Szent István Egyetem, Gödöllő

Doktori Iskola: SzIE Növénytermesztési és Kertészet Tudományok

MIKROSPÓRA EREDETŰ NÖVÉNYEK ÉS SZOMATIKUS HIBRIDEK ELŐÁLLÍTÁSA KUKORICA GENOTÍPUSOKBÓL

PhD értekezés Tézisei

Írta: Szarka Béla

Témavezető: Dr. Mórocz Sándor

Gödöllő, 2002

1. BEVEZETÉS

A növénynemesítést segítő módszerek köre számos új eszközzel bővült a növényi szövetek és sejtek *in vitro* tenyészthetőségének kidolgozása révén. A szomatikus hibridizáció és a haploid növények előállítási eljárásai különösen jól hasznosíthatónak bizonyultak, és kiemelkedő gyakorlati szerepet játszottak a szövettenyésztési módszerek között.

A protoplaszt fúzió -technikailag- megszüntette a növényi genomok egyesíthetőségének faji korlátait. A távoli keresztezések természetes inkompatibilitási akadályait sok esetben sikeresen feloldották a fúziós eljárások segítségével. A haploid növények előállítása a gyakorlati nemesítés eszközévé vált, lerövidítve, hatékonyabbá téve egyes növények nemesítési folyamatát. Emellett mindkét terület fontos új lehetőségeket nyitott meg a sejtszintű növényi kutatásokban.

Egyes növényfajok esetében a transzgénes és mikrospóra módszerrel előállított fajták, hibridek is a gyakorlati nemesítés részévé váltak napjainkra.

Az említett eljárások kulcsa minden esetben a növényi élet *in vitro* fenntarthatósága, melyre a növények mind fajonként, mind genotípusonként nagyon különböző mértékben alkalmasak. Általánosságban elmondható, hogy a jó szövettenyésztési és agronómiai értékek ritkán járnak együtt. Gyakorlati szempontból fontos, hogy a szövettenyészet károsodás nélkül, hosszabb ideig fenntartható, és termékeny növények regenerálására alkalmas legyen. Egyedi génkonstrukciók bejuttatásához elegendő egy-egy transzformációra alkalmas genotípus, melyből visszakeresztezéssel (backcrossing) a célfajtába, vagy beltenyésztett vonalba juttatható a gén. Az *in vitro* haploid eljárásoknál vagy szomatikus hibridizációnál azonban nem kerülhető meg magának a cél-genotípusnak a szövettenyészthetősége. Ez utóbbi területeken tehát a gyakorlati alkalmazás a mai napig is genotípusos korlátokba ütközik.

Különösen igaz ez a kukoricára, mely a szövettenyésztés nehezen ”megmunkálható” alapanyagainak sorába tartozik, protoplasztokra és a mikrospórára alapozott eljárások esetében egyaránt. A mikrospóra eredetű növények előállítása vagy a génbeviteli eredmények gyakran kis számú, szabadalmaztatott, korlátozott hozzáférhetőségű genotípushoz kötődnek, ami gátolhatja a módszerek szélesebb körű alkalmazását, s indokolttá teszi a felhasználható genotípusok körének bővítését.

A mikrospóra tenyésztés a növénynemesítés több fontos pontján hasznos kiegészítő módszer lehet. A megfelelő homogenitás eléréséhez több évi beltenyésztés szükséges. A haploid módszer ezt a szakaszt elméletileg egyetlen generációra rövidítheti le. A többi haploid eljárás között, a

mikrospóra módszer a transzgénikus növények előállítására irányuló munkákban is érdeklődésre tarthat számot. Jelentőségét az adja, hogy különálló haploid sejtekbe lehet bejuttatni a géneket. A genom megkettőzése után az idegen gén is természetes állapotban, kétallélos homozigóta formában jelenik meg. Ez előrelépés lehet a korábbi diploid sejttranszformációkhoz képest, ahol a bejuttatott génnek a diploid genomba kell beilleszkednie.

A haploid módszer alkalmas a recesszív gének hatásának gyors vizsgálatára is. Keresztezéses módszerrel ez is csak több beltenyésztéssel érhető el, míg a haploid eljárással csak a termékeny DH növények felnevelésére és tesztelésére van szükség.

A felsorolt lehetőségek mikrospóra módszerrel történő kiaknázása azonban jelenleg korlátozott a kukoricanemesítésben, mert világszerte is mindössze néhány genotípus mikrospórái alkalmasak fertilis növény előállításra.

A mikrospóra vizsgálatokhoz felhasznált kukorica genotípusok előzetes androgenetikus és agronómiai szelekció eredményeként (Mórocz 1997), mindkét szempontból értékes tulajdonságokat mutattak. A kísérletek során arra is választ kerestünk, hogy miközben az indukcióra alkalmas genotípusú mikrospórákat szelektáljuk a tenyésztés során, kapcsolódnak-e ehhez nemesítési szempontból hátrányos tulajdonságok (fattyasodás, növény habitus, gyenge termőképesség, -kombinálódóképesség) a mikrospóra eredetű növények utódaiban.

A szomatikus hibridizációt hosszú idő óta sikeresen alkalmazták az egymással nem keresztezhető fajok, sőt nemzetségek közötti hibridek létrehozására, melyek kedvező tulajdonságainak egyesítése a nemesítés számára korábban elérhetetlen volt. Az eljárást azonban nemcsak fajok közötti génátvitelre használják. Alkalmas génlokalizálásra és genom kölcsönhatások vizsgálatára is. A protoplaszt fúzió hasznos eszköz volt például a citoplazmás öröklés kutatásában, hiszen lehetővé tette két különböző sejt teljes citoplazmájának egyesítését. A nemesítési alkalmazások között számos példa található betegség ellenállóság, fonálféreg rezisztencia, szárazság és hidegtűrési tulajdonságok, vagy citoplazmás hímsterilitás sikeres átvitelére. E tulajdonságok elsősorban a gazdasági céllal termesztett növények agronómiai értékét növelték. A dísznövények esetében is hasznos módszernek bizonyult a szomatikus fajkeresztezés, olyan morfológiai tulajdonságok, mint például új virágszín,- alak, növénymagasság stb. kialakításában.

Elsősorban a kétszikű fajokkal (Nicotiana, Daucus, Solanum, Medicago, Brassica) végzett fúziós kísérletek bizonyultak sikeresnek. Az egyszikű növények közül a rizzsel és az árpával sikerült számottevő eredményeket elérni.

A kukoricasejtekkel végzett szomatikus hibridizáció azonban szinte alig érintett terület maradt, annak ellenére, hogy napjainkig száznál is több más növényfaj bevonásával hoztak létre különböző szomatikus hibrideket. A kukorica és búza faj szomatikus egyesítésére pedig - ismereteim szerint- nem történt korábbi kísérlet.

A szövettenyésztés "klasszikus" és általános gyakorlata szerint *in vitro* környezetben a sejt metabolizmus fenntartásához szükséges sók, vitaminok és szénhidrátforrások mellett kulcsszerep jut a dedifferenciált sejtosztódás fenntartásához, vagy a növényregeneráláshoz szükséges különböző hormonkombinációkra.

Ebben a dolgozatban a kukorica mikrospórák tenyésztését és a szomatikus kukorica sejtek fúziós kísérleteit, szövettenyésztési szempontból közös tulajdonságokat mutató genotípusokon végeztem, melyeket Mórocz és mtsai (1990, 1991) egy évtizedes munkával alakított ki. Mindkét módszer kiegészítő része lehet egy nemesítési programnak, ezért fontos kérdés, hogy milyen szövettenyészetek alkalmazhatók a módszerek működtetésére. A kísérletekben felhasznált tenyészetek szövettenyésztési szempontból egyedi jellemzője az, hogy hormonmentes N6M táptalajon, kallusz állapotukat, illetve növényregeneráló képességüket egyaránt megőrizve, tartósan tenyészthetőek. Feltételeztük, hogy ezek a tulajdonságok előnyt jelentenek a mikrospóta tenyésztés és a szomatikus hibridizáció során is.

A dolgozatban bemutatásra kerülő kísérletek céljai az alábbiak voltak:

1. Termékeny DH (doubled haploid) kukorica növényeket állítani elő az ismert előzetes eredményekhez képest egyszerűbb módszerrel: előzetes portok izolálás, dajkatenyészetek és kolchicin alkalmazása nélkül.

1.1. Megnövelni a mikrospórák izolálás utáni életképességét a kukorica genotípus protoplaszt tenyésztéséhez bevált táptalaj vagy változatai alkalmazásával.

1.3. Megvizsgálni, hogyan hat a táptalajokban használt pH, ozmotikus érték és a 2,4-D regulátor a mikrospórák életképességére.

1.4. Összehasonlítani a kísérletek alapanyagául használt PH TC és a belőlük származó, tisztán mikrospóra eredetű MH SC növények androgén válaszát.

2. Albínó kukorica szuszpenzió és búza mezofillum protoplasztok fúziója polietilén glikollal.

2.1. Zöld hibrid kolóniák szelekciója, és növényregenerálás.

2.2. A regeneránsok hibrid jellegeinek morfológiai és molekuláris vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Haploid növények, mikrospóraindukció

A haploid módszer lehetővé teszi, hogy a gaméták szintjén jelentkező változatosságot az intakt növények szintjére hozzuk. A haploid és DH növények létrehozása lehetőséget ad a gametoklonális variabilitás, és a fenotípusosan is megjelenő, recesszív tulajdonságok nemesítési felhasználására. A haploidnemesítés során, az egy generáció alatt előállítható homozigóta genotípusok alkalmazása lerövidíti a nemesítés első szakaszát, mely a keresztezéstől a kiegyenlített vonalak (törzsek) előállításáig terjed. Az idegentermékenyülő növények 6-10 generációs öntermékenyítési szakasza, végeredményben lerövidíthető egy generációra. Az öntermékenyülő fajok F1 és F2 növényei illetve a még hasadó F6-F7 törzsek egy generáció alatt rögzíthetők. Növelheti a szelekció hatékonyságát az, hogy homozigóta törzsek szabadföldi alkalmazása pontosabb képet ad az agronómiai teljesítménykülönbségekről. A gyorsabb szelekciós ciklusok hozzásegíthetik a nemesítőt új kórokozó és abiotikus stressz rezisztenciát hordozó, vagy javított lisztminőségű fajták előállításához. A haploid technikák alkalmazása a mutációs nemesítésben, *in vitro* szelekcióban, növényi transzformációs eljárásokban és géntérképezési programokban is hasznos lehet (Luchett és Darvey 1992, Abd El-Maksaoud et al. 1993, Kovács és Barnabás 1997, Karsai és Bedő 1998, Barnabás et al. 2000).

A haploid növények nemesítési célú felhasználásának elveit - lényegében napjainkig érvényes módon - már 1922-ben összefoglalták (Blakeslee et al. 1922). A haploidok kutatásának történetében elsőként Harlan talált haploid gyapotnövényeket 1920-ban. Ezt követően Blakeslee és mtsai Datura stramoniumban 1922-ben, Chipman és Goodsped dohányban 1927-ben, Gates esti kankalinban 1929-ben, Randolph kukoricában 1932-ben szintén megfigyelte haploid növények előfordulását, de e formák nemesítési célra való felhasználására Chase dolgozott ki olyan módszert 1952-ben, amellyel a spontán monoploid növényeket biztosan felismerte (Bálint 1990). A Chase-módszer szerint az alapanyagokat olyan marker gént hordozó szülővel keresztezik, amelynek hibridjeiben már a csíranövényeken megfigyelhető a markergén hatása (A1, A2. P1, bíborpiros), így a fehér gyökerű - partenogenikus eredetű - monoploid növények könnyen kiválogathatók, majd diploidizálás után nemesítési vonalként felhasználhatóak (Bálint 1990). A spontán kukorica haploidokat Chase (1969) eredményesen alkalmazta kereskedelmi hibridek létrehozására (Bálint 1990).

Számos egyéb sikeres haploid előállítási módszert is kidolgoztak. Megnövelt haploid indukciót eredményezett az anyai haploid indukáló vonalak (“inbred Stock 6”) (Coe 1968), és az

apai haploidokat eredményező spontán mutáció ("indeterminate gametophite") (Kermicle 1969) alkalmazása. Ezek a módszerek sem bizonyultak azonban teljesen alkalmasnak nemesítői vonalak gyors előállításra. Főként az egyszerűen alkalmazható genetikai markerek hiánya korlátozta alkalmazásukat (Dieu és Beckert 1986).

Kasha és Kao 1971-ben felfedezte fel a Bulbosum technikát, melyben a *Hordeum vulgare* x *H. bulbosu*m hibrid zigótában lezajló kromoszóma deléciót követően, szövettenyésztési módszerrel (embryo rescue) nevelik fel a haploid árpa növényeket (Dudits és Heszky 2000). Ezzel a módszerrel Jensen árpa monoploidokat állított elő 4,5-13,4 % gyakorisággal, 1974-ben (Bálint 1990).

A távoli keresztezéseken és genom eliminación alapuló ún. bulbosum technika más keresztezési kombinációkban is hasznosnak bizonyult. Ilyen például a búza x kukorica keresztezés, mellyel a haploid búza ma már rutinszerűen állítható elő (Dudits és Heszky 2000).

Fontos eredmények születtek az anyai (ginogenikus) haploidokkal végzett kísérletekből is. Számos előzetes sikertelen próbálkozás után (Sachar és Kapoor 1958, Maheswari 1958, Maheswari és Lal 1961), Tulecke (1964) állított elő elsőként ginogenikus *Ginko biloba* haploid kalluszt, amelyet további eredmények követtek. Sikeresen indukáltak haploid kalluszt *Solanum melongena* megtermékenyítetlen ovulumból (Uchimiya és Murashige 1974), és ezt követően további mintegy 30 növényfaj ovulum és ovárium tenyésztése eredményezett haploid tenyészeteket és növényeket a 90-es évek második feléig (Keller és Korzun összefoglalója 1996). A sikeres kísérletek kiterjedtek olyan gazdaságilag nagy jelentőségű kalászos növényfajokra is, mint a rizs (Asselin de Bauville 1980), búza (Lu és Vu 1986), kukorica (San és Demarly 1984, Lu és Vu 1986). Hazánkban cukorrépa ginogenikus haploidokat állítottak elő sikerrel (Potyondi és Heszky 1992).

Az *in vitro* haploidok kutatásának korai időszakában a *Datura* portokokkal elért eredmények után (Guha és Maheswari 1964) a kutatók érdeklődése jelentős mértékben a mikrospórák *in vitro* androgenezise irányába fordult, bár a ginogenikus haploid előállítási kísérletek is folytatódtak. Napjainkig mintegy 80 nemzetség csaknem 300 növényfajának pollenjéből sikerült az in vitro androgenezis indukciójával haploid kalluszt, embriót, illetve növényt előállítani (Dudits és Heszky 2000).

Ennek során a portokokba zárt vagy szabad mikrospórák egy része *in vitro* indukciós kezelés hatására, mitotikus osztódásokkal kísért sporofita fejlődési útvonalra tér át eredeti gametofita programja helyett. Jahne és Lörz összefoglalója alapján (1995), a legtöbb növényfaj esetében az egy- és korai kétmagvas mikrospóra állapot közötti fázisok bizonyultak legalkalmasabbnak az

indukcióra. Árpában és búzában a közép- és késői egymagvas (Ziauddin et al. 1990, Olsen 1991, Mejza et al. 1993), rizsben az egymagvas-korai kétmagvas (Cho és Zapata 1990, Datta et al. 1990), kukoricában a késői egymagvas- korai kétmagvas állapotú mikrospórák indukcióját írták le (Barloy et al. 1989, Coumans et al. 1989, Gaillard et al. 1991). Az első mitózis után lényegesen eltérhet a sporofita fejlődés további formája aszerint, hogy haploid kalluszok, vagy haploid embriók fejlődnek ki (Barnabás et al. 1988). Fluorokróm festékekkel jelölt búza mikrospórákon végzett vizsgálatok alapján összefüggést lehetett kimutatni az osztódás típusa (szimmetrikus, asszimmetrikus) és a kialakuló haploid struktúrák morfológiai jellege (kallusz, embrió) között (Szakács és Barnabás 1988, Barnabás et al. 1988). Az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazolt eredmények azt mutatták, hogy a szimmetrikus osztódást embrió-, az aszimmetrikus osztódást kalluszfejlődés követi (Barnabás et al. 1988). Az Mv exp. 2804 kukorica hibrid pollenembriogenezisét tanulmányozva valószínűnek tartották, hogy a többmagvú pollenszemek a vegetatív sejtből fejlődnek ki (Barnabás et al. 1987). Hasonló eredményre jutottak Pescitelli és Petolino (1988) is elit kukorica vonalak portok tenyészeteinek vizsgálata során.

Fontos szerepe van a haploid kromoszómaszerelvény megduplázásának, mely természetes úton is létrejöhet, mikor az első pollenmitózis után kialakuló két sejtmag fuzionál, és ezekből az ún. C típusú fejlődés során közvetlenül DH embriók és növények jöhetnek létre (Dudits és Heszky 2000). Az androgenezis gyakorlati alkalmazásában azonban nagyon hasznosnak bizonyult az *in vitro* kolchicin kezelés, amely megduplázza az egymagvas mikrospóra haploid kromoszóma szerelvényét. Kukoricában Wan és mtsai (1989) bizonyították a módszer hatékonyságát 0,05 % kolhicint tartalmazó D táptalajon (Duncan et al. 1985), mellyel 72 óra kezelés után nem találtak haploidokat a kezelt kalluszokból regenerált növények között. Barnabás és mtsai (1991) a mikrospórák kolhicin kezelésére dolgoztak ki hatékony módszert. A módszer előnye, hogy a kolhicin kezelés nyomán gyakoribb lett a szimmetrikus osztódás a vizsgált búza tenyészetekben, és igen jelentősen megnövelte a DH növények gyakoriságát. A mikrospóra osztódás és differenciálódás formáit hasonlónak találták a kétszikűeknél (Heberle-Bors 1985) és a gabonaféléknél is (Zheng és Ouyang 1980, Coumans et al. 1989). A búza mikrospórákon végzett vizsgálatok többnyire a szimmetrikus osztódást találták leggyakoribbnak (Zheng és Ouyang 1980, He és Ouyang 1984).

Az *in vitro* mikrospóra indukció hatékonyságát döntően befolyásolja a donor növények fejlettsége (Ouyang et al. 1973, He és Ouyang 1984), genotípusa (Genovesi és Collins 1982, Dieu és Beckert 1986, a növények élettani állapota (Ouyang et al. 1987) és az alkalmazott hidegkezelési (Jing et al. 1982, Dieu és Beckert 1986), tenyésztő táptalajok (Chu et al. 1975, Ku et al. 1978, Miao 1980, Ting 1981, Brettel et al. 1981, Genovesi és Collins 1982). A citoplazma is jelentős hatással

lehet a mikrospóra embriogenezisre valamint a haploid és szomatikus szövetek tenyészthetőségére is (Sági és Barnabás 1989). Az androgén indukció hatására kifejlődő haploid struktúrák száma igen jelentősen különbözik növényfajok között és fajon belül a különböző genotípusok között is. A búzával szerzett tapasztalatok alapján az indukció 8-80 % között változott, és csak néhány genotípus bizonyult ellenállónak (Barnabás et al. 1988, Kovács és Barnabás 1993). Az androgén - főként portok eredetű - haploidok felhasználására ma már jó példákat találhatunk a búza (Ouyang et al. 1973, Picard és de Buysier 1973, Heszky and Mesch 1976), az árpa (Olsen 1991, Mordhorst és Lörz 1993, Jähne et al. 1994) és a repce nemesítésében is (Beversdorf et al. 1987, Swanson et al. 1987). Számos növényfajból sikerült szabadalmaztatott fajtákat is előállítani, például tavaszi (Hu et al. 1988) és őszi búza fajtákat (Pauk et al. 1995, Khus és Virmani 1996), vagy az androgenetikus szomaklón módszerrel hazánkban elsőként előállított és regisztrált fajtát, a DAMA nevű rizsfajtát 1992-ben (Heszky et al. 1991, 1996). Ezt követte a GK Délibáb DH búzafajta 1993-ben történt állami minősítése (Pauk et al. 1995), majd további szegedi és martonvásári dihaploid búzafajták elismerése (GK Szinbád, Mv Szigma, Mv Madrigál) (Bedő et al. 1996, Barnabás et al. 2000).

Wenzel és mtsai németországi adatok alapján készült összefoglalójából (1994) az tűnik ki, hogy e növények (repce, árpa, búza) nemesítési programjaiba már az 1970-es évek közepétől világszerte beépült a haploidok alkalmazása. Ez elsősorban a portok tenyésztési sikereken alapult, de az említett növényfajok izolált mikrospóráit is jó eredménnyel tenyésztették. Napjainkig a következő fajok izolált mikrospóráiból regeneráltak növényeket: *Atropa belledonna, Brassica napus, Brassica carniata, Datura innoxia, Hordeum vulgare, Hyosciamus sp., Nicotiana rustica, Oryza sativa, Petunia hybrida, Solanum melongena, Solanum tuberosum, Triticum aestivum, Triticale, Zea mays* stb. (Dudits és Heszky 2000).

A kukoricának a többi fontos gazdasági növénnyel összehasonlítva viszonylag későn, az 1980-as évek legvégén jelentek meg az első mikrospóra haploidjai (Coumans et al 1989, Pescitelli et al 1989, Wenzel et al. 1994), azonban csak egy-egy speciális genotípusra korlátozódtak az eredmények.

A mikrospórák androgenezisének portokon belüli, és az izolált formában *ab initio* (Pescitelli et al. 1994) történő indukciója a növény fajok túlnyomó többségénél két jól elkülöníthető nehézségi fokú feladatot jelent. A portok kultúrával általában több genotípussal, és nagyobb hatékonysággal lehetséges a haploid indukció. A portok tenyészetekből felnevelt növények felhasználása során azonban sok problémát okozhat az, hogy hogy egy tenyészetben egyidejűleg előfordulhatnak „n” és a diploid portok falból származó „2n” sejtek is. Markerek nélkül nehéz megkülönböztetni a portokfal diploid, és a mikrospóra „n” vagy spontán DH (2n) kalluszait vagy embrióit. A portok

módszerrel előállítható növények vegyes ploidszintjéről Gu és mtsai (1983) kukoricával elért eredményei tanúskodnak. Vizsgálatuk során 8 genotípus 46 portok tenyészetéből nyert növényeinek citológiai vizsgálatát végezték el. A növények 60,9 %-a haploid, 28,3%-a diploid és 10,8 %-a mixoploid volt. Ezek a nehézségek kiküszöbölhetők az izolált mikrospóra tenyésztéssel. (Dudits és Heszky 2000). Az izolált mikrospórák a haploid egy sejtes rendszer további előnyeit is kínálják:

Pontosabb információt kaphatunk a táptalaj fejlesztési kísérletek eredményeiről, mert a mikrospórák közvetlenül érintkeznek a táptalajjal és így kiküszöbölhető a portokfal biológiai szűrő hatása.

Mód nyílik a sejtszintű haploid szelekcióra, ami a recesszív gének legkorábbi szelekciós szintje lehet.

In vitro termékenyítéshez felhasználható hímivarsejt izoláláshoz igen alkalmas forrás lehet, ha fenntartjuk az in vitro gametogenezist.

Lehetőséget ad pollen transzformációs vizsgálatokhoz, és az androgenezist szabályozó gének pontosabb vizsgálatára.

Az eredmények ellenére, még az androgenetikus szempontból sikeresnek számító növények esetében is megoszlott a felhasználók, a nemesítők választása az androgenetikus és a hagyományos haploid technikák gyakorlati alkalmazása között. Puolimatka és Pauk (2000) szerint, a kiterjedt kutatások és a búza androgenezisről felhalmozott tudás ellenére, a mikrospóra eredetű DH törzsek nemesítési alkalmazása még mindig háttérbe szorul például a búza x kukorica keresztezéssel előállított haploidok mellett. Véleményük szerint, a továbblépéshez az egyes genotípushoz igazítva kell javítani a tenyésztési körülményeket addig, míg alkalmasak lesz a nemesítési igényeknek megfelelő számú DH vonal előállítására (Puolimatka és Pauk 2000).

A hazai búza kísérletek alapján, a haploid törzsek előállítása hatékony eszköz lehet a nemesítésben és fajtafenntartásban, mert a megvizsgált hagyományos törzsek és portok eredetű DH változataik termőképessége, minősége, agronómiai értéke, genetikai variabilitása és stabilitása is azonos értékűnek tekinthető (Kertész et al. 2000). Ahhoz, hogy a haploid módszer a nemesítés hatékony részévé válhasson, a gyakorlatban fontos genotípusokból kellő számú, genetikailag stabil DH növényeket kellett biztosítani a nemesítési programokhoz (Barnabás et al. 2000).

A haploid módszer alkalmazásának fentebb említett fő céljai és feladatai minden tekintetben azonosak a kukorica esetében is. A kukorica portokok tenyésztésével először Kínában sikerült

haploid növényeket előállítani (401 kutatócsoport 1975, Ku et al 1978, Ting et al. 1981, Kuo et al. 1985), ezt követték az észak- amerikai, majd európai eredmények (Nitch 1982, Genovesi and Collins 1982, Pauk 1985). Az első haploid nemesítésből származó kereskedelmi értékű kukorica hibrideket is Kínában hozták létre, száznál is több *in vitro* androgén vonal előállítása után (Kuo et al. 1985), de a módszer a mai napig is fejlesztés alatt áll. A legnehezebben legyőzhető korlátot az jelenti, hogy a jelenleg ismert módszerekkel csak bizonyos genotípusok serkenthetők növényregenerációra képes kallusz vagy embrió fejlesztésére (Pescitelli et al. 1994). A kezdeti eredmények alapján erőteljes portokválaszra képes genotípusok, mint a Hsiao-pa-tang x Shui-pai (Miao et al. 1778), Batangbai (Ba-Tong-pai) (Cao és Leng 1983), CH-13 (Nitch et al. 1982), Sarhad Yellow (Pauk 1985) többnyire nem tartoznak a nemesítési szempontból elit genotípusokhoz. A korai kukorica portok kísérletek másik fontos jellemzője, hogy kevés növényen sikerült életképes szemeket nyerni. Genovesi és Collins (1982) statisztikailag ellenőrzött kísérleteiben például, százezer portok leoltása alapján a legjobb genotípus x táptalaj x hidegkezelés kombináció 18,3 %-os portok indukciót eredményezett. Ezeknek a kalluszoknak és embrióknak 19,2 %-a fejlődött növényekké, de csak 2 öntermékenyített szemet nyertek, és két további vonalat sikerült egymással keresztezni. E tapasztalatok alapján Petolino és Thompson (1987) arra keresett választ, hogy javítható-e a portok reakció. Négy kereskedelmi vonallal végzett diallél keresztezések alapján egyaránt jelentősnek találták az általános és speciális kombinálódóképesség portok válasz növelő hatását. Tapasztalataik alapján lehetségesnek tartották a nagy gyakorisággal válaszoló genotípusok szelekcióját.

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. Későbbi molekuláris vizsgálatok során Vergne és mtsai (1993) azonosítottak egy hidegkezelésre termelődő 32 kD méretű fehérjét a DH5 x DH7 kukorica hibridben. A hidegkezelés 7. napján mért fehérjetermék mennyisége pozitív korrelációt mutatott a kísérletben szereplő genotípusok portok indukciójával, és csak a reagáló változatokban fordult elő.

A portokból kiszabadított, izolált mikrospórákra is érvényes, hogy nehezebben, kisebb hatékonysággal lehet tenyészteni, mint a sértetlen antérákat. Ráadásul eddig világszerte mindössze öt kukorica genotípusról számoltak be, melyek izolált mikrospórái indukálhatóak voltak, és szövettenyészeteikből növényeket tudtak előállítani (Pescitelli et al. összefoglalója 1994). A

témakörben megjelenő közleményekből az tűnik ki, hogy azok a közvetett mikrospóratenyésztési eljárások voltak hatékonyabbak, melyekben a mikrospórák izolálását megelőzően a portokokat a címerből kiemelték, és előtenyésztették (Pescitelli et al. 1989) vagy előkezelték (Genovesi és Yingling 1990, 1994). Gaillard és mtsai (1991) portok dajkatenyészetet alkalmaztak a mikrospóra tenyésztéshez. Ez azonban megterheli a módszert a portok izoláláshoz szükséges többletmunkával. A dolgozatban szereplő munka a másik csoportba, a közvetlen izolálási módszerhez sorolható, mely gyorsabb, egyszerűbb, ezért a gyakorlati felhasználó számára előnyösebb lehet.

A szerzők többsége a mikrospóra módszer hatékonyságát, az előállítható mikrospóra-embriók számán méri le. Az eddigi eredmények alapján azonban, a termékeny növények előállítása legalább ilyen fontos szempont, hiszen életképes szemek, azaz termés híján nehezen képzelhető el bármilyen további, például nemesítési felhasználás. Ennek a dolgozatnak az eredményei között ezért szerepel központi helyen a termékeny mikrospóra növények előállítása.

Az embriószám és a fertilis növény-előállítás jelentős fejlesztéséről számolt be Genovesi és Yingling (1994). Ezt a dolgozatot megelőzően csak ők dokumentálták a termékeny növények előállítását, és számoltak be azok életképes utódnemzedékéről is. Eredményeiket a fentebb említett két eljárás közül azonban a közvetett módszerrel érték el.

2.2. Szomatikus hibridizáció

A növénynemesítés alapja a keresztezéssel létrehozott populációkban végzett szisztematikus szelekció. A fajták, hibridek túlnyomó többsége fajon belüli, genotípusok közötti keresztezésből ered. Ha e növényfajon belül egy- egy szükséges tulajdonság már nem található meg, akkor értékes génforrásul szolgálhatnak a termesztett növények vad rokonai. Ezekben az esetekben távoli keresztezések alkalmazásával, faj és nemzetség hibridek létrehozásával lehet a vad faj génjeit bevezetni a termesztésre alkalmas genotípusokba, majd több visszakeresztezés után leszűkíteni a vad faj genetikai állományát a kívánt tulajdonságot hordozó génekre.

A genetikailag távoli fajok, nemzetségek beporzásos keresztezhetőségének azonban természetes korlátai vannak, melyek a rendszertani távolság növelésével erősödnek. Az ivaros keresztezés csak egy viszonylag szűk rokonsági körön belül lehetséges. A két fő akadályozó mechanizmus a gaméta- összeférhetetlenség, és a hibrid embrió pusztulása (Dudits és Heszky 2000). A faj- és nemzetséghibridek tulajdonságairól hazánkban Belea (1986) készített összefoglaló munkát.

A szomatikus hibridizáció lehetőséget ad az ivaros inkompatibilitás megkerülésére és olyan hibrid növények létrehozására, melyek fontos alapanyagok lehetnek: nemesítési szempontból az új tulajdonságok miatt, alapkutatási szempontból pedig az inkompatibilitással összefüggő kérdések tanulmányozásához. Ehhez a növények a testi sejtjeinek *in vitro* egyesítésére van szükség, melyet a szomatikus sejtek esetében a sejtfal eltávolítása előz meg.

A szomatikus hibridizáció ötlete Ernst Küster citológustól származik, aki elsőként figyelt meg protoplasztfúziót a kilencszázas évek elején (Dudits és Heszky 2000). A módszer gyakorlati alkalmazásáig még további közel hetven évre volt szükség, elsősorban a protoplasztálhatóság módszertani akadályai miatt. A növényi sejtfal jelenléte megakadályozza a sejtek fúzióját. Az első hatékony sejtfal eltávolító módszert Cocking fejlesztette ki 1960-ban, mikor *Myrothecium verrucaria* gombából nyert cellulázzal sikeresen állított elő paradicsomgyökér protoplasztokat.

Cocking eredményéhez hasonló jelentősége volt a polietilén glikol (PEG) fuziogén hatását bizonyító felfedezésnek is (Kao és Michayluk 1974, Wallin et al. 1974). A két nagyszabású újítás lendületet adott a kutatásoknak, mert kaput nyitott a növényi protoplaszt- növény rendszerek kiépítéséhez, és az ehhez szorosan kötődő szomatikus hibridizációs eredményeknek is. Az 1970-es évektől egyre szélesebb körben kezdték kidolgozni a protoplaszt fúziós eljárásokat a legkülönbözőbb növényfajok paraszexuális keresztezésére (Nicotiana: Nagata, Takebe 1971, Kao, Michayluk 1974, Umbelliferaceae: Dudits et al. 1979, Gramineae: Terada et al. 1987,

Cruciferaceae: Toriyama et al. 1987, Rutaceae: Grosser et al. 1988, Solanaceae: Kim et al. 1993, Fabaceae: Crea et al. 1997).

A PEG mellet még számos egyéb fúziós kezelést is kialakítottak, de a legjelentősebb alternatíva az elektrofúzió lett (Zimmermann és Scheurich 1981).

Mind a PEG kezelés, mind az elektrofúzió széles körűen alkalmazható. A növényi protoplasztok mellet baktérium- és gombaprotoplasztok, valamint állati sejtek egyaránt fuzionáltathatók ezekkel a módszerekkel. A sejtek fúziója nem fajspecifikus fiziko-kémiai folyamat. A membránok szerkezetében levő nagyfokú hasonlóság lehetővé teszi még rendszertanilag igen távoli fajok hibridizációját is (Dudits és Heszky, 2000). Salhani et al. (1985) tapasztalata szerint az általuk elekrofúzióval egyesített egérsejtek és petúnia protoplasztok hibridsejtjeiben a növényi és állati sejtműködések egyaránt megmaradtak és még ilyen partnerek esetében is lehetséges a sejtszintű együttműködés (Dudits és Heszky 2000).

Az első növényi sejtfúziós eredmények a Solanaceae családhoz tartozó, ivarosan is keresztezhető fajokkal születtek, és főként alapkutatási érdeklődést szolgáltak (Melchers és Labib 1974, Gleba és Hoffmann 1978, Carlson et al. 1972, Power et al. 1976). A módszert felhasználták génlokalizálásra és genom kölcsönhatások vizsgálatára is (Gleba és Sytnik 1984, Negrutiu et al. 1989). A sejtfúzió kiegészítő nemesítési eszközként is alkalmazásra került, nehezen kivitelezhető ivaros keresztezések helyettesítésére (Hansen és Earle 1995, Samoylov et al. 1996).

A gazdaságilag jelentős fajokból (Solanum -Austin et al. 1985, Cichorium -Rambaud et al. 1993, Brassica - Sjödin et al. 1989, Oryza - Kyozuka et al. 1989, Citrus-1988, Grosser et al. 1988, Asparagus- Gibson et al. 1988) és ivaros úton nem keresztezhető, vad rokonaikból agronómiailag is értékes tulajdonságokkal bíró kombinációkat hoztak létre. Sor került rezisztencia gének átvitelére, melyek hatékonynak bizonyultak bakteriális (Preiszner et al. 1991, Kim et al. 1993, Hansen és Earle 1995, Polgár et al. 1996, Laferriere et al. 1999), gombás (Hansen és Earle 1997), vírusos betegségekkel (Austin et al. 1985, Gibson et al. 1988), sőt fonálférgekkel szemben is (Lelivelt et al. 1993). Megvalósult a citoplazmás hímsterilitás szomatikus átvitele (Kyozuka et al. 1989, Akagi et al. 1995), és kísérletek történtek szárazság és hidegtűrés javítására is (Preiszner et al. 1991, Begum et al. 1995, Louzanda et al. 1993).

Annak ellenére, hogy több mint száz különböző növényfaj hibridjét hozták eddig létre (Guo és Deng összefoglalója 1998), nagyon kevés adat található a kukorica szomatikus hibridjeiről (Kao, Michayluk 1974, Brar et al. 1980). Ennek egyik oka az lehet, hogy viszonylag kevés a megfelelő kukorica protoplaszt forrás (Rhodes et al. 1988, Prioli és Söndall 1989, Shilito et al. 1989, Mórocz

et al. 1990). A másik akadályt a fúziós kezelés károsító hatása jelentheti, melyre a kukorica protoplasztok néhány egyéb nehéz szövettenyészhetőségű fajhoz (Chapel et al. 1984, Krasnyanski és Menczel 1995) hasonlóan érzékenyek.

A gyakorlatban többféle fúziós, illetve szelekciós kombinácó alakult ki. A zöld mezofillum és fehér (albínó, szuszpenziós, vagy mezokotil) protoplasztok alkalmazása megkönnyíti a fúzió megfigyelését, lehetővé teszi a hibrid sejtek azonosítását, kiválogatását, sőt alapja lehet a szelekciónak is (Kao és Michayluk 1974, Dudits et al. 1977, 1979). Növelhető a zöld-fehér szelekció biztonsága, ha a fúziót a szuszpenzióból izolált protoplasztok (IOA) jód-acetamiddal végzett kezelése előzi meg, mely gátolja a sejtmag működését (Mizuhiro et al. 2001). A sejtek eltérő színű festése is kivitelezhető módszer, ha a protoplasztok természetes állapotukban azonos színűek (Keller, et al. 1973).

Más rendszerekben csak a szelekció vagy a növénynevelés során ismerhetőek fel a hibrid jellegek, különböző kiegészítő hatások alapján, mint például helyreállított hajtás regeneráció (Nakano et al. 1996), kettős antibiotikum rezisztencia (Ichikawa et al 1987, Schoenmakers et al. 1994).

A hibridizációs kísérletekből nyert kalluszok, növények genetikai jellegének vizsgálatára a citológiai és a molekuláris módszerek adnak lehetőséget, melyek közül gyakori az izoenzim, RAPD és *in situ* hibridizációs technikák alkalmazása.

A dolgozatban bemutatásra kerülő munka célja olyan fúziós körülmények kialakítása volt, mely lehetővé tették albínó kukorica és zöld búza sejtek egyesítését, a hibrid sejtek osztódását, s véső soron alkalmas volt zöld kaluszok kiválogatására és növényregenerálásra.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Mikrospóra eredetű növények előállítása

3.1.1. Donor növények

Az első kísérlet alapanyagául a PH TC háromvonalas kukorica hibrid szolgált, amelynek vonalai portoktenyésztésből származtak (Mórocz 1997, Mórocz nem közölt eredmények). A mikrospóra tenyésztéshez kapcsolódó címer előkezeléseket, a növényregenerálást és növénynevelést a Gabonatermesztési Kutató Kht. Kukorica szövettenyésztési laboratóriumában Mórocz Sándor által kialakított módszerek alapján végeztem. A növények nevelése a nyári időszakban szántóföldön, télen üvegházi körülmények között, 2 l-es cserepekben történt. A földkeverék homokot, tőzeget és Floraska B virágföldet tartalmazott 1:1:1 arányú keverékben. A növényházban 25/18 ^{o}C-os hőmérsékleten, éjszakai megvilágítást kaptak a növények (20-tól 7 óráig). A világítást Na és HGLR OSRAM higanygőz lámpák (400 W) biztosították. A növények naponta öntözést, és hetente kb 0.5-1 g műtrágyát (Volldünger) kaptak. A minták begyűjtésére az volt a legmegfelelőbb állapot, mikor a címerek már kitapinthatóak voltak az átlagosan három–öt felső levélen keresztül. Ebben az állapotukban már tartalmazták a késői egymagvas mikrospórákat, melyek alkalmasak az *in vitro* indukcióra. Ezt a fejlettséget üvegházban 60-78 nap után, szántóföldön 68-75 nap után érték el a növények. A begyűjtött címerek műanyag és papír tasakba kerültek, és hidegkezelést kaptak 7°C-on sötétben tartva 14-28 napig.

3.1.2. Mikrospóra izolálás és tenyésztés

A hidegkezelés után, a címereket a takarólevelek közül kiemelve, a virágzatokat csipesszel lehántottam a címer tengelyről. Ezután 10 perces felületi fertőtlenítés történt a kereskedelmi hypo 50%-os oldatával. A fertőtlenítő szer maradékát három steril vizes öblítéssel távolítottam el. A mikrospórák feltárása egy kávédarálóra szerelhető mixerrel történt, amely jól helyettesítette az általánosan használt, de lényegesen drágább Waring blendort. Egy-egy mintából 300-400 virágzat került megőrlésre 100 ml ISO oldatban (Gaillard et al. 1991), egységesen 8 mp-ig. A feltárt vegyes fejlettségű mikrospórákat először kiszűrtem a törmelékből (210 µm Tetex szűrővel), majd 60 µm-es lyukbőségű (Polymon) szűrővel összegyűjtöttem. Az így nyert frakció 2 ml ISO oldatban szuszpendálás, majd kétfázisú Percoll grádiens oldatra (20 és 30 %-os) rétegezés után centrifugálásra került (1000 fordulat/perc, 3 percig). Három mikrospóra frakció jelent meg, melyek közül csak a legfelső, a 20 %-os Percoll fölé úszó sejtek kerültek további tisztításra, mely egy következő centrifugálásból állt 0,44 M-os szaharózt tartalmazó tenyésztő táptalajon (Gaillard et al. 1991). Ebben a szakaszban a mikrospórák további két frakcióra váltak szét, ami a tenyésztésre

legalkalmasabb késői egymagvas, korai kétmagvas mikrospórák koncentrálódását eredményezte a felső rétegben. A tenyésztést a sejtek 0,09 M-os szaharóz tartalmú táptalajjal végzett mosása előzte meg (Gaillard et al. 1991). A mikrospórák tenyésztése $6x10^5$/ml sűrűségben, 35 x 10 mm-es Greiner csészékben, 2 ml tenyésztő táptalajban (a továbbiakban mYP) történt (Gaillard et al. 1991). Az oldat 0,35 M szaharózt tartalmazott. A táptalajok összehasonlítása 24 csészés Greiner tálcákban történt. Minden mikrospóra tenyészet sötétben volt, 28 ^oC-on, 14 napig, majd 20- 24 ^oC-ra és változó megvilágítás alá kerültek egészen a kolóniák kifejlődéséig. Kolhicinkezelést nem alkalmaztam sem a mikrospórák, sem a belőlük sarjadó növények kezelése során.

Az 1 mm-es átmérőt elérő kolóniákat N6M (Mórocz et al. 1990) hormonmentes, szilárd (5g/l Gelrite) táptalajra helyeztem, melyen 21 napos átoltásokkal a kalluszok és növények egyaránt jól fejlődtek 20^oC –on és folyamatos megvilágítás mellett. A gyökeres, 6-10 cm-es hajtáshosszú növények csapvizes mosás után átültetésre kerültek a fentebb leírt földkeverékbe. A növényeket műanyag tasakokkal borítottam le, hogy biztosítsam a kezdeti fejlődéshez szükséges párás mikroklímát. Tíz nap után az életképes növények kinőtték a tasakokat, melyeket eltávolítottam. A mikrospóra növények a donor növényekével azonos gondozást kaptak. A felnőtt növény állományon keresztezéseket és öntermékenyítéseket végeztem.

3.1.3. Növényregenerálás

A folyékony mikrospóra tenyésztő oldatokban növekvő egy mm nagyságot elérő kalluszokat csipesszel raktam át szilárd 50 ml N6M hormonmentes táptalajra. Az intenzív kallusznövekedés érdekében a kalluszokat 10-14 naponként oltottam át friss táptalajra. A növényregenerálás megindításához 3-4 hétre kellett ritkítani az átoltásokat. Az első kísérletben különböző F1 családokat képviselő PH TC címerekből izolált mikrospórák tenyészthetőségét vizsgáltam meg. Nyomon követtem az azonos körülmények között nevelt hibrid növények androgén reakcióinak címerenkénti variabilitását.

3.1.4. A táptalajok hatása a mikrospórák éleképességére

A második kísérlet célja a mikrospóra tenyésztés korai szakaszában tapasztalható alacsony életképességi arány javítása, valamint a két genotípus androgén reakciójának összehasonlítása volt. A kísérletben a ppN6M/89 (Mórocz et al. 1990), mN6M, és a mYP (Gaillard et al. 1991) táptalajokat vizsgáltam meg különböző tenyésztési szakaszokban.

Az mN6M táptalaj hasonlóan készül, mint a ppN6M/89 azzal az eltéréssel, hogy 0,1 g/l szaharózt tartalmazott és a 0,475 Osmol/kg ozmotikus érték vízzel került beállításra. A táptalaj 2,4-

D-t nem tartalmazott, pH-ja KOH-dal 5,8-ra lett beállítva. Az N6 jellegű mikrospóra tenyésztő táptalajok és az mYP vitamin oldatainak sterilizálása szűréssel (0,2 μm lyukbőségű membránon), míg az mYP többi alkotórészének csíramentesítése autoklávozással (120 ^{o}C 25 perc) történt. Az oldatokat 4 ^{o}C-on tároltuk felhasználásukig. A kísérletben felhasználásra kerültek mind az eredeti PH TC, mind az MH SC növények címerei, melyek az első kísérlet során két mikrospóra vonal keresztezéséből származtak.

A pH, ozmotikum és a 2,4-D hatások vizsgálatához az mN6M táptalaj különböző változatai készültek el úgy, hogy mindegyik összetevő két-két értéke került vizsgálatra: pH 3,0 és pH 5,8, ozmotikum 0,475 és 0,600 Osmol/kg valamint 2,4-D 0,2 és 0 mg/l.

A fenti táptalaj változatok (1. táblázat) hatását az élő mikrospórák mennyiségén mértem le, kísérletenként legalább 1500 mikrospóra megszámolásával.

Az előkísérletek során a mikrospórák korai életképességének vizsgálata fluoreszcein diacetátos (FDA) festéssel is megtörtént (adatok bemutatása nélkül), de az értékelés egyszerűsítése érdekében az első napi számolásoknál a megnőtt, sűrű citoplazmás mikrospórák, a 7. napi értékelésnél pedig az osztódó és a szemmel láthatóan élő sejteket számoltam meg, mivel ezek könnyen megkülönböztethetők voltak az elpusztult, kiüresedett vagy összezsugorodott mikrospóráktól.

3.1.5. Statisztikai értékelés

A táptalaj kísérletekhez randomizált teljes blokk elrendezést alkalmaztam. Ismétlésként az egyes címerek szolgáltak. A varianciaanalízis a Microsoft Excel programmal végeztem el.

3.1.6. Oldatok, táptalajok

1. táblázat: A mikrospóra tenyésztési kísérletekhez felhasznált táptalajok és törzsoldatok:

	ppN6M/89	**mN6M**	**mYP**
	mg/l	**mg/l**	**mg/l**
KNO_3	2830	2830	2500
$(NH4)_2SO_4$	463	463	0
KH_2PO_4	400	400	510
$MgSO_4x7H_20$	370	370	3700
$CaCl_2$ $x2H_2O$	300	300	176
NH_4NO_3	0	0	165
	ml	**ml**	**ml**
N6 vitaminok+ glicin (Chu et al 1975)	1	1	0
Strauss vitaminok –L aszparagin (Green 1975)	0	0	1
MS mikroelemek (Murahige and Skoog 1962)	1	1	1
$FeNa_2EDTA$	5	5	2,5
	mg/l	**mg/l**	**mg/l**
Fruktóz	30000	30000	0
Glükóz	50000	50000	0
Maltóz	2500	2500	0
Galaktóz	2500	2500	0
Galakturonsav	500	500	0
Glükuronsav	500	500	0
L-asparagin	500	500	0
L-glutamin	100	100	0
L-serin	100	100	99
Inosit	0	0	100
Szaharóz	10000	100	29950
2,4 D	0,4	0	0
Naftil ecetsav	0,7	0	0
Zeatin (kevert izomerek)	0,7	0,7	0
PH	2,9-3,0 (Beállítás nélkül)	5,8 (KOH)	5,8 (KOH)
	mOsmol/kg	**mOsmol/kg**	**mOsmol/kg**
Ozmotikum	700	475	475

A kísérlethez felhasznált törzsoldatok:

mg/100ml							
	Mn SO_4 \x4H2O	**Zn SO_4 X7H2O**	**H3BO3**	**KJ**	**Na_2MoO_4 x2H_2O**	**Cu SO_4 x5H_2O**	**$CoCl_2$ X6H_2O**
MS mikroelemek (Murahige and Skoog 1962)	2230	860	620	83	25	2,5	2,5

mg/100ml				
	Thiamin HCl	**Piridoxin HCl**	**Nikotinsav**	**Glicin**
N6 vitaminok+ glicin (Chu et al 1975)	100	50	50	200

mg/10ml					
	Thiamin HCl	**Piridoxin HCl**	**Niacin**	**Glicin**	**Ca- pantoteát**
Strauss vitaminok –L aszparagin (Green 1975)	2,5	2,5	13	77	2,5

g/l			
	$FeSO_4$x7H2O	**Na_2EDTA**	**Megjegyzés**
$FeNa_2EDTA$	5,57	7,45	45 perc forralás, majd 1l-re feltöltés, tárolás: 4-8^oC-on

3.2. Kukorica x búza szomatikus hibridizáció

3.2.1. Protoplaszt donor növények

A búza protoplasztok forrása a GK Öthalom fajta volt (Gabonatermesztési Kutató Intézet, Szeged) (3.A. ábra). A kukorica protoplasztokat a H 1160 albínó kukorica sejtvonalból izoláltam (3.B.ábra). A tenyészet a H229 x C2-A-18 növények portoktenyészetéből származott (Mórocz 1991), és protoplaszt tenyészthetőségre történt szelekció során került kiválasztásra.

3.2.2. Szuszpenziós tenyészetek

A sejttenyészetek kialakítása és fenntartása N6M folyékony táptalajon történt (Mórocz et al. 1990). A sejtszuszpenziókat (2 g/50 ml N6M) heti átoltással tenyésztettem, míg protoplasztálásra alkalmassá váltak. A fúzióra legmegfelelőbb sejtállapot ismételhetősége érdekében, előkísérletként 42 db 2g/50 ml szuszpenziót tenyésztettem vizsgáltam meg, melyekből naponta három minta sejttömeg növekedését, pH és ozmotikum értékeit mértem meg (Osmomat 030-D). A minták öszekeverése után következett a protoplaszt izolálás, majd a fúzió, melynek során az izolálható protoplaszt mennyiséget és a hibrid sejtek arányát mértem.

3.2.3. Növénynevelés

A búzanövényeket (GK Öthalom) steril körülények között csíráztattam. A magokat 1 percig abszolút alkohollal, 3 percig 0,1 %-os higany kloriddal, 15 percig kereskedelmi hypo 50 %-os oldatával kezeltem, majd háromszor lemostam steril ioncserélt vízzel. A növényeket nyolc napig 18 cm-es Schott csövekben, Gelrittel szilárdított steril csapvízen neveltem 22 ^{o}C –os hőmérsékleten folyamatos megvilágításban.

3.2.4. Protoplaszt izolálás

A kukorica protoplasztokat Mórocz et al. (1990) leírása szerint izoláltam, azzal az eltéréssel, hogy kétszakaszos enzimes emésztést alkalmaztam: 14 óra +4 ^{o}C-on rázatás nélküli kezelést, két óra szobahőmérsékleten végzett, kíméletes rázatással kísért szakasz egészített ki. A búza mezofillum protoplasztok izolálásához 8 napos csíramentes körülmények között nevelt növények levéllemezét vágtam le, majd belehelyeztem 10 ml “A” oldatba (Sarhan és Cesar 1988). Harminc perc úsztatás után a leveleket 2-3 csepp “A” oldatot tartalmazó Petri csészébe helyeztem, és az epidermiszt csipesszel eltávolítottam a levelek fonákjáról, majd a 2 g nyúzott levelelet 10 ml izoláló oldatban (Sarhan és Cesar 1988) +4 ^{o}C-on tartottam 4 órán át. Ezt követően a

protoplasztokat 60 um-es lyukbőségű szűrőn elválasztottam a törmeléktől, majd 1000 fodulat/perc centrifugálással leülepítettem, végül UM oldatban átmostam (Uchimaya és Murashige 1974).

3.2.5. Kukorica és búza protoplasztok fuziója

Az izolált protopasztokat 2:1 arányban (1 millió kukorica és 0,5 millió búza) összekevertem, és 10 ml UM oldatban felszuszpendáltam, majd lecentrifugáltam. A sűrű protoplaszt szuszpenziót (1,5 x 106 /400 ul UM) 20 percig ülepítettem egy 10 mm átmérőjű cseppben, 35 mm-es Greiner Petri csészében, rázkódás mentes helyen (kikapcsolt lamináris boxban). Mikor a sejtek hozzátapadtak a csésze aljához, egy ml, 40 %-os Kao D oldatban (Kao és Michayluk 1974) oldott, 3500 MW Sigma poly etilén glikolt (PEG) adtam hozzá, nagyon lassú, folyamatos pipettázással, gondosan elkerülve a csepegtetést, a protoplasztok fellazítását illetve felúsztatását. Öt perc PEG kezelés után 10 ml Kao C mosóoldattal hígítottam a PEG oldatot, igen lassú pipettázással adagolva és eltávolítva a keveréket. Befejező lépésként a mosóoldatot 1 ml ppN6M /89 tenyésztő táptalajra cseréltem (Mórocz et al. 1990). A hígítás hatékonyságát a fúziós és mosó oldat keverék ozmotikus értékének mérésével ellenőriztem minden ml mosóoldat hozzáadása után.

3.2.6. A szomatikus hibridek azonosítása

A hibrid sejtek első számlálása közvetlenül a fúzió után történt, fénymikroszkóp segítségével. A tenyészeteket LGT (low gelling temperature) agarózzal beágyaztam, így a jól látható hibrid sejtek helyzetét a csésze alján bejelöltem. A zöldülést mutató, feltételezett hibrid kalluszok, majd növények vizsgálata során kromoszómaszámlálást, DNS markereket alkalmaztunk (RAPD, *in situ* hibridizáció), valamint morfológiai összehasonlítást, és hideg tesztet végeztünk el.

A számláláshoz Feulgen módszerrel festettem meg a kromoszómákat.

A molekuláris DNS vizsgálatot RAPD (Randomly Amplified Polimorfic DNA) primerekkel végeztem el. A DNS-t CTAB módszerrel (Bousquet et al. 1990) tisztítottam. A reakció oldat (PCR, Polymerase Chain Reaction) a 20 µl térfogatban a következő összetevőket tartalmazta: 10 mM Tris HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 100 µl dNTP keverék (Pharmacia), 5 pmol primer (Operon Alameda), 10 ng genomi DNS, és 0,5 egység (unit) Taq polimeráz enzim (Boehringer Mannheim). A reakciót Hybaid Omnigene PCR készülékkel végeztem el a következő programmal: 1 perc denaturáció 94 ^{o}C-on, majd 35 cikluson át 30 mp 35 ^{o}C-on, 1 perc 72 ^{o}C, 5 mp 94 ^{o}C-on, végül egy ciklusban 30 mp 35 ^{o}C-on és 10 perc 72 ^{o}C-on.

A reakció termékeket 2,0 %-os agaróz gélen választottam el. A festés 0,5 µg/ml töménységű ethidium bromidos vizes oldatban történt. A kezelés időtartama 30 perc volt.

3.2.7. *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációt Göntér Ildikó végezte el (Szarka et al. 2002). Az albinó kukorica kromoszóma preparátumok előkészítése Kao et al. (1974) leírása szerint történt, a protoplaszt izolálás (Mórocz et al. 1990) és az acetokárminos festés kivételével. A búza és a hibrid növények kromoszómáinak előkészítése gyökércsúcsból, szétnyomott preparátumokban történt.

A fluorescens *in situ* hibridizáció Reader és mtsai. (1994) leírása alapján készült el. A búzából izolált teljes genomi DNS-t a beiktatott szonikálás 1000-1500 bp méretű darabokra törte. A DNS jelölése az alábbiak szerint történt: 5 µl Nick transzlációs puffer (0.5 M Tris HCl, pH: 7.8, 0.05 M $MgCl_2$, 0.5 mg/ml Bovine Serum Albumin), 5 µl jelöletlen nukleotid mix (0.5 mM dCTP, dGTP, dATP in 100 mM Tris HCl oldatban, pH: 7.5), 3,5 µl flourokróm jelölésű nukleotid keverék (1 µl 0.05 mM dTTP, 2.5 µl Fluorogreen [Amersham]), 1 µl 100 mM dithiotreitol és 200 ng/ µl búza DNS hozzáadása után a keveréket steril vízzel 45 µl térfogatúra egészítettük ki. Ezután 5 µl DNS polimeráz/DN-áz I (Gibco) hozzáadása után a jelölő oldatot 15 C^o –on 3,5 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő végén 5 µl 0.3 M EDTA (pH: 8.0) hozzáadásával állítottuk le az enzim aktivitást. A jelöletlen kettős szálú kukorica DNS-t 20 perces autoklávozással egyszálúsítottuk, majd a próba 30 szoros mennyiségében hozzáadva az azonos szekvenciák lekötésére használtuk a hibridizáció során. Az oldathoz 0,1 térfogat 3 M-os nátrium acetát oldatot, majd 3 térfogatnyi etil-alkoholt adtunk. Összekeverés után a csapadék 1 óra alatt vált ki –80 ºC –on. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk és a DNS csapadékot 4 ºC-on 500 µl 70% -os etilalkohollal mostuk át, majd újabb centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után a csapadékot 10-12 óráig szárítottuk, végül 20 µl TE pufferben feloldottuk. A tárgylemezre ötven µl hibridizáló oldatot (20 µl 25%-os dextrán szulfát, 5µl 20x SSC, 1,25 µl 10 %-os nátrium dodecil szulfát) pipettáztunk, majd 50 ng jelölt próbát és kompetitor DNS-t adtunk hozzá. Ezután két óra inkubálás következett 65 ^oC-on. Végül mosás után a 1 µl/ml koncentrációjú DAPI (4, 6 –diamino-2-fenilindol) festés következett. A kromoszómákat Zeiss Axioskop 20 epifluorescens mikroszkóppal vizsgáltuk meg, kiegészítve egy 10-es és egy három sávos, 25 számú szűrővel, az FITC illetve a DAPI megjelenítésére. A képeket egy SPOT CCD kamera rögzítette SPOT program segítségével (Diagnostic Instruments, Inc). A képfeldolgozást Image Pro Plus programmal végeztük el.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kukorica mikrospóra tenyésztés, és haploid növények előállítása

A magasabb rendű növények sejttenyészetei közül egyedül az izolált mikrospóra szuszpenzió jelent igazán külön álló sejteket tartalmazó tenyészeteket, de kevés azoknak a fajoknak a száma, melyekre a mikrospóra tenyésztés módszere rutinszerűen kidolgozott lenne (Dudits és Heszky 2000).

A szakirodalomban megjelent izolált mikrospóra-tenyésztési kísérleteket főként a DH vonalak előállítása és a haploid sejttranszformáció lehetősége motiválta. Ahhoz, hogy ezek a módszerek túlléphessenek a kísérleti szinten, és alkalmazhatóak legyenek gyakorlati feladatok megoldására, olyan mikrospóra-növény rendszerre van szükség, mely végeredményként életképes termést tud nyújtani. Az irodalmi összefoglalóban említett portok tenyésztési kísérletek eredményeként ismertté váltak a válaszadó genotípusok, a tenyesztésre eredményesen alkalmazható táptalajok, a megfelelő hideg előkezelés, és a növényregeneráláshoz, kromoszómaduplázáshoz szükséges kezelések is.

Ezekre a portok eredményekre épültek rá az izolált kukorica mikrospóra tenyésztési kísérletek, melyekben a B5 (Coumans et al. 1989), YP (Petolino et al. 1988, Gaillard et al. 1991), és N6 (Pescitelli et al. 1989), alapú táptalajokat alkalmaztak eredményesen. Megfigyelhető, hogy a mikrospóra tenyésztési körülmények optimalizálásával hatékonyan növelték a mikrospóra embriók számát (Petolino et al. 1988, Pescitelli et al. 1989, Gaillard et al. 1991). Ugyanakkor az előzetes irodalmi eredmények közül csak Genovesi és Yingling (1994) mutatták be a termékeny mikrospóra növények utódgenerációját is. Ennek egyik oka lehet Ku és mtsai (1978) megfigyelése, mely szerint a nincs összefüggés minden genotípus esetében az embrioid fejlődés gyakorisága és a növényregenerálás hatékonysága között.

A PH TC mikrospórák tenyésztése során a korábbi közleményekben leírtakhoz hasonló tapasztalatokat nyertem az izolálás és a tenyésztés első szakaszában: az életképességük megközelítette Gaillard és mtsai (1991) adatait, míg Coumans mtsai (1989) alacsonyabb, 50%-os életképességről számoltak be. Az mN6M táptalajban hasonló mennyiségű mikrospóra maradt életben a tenyésztés első napján, mint Coumans mtsai (1989) és Pescitelli és mtsai (1990a) kísérleteiben. A másik két táptalajon ennél alacsonyabb értéket tapasztaltam, amit az mYP esetében az is okozhatott, hogy az általam használt genotípusban szereplő forrásanyagok N6 jellegű (Mórocz et al. 1990) táptalajokhoz alkalmazkodtak, a ppN6M/89 táptalajnak pedig túl alacsony a pH értéke.

Eltérést jelent a korábbi közleményektől viszont az, hogy a válaszadó mikrospórákból embriók helyett (Pescitelli et al. 1989, Gaillard et al. 1991) fenntartható kalluszok fejlődnek, és a regenerálóképes vonalakból tartósan, nagyszámú növény állítható elő. Ez növeli a magfogás esélyét, míg az embriót fejlesztő genotípusoknál (Gaillard et al. 1991) minden embrióból egy növény sarjad, ezért ha -például növényápolási hiba miatt- nem sikerül a magfogás, akkor pótolhatatlanul elveszhet egy-egy új DH vonal.

Az irodalmi adatokból az tűnik ki, hogy az eddigi munkák többsége főleg az embrió szám (Pescitelli et al. 1989, 1990 a,b, Genovesi és Yingling 1990), vagy a növényregenerálás növelésén (Gaillard et al. 1991) mérték a rendszer hatékonyságát. Temékeny növényekről Coumans et al. (1989), Gaillard et al. (1991) tettek említést, Genovesi és Yingling (1994) pedig ezt képekkel is dokumentálták szabadalmuk leírásában. Az utóbbi két közleményben azonban a magas embrió szám eléréséhez és hatékony növényregeneráláshoz dajka tenyészetre (Gaillard et al. 1991), illetve portok izolálásra és előkezelésre volt szükség (Genovesi and Yingling 1994). Az itt bemutatott rendszer mentes ezektől a munkaigényes szakaszoktól, mivel a mikrospórák a virágzatból közvetlenül kerülnek izolálásra, és alkalmasak voltak termékeny növények regenerálására dajkatenyészet nélkül is.

Az utódnemzedék megjelenítését azért tartom fontosnak, mert tapasztalataim alapján ez a biztosítéka a teljes mikrospóra- növény rendszernek. Növényeink egy részén előállított magok ugyanis esetenként csíraképtelenek voltak, vagy csak gyenge terméketlen növények fejlődtek belőlük. Ezt alátámasztják a korai eredmények közül Miao és mtsai (1978) tapasztalatai, amikor 65 öntermékenyítéssel nyert DH kukorica magból csak 8-ban találtak embriót, és csak egy csírázott ki. A termékeny növények ilyen szintje még nem jelent előrelépést a modell értékű, terméketlen rendszerhez képest sem nemesítési, sem transzformációs szempontból. Például Gaillard és mtsai (1991) által kialakított, mikrospóra embriókat igen hatékonyan termelő rendszert transzformációs kísérletekre használták fel Jardinaud és mtsai (1995). Eredményesen optimalizálták a tranziens expresszió körülményeit, de nem sikerült transzgénikus növényeket regenerálniuk.

A mikrospóra-tenyésztő táptalaj kísérleteinket az az általános tapasztalat indokolta, hogy az izolált mikrospórák életképessége a tenyésztés első napjaiban töredékére csökken. Ezen próbáltam javítani a ppN6M/89 táptalaj alkalmazásával, amely a mYP–nél lényegesen gazdagabb összetételű, sajátosan alacsony pH-jú (3,0) (1. táblázat), és a HE/89 genotípus (Mórocz et al. 1990) diploid sejtjei (protoplasztjai) igen jól tenyészthetők benne. Mivel ez a genotípus szerepelt a PH TC pedigréjében, és a PH TC előzetes portok indukciója hasonló hormon autotróf kalluszt eredményezett, ezért azt feltételeztem, hogy a mikrospórák is kedvezően reagálnak a ppN6M/89–

ra. Valójában ezzel ellentétes eredményt kaptam (2. táblázat). E tapasztalat alapján készítettem el az mN6M táptalajt, mely megegyezett a ppN6M/89 összetételével, de pH, ozmotikus értékei, és 2,4-D mentessége a mYP táptalajéval volt azonos. Ezzel a módosítással az mN6M az mYP táptalajnál is jobb túlélést biztosított a mikrospóráknak, bár a tenyésztés előrehaladtával ez az előny csökkent. Hasonló jelenségről számoltak be Pescitelli et al. (1990a) az izolálási technika és az alacsony hőmérséklet előnyös hatásaival kapcsolatban. A részletes táptalajkísérletre a pH, az ozmotikum és a 2,4-D tartalom hatásainak rangsorolhatósága, valamint a PH TC és az MH SC genotípusok összehasonlítása érdekében került sor. A táptalaj változtatások közül legjelentősebbnek a pH bizonyult, és megerősítést nyert az 5,8-as pH használatának helyessége, amit Genovesi és Yingling (1994) valamint Pescitelli és mtsai (1989) közleményeiben is megfigyelhetünk.

Barloy és mtsai (1989) közlése szerint az általuk vizsgált androgén hibrid növények (DH5xDH7, DH7xDH9) címerei között nem volt jelentős különbség a válaszadó antérák számában. Ebből arra következtettek, hogy a donor növények nevelési körülményei nem befolyásolják az androgenezishez szükséges gének kifejeződését. Ezzel ellentétben nagyfokú variabilitást tapasztaltam mind az azonos feltételek között nevelt PH TC mind a MH SC növények címerei között (5. táblázat), valamint időszakos változás is megfigyelhető volt a mikrospóra indukció hatékonyságában. Tapasztalatomat közvetve az is alátámasztja, hogy az ugyancsak a DH5xDH7 mikrospórákat tenyésztő Gaillard és mtsai (1991) már utaltak az egységes növénynevelési körülmények fontosságára, az innen eredő hatások variációra a mikrospóra válaszban. Kísérleteimben az androgén reakcióra egyébként bizonyíthatóan képes PH TC és MH SC hibridek egyes növényei között tapasztalt indukálhatósági variabilitás közvetve arra utal, hogy a genetikai háttér mellett a növény aktuális élettani állapota is fontos az androgén folyamatban.

A tenyészetek fenntartása és a növényregenerálás leegyszerűsödött az N6M hormon nélküli táptalajon tartásra. A mikrospóra indukciótól az embriók kialakulásáig tartó szakaszra hasonló megfigyelést írtak le Coumans és mtsai (1989). Azt tapasztalták, hogy a mikrospóra indukciótól az embriók kialakulásáig tartó szakaszban az endogén hormonok hatása elegendőnek bizonyult a tenyésztéshez. Esetünkben ez az egész tenyésztési időszakra jellemző volt. A növényregenerációt és a kallusz fejlődést az embriogén illetve dedifferenciált szövetrészek válogatásával lehetett szabályozni. (Összehasonlításul: Genovesi és Yingling (1994) aktív szenet és hormonokat is tartalmazó, embrioid érlelő, majd regeneráló, végül ún. befejező táptalajokon állították elő növényeiket)

Egyes korábbi eredményekben igen nagy szerepet kaptak a különféle dajkatenyészetek. Gaillard és mtsai (1991) leírása szerint az általuk elért nagyszámú embrió előállításához a nyitott mikrospóra tenyészeteket egy légtérbe, közös tenyésztő edénybe kellett helyezni a másik, fedetlen csészében úsztatott portokokkal. Az ilyen módon létrehozott ˝gáz környezet˝ nélkül csak nagyon kevés embriót nyertek. Búza mikrospóra tenyésztési publikációból ismert, hogy ováriumok nélkül a mikrospóra sejtkolóniák nem fejlődtek két hétnél tovább (Puolimatka et al. 1996). Köhler és Wenzel (1985), valamint Mejza és mtsai (1993) eredményei szintén megerősítik a dajkatenyészet fontosságát az árpa és a búza mikrospóra tenyésztésben. Az ilyen kiegészítések esetében azonban, a dajkatenyészetként szolgáló növényi részek preparálása kézimunka igényes lépéssel terheli a módszert, ezért kísérleteinkben nem alkalmaztuk ezeket.

Bár az izolált kukorica mikrospórákkal kapcsolatban jelent meg olyan bizakodó vélemény, amely elképzelhetőnek tartotta a repcéhez hasonlítható szintű hatékonyság elérését (Gaillard et al. 1991), ez azonban a mai napig sem teljesült maradéktalanul. A legjelentősebb akadályt az indukcióra alkalmas genotípusok szűkössége valamint termékeny növények előállítási nehézségei jelentik.

Összefoglalásul, a következő eredményeket tartom fontosnak az itt bemutatott munkából. Megkíséreltünk összeállítani egy egyszerűsített, költségtakarékos, közvetlen mikrospóra izolálási módszert. Termékeny kukorica növényeket és azok utódnemzedékét is produkáló mikrospóra-növény rendszert sikerült működtetni, tehát bővítettük a közvetlen mikrospóra tenyésztés eredményeit (Pescitelli et al. 1994), mert hasonlót eddig csak komplex, közvetett módszerrel értek el (Genovesi és Yingling 1994).

A portok tenyésztéssel előállított PH TC és az itt bemutatott kísérletekből származó MH SC genotípusok növelték az eddig ismert, mikrospóra indukcióra alkalmas genotípusok számát (Brettel et al. 1981, Petolino et al. 1988, Barloy et al. 1989, Genovesi és Yingling 1990, 1994). A genotípusok korábbiaktól eltérő jelle hozzájárulhat a mikrospóra indukció genetikai hátterének pontosításához. Figyelembe véve, hogy az eddigi kukorica *ab initio* mikrospóra indukcióra alkalmas genotípusok általában a portok tenyésztésnél kevesebb embriót, illetve haploid növényt eredményeztek, fontos lenne pontosítani az antéra és az egysejtes mikrospóra indukció genetikai szabályozásának esetlegesen eltérő jellegét. A nemesítési alkalmazáshoz további fontos szempont, hogy a mikrospóra indukciót meghatározó gének kapcsolódnak-e nemesítési szempontból előnyös vagy hátrányos egyéb tulajdonságokkal.

Kukorica szomatikus hibridizáció

A búza és kukorica közötti hibridizációs célú ivaros keresztezések kevés eredményre vezettek a genetikai összeférhetetlenség miatt (Laurie és Bennett 1988, Inagaki és Tahir 1992). Ezekben az esetekben a kukoricakromoszómák elvesztek a befogadó búzaszülőben, a megporzás után, ezért a gyakorlatban búza haploid előállításra használták a módszert. Mivel e két faj génjeinek esetleges kombinációjára nem volt korábbi példa, ezért megpróbálkoztunk szomatikus hibridjük létrehozásával. Az eljárás más, filogenetikailag távoli fajok esetében eredményesnek bizonyult (Kisaka et al. 1997). A paraszexuális hibridizáció eredményeit többnyire kétszikű fajokkal érték el (Crea et al. 1997). Az egyszikűekkel végzett kísérletek kevesebb sikert hoztak, a gabonafélék protoplasztálási nehézségei, valamint megfelelő szelekciós rendszerek hiánya és a növényregenerálási nehézségek miatt.

A laboratóriumunkban (Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged) rendelkezésre álló morfogén albínó kukorica sejt szuszpenzió jó alapul szolgált a fúziós kísérletekhez. A sokéves vizsgálati idő alatt egyetlen zöld revertáns regeneráns növényt sem találtunk sem a fenntartott tenyészetekben, sem a PEG kezelést kapott, csak albínó kukorica plotoplasztokat tartalmazó kontrollban. Mivel azonban az albínó fenotípus genetikai hátterét nem ismerjük, nem zárhatjuk ki maradéktalanul az albinó fenotípus spontán reverziójának lehetőségét.

A kukorica és búza protoplasztok egyesítésétől nem lehetett reálisan együttműködő hibrid genom létrejöttét feltételezni, hiszen várható volt a szomatikus inkompatibilitás (Dudits 1982) a két faj filogenetikai távolsága és az eltérő élettani tulajdonságai miatt. Volt azonban esély kisebb kromoszóma darabok, gén szegmentumok átvitelére.

A fúziót követő mikroszkópos megfigyelés kétségtelenül bizonyította az osztódó, PEG kezelelés hatása nyomán létrejött hibrid sejtek jelenlétét, melyeken látható volt a búza kloroplasztiszok és kukorica citoplazma keveredése. Néhány száz életképes sejtegyesülésből mindössze hét zöldülő kalluszklónt és csak egy regenerálóképes tenyészetet sikerült előállítani. Ezek az adatok jól mutatják, hogy a létrehozható hibrid kallusz szövetekben csak igen ritka esetben áll helyre az albínó defektus. A filogenetikailag távoli fajok hibridjeinél hasonlóan alacsony hibridizációs hatékonyság figyelhető meg (Kisaka et al. 1997).

A molekuláris és citológiai folyamatok vizsgálatát és értelmezését megnehezítette, hogy csak egy hibridet sikerült előállítani. A hosszú *in vitro* regenerálási időszak során mind a növények

életképessége, mind a regeneráció hatékonysága javult, ami jó egyezést mutat például a répa hibrideknél korábban megfigyelt folyamatokkal (Dudits et al. 1977, 1980). A jelenség a kromoszómák elvesztésével, vagy átrendeződésével lehet összefüggésben. Az összeférhetetlenségi reakciók kiterjedt hatását jól mutatta az ivarszervek normális működésének hiánya. A hibrid genotípust csak *in vitro* tenyészetben lehetséges fenntartani. Ebből az is következik, hogy várható a genetikai állomány folyamatos változása ezekben a növényekben. Ez összhangban van a korábbi tapasztalatokkal (Dudits és Heszky 2000), hogy egyre nő azoknak a protoplasztfúziós kísérleteknek a száma, melyek dedifferenciált hibrid sejtvonalakat eredményeztek. Ezekben a kalluszsejtként fenntartott hibridekben a genomösszetétel igen változó (Dudits és Heszky 2000). Esetünkben a kukorica genotípus hosszú távú regenerációs képességének köszönhetően a vizsgált időszak alatt regenerált növények megtartották az 56-os kromoszómaszámukat. A kukorica x búza megporzásos keresztezésekben a kukorica genom eliminálódik. A fúziós kísérletekben nem alkalmaztunk besugárzást, hogy megfigyelhessük, hogyan történik az elimináció a szomatikus hibridekben. Szövettenyésztési szempontból a két donor genom közül a kukoricának volt esélye a túlélésre, mert a búza mezofillum protoplasztok *in vitro* körülmények között nem képesek osztódásra. A kukorica tulajdonságokat mutató fenotípus megfigyelésén túl, a kromoszóma vizsgálattól azt vártuk, hogy bepillantást enged a szelektált zöld kalluszok és növények genetikai összetételébe. Mivel a búza és kukorica kromoszómák méretükben és alakjukban is jelentősen különböznek, biztonsággal kijelenthető, hogy a szelektált szövetek csak kukorica kromoszómákat tartalmaztak. A zöld regeneráns növényekben több alkalommal 56 kromoszómát találtunk. A nagy és szabálytalan kromoszómaszámra magyarázatot adhat a fúzió során a PEG hatására gyakran előforduló többszörös sejt egyesülés, majd a regenerációs szakaszban lezajló kromoszómavesztés. Hasonló jelenséget figyeltek meg dísznövények és hagymafélék fajhibridjeinél is (Mizuhiro et al. 2001, Buiteveld et al. 1998). A morfológiailag felismerhető búza kromoszómák hiánya szükségessé tette, hogy molekuláris eszközökkel derítsük ki a szelektált genotípus eredetét.

A RAPD vizsgálat búzára utaló szekvenciákat jelenített meg. A búza DNS jelenlétét az *in situ* vizsgálat tette láthatóvá. Mivel a teljes DNS-t jelöltük, azt feltételezzük, hogy repetitív szekvencia darabok épültek be a kukorica genomba, ezt azonban nem bizonyítottuk. Tekintettel a nagy számú, sok kromoszómán eloszlott búza jelre, feltételezhetjük, hogy kiterjedt genetikai átrendeződés zajlott le a szülői DNS-ben. Ezt tűnik alátámasztani az is, hogy hosszú regenerációs időszak alatt, a kezdetben gyorsan elhaló torz hajtáskezdeményeket fokozatosan felváltották a normálishoz közeli megjelenésű növények. A genom összetétel értelmezéséhez jó alapot nyújthat egy korai tanulmány, melynek eredményei mitózisban és interfázisban levő protoplasztok fúziójára épült (Szabados és Dudits 1980). A korai kromoszóma kondenzáció (premature chromosome

condensation PCC) teljes fragmentációt idézhet elő az interfázisban levő magban. A citológiai vizsgálatok kromatin darabokat mutattak ki, melyek képesek beépülni a hibrid sejtek interfázisban levő magjába, az egymást követő osztódási ciklusok során. Bár ezek az S fázishoz kötődő korai kromoszóma kondenzációk nagyon ritkák, mégis magyarázatul szolgálhatnak a búza DNS szigetek kialakulására.

Bár egyedi és sok tekintetben még ismeretlen genetikai eseményhez jutottunk a búza DNS-t is tartalmazó kukorica genotípussal, a regenerált növények több további lehetőséget kínálnak genetikai és stressz vizsgálatokra. A búza oldalról várható tulajdonságok között a hidegtűrés vizsgálata tűnik logikusnak.

A létrehozott hibrid genotípusnak nincs közvetlen nemesítési jelentősége. Sikerült azonban kialakítani olyan sejt fúziós körülményeket, melyek között lehetővé vált a két faj genomjának egyesítése. Ez lehetőséget ad a búza régiók hígítására például kukoricával történő visszahibridizálás esetén.

A zöld kolóniák szelekciója alapján a fúzió hatékonysága igen alacsony, ezért – fúziós kísérletek folytatása esetén- célszerű lenne szelektálható markert (pl. foszfinotricin acetil transzferáz) hordozó búza levél protoplasztokat (Pauk et al. 1998) alkalmazni. A szelekciós nyomás miatt esetleg több hibridsejtben válhat aktívvá a búza DNS. Ebben az esetben a hibridek azonosítása is biztosabb, mert a szelektív gén egyértelmű bizonyíték a búza genom jelenlétére.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A hormonmentes táptalajon fenntartható-, és regeneráló képességét is hosszú ideig megőrző kukorica genotípusokat két szövettenyésztési szempontból fontos területen alkalmaztam.

1, A mikrospóra tenyésztés során az volt a cél, hogy a módszert dajkatenyészetek alkalmazása illetve portok előtenyésztés nélkül, az eddig leírt genotípuskört bővítve, és nem utolsósorban a termékeny utódnemzedéket is prezentálva akalmazzam. Megvizsgáltam az agronómiai értékeket is hordozó PH TC háromvonalas kukorica genotípus mikrospóra reakcióját három folyékony tenyésztő táptalajon. Az izolálás során elhagytam a portokok előtenyésztését, a növényelőállításhoz egy mikrospóra tenyésztő és egy hormonmentes fenntartó-regeneráló táptalajt alkalmaztam. Az mN6M táptalajon 12%- kal több mikrospóra élte túl a tenyésztés első napját (P= 5%), mint a kontrollként használt táptalajon. A kalluszokból nagy mennyiségű növény regenerálása után termékeny DH vonalakat (ML-1,-2,-8,-15) és azok hibridjeit sikerült felnevelni. A létrehozott vonalak és hibridjeik alkalmas források lehetnek a mikrospóra indukciót segítő kukorica gének további koncentrációjára és genetikai azonosítására.

2, Kukorica x búza nemzetség hibridek létrehozását kíséreltem meg protoplasztfúzióval. A szomatikus hibridizáció sikeres eszköznek bizonyult a természetes keresztezhetőségi határok kiterjesztésében sok növényfaj esetében. A kísérletekkel arra kerestem választ, hogy egyesíthetők-e két faj szomatikus sejtjei és életbentarthatók-e a hibrid sejtek. Tenyésztett albínó kukorica és búza mezofillum protoplasztokat polietilén glikollal egyesítve, sikerült hibrid sejteket létrehozni, majd ezekből zöld növényeket regenerálni. A két szülői sejtforrásból önállóan (fúzión kívül) nem lehetett zöld növényeket előállítani. A regenerált növények gyökércsúcsai 56 kromoszómát tartalmaztak, melyek egyértelműen kukorica jelleget mutattak. Három RAPD primer jelenített meg hibrid jellegre utaló mintát a teljes növényből izolált DNS-ből.

A fluorescens in situ hibridizáció búza DNS jelenlétét mutatta ki a kukorica kromoszómákon. A regenerált növények helyreállított zöld színtest termelése, valamint jelentősen megnövekedett mérete és vitalitása jelentettek morfológiailag új (köztes) tulajdonságot. A regenerált növények kukorica és búza DNS egyedi és ismeretlen keverékét hordozzák, és számos lehetőséget nyújtanak további genetikai és stressz vizsgálatokra.

6. MELLÉKLETEK

401-ES KUTATÓCSOPORT (1975): Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays*. *Acta Genetica Sinica*, 2, 138-143.

ABD EL- MASOUD M.M., BEDŐ Z. (1992): Half-diallel analysis of different characters wheat anther culture. *Acta Agr. Hung.* 41, 235-242.

AKAGI H., TAGUCHI T., FUJIMURA T. (1995): Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.,* 91, 563-567.

ASSELIN DE BAUVILLE M. (1980): Obtention d' haploides in vitro a partir d'ovaries non fecondés de riz Oryza sativa L. *C.R. Acad. Sci. Paris,* 290, 489- 492.

AUSTIN S., BAER M.A., HELGESON J.P. (1985): Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci.,* 39, 75-78.

BÁLINT A. (1990): Bevezetés a növénynemesítésbe. Egyetemi jegyzet, 147-149. Agrártudományi Egyetem Mezőgazdaságtudományi Kar Genetika és Növénynemesítés Tanszék, Gödöllő.

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.

BARNABÁS B., FRANSZ P.F., SCHEL J.H.N. (1987): Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Reports 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., SZAKÁCS É., KARSAI I., BEDŐ Z. (2000): in vitro androgenesis of wheat from fundamentals to practical application. In: BEDŐ Z., LÁNG L. (Szerk.) *Wheat in a global environment,* Kluwer Acad, Publishers. Dordrecht/ Boston/ London, 517-525.

BARNABÁS B., SZAKÁCS É., LISZT K. (1988): Cytological aspects of in vitro androgenesis in cereals. In, CRESTI M., GORI P., PACINI E. (Szerk.) *Sexual reproduction in hiher plants*. Springer -Verlag, Berlin, Hiedelberg, 113- 118.

BEDŐ Z., KARSAI I., LÁNG L., VIDA G. (1996): Current Plant Sci.,ence 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.

BEGUM F., PAUL S., BAG N., SIKDAR S.R., SEN S.K. (1995): Somatic hybrids between *Brassica juncea* (L). Czern. and *Diplotaxis harra* (Forsk) Boiss and the generation of backcross progenies. *Theor. Appl. Genet.,* 91, 1167-1172.

BELEA A. (1986): Faj és nemzetségkeresztezések a növényvilágban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

BEVERSDORF W.D.-SWANSON E.B.-COUMANS M.P.R. (1987): Microspore-based selection systems and products thereof. US Patent Serial, # 030987.

BLAKESLEE A.F., BELLING J., FARNHAM M.E., BERGNER A.D.(1922): A haploid mutant in the Jimson weed, Datura stamonium. *Science,* 55, 646-647.

BLAKESLEE A.F., BELLING M.E., FARNHAM M.E., BERGNER A.D. (1922): A haploid mutant in Jimson weed, Datura stramonium. *Science,* 55, 646-647.

BOUSQUET J., SIMON L., LALONDE M. (1990.): DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polimerase chain reaction. *Can. J. For. Res* ., 20, 254-257.

BRAR D.S., RAMBOLD S., CONSTABEL F., GAMBORG O.L. (1980): Isolation, fusion and culture of *Sorghum* and corn protoplasts. *Y. Pflanzenphysiol.,* 96, 269-275.

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

BUITEVELD J., SUO Y., VAN LOOKEREN M.M., CREEMERS-MOLENAAR J. (1998): Production of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L) and onion (*Allium cepa* L). *Theor and Appl Genet* 96, 765-775

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

CARLSON P.S., SMITH H.H., DEARING R.D. (1972): Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc Natl Acad Sci* (USA) 69, 2292-2294.

CHAPEL M., TEISSIE J., ALIBERT G. (1984): Electrofusion of spermine-treated plant protoplasts. *FEBS Lett.,* 173, 331-336

CHASE S.S. (1969): Monoploids and monoploid – derivatives of maize. *Botanical review,* 35, 117-167.

CHO M.S., ZAPATA F.J. (1990): Plant regeneration from isolated microspore of Indica Rice. *Plant Cell Physiol.,* 31, 881-885.

CHU C.C., WANG C.C. SUN C.S., HSÜ C., YIN K.C., CHU C.Y. AND BI F.Y. (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica,* XVIII: 659-668.

CHU C.C., WANG C.S., SUN C.S., HSU C., YIN K.C., BI F.Y., (1975): Establishment of an efficien medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen sources. *Sci. Sin*., 18, 659-688.

COCKING E.C. (1960): A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature,* 187, 962-963.

COE J.R. (1969): A line of maize with high haploid frequency. *The American Naturalist,* 93, (873): 381-382.

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

CREA F., CALDERINI O., NENZ E., CLUSTER P.D., DAMIANI F., ARCIONI S. (1997): Chromosomal and molecular rearrangements in somatic hybrids between tetraploid *Medicago sativa* and diploid *Medicago falcata*. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 1112-1118.

DATTA S.K., DATTA K., POTRYKUS I. (1990): Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both “Indica” and “Japonica” Rice (*Oryza sativa*) *Plant Sci.*, 67, 83-88.

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

DUDITS D., és HESZKY L. (2000): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Második, átdolgozott, bővített kiadás. Agroinform Kiadó, Budapest, 2000.

DUDITS D., FEJÉR O., HADLACZKY GY., KONCZ CS., LÁZÁR G.B., HORVÁTH G. (1980): Intergenetic gene transfer mediated by plant protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, 179, 283-288.

DUDITS D., HADLACZKY GY., BAJSZÁR G.Y., KONCZ CS., LÁZÁR G. (1979): Plant regeneration from intergeneric cell hybrid. *Plant Sci, Lett.*, 15, 101-112.

DUDITS D., HADLACZKY GY., LÉVI E., FEJÉR O., HAYDU ZS., LÁZÁR G. (1977): Somatic hybridization of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.*, 51, 127-132.

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.

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

GENOVESI A.D., YINGLING R.A. (1990): Isolated microspore culture of Zea mays L. Abstr. VIIth Int. Congr. Plant tissue and cell culture IAPTC, Amsterdam, A7-19 p. 196.

GENOVESI A.D., YINGLING R.A. (1994): Isolated microspore and anther culture of corn. United States Patent, No 5 322 789.

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

GIBSON R.W., JONES M.G.K., FISH N. (1988): Resistance to potato leaf roll virus and potato Y virus in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.*, 76, 113-117.

GLEBA Y., SYTNIK K.M. (1984): Protoplast fusion. Springer, Berlin, 203.

GLEBA Y.Y., HOFFMANN F. (1978): Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*, No evidence for specific chromosome elimination. *Mol. Gen. Genet.*, 165, 257-264.

GROSSER J.W., GMITTER F.G., CHANDLER J.L. (1988): Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species, *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.*, 75, 394-401.

GU M.G., ZHANG X.Q., CAO,Z.Y., GUO C.Y. (1983): Totipotency and cytogenetic stability in subcultures of maize pollen callus. In: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement.* Science Press pp. 105-116.

GUHA S., MAHESWARI S.C., (1964): In vitro production of embryos from anthers of Datura. *Nature* 204, 497.

GUO W.W., DENG X.X. (1998): Somatic hybrid plantlets regeneration between *Citrus* and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. *Plant Cell Rep.,* 18, 297-300.

HANSEN L.N., EARLE E. D. (1995): Transfer of resistance to *Xantomonas campestris* pv. *campestris* into *Brassica oleraceae* L. by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.,* 91, 1293-1085.

HANSEN L.N., EARLE E. D. (1997): Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk) Sacc. *Theor. Appl. Genet.,* 94, 1078-1300.

HE D.G., QUYANG J.W., (1984): Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. *Plant Sci. Letters,* 33, 71-79.

HEBERLE-BORS E. (1985): In vitro haploid formation from pollen, a critical review. *Theor. Appl. Genet.,* 71, 361-374.

HESLOP-HARRISON J.S., BENNETT M.D. (1990): Nuclear architecture in plants. *Trends Genet.,* 6, 401-405.

HESZKY L., MESCH J., (1976): Anther culture investigation in cereal gene bank collection. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung,* 77, 187-197.

HESZKY L.E., 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 f*orestry. Vol. 6. Rice. 619-641. Springer Verlag, Berlin- Heidelberg- NewYork.

HESZKY L.E., 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.

HU D.F., TANG Y.L., YUAN Z.D., WANG J. (1988): The new strain “764” of spring wheat by pollen haploid technique from anther culture. Genetic Manipulation in *Crop Newsletter* 4, 70-85.

ICHIKAWA H., TANNO-SUENAGA L., IMAMURA J. (1987): Selection of Daucus cybrids based on metabolic complementation between X-irradiated D. capillifolius and iodoacetamid-treated D. carota by somatic cell fusion. *Theor. Appl. Genet.,* 74, 746-752.

INAGAKI M.N., TAHIR M. (1992): Production of haploid wheat throught intergeneric crosses. *Hereditas* 116, 117-120.

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

JAHNE A. LÖRZ H. (1995): Cereal microspore culture. *Plant Science,* 109, 1-12.

JARDINAUD M.F., SOUVRÉ A., BECKERT M., ALIBERT G. (1995): Optimisation of DNA transfer and transient *β*-glucuronodase expression in electroporated maize (Zea mais L.) microspores. *Plant Cell Rep.*, 15, 55-58.

JENSEN C.L., (1974): Chromosome doubling techniques in haploids. In. Kasha, K.J., (Szerk.) *Haploids in higher plants, Advances and potential.* Univ. Of Guelph. 153-190.

JING J.K., XI Z.Y., HU H. (1982): effects of high temperature and physiological condition of donor plants on induction of pollen derived plants in wheat. *Ann. Rep. Inst. Genet. Sin. Beinjin* 67-68).

KAO K.N., MICHAYLUK M.R. (1974): A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta,* 115, 355-367.

KARSAI I., BEDŐ Z. (1998): Relationship between anther culture response and aluminium tolerance of wheat (Triticum aestivum L). *Euphitica,* 100, 249-252.

KELLER E.R., KORZUN L. (1996): Ovary and ovule culture for haploid production. MOHAN JAIN, S., SOPORY, S.K., VEILLEUX, R.E (Szerk.) In, *In vitro haploid production in higher plants.* Vol. 1, 217-235. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/ Boston/ London.

KELLER W.A., HARVEY B.L., KAO K.N., MILLER R.A., GAMBORG O.L. (1973) Determination of the frequency of interspecific protoplast fusion by differential staining. In, Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, 456-463. Paris, CNRS.

KERMICLE J.L. (1969): Androgenesis conditioned by mutation in maize. Science, 166, 1422-1424.

KERTÉSZ Z., KERTÉSZ C., PAUK J., FALUSI J., TÖRJÉK O., KISS E., MÁZIK K., HASSAN S., HESZKY L. (2000): Utilization of the anther culture in wheat breeding and seed production. In: BEDŐ Z., LÁNG L. (Szerk.) *Wheat in a global environment*, Kluwer Acad, Publishers. Dordrecht/ Boston/ London, 527-530.

KHUSH G.S., VIRMANI S.S. (1996) Haploids in plant breeding. Mohan Jain, S., Sopory, S.K., Veilleux, R.E (Szerk.) In, In vitro haploid production in higher plants.. Vol. 1, 11-34. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/ Boston/ London.

KIM H., COI S.U., CHAE M.S., WEILGUS S.M., HELGESON, J.P. (1993): Identification of somatic hybrids produced by protoplast fusion between Solanum commersonii and S. tuberosum haploid. *Korean J Plant Tissue Cult.,* 20,337-344.

KISAKA H., KISAKA M., KANNO A., KAMEYA T. (1997): Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L) and carrot (*Daucus carota* L). *Theor. Appl. Genet.,* 94, 221-226.

KOVÁCS G., BARNABÁS B., (1993): Klasszikus extenzív magyar búzafajták androgenezisének vizsgálata antérakultúrában. *Növénytermelés,* 42, 487-495.

KÖHLER F., WENZEL G., (1985): Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsive factors. *J. Plant Physiol*., 121, 181-191.

KRASNYANSKI S. MENCZEL L. (1995): Production of fertile somatic hybrid plants of sunflower and *Helianthus giganteus* L. by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.*, 14, 232-235.

KU M.G., CHENG W.C., KUO L.C., KUAN Y.L., AN H.P., HUANG C.H. (1978): Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*) In: *Proc. Symp. Plan Tissue Cult.* May 25-30, 1978, Peking. Science Press pp. 35-42

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.

KYOZUKA J., KANEDA T., SHIMAMOTO K. (1989): Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa L)* by cell fusion. *Bio/Technology* 7, 1171-1174.

LAFERRIERE L.T., HELGESON J.P., ALLEN C. (1999): Fertile *Solanum tuberosum+S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 1272-1278.

LAURIE D.A., BENNETT M.D. (1988): The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor. Appl. Genet.*, 76, 393-397.

LELIVELT C.L.C., LEUNISSEN E.H.M., FREDERICS H.J., HELSPER J.P.F.G., KRENS F.A. (1993): Transfer of resistance to beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm) from *Sinapis alba* L. (white mustard) to the *Brassica napus* L. gene pool by means of sexual and somatic hybridization. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 688-696.

LOUZANDA E.S., GROSSER J.W., GMITTER JR., F.G. (1993): Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents, *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. *Plant Cell Rep.*, 12,687-690.

LU W.Z., WU G.N. (1986): Curren development on biotechnology and its application to plant breeding in China. *J.Agric. Sci. China*, 2. Suppl., 1-9.

LUCHETT D.J., DARVEY N.L. (1992): Utilisation of microspore culture in wheat and barley improvement. *Aust. J. Bot.*, 40, 807-828.

MAHESWARI N. (1958): In vitro culture of excised ovules of papaver somniferum L. *Science*, 127, 342.

MAHESWARI N., LAL M. (1961): In vitro culture of excised ovules of papaver somniferum L. *Phytomorphology*, 11, 307-314.

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

MELCHERS G., LABIB G. (1974): Somatic hybridization of plants. Selection of light resistant hybrids of “haploid” light sensitive vareties of tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 135, 277-294.

MIAO S.H. (1980): Effect of different ammonium salts on formation of maize pollen embryoid. *Acta Botanica Sinica*, 22:356-359.

MIAO S.H., KUO C.S., KWEI Y.L., SUN A.T., KU S.Y., LU W.L., WAN Z.Z., CHEN M.L., WU M.K., HANG L. (1978): Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: *Proc. Symp. Plan Tissue Cult.* May 25-30, 1978, Peking. Science Press pp. 23-33.

MIZUHIRO M., ITO K., MII M. (2001) Production and characteriyation of interspecific somatic hybrids between P*rimula malacoides* and *P. obonica. Plant Sci.*,161, 489-496.

MORDHORST A.P., LÖRZ H., (1993): Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *J. Plant Physiol.,* 142, 485-492.

MÓROCZ S. (1997): Kandidátusi tézisek. MTA Könyvtára, Budapest.

MÓROCZ S., DONN G., NÉMETH J., DUDITS D. (1990): An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor. Appl. Genet.,* 80, 721-726.

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

NAGATA, T., TAKEBE, I. (1971): Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta,* (Berl) 99, 12-20.

NAKANO M., HOSHINO Y., MII M. (1996): Intergeneric somatic hybrid plantlets between Dianthus barbatus and Gypsophila paniculata obtained by electrofusion. *Theor. Appl. Genet.,* 92, 170-172.

NEGRUTIU I., DE BROUWER D., WATTS J.W., SIDOROV V.I., DIRKS R., JACOBS M. (1986): Fusion of plant protoplasts, a study using auxotrophic mutants of Nicotiana plumbaginifolia Viviani. *Theor. Appl. Genet., 72,* 279-286.

NITSCH C., ANDERSEN S., GODARD M., NEUFFER M.G., SHERIDAN W.F. (1982): Production of haploid plants of Zea mays and Pennysetum through androgenesis. In: Earle E.D., DEMARLYY. (Szerk.) *Variabilities in plants regenerated from tissue culture*. Praeger, New York 69-91.

OLSEN F.L., 1991. Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L). *Hereditas,* 115, 255-266.

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

PAUK J., HANSCH R., SCHWARZ G., NERLICH A., MONOSTORI T., MÉSZÁROS A., JENES B., KERTÉSZ Z., MATUZ J., SCHULZE J., MENDEL, R.R. (1998): Transzgénikus búza előállítása Magyarországon. Növénytermelés, 47, (3), 241-251.

PAUK J., KERTÉSZ Z., CSŐSZ M., MATUZ J. (1995): New winter wheat variety, 'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Res. Comm.*, 23, 251-256.

PESCITELLI S.M., JOHNSON C.D., PETOLINO J.F., (1990a): 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, (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 25pp. 187-200.

PESCITELLI S.M., JOHNSON C.D.,, PETOLINO J.F., (1990b): Isolated microspore culture of maize Abstr VIIth Int Congr Plant tissue and cell culture. IAPTC, Amsterdam, p 189.

PESCITELLI S.M., MITCHELL J.C., JONES A.M., PAREDDY D.R., PETOLINO J.F., (1989): High frequency androgenesis from isolated microspores of maize. *Plant Cell Rep.,* 7,673-676.

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

PETOLINO J.F. 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.

PICKARD E., DE BUYSER J. (1973): Obtention des plamted haploides de Triticum aestivum L. a pertir de cultures d'antheres *in vitro CR Acedemie des Science,s, Paris,* 277, 1463-1466.

POLGÁR ZS., DUDITS D., HORVÁTH S. (1996): Burgonya + Solanum brevidens (Phil.) szomatikus hibridek előállítása, jellemzése és nemesítési értékének meghatározása. *Növénytermelés* 45, (1), 1-11.

POLGÁR ZS., PREISZNER J., DUDITS D., FEHÉR A. (1993): Vigorous growth of fusion products allows highly efficient selection of interspecific potato somatic hybrids: molecular proofs. *Plant. Cell Rep.* 12, 399-402.

POTYONDY L., HESZKY L. (1992): Gynogenic haploids produced in ovule cultures of male sterile, fertile, mono-and multigerm sugar beet (Beta vulgaris L). *Acta Agronomica,* 41, 125-130.

POWER J.B., FREARSON E.M., HAYWARD C., GEORGE D., EVANSP.K., BERRY S.F., COCKING E.C. (1976) Somatic hybridisation of Petunia hybrida and P. parodii. *Nature,* 263, 500-502.

PREISZNER J., FEHÉR A., VEISZ O., SUTKA J., DUDITS D. (1991): Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hibrids between potato (Solanun tuberosum L.) and S. brevidens. *Phil. Euphytica*, 57, 37-49.

PRIOLI L.M., SÖNDALL M.R. (1989): Plant regeneration and recoveryof fertile maize plants from protoplasts of maize (Zea mays L). *Bio/Technol.,* 7, 589-594.

PUOLIMATKA M., LAINE S., PAUK J. (1996). Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. *Cereal Research Comm.,* 24, 393-400.

PUOLIMATKA M., PAUK J. (2000). Effect of induction duration and medium composition on plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L) anther culture. *J. Plant Physiol*., Vol. 156, 197-203.

QUYANG Y.W., HE D.G., FENG G.H., JIA S.E. (1987): the response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther donor plants. *Plant Sci.,* 49, 145-148.

QUYANG Y.W., HU C.C., CHUANG C.C., TSENG C.C. (1973): Induction of pollen plants from anthers of Triticum aestivum L. cultured *in vitro*. *Sci. Sin.,* 16, 79-95.

RAMBAUD C., DUBOIS J., VASSEUR J. (1993): Male sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.,* 87, 347-352.

READER S.M., ABBO S., PURDIE K.A., KING I.P., MILLER T.E. (1994): Direct labelling of plant chromosomes by rapid in situ hybridization. *Trends In Genet.,* (August): Vol, 10 No, 8.

RHODES C.A., LOWE K.S., RUBY K.L. (1988): Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Bio/Technol.,* 6, 56-60.

SACHAR R.C., KAPOOR R. (1958): Influence of kinetin and gibberellic acid on the test tube seeds of *Cooperia Pendunculata* Herb. *Naturwissenschaften,* 45, 552-553.

SACHAR R.C., KAPOOR R. (1959): In vitro culture of ovules *Zephyrantes*. *Phytomorphology,* 9, 147-156.

SÁGI L., BARNABÁS B. (1989): Evidence for cytoplasmic control of in vitro microspore embriogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L). *Theor. Appl. Genet.,* 78, 867-872.

SALHANI N., VIENKEN J., ZIMMERMANN U., WARD M., DAVEY M.R, CLOTHIER R.H., BALLS M., COCKING E.C., LUCY J.A. (1985): Haemoglobin synthesis and cell wall regeneration by electric field induced interkingdom heterokaryons. *Protoplasma,* 125, 30-35.

SAMOYLOV V.M., IZHAR S., SINK K.C. (1996): Donor chromosome elimination and organelle composition of asymmetric hybrid plants between an interspecific tomato hybrid and eggplant. *Theor. Appl. Genet.,* 93, 268-274.

SAN L.H., DEMARLY Y. (1984): Gynogenesis in vitro and biometric studies of doubled haploids obtained by three techniques in Hordeum vulgare L. In, LANGE, W., ZEVEN A.C., HOGEN BOOM N.G. (Szerk.): *Efficiency in plant breeding.* Proc. 10th. Congr. EUCARPIA, Wageningen, June 19-24. 1983, p. 347.

SARHAN F., CESAR D. (1988): High yield isolation of mesophyll protoplats from wheat, barley and rye. *Physiol Plantarum,* 72, 337-342.

SCHOENMAKERS H.C.H., VAN DER MEULEN-MUISERS J.J.M., KOORNEEF M. (1994): asymmetric fusion between protoplasts of tomato (Lycopersicon esculentum Mill) and gamma irradiated protoplasts of potato (Solanum tuberosum L): the effects of gamma irradiation. *Mol. Gen. Genet.,* 242, 313-320.

SHILITO R.D., CARSWELLG.K., JOHNSON C.M., DIMAIO J.J., HARMS, C.T. (1989) Regeneration of fertile plants from protoplasts of of elite inbred maize. *Bio/Technol,* 7, 581-587.

SJÖDIN C., GLIMELIUS K. (1989): Transfer of resistance against *Phoma lingam* to *Brassica napus* by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection. *Theor. Appl. Genet.,* 78, 513-520.

SWANSON E.B., COUMANS M.P., WU S.C., BARSBY T.L., BEVERSDORF W.D., (1987): Efficient isolation of microspores and the production of microspore derived embryos from Brassica napus. *Plant Cell Rep.,* 6,94-97.

SZABADOS L., DUDITS D. (1980): Fusion between interphase and mitotic plant protoplasts. Induction of premature condensation. *Exp Cell Res.,* 127, 442-446.

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

SZARKA B., GÖNTÉR I., LÁNGNÉ M. M., MÓROCZ S., DUDITS,D. (2002): Mixing of maize and wheat genomic DNA by somatic hybridization in regenerated sterile maize plants. *Theor and Appl. Genet.* közlésre elfogadva (TAGB970).

TERADA R., KYOZUKA Y., NISHIBAYASHI S., SHIMAMOTO K. (1987) Hybrids of rice (*Oryza sativa* L) and wild barnyard grass (*Echinochloa oryzicola* Vashing). Mol. Gen. Genet., 210, 39-43.

TERADA R., YAMASHITA Y., NISHIBAYASHI S., SHIMAMOTO K. (1987): Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*, selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Theor. Appl. Genet.,* 73, 379-384.

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

TORIYAMA K., HINATA K., KAMEYA T. (1987): Production of somatic hybrid plant "Brassicamoricandia" through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Sci.,* 48, 123-128.

TULECKE, W. (1964): A haploid tissue from the female gametophyte of *Ginko biloba. Nature,* 203, 94-95.

UCHIMAYA H. MURASHIGE T. (1974): Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.,* 54, 936-944.

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

WALLIN A., GLIMELIUS K., ERIKSSON T. (1974): The induction of aggregation and fusion of Daucus carota protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.,* 74, 64-80.

WENZEL G., FREI U., JAHOOR A., GRANER A., FORUGHI-WEHR B. (1994): Haploids- an integral part of applied and basic research. In Terzi M et al., (Ed) *Current Issues in Plant Molecular*

and Cellular Biology, Proceedings of the VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Florence, Italy.

ZHENG J., QUYANG J. (1980): The early androgenesis in vitro wheat anthers under ordinary and low temperature. *Acta Genet. Sci.*, 7, 165-175.

ZIAUDDIN A., SIMION E., KASHA K.J. (1990): Improved plant regeneration from shed microspore culture of barley (Hordeum vulgare L) cv. Igri. *Plant Cell Rep.*, 9, 69- 72.

ZIMMERMANN U., SCHEURICH P. (1981): Hihg frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta*, 151, 26-32.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Mórocz Sándor és Dr. Dudits Dénes témavezetőknek a lehetőséget és szakmai segítséget, hogy a dolgozatban bemutatott témákkal foglalkozhattam, Dr. Heszky László tanszékvezetőnek a “Növénygenetika,- biotechnológia és növénynemesítés” doktori iskolában való részvétel lehetőségét.

Köszönettel tartozom Göntér Ildikónak az in situ hibridizációhoz, Lajtosné Vince Rozáliának és Becsei Magdolnának a kromoszóma- preparáláshoz, Dévényi Károlynénak a statisztikai értékeléshez és Búza Lajosnénak az angol szövegek ellenőrzéséhez nyújtott segítségükért.

Köszönetet mondok a Gabonatermesztési Kutató Kht. Kukorica Nemesítési Igazgatósága munkatársainak, elsősorban Dr. Szél Sándor és Dr. Kálmán Lászlónak a szakmai lehetőségért, Dr. Lángné Molnár Mártának (MTA Mezőgazdasági Kutató Intézete, Martonvásár), értékes tanácsaiért és hogy lehetőséget biztosított az in situ hibridizációs vizsgálatokra, és Dr. Mark De Loose-nak (Rijksstation voor Plantenveredeling Belgium - VLAHON Project) a RAPD módszer ejsajátításához nyújtott sokrétű segítségért.

Dr. Sági Ferencnek, Dr. Pauk Jánosnak, Dr. Purnhauser Lászlónak és Dr. Bartók Tibornak köszönöm értékes, önzetlen szakmai segítségüket.

Az Országos Tudomány- és Kutatásfejlesztési Alap támogatta a szomatikus hibridizációs (OTKA 488), és a mikrospóra kísérleteket (OTKA T17139), valamint utazási ségítséget is nyújtott (OTKA 2046). Az "MHB Magyar Tudományért" Alapítvány a PhD képzéséhez nyújtott támogatást.