,101-111.

BRISIBE E. A., GAJDASOVA A., OLESEN A., ANDERSEN S.B. (2000): Cytodifferentation and transformation of emnbryogenic callus lines derived from anther culture of wheat. *J. Exp. Bot*., 343, 187-196.

BUENO P., VARELA J., GIMENEZ-GALLEGO G., DEL RIO L.A. (1995): Peroxisomal copper, zink superoxide dismutase. *Plat Physiol.,* 108,1151-1160.

BÜTER B., PESTICELLI S. M., BERGER K., SCHMID J.E., STAMP P. (1993): Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. *Plant Cell Rep.,* 13,79-82.

CAO Z., AND LENG G. (1983): A preliminary report on studies of haploid embryogenic cell clone of albino plantlets in maize. *Kexue Tongbao,* 28, 1118-1122.

CANDEAS E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.,* 58, 79-110.

CASTILLO A.M., VALLES M.P. AND CISTUE L. (2000): Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica,* 113, 1-8.

CHANG M.T. AND NEUFFER M.G. (1989): Maize microsporogenesis. *Genome*, 32, 232-244.

CHASE S.S. (1952): Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.,* 44, 263-267.

CHEN Y. AND LI L. (1978): Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat. In: *Proceedings of symposium on plant tissue culture*. Science Press, Peking, pp. 199-213.

CHU C.C. (1978): The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Plant Tissue Culture, Proceedings of the Beijing Symposium*, 1981, Pitman, Boston, pp. 43-50.

CHU C.C., HILL R.D. AND BRULE-BABEL A.L. (1990): High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci.,* 66,255-262.

COCHEMÉ H.M. AND MURPHY M.P. (2008): Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J. Biol. Chem.,* 283, 1786-1798.

COE E.H. AND SARKAR K.R. (1964): The detection of haploids in maize. *J. Heredity,* 55, 231-233.

COUMANS M.P., SOHOTA S., SWANSON E.B. (1989): Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep.,* 7,618-621.

CORDEWENER J., VAN DER WAL F., JOOSEN R., BOUTILIER K., AMERICA T. (2009): Proteomics in rapeseed microspore embryogenesis. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM, (Szerk.), *Advances in haploid production in higher plants*. Springer: Heidelberg, pp. 135-46.

COWEN N.M., JOHNSON C.D., ARMSTRON G.K., MILLER M., WOOSLEY A., PESCITELLI S., SKOKUT M., BELMAR S., PETOLINO JF. (1992): Mapping genes conditioning *in vivo* androgenesis in maize using RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.,* 84, 720-724.

DARKÓ É., AMBRUS H., STEFANOVITS-BÁNYAI É., FODOR J., BAKOS F. AND BARNABÁS, B. (2004): Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. *Plant Sci.,* 166, 583-591.

DARKÓ É., AMBRUS H., FODOR J., KIRÁLY Z. AND BARNABÁS B. (2009): Enhanced tolerance to oxidative stress with elevated antioxidant capacity in doubled haploid maize derived from microspore exposed to paraquat. *Crop Sci.,* 49, 628-636.

DARKÓ É., FODOR J., DULAI S., AMBRUS H., SZENZENSTEIN A., KIRÁLY Z. AND BARNABÁS B. (2011): Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *J. of Agron. and Crop Sci.,* 197, 454-465.

DARKÓ É. AND BARNABÁS B. (2012): Improvement of abiotic stress tolerance of crops *via* enchancement of their antioxidant capacity. *Curr. Chem. Biol.,* 6, 265-274.

DAT J.F, LOPEZ-DELGADO H., FOYER C.H., SCOTT I.M. (2000): Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J. Plant Physiol*., 156, 659-665.

DEAN J.V., GRONWALD J.W. EBERLEINC.V. (1990): Induction of GST isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol*., 19, 467-473.

DIAZ-VIVANCOS P., RUBIO M., MESONERO V., PERIAGO P. M., ROS BARCELÓ A., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., HERNÁNDEZ J. A. (2006): The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *J. of Exp. Bot.,* 57, 3813-3824.

DEÁK M., HORVÁTH V.G., DAVLETOVA S., TÖRÖK K., SASS L., VASS I., BARNA B., KIRÁLY Z. DUDITS D. (1999): Plants ectopically expressing the iron-blinding protein, ferritina re tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nat. Biotechnol.,* 17, 192-196.

DIEU P. AND BECKERT M. (1986): Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from *in vitro* cultured anthers in maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 31, 245-259.

DODGE A.D. (1994): Herbicide action and effects on detoxification process. In: *Causes of photoactive stress and amelioration of defense system in plants.* Foyer C.H. and Mullineux P.M. (Szerk.), CRC Press. Boca Raton. pp. 219-236.

DOULIS A.G., DEBIAN N., KINGSTON-SMITH A.H., FOYER C.H. (1997): Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiol*., 114, 1031-1037.

EDER J. AND CHALYK S. (2002): *In vivo* haploid induction in maize; *Theor. Appl. Genet*., 104, 703-708.

EDREVA A. (2005): Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agr. Ecosyst. Environ.,* 106, 119-133.

EDWARDS, K.J. AND MOGG, R. (2001): Plant genotyping by analysis of single nucleotide polymorphism. Henry, R.J. (ed.): *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants.* CABI Publishing. 1-14.

ELTAYEB A.E, YAMAMOTO S., HABORA M.E.E., MATSUKUBO Y., AONO M., TSUJIMOTO H., TANAKA K. (2010): Greater protection against oxidative damages imposed by various environmental stresses in transgenic potato with higher level of reduced glutathione. *Breeding Sci*., 60, 101-109.

FADEL F., WENZEL G. (1993): *In vivo* selection for tolerance to fusarium in F1 microspore populations of wheat. *Plant Breed.,* 110, 89-95.

FERRIE A.M.R., PALMER C.E., KELLER W.A. (1995): Haploid embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (Szerk.), *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer, Dodrecht, pp. 309-344.

FINNIE S. J., POWEL W. AND DYER A. F. (1989): The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.,* 103, 110-118.

FROVA C. (1990): Analysis of gene expression in microspores, pollen, and silks of *Zea mays* L. *Sex. Plant Rep.,* 3, 200-206.

FRYER M.J., OXBOROUGH K., MULLINEAUX M., BAKER N.R. (2002): Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J. Exp. Bot.*, 372, 1249-1254.

FOYER H.C., LELANDAIS M., GALAP C. AND KUNERT K.J. (1991): Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.,* 97, 863-872.

FOYER C.H., DESCOURVIÉRES P. AND KUNERT K.J. (1994): Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studies in transgenic plants. *Plant Cell Environ.,* 17, 507-523.

FOYER C.H., LOPEZ-DELGADO H., DAT J.F., SCOTT I.M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.,* 100, 241-254.

FOYER C.H. AND NOCTOR G. (2009): Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications *Antioxidants and Redox Sign.,* 11, 861-905.

FOYER C.H. AND NOCTOR G. (2011): Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiol.,* 155, 2-18.

FÖLDESINÉ FÜREDI PK., AMBRUS H., BARNABÁS B. (2012): Development of cultured microspores of maize in the presence of *n*-butanol and 2-aminoethanol. *Acta Agron. Hung.,* 3, 183-189.

FUJII H. (1990): Studies on the Electronic Structure and Reactivities of Catalytic Intermediates in Heme Enzymes. Ph.D. thesis, Kyoto University.

FURUSAWA I., TANAKA K., THANUTONG P., MIZUGUCHI A. YAZIKI M. (1984): Paraquat-resistant tabacco calluses with enhanced superoxide activity. *Plant Cell Physiol.,* 25, 1247-1254.

GABER A., YOSHIMURA K., YAMAMOTO T., YABUTA Y., TAKEDA T., MIYASAKA H., NAKANO Y. AND SHIGEOKA S. (2006): Glutathione peroxidase-like protein of Synechocystis

PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic Arabidopsis. *Physiol. Plant.,* 128, 251-262.

GAILLARD A., VERGNE P., BECKERT M. (1991): Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep.,* 10, 55-58.

GAYEN P., MADAN J.K., KUMAR R., SARKAR K.R. (1994): Chromosome doubling in haploids through colchicine. *Maize Genet. Coop Newslett.,* 68, 65.

GEIGER H.H. (2006): Haploid induction by inducer line technology in maize; The International Conference "*Haploids in Higher Plants III",* Vienna, Austria, February 12-15 2006 Abstract book. pp. 19.

GEIGER H.H. (2009): Doubled haploids. In. Bennetzen J.L. and Hake S. (Szerk), *Maize Handbook.* Vol.:II: Genetics and Genomics, Springer Science+Business Media LLC. pp. 641-657.

GENOVESI A.D. AND COLLINS B.G. (1982): *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.,* 22, 1137-1144.

GENOVESI A.D. (1990): Maize (*Zea mays* L.) *in vitro* production of haploids. In: Bajaj, Y. P. S. (Szerk.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry,* Vol. 12, Haploids in Crop Improvement I, Springer Verlag, New York, pp.176-203.

GENOVESI A.D. AND YINGLING R.A. (1994): Isolated microspore and anther culture of corn. United States Patent, Patent Number: 5,322,789, June 21 1994, United States Patent and Trademark Office, Washington DC, USA.

GENTY B. AND MEYER S. (1994): Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. *Aust. J. Plant Physiol*., 22, 277-284.

GILL S.S. AND TUTEJA N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.,* 48, 909-30.

GOSAL S.S., SINDHU A.S., SANDHU J.S., SANDHU-GILL R., SINGH B., KHEHRA G. S., SIDHU G. S., DHALIWAL H. S. (1997): Haploidy in rice. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (Szerk.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Vol. 4. Kluwer, Dodrecht, pp. 1-35

GUAN Z., CHAI T., ZHANG Y., XU J., WEI W. (2009): Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere,* 76, 623-630.

GULLNER G., KŐMIVES T., KIRÁLY L. (1991): Enhanced inducibility of antioxidant systems in a *Nicotiana tabacum* L. biotype results in acifluorfen resistance. *Z. Naturforsch*., 46C, 875-881.

GULLNER G., FODOR J., KIRÁLY Z. (1995): Induction of glutation S-transferase activity in tabacco by tabacco necrosis virus infection and by salicyclic acid. *Pestic. Sci.,* 45, 290-291.

GUPTA H.S., BHUYAN R.N., PATTANAYAKET A. AND PANDENY D.K. (1996): Development of cold-tolerant rice through anther culture. *Int. Rice Res. Notes,* 21, 1-6.

GRANT J.J. AND LOAKE G.J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.,* 124, 21-29.

HABIG W., PABST M.J., JACOBY W.B. (1974): Gluthation-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biol. Chem.,* 249, 7130-7139.

HALLIWELL B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of life aerobic life. *Plant Physiol.,* 141, 312-322.

HAMAOKA Y., FUJITA Y., IWAI S. (1991): Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris. Physiol. Plant.,* 82, 67-72.

HANSEN N.J.P AND ANDERSEN S.B. (1998a): Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breed.,* 117, 401-405.

HANSEN N.J.P. AND ANDERSEN S.B. (1998b): *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica,* 102, 101-108.

HANSON D.D., HAMILTON D.A., TRAVIS J.L., BASHE D.M., AND MASCARENHAS J.P. (1989): Characterization of a pollen-specific cDNA from *Zea mays* and its expression. *Plant Cell,* 1**,** 173-179.

HASISSOU D. AND BOUHARMONT J. (1994): *In vitro* selection and characterization of drought tolerant plants of durumwheat (Triticum durum desf). *Agronomy,* 14, 65–70.

HAUSE L.A. AND ALSCHER R.G. (1994): Purification and characterisation of glutathione reductase isoenzymes specific for the state of cold hardiness of red spruce. *Plant Physiol.,* 105, 205-213.

HE S., HAN Y., WANG Y., ZHAI H., LIU Q. (2009): *In vitro* selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.,* 96, 69-74.

HERCZEGH M. (1978): A kukorica hidegtűrő képességének javítása nemesítéssel. Kandidátusi értekezés, Martonvásár, p. 139.

HESZKY L. (1974): A *Nicotiana tabacum* L. haploid és homozigóta diploid alakjainak előállítása portokkulturában, valamint kalluszszövet-kulturában. *Agrobotanika,* 15, 215-232.

HESZKY L. ÉS PAUK J. (1976): Haploid növények előállítása az *Oryza sativa* L. *in vitro* portok- és ováriumkulturájából. II. Növényindukció portokkultúrában. *Agrobotanika,* 16, 147-153.

HESZKY L., LI S.N., KISS E., SIMON-KISS I., LŐKÖS K., DO Q.B. (1991): *In vitro* production of rice in Hungary. In, Bajaj, Y.P.S. (Szerk.), *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 6. Rice. 619-641. Springer Verlag, Berlin- Heidelberg- NewYork.

HESZKY L., SIMON-KISS I., DO Q.B. (1996): Release of rice variety "DAMA" developed through haploid somaclone breeding. In, Bajaj, Y.P.S. (Szerk.), *Biotechnology in agriculture and forestry.* Vol. 36. Somaclonal variation in crop improvement II., 45-54. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- NewYork.

HESZKY L. (2003): Az ivaros szaporodás biotechnológiája. In: Dudits, D. és Heszky L. (Szerk.) *Növényi biotechnológia és géntechnológia,* pp. 57-96. Agroinform, Budapest.

HU H. (1978): Genetic analysis of pollen plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Genet. Sin.,* 6, 3.

HU T. AND KASHA K. J. (1999): A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome,* 42, 432-441.

HOEKSTRA S., VAN ZIJDERVELD M.H., LOUWERSE J.D., HEIDEKAMP F., VAN DER MARK F. (1992): Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. Cv Igri. *Plant Sci*., 86, 89-96.

HOCHHOLDINGER F., SAUER M., DEMBINSKY D., HOECKER N., MUTHREICH N., SALEEM M., LIU Y. (2006): Proteomic dissection of plant development. *Proteomics*, 6, 4076-83.

HOSP J., MARASCHIN S.F., TOURAEV A., BOUTILIER K. (2006): Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica,* 158, 275-85.

HUNTER C.P. (1988): Plant regeneration from microspores of barley (*Hordeum vulgare*), MS Thesis, Wye College, Univ. of London, London, UK.

IANNELLI MA., VAN BREUSEGEM F., VAN MONTAGU M., INZÉ D., MASSACI A. (1999): Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. *J. Exp. Bot.,* 50, 523-532.

IMIN N., KERIM T., ROLFE B.G., WEINMAN J.J. (2004): Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. *Proteomics,* 4, 1873-82.

INDRIANTO A., HEBERLE-BORS E. AND TOURAEV A. (1999): Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Sci.,* 143, 71-79.

INDRIANTO A., BARINOVA I., TOURAEV A. AND HEBERLE-BORS E. (2001): Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta,* 212, 163-174.

INZÉ D. AND VAN MONTAGU M. (1995): Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.,* 6, 153-158.

JÄHNE A., BECKER D., BRETTSCHNEIDER R. AND LÖRZ H. (1994): Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor. Appl.Genet.,* 89, 525-533.

JÄGER K., KŐSZEGI D., BARNABÁS B. (2005a): Regeneration capacity of microspore-derived structures in anther cultures of maize (*Zea mays* L.). *Acta Physiol. Plant.,* 27, 621-629

JÄGER K., KŐSZEGI D., BARNABÁS B. (2005b): A kukorica portoktenyészetekben a legnagyobb számú spontán dihaploid növényt eredményező mikrospóra eredető struktúra morfológiai és citológiai jellemzése. *Növénytermelés*, 54, 23-33.

JÄGER K. (2005): Növényi növekedésszabályozó anyagokat (PGR) termelő algatörzsek, mint alternatív hormonforrások felhasználása magasabb rendű növények szövettenyészeteiben. Doktori értekezés. Mosonmagyaróvár. pp. 141

JENSEN C.L. (1974): Chromosome doubling techniques in haploids. In: Kasha K.J. (Szerk.), *Haploids in higher plants: advances and potential*. University of Guelph, Canada, pp. 153-190

JOHANSSON L. (1983): Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiol. Plant.,* 59, 397-403.

JOOSEN R., CORDEWENER J., SUPENA E.D., VORST O., LAMMERS M., MALIEPAARD C., ZEILMAKER T., MIKI B., AMERICA T., CUSTERS J., BOUTILIER K. (2007): Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiol.,* 144, 155–72.

KARSAI I. AND BEDŐ Z. (1997): Effect of carbohydrate content on the embryoid and plant production in triticale anther culture. *Cer. Res. Comm*., 25, 109-116.

KARSAI I, BEDŐ Z, KOVÁCS G AND BARNABÁS B. (1994): The effect of *in vivo* and *in vivo* aluminium treatment on anther culture response of triticale x wheat hybrids. *J. Genet. Breed.,* 48, 353-7.

KARUPPANAPANDIAN T., CHEOL MOON J., , CHANGSOO K., KUMARIAH M., WOOK K. (2011): Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop Sci.,* 5, 709-725.

KELLER W.A. AND ARMSTRONG K.C. (1978): High frequency production of microsporederived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzenzuecht.,* 80, 100-108.

KERIM T., IMIN N., WEINMAN J.J. ROLFE B.G. (2003): Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. *Proteomics,* 3, 738-51.

KIM M., JANG I.C., KIM J.A., PARK E.J., YOON M. AND LEE Y. (2008): Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.,* 27, 425-434.

KIRÁLY Z. (2000): New aspects of breeding crops for disease resistance. In: *Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology*. (Szerk.), Hrazdina, IOS Press, Amsterdam, pp. 124-130.

KLAPHECK S., YIMMER I., COSSE H. (1990): Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.,* 31, 1005-1012.

KOVÁCS G., KOVÁCS M., BARNABÁS B. (1992): A genotípus és az indukciós táptalaj hatásának vizsgálata kukorica antérakultúrában. *Növénytermelés,* 41, 193-199.

KOVÁCS G. AND BARNABÁS B. (1997): Selection for frost tolerance in anther culture-derived embryos and regeneration of frost-tolerant fertile DH plants in winter wheat. *Acta Agron. Hung.,* 43, 285-293.

KOVÁCS G., OBERT B., BARNABÁS B. (1999): Fertilis növények elıállítása egysejtmagvasmikrospórák korai kolhicin kezelésével kukorica (Zea mays L.) antérakultúrában. *Növénytermelés*, Tom. 48. 1, 13-23.

KOCSY G, VON BALLMOOS P, SUTER M, RUEGSEGGER A., GALLI U., SZALAI, G., GALIBA G., BRUNOLD C. (2000): Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta,* 211, 528-536.

KOCSY, G., VON BALLMOOS, P., RÜEGSEGGER, A., SZALAI, G., GALIBA, G., BRUNOLD, C. (2001): Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol.,* 127, 1147-1156.

KNOX J.P. AND DODGE A.D. (1985): Singlet oxygen and plants. *Phytochem.,* 24, 889-896.

KRAUSE G.H. AND WEISS E. (1991*):* Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Ann. Rev. Plant Physio.Plant Mol. Biol.,* 42**,** 313-349.

KRIEGER-LISZKAY A., KOS P.B., HIDEG É. (2011): Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiol. Plant.,* 142, 17-25.

KU M.K., CHEN W.C., KUO L.C., KUAN Y.L., AN H.P., HUAMG C.H. (1981): Induction factors and morpho- cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays* L.). In: *Proceedings of symposium on plant tissue culture*. Science Press, Peking, pp. 35-41.

KUNERT K.J. AND DODGE A.D. (1989): Herbicide-induced radical damage and antioxidative systems. In: P. Böger, G. Sandmann (Szerk.), *Target Sites of Herbicide Action*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 45-63.

KUO C.S., LU W.L., KUI Y.L., (1985): Corn (Zea mays L): Production of pure lines through anther culture. In: BAJAJ Y.P.S. (Szerk.), *Biotechnology of plant improvement*., Vol. 2. Springer Verlung Heilderberg pp. 152-164.

KUO C., GUO Z.C, LI Z., GUI Y. (1994): Anther culture for rice improvement in China. In: Bajaj, Y.P.S. (Szerk.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 14. Rice, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 151-179.

KWON S.Y., JEONG Y.J., LEE H.S., KIM J.S., CHO K.Y., ALLEN R.D., KWAK S.S. (2002): Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant, Cell Environ.,* 25, 873-882.

LANTOS CS. (2009): Az *in vitro* androgenezis indukciója búzában (*Triticum aestivum* L.), tritikálában (X *Triticosecale* Wittmack), fűszerpaprikában (*Capsicum annuum* L.) és az eredmények felhasználása a nemesítésben. Doktori értekezés. Gödöllő. pp. 108.

LANTOS CS., SOMOGYI GY., PAUK J. (2011): Paprika hibidek, új technológiával. *Gabona Kutató Híradó,* 25, 16.

LAZAR M.D., SHAEFFER G.W., BAENZIGER P.S. (1984): Cultivar and cultivar x enviroment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat. *Theor. Appl. Genet.,* 67, 273-277.

LEE S.Y., LEE J.H., KNOW T.O. (2003): Selection of salt tolerant doubled haploids in rice anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.,* 74, 143-9.

LEE S.H., AHSAN N., LEE K.W., KIM D.H., LEE D.G., KWAK S.S., KWON S.Y., KIM T.H., LEE B.H. (2007): Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J. Plant Physiol.,* 64, 1626-38.

LEVAN A. (1938): Effect of colhicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas,* 24, 471-486.

LETARTE J., SIMION E., MINER M. AND KASHA K. J. (2006): Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep.,* 24, 691-698.

LI, L. (1998): Effects of paraquat and sodium benzoate on calluses of two maize cultivars with different drought resistance under osmotic stress. *Acta Phytophysiol. Sin.,* 24, 405-412.

LICHTENTHALER H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol.,* 148, 350-382.

LICHTENTHALER H.K. (1996): Vegetation stress: an introduction to stress concept in plants. *J. Plant Physiol.,* 148, 4-14.

LIU W., ZHENG M.Y. AND KONZAK C.F. (2002): Improving green plant production via isolated microspore culture in bred wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.,* 20, 821-824.

LŐKÖS TÓTH, K., MÁZIK TŐKEI, K., KERTÉSZ, Z., PAUK, J. ÉS HESZKY, L. E. (1997): Agronomic performance of doubled haploid wheat varieties. *Cer. Res. Comm.,* 25, 155-161.

LU S., PENG X., GUO Z., ZHANG G., WANG Z., WANG C., PANG C., FAN Z., WANG J. (2007): *In vitro* selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (Cynodon transvaalensis × C. dactylon) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Rep.,* 26, 1413-1420.

MALAN C., GREYLING M.M. AND GRESSEL J. (1990): Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci.,* 69, 157-166.

MALUSZYNSKI M., KASHA K.J., FORSTER B.P., SZAREJKO I. (Szerk.), (2003a): *Doubled haploid production in crop plants*: *a manual.* Kluwer, Dordrecht.

MALUSZYNZKI M., KASHA K.J., SZAREJKO I. (2003b): Published double haploid protocols in plant species. In: Maluszynski M,. Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Szerk.), *Haploid production in crop plants: a manual.* Kluwer, Dordrecht, pp. 309-335.

MANDAL N. AND GUPTA S. (1995): Effect of genotype and culture medium on androgenic callus formation and green plant regeneration in indica rice. *Indian J. Exp. Biol.,* 33, 761-765.

MARASCHIN S.F., DE PRIESTER W., SPAINK H.P. AND WANG M. (2005a): Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.,* 56, 1711-1726.

MARASCHIN S.F., GAUSSAND G., PULIDO A., OLMEDILLA A., LAMERS G.E.M., KORTHOUT H., SPAINK H. P. AND WANG, M. (2005b): Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *Planta,* 221, 459-470.

MARTIN B. AND WIDHOLM J.M. (1996): Ploidy of small individual embryo-like structures from maize anther cultures treated with chromosome doubling agents and calli derived from them. *Plant Cell Rep.,* 15, 781-785.

MARTON L.CS. (1992): Kukorica beltenyésztett törzsek és hibridjeik hidegtűrése. Kandidátusi értekezés. Martonvásár, p. 132.

MARTON CS.L. AND KŐSZEGI B. (1997): Inheritance of cold test index of maize in sterilised and normal soil. In: *Proceedings of the international symposium on cereal adaptation to low temperature stress in controlled environments*. (Szerk). Bedo Z., Sutka J., Tischner T., Veisz O. Martonvásár Phytotron 25th Anniversary celebrations, 2-4 June 1997. pp. 281-284

MARÓTI M. (1976): A növényi szövettenyésztés. Akadémiai Kiadó, Budapest, 89.

MASCARENHAS J.P. (1990): Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* 41, 317-338.

MATSUMURA T., TABAYASHI N., KAMAGATA Y., SOUMA C. AND SARUYAMA H. (2002): Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiol. Plant.,* 116, 317–327.

MAUCH F. AND DUDLER R. (1993): Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.,* 102, 1193-1201.

MCKERSIE B.D., BOWLEY S.R., HARJANTO E., LEPRINCE O. (1996): Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.,* 111, 1177-81.

MELCHIORRE M., GERMÁN R., TRIPPI V., RACCA R., RAMIRO LANCASO H. (2009): Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: tooxidative stresstolerance and changes in cellular redox state. *Plant Growth Regul.,* 57, 57-68.

MEJZA S.J., MORGANT V., DIBONA D.E. AND WONG J.R. (1993): Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep.,* 12, 149-153.

MENEGUZZO S., NAVARRI-IZZO F. AND IZZO R. (1999): Antioxidative responses of shoots and roots of wheat increasing NaCl concentrations. *J. Plant Physiol.,* 155, 274-280.

METZ S.G., SHARMA H.C., AMSTRONG T.A. AND MASCIA P.N. (1988): Chromosome doubling and aneuploidy in anther-derived plants from two winter wheat lines. *Genome,* 30, 177-181.

MEYER R.C., GOLDSBUROUGH P.B. AND WODSON W.K. (1991): An ethylene-responsive flower senescense-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione S-transferase. *Plant Mol. Biol.,* 17, 277-281.

MIAO S.H, KUO C.S., KWEI Y.L., SUN A.T., KU S.Y., LU W.L., WANG Y.Y.(1978): Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: Plant Tissue Culture. Proc. Symp. Beijing, Pitman, 1981, Boston, pp. 23-34.

MITCHELL J.C. AND PETOLINO J.F. (1991): Plant regeneration from haploid suspension and protoplast cultures from isolated microspores of maize. *J. Plant Physiol.,* 137, 530-536.

MITTLER R., SHULAEV V., SESKAR M., LAM E. (1996): Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell,* 8, 1991-2001.

MITTLER R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.,*7, 405-410.

MITUSKO A., AKHIRIO K., HIKARU S., TOSHIKI N., KIYOSHI T. AND ORIAKI K. (1991): Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escheria coli. Plant Cell Physiol.,* 32, 691-697.

MITYKÓ J., ANDRÁSFALVY A., CSILLÉRY G. AND FÁRY M. (1995): Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breed.,* 114, 78-80.

MONOSTORI T. ÉS PAUK J. (1995) Androgenezis indukciója izolált árpa mikrospórák *in vitro* tenyészetében. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, Hódmezővásárhely, 1995. április 21-22. p. 365.

MONOSTORI T., PAUK J. AND PUOLIMATKA M. (1998): Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) *in vitro* androgenesis in isolated microspore culture. *Növénytermelés*, 47, 371-382.

MONOSTORI T., LANTOS CS., MIHÁLY R. AND PAUK J., (2003): Induction of embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. *Cer. Res. Comm.,* 31, 297-300.

MÓROCZ S. (1991): Plant regeneration from protoplasts of androgen-ic maize haploids. Abstracts. *8-th Int. Protoplast Symp* Uppsa-la, Sweeden, 16-20 June. *Physiol. Plantarum,* 82(1), A5–26.

MORIWAKI T., YAMAMOTO Y., AIDA T., FUNAHASHI T., SHISHIDO M.A., PRODHAN S.H., KOMAMINE A., MOTOHASHI T. (2008): Overexpression of the Escherichia coli catalase gene, katE, enhances tolerance to salinity stress in the transgenic indica rice cultivar, BR5. *Plant Biotechnol. Rep.,* 2, 41-46.

MOZSÁR J. AND VICZIÁN O. (1996): Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. *Vitis*, 35, 155-157.

MÖLLERS C., IQBAL M.C.M, RÖBBELEN G. (1994): Efficient production of doubled haploid plants *Brassica napus* L. plants by colchicine treatment of the microspores. *Euphytica*, 75, 95-104.

MURASHIGE T. AND SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.,* 15, 473-497.

MURIGNEUX A., BENTOLILA S., HARDY T., BAUD S., GUITTON C., JULLIEN H., BEN TAHAR S., FREYSSINET G., BECKERT M. (1994): Genotypic variation of quantitative trait loci controlling *in vivo* androgenesis in maize. *Genome,* 37, 970-976.

NAKANO Y. AND ASADA K. (1987): Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.,* 28, 131-140.

NAVARRO-ALVAREZ W., BAENZINGER P.S., ESKRIDE K.M., HUGO M., GUSTAFSON V.D. (1994): Addition of colchicine of wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. *Plant Breed.*, 112, 192-198.

NEDBAL L. AND WHITMARSH J. (2004): Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Szerk.), *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands pp. 389-407.

NEILL S., DESIKAN R. HANCOCK J. (2002): Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.,* 5, 388-395.

NITSCH C. (1981): Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In: Thorpe, T. A. (Szerk.), *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, pp. 241-252.

NITSCH C., ANDERSEN S., GODARD M., NEUFFER M.G., SHERIDAN W. F. (1982): Production of haploid plants of *Zea mays* and P*ennisetum* through androgenezis. In: Earle, E. D., Demarly, Y. (Szerk.), *Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture*, Praeger, New York, pp 69-91.

NOCTOR G. AND FOYER C. (1998): Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.,* 49, 249-279.

OBERT B., OROSZ Á., KOVÁCS G., BARNABÁS B. (1998): A haploidindukciós képesség vizsgálata jól indukálható és antérakultúrában nem reagáló kukoricatörzsek hibridjeiben. *Növénytermelés,* Tom. 47. 5, 473-481.

OBERT B. AND BARNABÁS B. (2004): Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell Tissue Org. Cult.,* 77, 283-285.

OBERT B., SZABÓ L., MITYKÓ J., PRETOVA A. AND BARNABÁS B. (2005): Morphological events in cultures og mechanically isolated maize microspores. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41, 775-782.

OLESZCZUK S., SOWA S. AND ZIMNY J. (2004): Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.,* 22, 885-893.

OLSEN F. (1987): Indution of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagines as nitrogen sources. *Carlesberg Res. Comm.,* 52, 393-404.

ORSHINSKY B.R., MCGREGOR L.J., JOHNSON G.I.E., HUCL P., KARTHA K.K. (1990): Improved embryoid formation and green plant regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.,* 9, 365-369.

OROSZ Á., BARNABÁS B. (1997a): Per se analysis of DH maize (Zea mays L.) lines in field experinets. In: Bedő z., Sutka J., Tischner T., Veisz O. (szerk): *Proc. of the International Symposium on Cereal Adaptation to low temperature stress in controlled environments.* June 2-4, 1997, *Martonvásár*, pp. 277-280.

OROSZ Á, BARNABÁS B. (1997b): *Per se* analysis of DH maize (Zea mays L.) lines in field experiments. *Acta Agron. Hung.,* 45, 277-280.

OTTAVIANO E., SARI-GORLA M., FROVA C., PE M.E. (1988a): Male gametophytic selection in higher plants. In: Cresti M, Gori P, Pacini E (Szerk.), *Sexual reproduction in higher plants.* Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 35-42.

OTTAVIANO E., PETRONI D., PE M.E. (1988b): Gametophytic expression of genes controlling endosperm development in maize. *Theor. Appl. Genet.,* 75,252–258.

OVERMYER K., BROSCHÉ M., KANGASJÄRVI J. (2003): Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.,* 8, 335-342.

PAOLETTI F. AND MOCALI A. (1990): Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymol.,* 186, 209-220.

PASTORI G.M. AND TRIPPI V.S. (1992): Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.,* 33, 957-961.

PASTORI G., FOYER C.H. (2002): Common components networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.,* 129, 460-468.

PAUK J. (1985): Production of haploid plants of maize (*Zea mays* L.) through androgenezis. *Cer. Res. Comm*., 13, 47-53.

PAUK J., MANNINEN O., MATTILA I., SALO Y. AND PULI S. (1991): Androgenesis in hexaploid spring wheat F_2 population and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breed.,* 107, 18-27.

PAUK J., KERTÉSZ Z., BEKE B., BÓNA L., CSŐSZ M. AND MATÚZ J. (1995): New winter wheat variety: 'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. *Cer. Res. Comm.,* 23, 251-256.

PÁL M., HORVÁTH E., JANDA T., PÁLDI E., SZALAI G. (2005): Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays* L.) plants. *Physiol. Plant.,* 125, 356-364.

PELEMAND J.D AND VN DER VOORT J.R. (2003): Breeding by desing. *Trends in Plant Sci.,* 7, 330-334.

PENA VALDIVIA C.B. AND RODRIGUEZ GRACIA R. (1999): Free amino acids in maize (*Zea mays* L.) anthers during microsporogenesis. *Cer. Res. Comm.,* 27, 395-402.

PETOLINO J.F. AND JONES A.M. (1986): Anther culture of elite genotypes of maize. *Crop Sci.,* 26, 1072-1074.

PETOLINO J.F. AND THOMPSON S.A. (1987): Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.,* 74, 284-286.

PETOLINO J.F., JONES A.M., THOMPSON S.A. (1988): Selection for increased anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet*., 76, 157-159.

PESCITELLI S.M. AND PETOLINO J.F. (1988): Microspore development in cultured maize anthers. *Plant Cell Rep.*, 7, 441-444.

PESCITELLI S.M., JOHNSON C.D., PETOLINO J.F. (1990): Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique reduced temperature and sucrose level. *Plant Cell Rep.,* 8, 628-631.

PESCITELLI S.M., JOHNSON C.D., PETOLINO J.F. (1994): Isolated microspore culture of maize. In: Bajaj YPS, (Szerk), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 25 pp. 187-200.

PRASAD T.K., ANDERSON M.D., MARTIN B.A., STEWART C.R. (1994): Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulartory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6, 65-74.

PRASHANTH S.R., SADHASIVAM V., PARIDA A. (2008): Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant Avicennia marina in indica rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic Res.,* 17, 281-291.

PRESTON C (1994): Resistance to photosystem I disrupting herbicides. In: Powles S.B., Holtum J.A.M. (Szerk.), *Herbicide resistance in plants*. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp. 61-80.

POTTERS G., HOREMANS N., MARCEL A.K. (2010): The cellular redox state in plant stress biology a charging concept. *Plant Physiol. Biochem*., 48, 292-300.

PURUSHOTHAM M.G., PATIL V., RADDEY P.C., PRASAD T.G., VAJRANABHAIAH S.N. (1998): Development of *in vitro* PEG stress tolerant cell lines in two groundnut (*Arachishypogaea* L.) genotypes. *Indian J. Plant Physiol.,* 3, 49-51.

QUEIRÓS F., FIDALGO F., SANTOS I. AND SALEMA R. (2007): *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in Solanum tuberosum L. *Biol. Plant.*, 51, 728-734.

RAGHAVAN V. (1978): Origin and development of pollen embyoids and pollen in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane). *Am. J. Bot.,* 65, 984-1002.

RAGHAVAN V. (1989): mRNA and a cloned histon gene are differentially expressed during anther and pollen development in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Cell. Sci.,* 92, 217-229.

RAGHAVAN V. (1997): Embryogenic development of pollen grains. In: Molecular Embryology of Flowering Plants, Cambridge Univ. Press, New York, p. 505.

RAI M.K., KALIA R.K., SINGH R., GANDOLA M.P., DHAWAN A.K. (2011): Developing stress tolerant plants through *in vivo* selection – An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.,* 71, 89-98.

RAKOCZY-TROJANOWSKA M., SMIECH M., MALPSZY S. (1997): The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*., 48, 15-21.

RALPH P.J., SCHREIBER U., GADEMANN R., KUHL M., LARKUM A.W.D. (2005): Coral photobiology studied with a new imaging pulse amplitude modulated fluorometer. *J. Phycol.,* 41, 336-338.

RASHID A. **(**1988): Induction of haploid plant/cell. In: *Cell Physiology and Genetics of Higher Plants,* Vol 1. CRC, Boca Raton, pp. 119-158.

REICHHELD J.P., VERNOUX T., LARDON F., VAN MONTAGU M., INZÉ D. (1999): Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.,* 17, 647–656.

RIBAUT J.M. AND RAGOT M. (2007): Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *J. Exp. Bot.,* 58, 351-360.

ROUT G.R, SAMANTARAY S. AND DAS P. (1999): *In vitro* selection and biochemical characterisation of zinc and manganese adapted callus lines in Brassica spp. *Plant Sci.,* 146, 89-100.

ROUT G.R. AND SAHOO S. (2007): *In vitro* selection and plant regeneration of copper-tolerant plants from leaf explants of Nicotiana tabacum L. cv. 'Xanthi'. *Plant Breed.,* 126, 403-409.

ROUT G.R, SENAPATI S.K., PANDA J.J. (2008): Selection of salt tolerant plants of Nicotiana tabacum L. through in vitro and its biochemical characterization. *Acta Biol. Hung.,* 59, 77-92.

ROXAS V.P., LODHI S.A., GARRETT D.K., MAHAN J.R. AND ALLEN R.D. (2000): Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.,* 41, 1229-1234.

RÖBER F.K., GORDILLO G.A., GEIGER H.H. (2005): *In vivo* haploid induction in maize - Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 50, 275-283.

SABBAH S. AND TAL M. (1990): Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult..* 21, 119-124.

SAISINGTONG S., SCHMID J.E., STAMP P., BÜTER B. (1996): Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.,* 92, 1017-1023.

SALIN M.L. (1987): Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.,* 72, 681-689

SÁRKÁNY S. ÉS SZALAI I. (1957): Növénytani praktikum I. Növényszervezettani gyakorlatok. pp. 547-548, 580. Tankönyvkiadó, Budapest.

SARI-GORLA M., FROVA C., BINELLI G., OTTAVIANO E. (1986): The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theor. Appl. Genet.,* 72, 42-47.

SCANDALIOS J. G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* 28: 1-41.

SELYE H. (1936): A syndrome produced by various nocuous agents. *Nature*, 138, 32-34.

SELYE J. (1978): Életünk és a stress. Akadémiai Kiadó, Budapest.

SHAALTHIEL Y., GLAZER A., BOCION P.F., GRESSEL J. (1988): Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide and ozone. *Pest. Biochem. Physiol.,* 31, 13-23.

SHAO H.B., CHU L.Y., SHAO M.A., JALEEL C.A. MI H.M. (2008): Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *CR Biol.,* 331, 433-441.

SHARIATPANAHI M.E., BELOGRADOVA K., HESSAMVAZIRI L., HEBERLE-BORS E. AND TOURAEV A. (2006): Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep.,* 25, 1294-1299.

SHARMA P., JHA BHUSHAN A., DUBEY R.S, AND PESSARAKLI M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.,* Article ID 217037, 26 doi:10.1155/2012/217037

SHIM Y.S., KASHA K.J. SIMION E., LETARTE J. (2006): The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma,* 228, 79-86.

SHIVANNA K.R. AND JOHRI B.M. (1985): The angiosperm pollen. *Wiley Eastern Limited, New Delhi.,* 5-52.

SINGH M.B., O'NEILL P.M., KNOX R.B. (1985): Initiation of postmeiotic *β*-galactosidase synthesis during microsporogenesis in oilseed rape. *Plant Physiol.,* 77, 225-228.

SLOOTEN L., CAPIAU K., VAN CAMP W., VAN MONTAGU M., SYBESMA C., INZÉ D. (1995): Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol.,* 107, 737-750.

STINSON J.R. AND MASCARENHAS J.P. (1985): Onset of alcohol dehydrogenase synthesis during microsporogenesis in maize. *Plant Physiol.,* 77, 222-224.

STINSON J.R., EISENBERG A.J., WILLING R.P., PE M.E., HANSON D.D., MASCARENHAS J.P. (1987): Genes expressed in the male gametophyte of flowering plants and their isolation. *Plant Physiol.,* 83, 442-447.

SMIRNOFF N. (1998): Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. in Biotech.,* 9, 214-219.

SMITH I.K., VIERHELLER T.L. AND THURNE C.A. (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.,* 175, 408-413.

SMITH I.K., VIERHELLER T.L. AND THORNE C.A. (1989): Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol. Plant.,* 77, 449-456.

SMỲKAL P. (2000): Pollen embryogenesis- the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospect. *Biol. Plantarum,* 43, 481-489.

SONG Y.G., LIU B., WANG L.F., LI M.H., LIU Y. (2006): Damage to the oxygen-evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II. *Photosynth. Res.,* 90, 67-78.

SOPORY S.K. (1979): Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther culture of dihaploid *Solanum tuberosum. Can. J. Bot.,* 57, 2691-2694.

SUBRAHMENYAM N.C. AND KASHA K.J. (1975): Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicines treatment. *Can. J. Genet. Cytol.,* 17, 573-583.

SUNDERLAND N., COLLINS G.B., DUNWELL J.M. (1974): The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. *Planta,* 117, 227-241.

SUNDERLAND N. AND EVANS L.J. (1980): Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. II. The A, B and C pathways. *J. Exp. Bot.,* 31, 501-540.

SUNDERLAND N. AND DUNWELL J.M. (1974): Pathways in pollen embryogenesis. In: Street, H. E. (Szerk.), Tissue Culture and Plant Science. Academic Press, London, pp. 141-167.

SUNDERLAND N. AND DUNWELL J. M. (1977): Anther and pollen culture. In: Street, H.F. (szerk.). *Plant Tissue and Cell Culture*, University of California Press, Berkeley, pp. 223-265.

SUNDERLAND N. AND WICKS F. (1971): Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.,* 22, 213-226.

SPITKÓ T., SÁGI L., PINTÉR J., MARTON L.C. BARNABÁS B. (2006): Haploid regeneration aptitude of maize (Zea mays L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica,* 51, 537-542.

SPITKÓ T. (2010): *In vitro* dihaploid kukoricavonalak szövettenyésztési eredményei és kombinálódó-képesség vizsgálata. Doktori értekezés. Gödöllő. pp. 115.

SPURR A.R. (1969): A low viscosity resin-embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.,* 26, 31-43.

SZAKÁCS É. AND BARNABÁS B. (1988): Cytological aspects of *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L). *Sex. Plant Reprod*., 1, 217-222.

SZALAI G., KELLŐS T., GALIBA G., KOCSY G. (2009): Glutathione as antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J. Plant Growth Regul.,* 28, 66-80.

SZALAI G. AND JANDA T. (2009): Effect of salt stress on the salicylic scid synthesis in young maize (*Zea mays* L.) plants. *J. Agron. Crop Sci.,* 3, 165-171.

SZARKA B., DÉVÉNYI K., MÓROCZ S. (1999): Termékeny kukoricanövények előállítása mikrospórákból. *Növénytermelés,* 48, 571-582.

SZARKA B., DÉVÉNYI M., MÓROCZ S. (2001): Fertile maize lines obtained from isolated microspores *Euphytica,* 122, 53-60.

SZARKA B. (2002): Mikrospóra eredetű növények és szomatikus hibridek előállítása kukorica genotípusokból. Doktori értekezés. Gödöllő. pp. 53.

TAUSZ M. (2001): The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. In: *Significance of Glutathion to Plant Adaptation to the Environment*, Grill D., Tausz M., és De Kok L.J. (Szerk). Dordrecht.

TAKÁČ T., PECHAN T., ŠAMAJ J. (2011): Differential proteomics of plant development. *J. Proteomics*, 74, 577-88.

TAKAHASI Y. AND NAGATA T. (1992): part B: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA), 89, 56-59.

TANAKA K., FURUSAWA I., KONDO N. (1988): SO_2 tolerance of tobacco plants regenerated from paraquat-tolerant callus. *Plant Cell Physiol.,* 29, 743-746.

TANKSLEY S.D., ZAMIR D., RICK C.M. (1981): Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. *Sci.,* 213, 453-455.

TANTAU H. AND DÖRFFLING K. (1991): *In vitro*-selection of hydroxyproline-resistant cell lines of wheat (Triticum aestivum): accumulation of proline, decrease in osmotic potential, and increase in frost tolerance. *Physiol. Plant.,* 82, 243-248.

TERTIVANIDIS K., GOUDOULA C., VASILIKIOTIS C., HASSIOTOU E., PERL-TREVES R., TSAFTARIS A. (2004): Superoxide dismutase transgenes in sugarbeets confer resistance to oxidative agents and the fungus C. beticola. *Transgenic Res.,* 13, 225-33.

TING Y.C., YU M., ZHENG W.Z. (1981): Improved anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci. Lett.,* 23, 139-145.

TISCHNER T., KŐSZEGI B., VEISZ O. (1997): Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron. Hung.,* 45, 85-104.

THOMAS W.T.B., FORSTER B.P. GERTSSON B. (2003): Doubled haploids in breeding. In: Maluszinsky, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko I. (Szerk.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants.* A Manual, Kluwer, Dordrecht, pp. 309-337.

THOR H., SMITH M.T., HARTZELL P., BELLOMO G., JEWELL S.A., ORRENIUS S. (1982): The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinine) by isolated hepatocytes. *J. Biol, Chem.,* 257, 12419-12425.

THORDAL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEI Y., COLLINGE D.B. (1997): Subcellular localisation of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.,* 11, 1187-1194.

TOURAEV A., VICENTE O., HEBERLE-BORS, E. (1997): Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Sci.,* 2, 297-302.

TOURAEV A. AND HEBERLE-BORS E. (1999): Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. In: Hall, R. D. (Szerk.), *Methods in Molecular Biology*, vol. III, Plant Cell Culture Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 281-291.

TOURAEV A., PFOSSER M. AND HEBERLE-BORS, E. (2001): The microspore: A haploid multipurpose cell. *Adv. Bot. Res.,* 35, 53-109.

TROYER A.F. (1999): Background of U.S. hybrid corn. *Crop Sci.,* 39, 601-626.

TSAY H.S., MIAO E.H., WIDHOLM J.M. (1986): Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *J. Plant Physiol.,* 126, 33-40.

UOTILA M., GULLNER G. AND KŐMÍVES T. (1995): Induction of glutathione S-transferase and glutathione level in plants exposed to glyphosphate. *Physiol. Plantarum,* 93, 689-694.

VAN BERGEN S., KOTTENHAGEN M. J., VAN DER MEULEN R. M. AND WANG M. (1999): The role of abscisic acid in induction of androgenesis: A comparative study between *Hordeum vulgare* L. Cvs. Igri and Digger. *J. Plant Growth Reg.,* 18, 135-143.

VAN BREUSEGEM F., SLOOTEN L., STASSART J.M., MOENS T., BOTTERMAN J., MONTAGU V.M., INZÉ D. (1999a): Overproduction of arabidopsis thaliana FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiol.,* 40, 515-523.

VAN BREUSEGEM F., VRANOVA E., DAT J.F., INZÉ D. (2001): The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.,* 161, 405-414.

VAN KOOTEN O. AND SNEL J.F.H. (1990): The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.,* 25, 147-150.

VAN OVERBEEK J., CONKLIN M.E., BLAKESLEE A.F. (1941): Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos. *Sci.,* 94, 350.

VAN WINKLE S.C., JOHNSON S., PULLMAN G.S. (2003): The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Cell Biol. Morphogen.,* 21, 1175-1182.

VERGNE P., DELVALÉE I., DUMAS C. (1978): Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Tecnol*., 62, 299-304.

VERGNE P. AND DUMAS C. (1988): Isolation of viable wheat male gametophytes of different stages of development and variations in their protein patterns. *Plant Physiol.,* 88, 969-972.

VERGNE P., RICARDI F., BECKERT M., DUMAS C. (1990): Detection of androgenesis-related proteins in maize. In: Nijkamp H.J.J., Van Der PLas L.H.W., Van AArtrijk J. (Szerk) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers pp.416-421

VERGNE P., RICARDI F., BECKERT M., DUMAS C. (1993): Identification of a 32-kDa anther marker protein for androgenic response in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.,* 86, 843-850.

VRANOVÁ E., INZÉ D., VAN BREUSEGEM F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot*., 53, 1227-1236.

WAN Y., PETOLINO J.F. AND WIDHOLM J.M. (1989): Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.,* 77, 889-892.

WAN Y., DUNCAN D.R. RAYBURN A.L. PETOLINO J.F. WIDHOLM J.M. (1991): The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.,* 81, 205-211.

WASSOM J.J., MEI T.R., ROCHEFORD T.R., WIDHOLM J.M. (2001): Interaction of environment and ABA and GA treatments on the maize anther culture response. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.,* 64, 69-72.

WENZEL G. AND FOROUGHI-WEHR B. (1984): Anther culture of cereals and grasses. In: Vasil, I. K. (Szerk.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1. Academic Press, New York.

WEATHERHEAD M.A., BOURDON L., HENSHAW G.G. (1978): Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol.,* 89, 141-147.

WEATHERHEAD M.A., HENSHAW G.G. (1979): The production of homozygous diploid plants of *Solanum verrucosum* by tissue culture techniques. *Euphytica*, 28, 765-768.

WHEATLEY W.G., MARSOLAIS A.A., KASHA K.J. (1986): Microspore growth and anther staging in barley anther culture. *Plant Cell Rep,.* 5, 47-49.

WIDHOLM J.M. (1972): The use of fluoresceine diacetate and phenosaphranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.,* 47, 189-194.

WILLEKENS H., CHAMNONGPOL S., DAVEY M., SCHAUDNER M., LANGEBARTELS C., VAN MONTAGU M., INZE D., VAN CAMP W. (1997): Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensible for stress defence in C3 plants. *EMBO J.,* 16, 4806-4816.

WILLING R.P., MASCARENHAS J.P. (1984): Analysis of complexity and diversity of mRNAs from pollen shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiol.,* 75, 865-868.

WOHLGEMUTH, H., MITTELSTRASS K., KSCHIESCHAN S., BENDER J., WEIGEL H.J., OVERMYER K., KANGASJARVI J., SANDERMANN H., LANGEBARTELS C. (2002): Activation of an oxidative brust is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ.,* 25, 717-726.

YAN J., WANG J., TISSUE D., HOLADAY A.S., ZHANG H. (2003): Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an arabidopsis ascorbate peroxidase gene. *Crop Sci.,* 43, 1477-83.

ZABIROVA E.R., CHUMAK M.V., SHATSKAIA O.A., SCHERBAK V.S. (1996): Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian). *Kukuruza I sorgo* N 4: 17-19.

ZACCHINI M., REA E., TULLIO M., AGAZIO M. (2003): Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. *Plant Physiol. Biochem.,* 41, 49-54.

ZHAO F. ANG ZHANG H. (2006): Salt and paraquat stresstolerance results from coexpression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.,* 86, 349-58.

ZHENG Y., LIU W., WENG Y., POLLE E. AND KONZAK C.F. (2001): Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspoeres treated with inducer chemicals. *Plant Cell Rep.,* 20, 685-690.

ZHENG M.Y., WENG Y., LIU W. AND KONZAK C.F. (2002): The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.,* 20, 802-807.

ZHENG M.Y., WENG Y., SAHIBZADA R., KONZAK C.F. (2003): Isolated microspore culture in maize (*Zea mays* L.), production of doubled-haploids *via* induced androgenezis. In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (Szerk.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. A Manual.Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 95-102.

ZIAUDDIN A., MARSOLAIS A., SIMION E. AND KASHA K. J. (1992): Improved plant – regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenilacetic acid (PAA). *Plant Cell Rep.,* 11, 489-498.

ZOK A., OLÁH R., HIDEG É., HORVÁTH V.G., KÓS P.B., MAJER P., VÁRADI GY. SZEGEDI E. (2010): Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.,* 100, 339-344.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom az MTA ATK Mezőgazdasági Intézet főigazgatójának, **Dr. Bedő Zoltán** Úrnak, hogy lehetőséget nyújtott a dolgozatom elkészítéséhez. Valamint köszönettel tartozom a munkámhoz kapcsolódó pályázati forrásnak (OTKA T037391), hogy biztosította a dolgozat elkészítéséhez szükséges anyagi fedezetet.

Hálás köszönettel tartozom Témavezetőimnek, **Dr. Barnabás Beátának** aki bevezetett a pollenek csodálatos világába és a kutatói pályán tett első lépéseimtől kezdve mérhetetlen türelemmel segítette munkámat, valamint **Dr. Darkó Évának** aki bevezetett a növényfiziológia világába és számos hasznos módszerrel gazdagított, köszönöm mind a kísérletek kivitelezésében mind pedig a dolgozat elkészítése során tett hasznos tanácsaikat és építő kritikáikat. Továbbá köszönöm **Dr. Heszky László** programvezetőnek, hogy lehetőségét nyújtott a Doktori Iskola „Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel" programjában való részvételemhez.

Köszönetemet fejezem ki a Sejtbiológiai Osztály valamennyi munkatársának. Köszönet **Dr. Sági Lászlónak** a dolgozatommal kapcsolatos kritikáiért és hasznos tanácsaiért. Hálás köszönettel tartozom **Gondos Erikának** és **Olasz Ildikónak** akiktől megtanultam a kukorica szövettenyésztés rejtelmeit, **Békné Kapral Emesének, Fehér E. Mónikának** és **Keserűné Cseh-Kiss Ilonának** a szövettenyésztési vizsgálatokhoz nyújtott segítségükért, valamint **Fodor Szilviának** és **Szalay Józsefnének** akik biztosították számomra, a tiszta eszközöket a vizsgálataimhoz.

Köszönettel tartozom **Dr. Galiba Gábornak** és **Dr. Kocsy Gábornak**, azért hogy a Növényi Molekuláris Biológiai Osztályon lévő műszereket éjszakába nyúló méréseim folyamán is használhattam, valamint **Dr. Janda Tibornak**, hogy a Növényélettani Osztály műszereit a rendelkezésemre bocsátotta, a Fitotron munkatársainak a növénynevelésben és a növénynevelő kamrák használatakor nyújtott segítségükét, **Dr. Pintér Jánosnak** és **Dr. Spitkó Tamásnak** a Kukoricanemesítési Osztály kutatóinak szakmai tanácsaikért.

Köszönettel tartozom **Kőszegi Ferencnének** (Bellának) az adminisztrációs feladatok elvégzésében nyújtott segítségéért valamint **Harasztos Barbarának** dolgozatomhoz kapcsolódó publikációk, a dolgozat és a tézisek angol nyelvi lektorálásáért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **Szüleimnek, Férjemnek, Fiaimnak, Testvéreimnek** és közeli barátaimnak azt a mérhetetlen türelmet és segítséget, amit a dolgozat elkészítésekor kaptam Tőlük.