SZENT ISTVÁN EGYETEM

AZ *IN VITRO* ANDROGENEZIS INDUKCIÓJA BÚZÁBAN (*TRITICUM AESTIVUM* L.), TRITIKÁLÉBAN (X *TRITICOSECALE* WITTMACK), FŰSZERPAPRIKÁBAN (*CAPSICUM ANNUUM* L.) ÉS AZ EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSA A NEMESÍTÉSBEN

Doktori értekezés

LANTOS CSABA

Gödöllő
2009

Doktori iskola:	Növénytudományi Doktori Iskola
Vezetője:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja igazgató, egyetemi tanár, SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Tudományága:	Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
Program:	Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel
Programvezető:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja igazgató, egyetemi tanár, SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Témavezető:	Dr. Pauk János tudományos tanácsadó, az MTA doktora

....……

Dr. Heszky László
programvezető

.....……

Dr. Pauk János
témavezető

……

Dr. Heszky László
iskolavezető

TARTALOMJEGYZÉK

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK 6
1. BEVEZETÉS 7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9
2. 1. A haploid kutatás rövid történeti áttekintése 9
2. 1. 1. A búza portok- és izolált mikrospóra tenyésztésének történeti áttekintése 10
2. 1. 2. Az androgenezis indukciójának történeti áttekintése tritikálében 12
2. 1. 3. A paprika androgenezis indukciójának történeti áttekintése 12
2. 2. A mikrospórák citológiai és molekuláris változásai az androgenezis indukciója során 13
2. 3. Az androgenezis indukcióját és hatékonyságát befolyásoló tényezők 16
2. 3. 1. Az androgenezist befolyásoló tényezők búza és tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben 17
2. 3. 1. 1. A genotípus hatása búza és tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben 17
2. 3. 1. 2. A donor növények felnevelése és a mikrospórák fejlettségi állapota 18
2. 3. 1. 3. Különböző stresszek szerepe az androgenezis indukciójában 19
2. 3. 1. 4. A mikrospórák izolálása és a sűrűség hatása a mikrospórák tenyésztésére 20
2. 3. 1. 5. A tenyésztési körülmények hatása 22
2. 3. 1. 6. A dajkatenyésztés szerepe a búza és tritikálé izolált mikrospóra tenyésztésben 23
2. 3. 1. 7. Növényregenerálás 25
2. 3. 1. 8. A ploidia fok vizsgálata és a kromoszóma duplikáció 26
2. 3. 2. Az in vitro androgenezist befolyásoló tényezők paprika portok- és izolált mikrospóra tenyészetben 27
2. 3. 2. 1. Genotípus hatás 28
2. 3. 2. 2. A donor növények nevelése és a mikrospórák fejlettségi állapota 28
2. 3. 2. 3. A stressz szerepe a paprika androgenezis indukciójában 29
2. 3. 2. 4. A paprika mikrospórák izolálása és a tenyésztési sűrűség 29
2. 3. 2. 5. A tenyésztési körülmények hatása 29
2. 3. 2. 6. Növényregenerálás 30
2. 3. 2. 7. A ploidia fok vizsgálata és a kromoszóma duplikáció 31
2. 4. Az androgenezis felhasználása a nemesítési és kutatási módszerekben 31
2. 4. 1. A megkettőzött haploidok szerepe a nemesítésben 31
2. 4. 2. A haploid módszer jelentősége a térképezési populációk létrehozásában 32

2. 4. 3. In vitro szelekció 33
2. 4. 4. Haploidia és genetikai transzformáció 33
2. 4. 5 . Haploidia és indukált mutáció 34
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 35
3. 1. A kísérletek növényanyaga 35
3. 2. A növényi alapanyag előállításának körülményei 35
3. 3. A növényi alapanyagok begyűjtése 36
3. 4. A donor portokok előkezelése 36
3. 5. A mikrospórák izolálása előkezelt portokokból 37
3. 6. Az izolált mikrospórák tenyésztése 38
3. 7. Növényregenerálás 38
3. 7. 1. A búza és tritikálé növénykék regenerálása 40
3. 7. 2. A fűszerpaprika növények regenerálása 40
3. 8. A ploidia fok meghatározása 40
3. 9. A kromoszóma duplikáció paprikában 42
3. 10. Citológiai és szövettani vizsgálatok 42
3. 11. A tritikálé DH törzsek variabilitásának vizsgálata 42
3. 12. Statisztikai analízis 43
4. EREDMÉNYEK 45
4. 1. Búza izolált mikrospóra tenyésztés 45
4. 1. 1. Búza izolált mikrospóráinak tenyésztése 45
4. 1. 2. Az alaptápoldat hatása a búza mikrospórák tenyésztésére 47
4. 1. 3. Izolált búza mikrospórák tenyésztése hazai búzafajták felhasználásával 48
4. 2. A tritikálé izolált mikrospórák tenyésztése 50
4. 2. 1. Az ovárium dajkatenyésztés hatása tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben 50
4. 2. 2. A tritikálé DH törzsek variabilitásának vizsgálata 53
4. 2. 2. 1. A DH törzsek növénymagasságának összehasonlítása 54
4. 2. 2. 2. A tritikálé DH törzsek kalászhosszának statisztikai elemzése 55
4. 2. 2. 3. Az ezerszemtömeg összehasonlítása tritikálé DH törzsek között 56
4. 2. 2. 4. A tritikálé DH törzsek szemkeménységének vizsgálata 57
4. 2. 2. 5. A fehérjetartalom statisztikai vizsgálata tritikálé DH törzseken 58
4. 2. 2. 6. A tritikálé DH törzsek hamutartalmának összehasonlító vizsgálata 59
4. 3. A fűszerpaprika izolált mikrospóra tenyésztése 60
4. 3. 1. A mikrospórák fejlettségi állapotának hatása izolált mikrospóra tenyészetben 60
4. 3. 2. A különböző fajú ováriumok hatása fűszerpaprika fajták androgenezisére izolált mikrospóra tenyészetben 63

4. 3. 3. Az exogén hormonok hatása az embrioidok számára izolált mikrospóra tenyészetben 65
4. 3. 4. A mikrospóra eredetű embrioidok szövettani tanulmányozása és a fűszerpaprika növények regenerálása 66
5. MEGVITATÁS (KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK) 71
5. 1. Az androgenezis indukciójának értékelése 71
5. 1. 1. Búza izolált mikrospórák tenyésztése 71
5. 1. 2. Tritikálé izolált mikrospórák tenyésztése 73
5. 1. 3. Paprika mikrospóra tenyésztés 75
5.2. Az androgenezis indukciója a három vizsgált fajban izolált mikrospóra tenyészetében 79
5. 3. Az androgenezis további vizsgálatai és fejlesztési irányai mikrospóra tenyészetben (javaslatok) 81
5. 4. Új tudományos eredmények 83
6. ÖSSZEFOGLALÁS 85
7. SUMMARY 87
IRODALOMJEGYZÉK 89
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 108

Alkalmazott rövidítések:

2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid),	2,4-Diklórfenoxi-ecetsav
ABA (Abscisic acid)	Abszcizinsav
BAP (6-Benzylaminopurine)	6-Benzil-amino-purin
DH (Doubled Haploid)	kettőzött haploid
EcMt (Early cysteine-labeled Metallothionein)	korai cisztein jelölt metallotionein
FDA (Fluorescein diacetate)	Fluoreszcein-diacetát
FSOC (Foreign Species Ovary Co-culture),	idegen fajú dajkatenyésztés
GA_3 (Gibberellic acid)	Gibberellinsav
HSP (heat shock protein)	hősokk fehérje
IAA (Indole-3-acetic acid)	Indol-ecetsav
MAS (Marker Assisted Selection)	marker támogatta szelekció
NAA (1-Naphthylacetic acid)	Naftil-ecetsav
OVCM (Ovary Conditioned Media)	ováriummal kondicionált tápoldat
PAA (Phenylacetic acid),	Fenil-ecetsav
QTL (Quantitative Trait Locus)	mennyiségi tulajdonság lókusza

Hivatkozott tápközegek és referenciáik:

190-2	Zhuang és Jia (1983)
A2	Touraev és mtsai (1996b)
AT3	Touraev és Heberle-Bors (1999)
CHB	Chu és mtsai (1990)
CP	Dumas de Vaulx és mtsai (1981)
GEM	Eudes és Amundsen (2003)
MS	Murashige és Skoog (1962)
NLN	Coventry és mtsai (1988)
NPB99	Zheng és mtsai (2001)
P4	Ouyang és mtsai (1983)
R1	Dumas de Vaulx és mtsai (1981)
W14	Ouyang és mtsai (1989)

1. BEVEZETÉS

A természetben a nyitvatermő és zárvatermő növények haploid fázisa meglehetősen rövid időszak, a meiózist követően kezdődik és a megtermékenyítéssel ér véget. Ez az a rövid időtartam, amely alatt a haploid sejtek osztódása és továbbfejlődése *in vivo* vagy *in vitro* körülmények között indukálható, és belőlük haploid illetve kettőzött haploid vagy másnéven doubled haploid (DH) növény állítható elő. DH növényeknek azokat a növényeket nevezzük, amelyek egy haploid (n) genomból származó kromoszóma készlete spontán vagy indukált módon megduplázódott.

A jelenség nemcsak a kutatók, hanem a nemesítők figyelmét is felkeltette, így a haploid kutatás története során számos módszert fejlesztettek ki a DH növények előállítására. Az *in vivo* körülmények között elvégezhető marker módszer vagy ikercsírás módszer alkalmazásakor csak kis hatékonysággal lehet DH növényeket létrehozni. A távoli fajkeresztezésen alapuló technikák között jól ismert a *bulbosum* és *phureja* technika, búza esetében a kukorica pollennel történő termékenyítés terjedt el. *In vitro* körülmények között androgenikus DH növényeket lehet előállítani portoktenyésztéssel és izolált mikrospóra tenyésztéssel. Az *in vitro* technikák közé tartozik még a ginogenezisen alapuló ováriumtenyésztést, ovulum- és petesejttenyésztést is.

Hazánkban és az Európai Unióban is a fajtákkal és hibridekkel szemben támasztott egyik alapkövetelmény a kiegyenlítettség, ami a DH növényekből előállított vonalak sajátossága. Csaknem minden gazdaságilag fontos növényfaj esetében rendelkezésre áll olyan haploid eljárás, amelyet a nemesítésben már alkalmaztak, azonban a rutinszerűen alkalmazott haploid módszerek száma már jóval kevesebb. A hatékony DH módszerek nagy előnye, hogy általuk a nemesítési program bármely szakaszában egy generáció alatt lehet homozigóta törzseket/vonalakat előállítani. Ezeket a módszereket a klasszikus nemesítésbe bevonva lerövidíthető egy fajta vagy hibrid szülőpartner nemesítési ideje. Hagyományos módon ugyanis a genetikailag homozigóta alapanyagok előállítása jóval hosszabb időt vesz igénybe.

A kutatók figyelme nemcsak a mikrospóra embriogenezis és ginogenezis folyamatának leírására terjedt ki, hanem az *in vitro* technikák nyújtotta lehetőségek kiaknázására is törekedtek. Az egy generáció alatt előállított nagyszámú DH populáció kiváló alapot kínál a genetikai térképezés alapjainak létrehozásához, mennyiségi tulajdonságok lókuszainak (QTL) kereséséhez. Számos publikációt találunk a haploid módszerek, az *in vitro* szelekció, az indukált mutáció, illetve a genetikai transzformáció

kombinálására. Természetesen a választott növényfajtól és az alkalmazott módszerektől függően eltérő eredményeket értek el a kutatók.

A nemesítés mindig a leghatékonyabb és legköltségtakarékosabb módszereket választotta a gyakorlati felhasználásra. A portoktenyészetben és ovárium tenyészetben az ivarsejteken kívűl más sejtekből is regenerálódhatnak növények, azonban a szomatikus szövetektől mentes tenyészetekben a regeneránsok bizonyosan ivarsejt eredetűek. Így a kutatás iránya az izolált sejttenyésztési rendszerek (petesejttenyésztés, mikrospóra tenyésztés) kidolgozása felé fordult. Kísérleteinkben célul tűztük ki három faj (búza, tritikálé és fűszerpaprika) mikrospóra tenyésztésének módszertani fejlesztését és lépéseket tettünk a nemesítési felhasználás irányába, az alábbi **célkitűzések** szerint:

I. Termesztési szempontból fontos növényfajok – búza, tritikálé és fűszerpaprika – *in vitro* androgenezis indukciójának fejlesztése, hogy az érintett fajok nemesítése és kutatása számára új módszereket és alapanyagokat hozzunk létre.

II. A búza izolált mikrospóra tenyésztés továbbfejlesztése az alaptápoldatok és a genotípus hatását elemző kísérletekben.

III. A tritikálé izolált mikrospóra tenyésztés módszertani kidolgozása a dajkatenyésztés és a genotípushatás elemzésével, és az előállított DH törzsek nemesítésbe történő integrálása.

IV. A fűszerpaprika mikrospóra embriogenezis indukciója izolált mikrospóra tenyészetben. A mikrospóra fejlettségi állapot, a dajkatenyésztés, az exogén hormonok és a genotípus hatása az androgenezis folyamatára.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. A haploid kutatás rövid történeti áttekintése

A haploidia története a múlt század elejére nyúlik vissza. Blakeslee és mtsai (1922) *Datura stramonium* L. növények között figyelték meg és írták le az első természetben előforduló haploid növényt. Az első *in vitro* mikrospóra eredetű növényeket *Datura innoxia* L. portoktenyészetéből állították elő (Guha és Maheswary 1964). Azóta több mint kétszázötven növényfaj esetében sikerült *in vitro* körülmények között indukált haploidokat előállítani (Maluszynski és mtsai 2003). Természetesen nem mindegyik faj esetében válhattak széles körben alkalmazhatóvá a módszerek, de szép számmal találunk példát a nemesítési és kutatási alkalmazásukra (Thomas és mtsai 2003, Tuvesson és mtsai 2007, Werner és mtsai 2007).

A célzott sejt(ek) típusa alapján éretlen pollenből (portoktenyésztés, úsztatott portoktenyésztés és izolált mikrospóra tenyésztés) és petesejtből (ováriumtenyésztés, ovulumtenyésztés, petesejttenyésztés és távoli fajkeresztezés) lehet DH növényeket előállítani.

Az *in vivo* és *in vitro* technikákat párhuzamosan fejlesztették a kutatók. Egyes fajokban (pl. kukorica) ma is nagy figyelmet fordítanak az *in vivo* módszerek fejlesztésére és gyakorlati alkalmazására (Röber és mtsai 2005). Az *in vivo* haploid indukció első sikereit követően a távoli fajkeresztezés (kukorica pollennel történő megtermékenyítés) módszerét alkalmazza a búzanemesítés (Laurie és Bennett 1988, Verma és mtsai 1999, Thomas és mtsai 2003). A rendszer hatékonyságát nemcsak a búza genotípusa, hanem a pollenadó kukorica genotípusa is befolyásolja (Verma és mtsai 1999). Tritikálé esetében azonban még nem vált e módszer a gyakorlat részévé. A ginogenikus haploidok előállítása lehetőséget teremt a ginogenezis sejtszintű vizsgálatára, *in vitro* termékenyítés kivitelezésére vagy mikroinjektálással transzgénikus DH növények előállítására (Kranz és Lörz 1993, Holm és mtsai 1994, Kovács és mtsai 1995, Leduc és mtsai 1996, Holm és mtsai 2000, Kumlehn és mtsai 2001).

Az androgenikus haploid technikákat alkalmazzák még az androgenezis (másnéven mikrospóra embriogenezis) tanulmányozására, térképezési populációk elkészítésére, genetikai transzformációra, *in vitro* szelekcióra vagy mutáns szelekcióra is. Nemesítési programokban önállóan vagy marker támogatta szelekcióval (MAS) kombinálva is szerepelnek. A búza portoktenyésztés számos hazai és külföldi intézet nemesítési programjába is beépült (De Buyser és mtsai 1987, Pauk és mtsai 1995). A tritikálé DH növény előállítás hatékonysága elmarad a búzához képest, azonban a nemesítési hasznosítására már vannak példák (Thomas és mtsai 2003). Paprika esetében a

portoktenyésztés módszerét alkalmazza a nemesítés, és a nemesítési igény szorgalmazza a DH növények előállítási módszereinek fejlesztését.

A portoktenyésztés módszerének gyakorlati alkalmazására számos példát találunk a vizsgált fajok közül búzában és paprikában. A módszer azonban munkaigényes és genotípusfüggőséget is megfigyeltek (Agache és mtsai 1989, Mitykó és mtsai 1995). Az androgenezis indukciója a portok falán belül kezdődik, így a folyamat első lépései csak nehezen tanulmányozhatóak, és a portok falából is regenerálódhatnak növények, amelyek nem tekinthetőek genetikailag homozigóta DH növénynek.

A mikrospóra tenyésztés egy alternatív lehetőséget kínál az androgenikus DH növények előállítására. Modell növényei (árpa, dohány és repce) között a negyedik helyen a búza szerepel. A módszer fejlesztését követően a modell növények közül árpában és repcében hatékonyabb módszerré vált az izolált mikrospóra tenyésztés, mint a portoktenyésztés.

Előnyei között lehet megemlíteni, szemben a portoktenyésztéssel:

1. Izolált mikrospóra tenyészetben szomatikus sejtek és szövetek nélkül indukálódnak a mikrospórák, így nem kell más sejtek és szövetek indukciójával számolni (Oleszczuk és mtsai 2004).

2. A mikrospóra tenyésztés (mikrospóra embriogenezis) folyamata könnyebben tanulmányozható izolált sejtek tenyészetében, mint portoktenyészetben (Indrianto és mtsai 2001).

3. Az izolált mikrospóra tenyészetben végzett sejtszintű megfigyelések segítik a sejttenyésztési körülmények további fejlesztését (Kim és mtsai 2008).

2. 1. 1. A búza portok- és izolált mikrospóra tenyésztésének történeti áttekintése

Az első búza portoktenyésztési eredmények 1973-ban születtek (Ouyang és mtsai 1973, Picard és de Buyser 1973, Wang és mtsai 1973a). Majdnem másfél évtizeddel később számoltak be az első portoktenyészet eredetű fajtáról (De Buyser 1987). A módszert ma is alkalmazza mind a nemesítés mind a kutatás. Térképezési populációk készítésére és *in vitro* szelekcióra egyaránt felhasználták a búza portoktenyésztést (Fadel és Wenzel 1993, Darkó és mtsai 2004, Bakos és mtsai 2008, Cuthbert és mtsai 2008, Szabó-Hevér és mtsai 2008, Zhang és mtsai 2008).

Portoktenyészetben több olyan tényezőt vizsgáltak, amelynek fontosságát később izolált mikrospóra tenyészetben is igazolták. A mikrospórák

fejlettségi állapotának hatását tanulmányozták az androgenezis indukciójában (He és Ouyang 1984), a hideg előkezelés jelentőségét bizonyították (Lazar és mtsai 1984) és a genetikai háttér szerepét igazolták (Szakács és mtsai 1988). A maltóz (Finnie és mtsai 1989) és a Ficoll® (Zhou és Konzak 1989) bevezetésével sikerült a portoktenyésztés módszerét a gyakorlati felhasználás szintjére emelni.

A mikrospóra tenyésztés fent említett előnyei miatt azonban a kutatók figyelme az izolált mikrospóra tenyésztés módszerének fejlesztésére is kiterjedt. Az első búza mikrospóra tenyésztési eredményeket Datta és Wenzel (1987) publikálta. A szerzők úsztatott portokokból kiszóródott mikrospórákat tenyésztettek folyékony tápközegen. Így az első igazi izolált mikrospóra tenyészet eredetű növények előállításáról szóló publikációkat két másik kutatócsoport munkájához köthetjük (Mejza és mtsai 1993, Tuvesson és Öhlund 1993).

A legtöbb publikált eredmény esetében stresszort alkalmaztak az androgenezis indukciójához. A fizikai (hideg kezelés, hősokk), élettani (éheztetés) vagy kémiai stresszorok önmagukban és kombinálva is alkalmazhatóak a mikrospóra embriogenezis indukciójára mikrospóra tenyészetben (Hu és Kasha 1999, Liu és mtsai 2002b, Soriano és mtsai 2007).

Mejza és mtsai (1993) alkalmazták először a búza ovárium dajkatenyésztést búza izolált mikrospóra tenyészetben. A dajkatenyésztés jelentősen emelte a tenyészetekben az embrioidok számát és javította a növényregenerációt. Eredményeiket számos kutatócsoport megerősítette. Dajkatenyészetben tanulmányozták a dajkák (ovárium, pelyva, portok) típusát (Puolimatka és Pauk 1999), a dajkaként használt ovárium faját (Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Konzak és mtsai 2000, Liu és mtsai 2002b), genotípusát (Zheng és mtsai 2001, Liu és mtsai 2002b), az együtt tenyésztés idejét (Puolimatka és Pauk 1999) és az ováriummal kondicionált tápoldat (OVCM) hatását (Zheng és mtsai 2002). Számos publikált adat gyűlt össze a dajkatenyésztésről, azonban keveset tudunk az ováriumok valódi kémiai és/vagy fizikai hatásáról. Letarte és mtsai (2006) arabinogalaktánokkal (Larcoll) és arabinogalaktán fehérjékkel (gumiarábikum) részlegesen tudták helyettesíteni az ovárium hatását. Larcoll és/vagy gumiarábikum alkalmazásával növelték a tenyészetekben az embrioidok számát és javították a növényregeneráció hatékonyságát, de az ovárium dajkatenyésztés hatékonyságát nem lehetett teljes mértékben helyettesíteni (Letarte és mtsai 2006).

Jelentős számban fejlődnek embriók a búza mikrospóra tenyészetekben. Így vált a mikrospóra embriogenezis tanulmányozásának egyik modell növényévé a búza (Indrianto és mtsai 2001). A mikrospóra eredetű struktúrák regeneráló képessége is megfelelő, azonban a gyakorlati felhasználás fő korlátozó tényezője az albínó növények nagy gyakorisága (Liu és mtsai 2002b).

2. 1. 2. Az androgenezis indukciójának történeti áttekintése tritikálében

Az első portoktenyészet eredetű tritikálé növényről két kutatócsoport számolt be 1973-ban (Sun és mtsai 1973, Wang és mtsai 1973b). Azóta számos publikáció született e kutatási területen is, és nagy erőfeszítéseket tettek a módszer fejlesztésére. Néhány DH fajta bizonyítja a portoktenyésztés alkalmazhatóságát a tritikálé nemesítésben is (Thomas és mtsai 2003). A módszer azonban nem vált a nemesítési programok szerves részévé.

A stressz előkezelés, akárcsak búzában, tritikálében is kulcsszerepet játszik a mikrospórák androgenezisének indukciójában (Keller 1991, Immonen és Robinson 2000). A genotípus függőség befolyásolja az androgenezis hatékonyságát (Charmet és Bernard 1984, Balatero és mtsai 1995, Marciniak és mtsai 1998, 2003, Immonen és Robinson 2000). A portoktenyésztés körülményeinek vizsgálatakor a burgonyakivonat jótékony hatását figyelték meg (Schumann és Hoffmann 1989). Az indukciós tápoldat pH-ja és szénforrása befolyásolja az embriók számát a tenyészetekben és a növényregeneráció hatékonyságát (Karsai és mtsai 1994, Karsai és Bedő 1997, Marciniak és mtsai 1998). A portoktenyészet eredetű DH növények aránya indukált rediploidizációval (haploid növények kolchicin kezelése) hatékonyan növelhető (Arzani és Darvey 2001).

Az első izolált mikrospóra tenyészet eredetű tritikálé növényről laboratóriumunk számolt be (Pauk és mtsai 2000). Oleszczuk és mtsai (2004) egy hatékony tenyésztési módszert publikáltak a 'Bogo' tritikálé fajtával. Eudes és Amundsen (2005) a Ficoll® (ozmotikus ágens) alkalmazásával megnövelték az embrioid számot és növényregenerációt tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben, és erős genotípus függőséget mutattak ki. Zur és mtsai (2008) eltérő válaszadó képességű genotípusok izolált mikrospóra tenyészetében tanulmányozták az egyes genotípusok antioxidáns enzimeinek változását és az endogén abszcizinsav (ABA) koncentrációt. A gyenge válaszadó képességű genotípus esetében stressz hatására megemelkedett az endogén ABA koncentráció, ami összefüggésbe hozható a gyengébb válaszadóképességgel (Zur és mtsai 2008). Tritikálé izolált mikrospóra tenyészetekben is a növényregeneráció javítása (genotípus függőség és albinizmus csökkentése) szükséges a rutinszerű alkalmazáshoz.

2. 1. 3. A paprika androgenezis indukciójának történeti áttekintése

Az első paprika portoktenyészet eredetű növényekről szóló eredményeket három különböző kutatócsoport publikálta szinte azonos időben (George és Narayanaswamy 1973, Kuo és mtsai 1973, Wang és mtsai 1973b). Sibi és mtsai (1979) kétlépcsős portoktenyésztési rendszert dolgoztak ki,

amelyet Dumas de Vaulx és mtsai (1981) módosítottak egy rutinszerűen alkalmazható módszerré. Ezt a portoktenyésztési rendszert különböző kutatócsoportok tanulmányozták és továbbfejlesztették az elmúlt húsz évben (Mitykó és mtsai 1995, 1999, Dolcet-Sanjuan és mtsai 1997, Gémes és mtsai 1998, 2006, Bárány és mtsai 2001, 2005, Kim és mtsai 2004), valamint alkalmazták a hazai és külföldi nemesítési programokban (Thomas és mtsai 2003, Gémes és mtsai 2006, Mitykó és Gémes 2006). A paprika portoktenyésztés módszerét nemcsak a nemesítés alkalmazza, hanem genetikai térképezéshez is felhasználták (Sugita és mtsai 2006).

A paprika portoktenyésztés módszerének sikeres alkalmazása ellenére néhány faktor korlátozza a nemesítés igényeinek kielégítését. A portoktenyésztés hatékonysága függ a genotípustól (Mitykó és mtsai 1995), valamint a donor növények felnevelési körülményei és a donor növények kora is befolyásolja a portoktenyésztés hatékonyságát (Kristiansen és Andersen 1993, Buyukalaca és mtsai 2004).

Supena és mtsai (2006a, 2006b) írták le az úsztatott portoktenyésztés, másnéven kiszóródott mikrospórák tenyésztésének módszerét. A paprika portokokat folyékony tápközegen tenyésztették, a mikrospórák androgenezise indukálódott a portokon belül és a belőlük kiszóródott mikrospórákban is. Ugyanezen szerzők megemlítették az izolált mikrospóra tenyésztés módszerének sikeres alkalmazását is, azonban a részletes tenyésztési rendszer leírása nélkül (Supena és mtsai 2006a). Tanulmányozták az első sejtosztódásokat, és izolált mikrospóra eredetű növényeket állítottak elő (0,1 növény/bimbó). Kim és mtsai (2008) publikáltak elsőként részletes izolált mikrospóra tenyésztési protokollt, rendszerüket a ‘Milyang-jare’ genotípussal dolgozták ki. Optimalizálták a mikrospórák sűrűségét (80 000 – 100 000 mikrospóra/ml) és az indukciós tápoldat szénforrását (9% szacharóz). Más genotípusok válaszadó képességét nem ismertették.

2. 2. A mikrospórák citológiai és molekuláris változásai az androgenezis indukciója során

Az izolált növényi mikrospórák gametofitikus fejlődése kisebb vagy nagyobb mértékű stressz hatására törlődik és sporofitikus útra terelődik. Ezt az eseményt az androgenezis indukciójának vagy mikrospóra embriogenezisnek nevezik. A folyamat jól ismert több mint kétszázötven növényfaj esetében, azonban a molekuláris háttere kevésbé feltárt (Maluszynski és mtsai 2003). A mikrospóra embriogenezis citológiai és molekuláris folyamatait főként a modell fajokban (például búzában) tanulmányozták, ahol jól kidolgozott az izolált mikrospóra tenyésztés. Tritikálé és paprika embriogenezis molekuláris hátteréről jóval kevesebb kutatási eredmény áll rendelkezésre.

A vitatható „P-grain” hipotézis szerint nem minden mikrospóra alkalmas az androgenezisre, csak azok, amelyek fejlődése rendellenes volt a portokon belül már *in vivo* körülmények között is (Heberle-Bors 1985). A hipotézis alapján a fajták eltérő mennyiségben tartalmaznak hibásan fejlődött mikrospórákat a portokokon belül, és ez határozza meg a genotípus függőséget (Picard és mtsai 1990). A citológiai tanulmányok azonban nem támasztották alá a hipotézist (Reynolds 1993, Hu és Kasha 1999, Indrianto és mtsai 2001), ezért átértékelésre szorul (Zheng és mtsai 2003).

A stressz indukálta androgenezis folyamata jórészt ismeretlen, azonban az összegyűlt adatok alapján néhány általános következtetés levonható. A stresszkezelt búza mikrospórákon teljes citológiai változást figyeltek meg. A mikrospórák megnagyobbodtak, a citoszkeleton átrendeződött, a vakuólum fragmentálódott, és csillagszerű struktúrát mutattak a mikrospórák. A sejtmag a mikrospóra középső részében helyezkedett el.

A stressz hatására bekövetkező citológiai változások alapján három különböző típusú búza mikrospórát különböztettek meg (Indrianto és mtsai 2001).

1. típus: A mikrospórák kései egysejtmagvas vakuólumos állapotúak, viszonylag nagy vakuólum figyelhető meg. A sejtmag szorosan a mikrospóra fala mellett található, gyakran a csírakapuval szemben (hasonlóan az *in vivo* pollen fejlődéséhez).

2. típus: A mikrospóra fragmentált vakuólummal rendelkezik, a sejtmag a sejt középső részén található.

3. típus: A sejtmag pontosan a mikrospóra közepén található, a vakuólum egyenletesen osztott, a mikrospóra látványa csillagszerű megjelenést mutat.

A három említett típus a válaszadó és nem válaszadó mikrospóráknak nem az elkülönített osztálya, hanem egy fejlődési út egyes lépéseit jelenti. A harmadik típusú mikrospórákból indukálható a leggyorsabban embrió, és ezek regenerálódnak a legnagyobb arányban (Indrianto és mtsai 2001). Az első típusból a legtöbb esetben nem fejlődik embrió, míg a második típus köztes hatékonyságot mutat. A stresszor(ok) megválasztásakor arra kell törekedni, hogy a kezelés a harmadik típusú mikrospórák arányát növelje az izolált mikrospórák között.

A stresszor nemcsak a mikrospórák típusát befolyásolja, hanem az első sejtosztódásokat is (Hu és Kasha 1999). A mikrospórákat egy hétig 0,4 M mannit oldatban (28 ºC) éheztetve, a portokokon belül a mikrospórák többségénél megtörtént az első mitotikus osztódás, amely főként szimmetrikus osztódás volt. Donor hajtások hosszú idejű hideg kezelése (4 ºC, 28 nap) alatt

illetve azt követően szintén megfigyelték az első mitotikus osztódásokat, amelyek minden esetben aszimmetrikusak voltak. Mindkét kezelést követően az osztódó mikrospórákból embriók fejlődtek, amelyekből növényeket regeneráltak. Paprika portoktenyészetben aszimmetrikus és szimmetrikus osztódásokat is megfigyeltek (Testillano és mtsai 2000, Kim és mtsai 2004, Bárány és mtsai 2005), mindkét úton sikerült mikrospóra eredetű embriókat előállítani, amelyekből növényeket regeneráltak. Kim és mtsai (2004) kísérletei során aszimmetrikusan osztódott a mikrospórák többsége, míg mások főként szimmetrikus osztódásokat figyeltek meg (Testillano és mtsai 2000, Bárány és mtsai 2005). Az eltérések valószínűleg a különböző tenyésztési körülményekre vezethetők vissza.

Azon búza mikrospórákban, amelyekben az androgenezis indukálódott, a tenyésztés kezdetén a vakuólum eltűnik, helyét a citoplazma foglalja el, és keményítő felhalmozódás figyelhető meg, főleg a csírakapu közelében. Később a soksejtes struktúra az ellentétes oldalon töri át a mikrospóra falát, mint ahol a keményítő felhalmozódás történt (Indrianto és mtsai 2001).

A mikrospóra eredetű érett embriók morfológiailag sok hasonlóságot mutatnak a zigotikus embriókkal búza, tritikálé és paprika esetén (Zheng 2003, Oleszczuk és mtsai 2004, Bárány és mtsai 2005). Az osztódó mikrospórák egy része még soksejtes állapotban abortált. A 2 mm-es méretű struktúráknak is csak egy része mutat zigotikus embrióra emlékeztető morfológiát. Egy kalászból indított tenyészetekben nagyszámú struktúra fejlődött, így ez növeli a lehetőségét, hogy a mikrospóra tenyésztés is a nemesítés módszerévé váljon (Zheng 2003).

Számos tanulmány tűzte ki célul, hogy specifikus molekuláris változásokat azonosítson a mikrospórák embriogenezise során. A hősokk fehérjék (HSP) talán a legtöbbet tanulmányozott résztvevői a mikrospóra embriogenezisnek. Néhány órás hőkezelés után a mikrospórákban számos HSP termelődik, a HSP68 és HSP70 megemelkedett szintézisét írták le *Brassica* fajok mikrospóra tenyészetében (Cordewener és mtsai 1995). Kis HSP-k szintézisét mutatták ki dohány mikrospóra tenyészetekben (Zarsky és mtsai 1995). Paprika portoktenyészetben is beszámoltak a HSP70 szintézisről a mikrospóra embriogenezis korai fázisában (Bárány és mtsai 2001). Látható, hogy a HSP-k több faj esetében is jelen vannak a mikrospóra embriogenezis indukciója során, kulcsszerepük azonban vitatható. Repce (*Brassica napus* L.) mikrospóra tenyészetben kémiai kezeléssel (kolchicin) indukálták a mikrospórák embriogenezisét, de a HSP-k megemelkedett szintézise elmaradt (Zhao és mtsai 2003). A HSP-k szerepe elsődlegesen mikrospórák stressztoleranciájával kapcsolatos, közvetett módon azonban az androgenezisre is hathatnak (Seguí-Simarro és Nuez 2008).

A búza mikrospóra embriogenezis markereként írták le a korai cisztein jelölt metallothionein (EcMt) gént. Az EcMt gén az embriogén mikrospórákban, az embriókban és a zigotikus embriókban, valamint ABA

kezelés hatására más szövetekben is kifejeződik (Reynolds és Crawford 1996). Az EcMt gén expresszióját valószínűleg a stressz hatására termelődött ABA váltotta ki a mikrospórák embriogenezise során (Seguí-Simarro és Nuez 2008).

Az elmúlt évek genomikai, transzkriptomikai, proteomikai és metabolomikai kutatásai a haploid kutatás területére is kiterjedtek (Boutilier és mtsai 2005, Maraschin és mtsai 2005, 2006, Munoz-Amatriaín és mtsai 2006, Pauls és mtsai 2006, Hosp és mtsai 2007, Joosen és mtsai 2007, Malik és mtsai 2007, Tsuwamoto és mtsai 2007). Ikercsírás haploid és diploid rizs növények metilációs mintázatában különbségeket mutattak ki, a megfigyelt eltérések feltételezhetően a haploid növények túlélését segítették (Zhang és mtsai 2006). Árpa portoktenyészeteken végzett transzkriptomikai vizsgálatok szerint stressz (4 nap, 25 ºC, 0,7 M mannit tartalmú szilárdított tápközeg) hatására 2673 gén változtatta meg a kifejeződését a mikrospórákban, ami sokoldalú stresszválaszra utal (Munoz-Amatriaín és mtsai 2006, Munoz-Amatriaín és mtsai 2009). Repce mikrospórák androgenezisének indukciója során szintén több ezer gén változtatja meg kifejeződését, jelen ismereteink szerint azonban csak néhány alkalmas markere a mikrospóra embriogenezisnek (Malik és mtsai 2007, Malik és Krochko 2009). Proteomikai vizsgálatok alapján egyes fehérjék mennyisége eltérést mutatott a sporofita és a gametofita fejlődési utat folytató repce mikrospórákban (Cordewener és mtsai 2009). Egyes fehérjék mennyiségi változását a fejlődő mikrospóra eredetű embriókban is kimutatták (Cordewener és mtsai 2000). A proteomikai vizsgálatok nemcsak a fehérje szintézis változására adhatnak választ, hanem a fehérjék stabilitására, posztranszlációs változásaikra és az egyes fehérjék sejten belüli pozíciójára is (Cordewener és mtsai 2009). Remélhetőleg az új kutatási eredmények segítenek tisztázni az egyes gének, fehérjék funkcióját és ok-okozati összefüggését a mikrospóra embriogenezisben.

2. 3. Az androgenezis indukcióját és hatékonyságát befolyásoló tényezők

Az androgenezis folyamatát számos ismert tényező befolyásolja (genotípus, donor növények felnevelése, mikrospórák fejlettségi állapota, stresszor, tenyésztési és regenerálási körülmények). A folyamat komplexitását figyelembe véve nehéz az egyes tényezők hatását külön-külön értékelni. A szakirodalomban jelentős mennyiségű adat áll rendelkezésre az izolált mikrospóra tenyésztésről (főleg búzában), azonban figyelembe kell venni a különböző kutatócsoportok tenyésztési rendszereinek az eltérését.

2. 3. 1. Az androgenezist befolyásoló tényezők búza és tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben

A búza és tritikálé DH növények előállítását a genotípustól kiindulva az *in vitro* tenyésztési körülményekig számos tényező befolyásolja. A jó válaszadó képességű genotípusok kiválasztása megfelelő alapot ad a különböző fizikai és kémiai kezelések teszteléséhez, az *in vitro* tenyésztési körülmények optimalizálásához. Így nem véletlen, hogy a kutatások kiterjedtek a válaszadó képes genotípusok kiválasztására, és a válaszadó képességért felelős gének illetve kromoszóma régiók azonosítására.

2. 3. 1. 1. A genotípus hatása búza és tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben

Búza portok és izolált mikrospóra tenyészetben jelentős különbséget találtak az egyes genotípusok válaszadó képessége között. A kutatók elsősorban jó válaszadó képességű tavaszi búza genotípusokat választottak a haploid előállítási módszerek fejlesztéséhez, így a vernalizációs idő mellőzésével lerövidült a donor növények felnevelésének ideje. Néhány genotípus a búza haploid kutatásban valódi modell genotípussá vált. Az egyes kutatócsoportok néhány jó válaszadó genotípust alkalmaztak izolált mikrospóra tenyésztési rendszerükhöz. A ’Wed 202-16-2’ és ’Svilena’ amerikai (Zheng és mtsai 2001, 2002, Liu és mtsai 2002a, 2002b), amíg a ’Pavon’ és a ’Chris’ genotípusok kanadai és amerikai kutatócsoportok (Mejza és mtsai 1993, Hu és Kasha 1997a, 1997b, 1999, Zheng és mtsai 2001, 2002, Letarte és mtsai 2006) által alkalmazott donor genotípusok. A ’Mahti’ és ’Hja 24201’ genotípus finn eredetű modell genotípus (Puolimatka és mtsai 1996, Puolimatka és Pauk 1999). A mi intézményünk kutatói a szomatikus és androgenikus tenyészetekben is kiváló válaszadó és regeneráló képességű ’CY-45’ tavaszi búza genotípust választották (Felföldi és Purnhauser 1992, Purnhauser és Gyulai 1993, Lantos és mtsai 2005, 2006, Mihály és Pauk 2007, Mihály és mtsai 2009). A fent említett valamennyi genotípus jó válaszadó képességgel rendelkezik, valamennyi alkalmas haploid előállítási rendszer fejlesztésére, azonban fontos, hogy a kidolgozott rendszer alkalmazható legyen a nemesítés szempontjából értékes genotípusok esetében is.

Portoktenyésztési kísérletek alapján írták le, hogy a búza DH növény előállításának három fontos tulajdonsága van: egy kalász portokjaiból indukálható embriók mennyisége, az embriók növényregeneráló képessége, valamint az albínó és zöld növények aránya. Ez a három tulajdonság egymástól függetlenül öröklődik (Agache és mtsai 1988). Az említett tulajdonságok főleg additív kölcsönhatásokon alapulnak (Lazar és mtsai 1984, Deaton és mtsai 1987, Szakács és mtsai 1988), de episztatikus és domináns kölcsönhatást is

tapasztaltak (Agache és mtsai 1988). Elsősorban az additív és a domináns génkölcsönhatások biztosítják annak a lehetőségét, hogy az androgenezisen alapuló módszereket gyenge válaszadó képességű fajták esetében is tudja alkalmazni a növénynemesítés (pl. jó válaszadó képességű keresztezési partner megválasztásával).

A mikrospóra eredetű embriók indukciójáért felelős nagy hatású géneket találtak a 2A és 2D kromoszómán, amíg a 2B, 4A, 5A és 5B kromoszómán kis hatású géneket azonosítottak (Zhang és Li 1984). A regeneráló képességért felelős géneket az 1RS kromoszóma régión azonosítottak (Agache és mtsai 1989). Ez a kromoszómakar a rozs genom transzlokációja révén a Magyarországon termesztett búzák nagy részében is jelen van. A CS-5B kromoszómán lévő gének az albínó növények gyakoriságát befolyásolták (Agache és mtsai 1989).

A nukleáris géneken kívül a citoplazmatikus gének is befolyásolják az androgenezis hatékonyságát. Jelentős különbséget mutattak ki reciprok keresztezett hibrid párok esetén az embriók számában és zöld növényregeneráló képességben (Ekiz és Konzak 1991a, 1991b, Orlov és mtsai 1999).

Tritikálé fajták válaszadó képességét tekintve szignifikáns különbséget tapasztaltak az egyes genotípusok között portoktenyészetben (Hassawi és mtsai 1990, Balatero és mtsai 1995, Marciniak és mtsai 1998, 2003) és izolált mikrospóra tenyészetben (Pauk és mtsai 2000, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008). Tritikálé portoktenyészet eredetű DH törzseken tanulmányozták a válaszadó képesség genetikai hátterét. Az embrió indukciót 30%-ban (6B, 4R) és a növény regenerációt (6B) jelentős mértékben befolyásoló QTL-eket azonosítottak (Gonzalez és mtsai 2005). Az 1B, 1R, 3R, 4R és 7R kromoszómán azonosítottak még a válaszadó képességért felelős QTL-eket (Gonzalez és mtsai 2005).

Az egyes genotípusok válaszadó képessége alapvetően meghatározza a DH növény előállítás hatékonyságát. A válaszadó képességért felelős gének átvitelével is javítható a DH módszerre épülő nemesítési program hatékonysága, de az *in vitro* tenyésztési feltételek fejlesztése előnyösebb megközelítésnek látszik. Egy jól kidolgozott haploid indukciós rendszer szélesebb genetikai háttér esetében is képes jelentős DH növény előállítására, így a módszer nemesítési jelentősége növekedhet.

2. 3. 1. 2. A donor növények felnevelése és a mikrospórák fejlettségi állapota

A donor növények felnevelése a lehetőségektől függően szántóföldi és üvegházi körülmények között történhet. Az üvegházi alapanyag szinte egész évben a kutató rendelkezésére áll, ami folytonos munkalehetőséget biztosít számára. A szántóföldi körülmények között felnevelt jól fejlett hajtások

használata nemcsak a munkaerő kihasználás hatékonyságát növeli, hanem évenként egy „nagy lélegzetű” kísérlet lehetőségét is megteremti. Búza izolált mikrospóra tenyésztéssel foglalkozó publikációkban szinte kivétel nélkül a folytonos munkalehetőséget biztosító üvegházi alapanyagot használták a kutatók.

A tritikálé mikrospóra tenyésztés első publikációi szabadföldi alapanyag felhasználásából születtek (Monostori és mtsai 1998, Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004). A legutóbbi jelentősebb publikációk szerzői üvegházi alapanyagot használtak (Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008). Gondos alapanyag előállítási körülmények között mindkét alapanyag használható.

A mikrospórák fejlettségi állapota befolyásolja az androgenezis hatékonyságát az embriók számát és a növényregenerációt. Búza izolált mikrospóra tenyészetben középső és kései egysejtmagvas vakuólumos állapotban gyűjtötték be a donor kalászokat (Mejza és mtsai 1993, Hu és Kasha 1997a, Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Indrianto és mtsai 2001, Zheng és mtsai 2001, 2002, Liu és mtsai 2002a, Letarte és mtsai 2006). Tritikálé izolált mikrospóra tenyésztéshez a donorhajtásokat szintén a mikrospórák középső egysejtmagvas és kései egysejtmagvas vakuólumos állapotában gyűjtötték be (Pauk és mtsai 2000, 2003, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008).

2. 3. 1. 3. Különböző stresszek szerepe az androgenezis indukciójában

Néhány kivételtől eltekintve a kutatók stresszorokat (különböző előkezeléseket) alkalmaznak az androgenezis indukciójához. Számos *in vivo* vagy *in vitro* kezelés ismert. A kezelések típusa és időtartama rendkívül fontos a folyamatban, ahol a kezelések célja nem csupán az izolálható embriogén mikrospórák számának maximalizálása, hanem a tenyészetenkénti embriószám növelése, és végső soron a DH növények számának emelése.

A fizikai kezelések közül a hideg előkezelés általánosan elterjedt, bár pontos hatásmechanizmusát még nem definiálták (Sunderland és mtsai 1984, Tuvesson és mtsai 2000). Egyes vélemények szerint lassítja a mikrospórák metabolizmusát, megállítja a sejtciklust, ami elősegíti, hogy a mikrospórák mitotikus osztódása egyszerre történjen meg az *in vitro* tenyésztés során magasabb (25-28 ºC) hőmérsékleten (Zheng 2003). Mások szerint a hideg kezelés közben az éheztetés fontosabb szerepet tölt be az androgenezis indukciójában, mint a hideg hatás (Kasha és mtsai 1990, Ziauddin és mtsai 1992). Bizonyították, hogy a 0,3 M mannit oldaton „éheztetett” portokok mikrospórái esetében hatékonyabb az androgenezis indukciója, mint hideg előkezelt portokok mikrospóráinál (Roberts-Oehlschlager és Dunwell 1990, Olsen 1991, Ziauddin és mtsai 1992, Hoekstra és mtsai 1993, Mejza és mtsai 1993, Hu és mtsai 1995). A két kezelés kombinálásával (27 nap, 4 ºC; 0,4 M

mannit, 28 ºC, 7 nap) érték el a legjobb hatékonyságot a tenyészetenkénti embriószám tekintetében (Hu és Kasha 1999).

A fent említett fizikai és élettani hatások mellett tovább emelhető a DH növények előállításának hatékonysága, ha kémiai előkezelésekkel egészítjük ki a búza izolált mikrospóra tenyésztés rendszerét. Liu és mtsai (2002b) a búza donor hajtások *in vivo* körülmények között alkalmazott kémiai kezelésével [0,01% 2-Nikotinsav, 10^{-6} M 6-Benzil-amino-purin (BAP) és 10^{-6}-10^{-5} M 2,4-Diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D)] emelték meg az izolált embriogén mikrospórák arányát. Az *in vitro* körülmények között végzett kémiai előkezelésekkel közvetlenebb hatást lehet kifejteni a mikrospórákra. Habár a kolchicin szerepe a kromoszóma duplikációban van, egyes szerzők felfigyeltek arra, hogy portoktenyészetekben megemelte a szimmetrikus sejtosztódások és az embriók mennyiségét (Szakács és Barnabás 1995, Zamani és mtsai 2003). Az indukciós tápoldatban alkalmazott rövid idejű kolchicin kezelés megemelte a mikrospóra eredetű struktúrák számát izolált mikrospóra tenyészetben (Soriano és mtsai 2007). Zheng és mtsai (2001) számos olyan kémiai stresszort (pl. nikotinsav) írtak le, amelyet az előkezelés során *in vitro* mikrospóra szuszpenzióban alkalmazva emelte a mikrospórák életképességét.

Tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben több hetes (2-4 hét) hideg előkezeléssel indukálták az androgenezist (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008). Zur és mtsai (2008) hideg előkezelést követően 4 napig B (20 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 0,3 M mannit, pH 7,0) előkezelő oldatban (Kyo és Harada 1986) éheztették a portokokon belüli mikrospórákat.

2. 3. 1. 4. A mikrospórák izolálása és a sűrűség hatása a mikrospórák tenyésztésére

Jelenleg négy különböző megközelítést ismerünk a mikrospórák szomatikus szövetektől való elkülönítésére: (1) kiszóródott mikrospórák összegyűjtése, (2) mágneses keverés, (3) macerálás és (4) késes homogenizálás.

(1) Az első esetben nem beszélhetünk valódi izolált mikrospóra tenyésztésről, hiszen a portokokból kiszóródott mikrospórákat gyűjtik össze tenyésztés céljából (Datta és Wenzel 1987).

(2) A mágneses keverés, egy továbbfejlesztett változata az első megközelítésnek. A mágneses keverés csupán növeli a kiszóródott mikrospórák mennyiségét (Cho és Zapata 1990, Indrianto és mtsai 1999).

A macerálás és késes homogenizálás módszerét már valódi izolálásnak tekinthetjük.

(3) A macerálás során műanyag szűrőhálót és üvegrudat használnak arra, hogy a portokokat eldörzsölve nagy mennyiségű mikrospórát izoláljanak a portokokból (Tuvesson és Öhlund 1993).

(4) A késes homogenizálás során gyorsan forgó éles pengéket tartalmazó steril zárt edényt használnak arra, hogy a kalászokból kiszabadítsák a mikrospórákat (Mejza és mtsai 1993).

A macerálás és a késes homogenizálás módszere vált széleskörűen alkalmazott technikává búzában. A macerálás munkaigényesebb, de kevesebb optimalizálást igényel, és a mikrospórák kevésbé sérülnek az izolálás során. A késes homogenizáló készülék alkalmazása nemcsak munkaerő takarékos, de nagy mennyiségű embriogén mikrospóra izolálására is lehetőséget kínál (Gustafson és mtsai 1995a). Hátránya, hogy optimalizálni kell az izolálás idejét és sebességét, amelyet befolyásol a donor kalászok száma és fejlettsége, valamint az izoláló folyadék mennyisége is. Tritikálé izolált mikrospóra tenyészet létrehozására mind a késes homogenizálás (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és Amundsen 2005), mind a macerálás módszere (Zur és mtsai 2008) sikeresen alkalmazható.

Az izolált mikrospórák tisztasága alapvetően fontos része a sikeres tenyésztésnek. Az élettelen sejt- és szövettörmelékek eltávolítására a szűrés és 3-4 mosás, centrifugálás megfelelőnek látszik (Indrianto és mtsai 1999, Patel és mtsai 2004, Shariapanahi és mtsai 2006), ha a mikrospórák több mint fele életképes. Ha az élő mikrospórák aránya 50% alatti, akkor az izolátum tisztaságát szükséges fokozni, erre alkalmas módszer a grádiens centrifugálás (Kasha és mtsai 2003). A centrifugálás során a vakuolizált embriogén mikrospórák a két oldat határán összegyűlnek, így az élettelen sejt- és szövettörmeléktől könnyen elkülöníthetőek. A grádiens centrifugálás két típusa ismert. A költségesebb Percoll grádiens centrifugálással jó minőségű tisztítást lehet elérni (Indrianto és mtsai 2001, Zheng és mtsai 2003, Supena és mtsai 2006a), azonban a szénhidrát grádiens használatával történő centrifugálás is megfelelő minőséget biztosít a sikeres tenyésztéshez, ráadásul jóval olcsóbb (Mejza és mtsai 1993, Puolimatka és mtsai 1996, Hansen és Andersen 1998b, Holme és mtsai 1999, Orlov és mtsai 1999, Puolimatka és Pauk 1999, Pauk és mtsai 2000, 2003, Liu és mtsai 2002b).

A tenyészetek sűrűségére vonatkozólag nagy különbséget találunk az egyes szerzők munkái között. Az első sikeres kísérletek során az alkalmazott mikrospóra sűrűség kb. 80 000 – 100 000 mikrospóra/ml volt (Mejza és mtsai 1993, Tuvesson és Öhlund 1993, Gustafson és mtsai 1995a, Puolimatka és

mtsai 1996, Orlov és mtsai 1999). Később 20 000 – 50 000 mikrospóra/ml denzitást alkalmaztak a kutatók (Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Holme és mtsai 1999, Indrianto és mtsai 1999, Puolimatka és Pauk 1999, Kunz és mtsai 2000, Liu és mtsai 2002a, Letarte és mtsai 2006, Shariatpanahi és mtsai 2006). Búza izolált mikrospóra tenyészetben nem szükséges a magas denzitás az androgenezis indukciójához, alacsonyabb denzitással (4 000 – 10 000 mikrospóra/ml) is állítottak elő mikrospóra tenyészet eredetű DH növényeket (Zheng és mtsai 2001, 2002, Liu és mtsai 2002b).

Tritikálé esetében is hasonlóak az irodalmi adatok. Magas, 100 000 – 250 000 mikrospóra/ml sűrűség található az első publikációkban (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004), majd a későbbiekben alacsonyabb denzitás mellett (10 000 – 70 000 mikrospóra/ml) is sikeresen állítottak elő mikrospóra eredetű tritikálé embrioidokat és zöld növényeket (Eudes és Amundsen 2005, Lantos és mtsai 2005, Zur és mtsai 2008).

2. 3. 1. 5. A tenyésztési körülmények hatása

Régóta ismeretes, hogy a tápoldat összetevői (makroelemek, mikroelemek, vitaminok, szénforrás és hormonok) hatással vannak a különböző növényi explantátumok fejlődésére (Murashige és Skoog 1962). A tenyésztő közeg összetevői és fizikai tulajdonságai befolyásolják a mikrospóra eredetű struktúrák fejlődését, az embriók számát és minőségét. Búza mikrospóra tenyésztéshez kisebb módosításokkal és különbségekkel a leggyakrabban használt alaptápoldatok a CHB (Chu és mtsai 1990, Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Holme és mtsai 1999, Mentewab és mtsai 1999, Patel és mtsai 2004), az A2 (Indrianto és mtsai 1999, 2001, Shariatpanahi és mtsai 2006), az MS (Hu és Kasha 1997a, 1999, Kasha és mtsai 2003, Letarte és mtsai 2006), és a NPB99 (Zheng és mtsai 2001, 2002, Liu és mtsai 2002b). Az első sikeres tritikálé izolált mikrospóra tenyésztésnél alkalmazott tenyésztő közeg a 190-2 alaptápoldat volt (Pauk és mtsai 2000), melynek használatát a következő publikációk is megerősítették (Oleszczuk és mtsai 2004, Lantos és mtsai 2005, Zur és mtsai 2008). Eudes és Amundsen (2005) a CHB és NPB alaptápoldatokat alkalmazta eredményesen. Habár jelentős különbségeket láthatunk az említett tápoldatok fő összetevői között, mindegyikkel eredményesen dolgoztak a kutatócsoportok.

Sejt- és szövettenyészetekben a leggyakrabban alkalmazott szénforrás a szacharóz és a maltóz. Hunter (1988) számolt be arról, hogy a maltóz mint szénforrás emeli az árpa mikrospóra tenyészet hatékonyságát, különös tekintettel a növényregenerációra. A maltóz pozitív hatását figyelték meg búza mikrospóra tenyészetben is (Mejza és mtsai 1993, Indrianto és mtsai 1999). Tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben szintén maltózt használnak szénforrásként (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és

Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008). Azonos töménységű maltózt és szacharózt tartalmazó tápoldatokat összehasonlítva nagyobb ozmolaritás változás volt megfigyelhető a szacharóz tartalmú tápoldatban, amely a szacharóz hidrolízisével magyarázható. Ez károsan befolyásolhatja a mikrospóra eredetű struktúrák fejlődését (Zheng és mtsai 2003). Az izolált búza mikrospóra tenyészetek optimális ozmolaritása 300 mOsm/l körüli érték, amely 0,3 M mannit oldattal vagy 0,25 M maltózzal egyenértékű (Liu és mtsai 2002b). Tritikálé esetében a tápoldathoz adott 100 g/l Ficoll® (ozmotikus ágens) segítette a mikrospóra eredetű struktúrák indukcióját és a növényregeneráció hatékonyságát (Eudes és Amundsen 2005).

A tápoldatokhoz adagolt exogén hormonok a mikrospóra eredetű struktúrák mennyiségét és minőségét is befolyásolják. Nincs általános megegyezés az exogén hormonok kombinációjára és mennyiségére vonatkozólag. Egyes kutatók hormonmentes indukciós tápoldatot alkalmaznak búza izolált mikrospóra tenyészetben (Indrianto és mtsai 1999, 2001, Shariatpanahi és mtsai 2006). A másik fő irány a 2,4-D és kinetin hormonkombináció (Tuvesson és Öhlund 1993, Puolimatka és mtsai 1996, Puolimatka és Pauk 1999, Kunz és mtsai 2000), de jelentős irodalma van a fenil-ecetsav (PAA) és kinetin alkalmazásának is (Hu és Kasha 1997a, Liu és mtsai 2002b, Letarte és mtsai 2006). A három legáltalánosabban alkalmazott megközelítésen kívül egyéb hormonok és hormonkombinációk alkalmazásáról is olvashatunk (Zheng és mtsai 2001, Liu és mtsai 2002a, Patel és mtsai 2004).

Tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben a módosított 190-2 hormonmentes tápközeg a leggyakrabban alkalmazott indukciós tápoldat (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Zur és mtsai 2008). Ez az exogén hormonokat nem tartalmazó tápoldat pozitívabb hatású volt az androgenezis hatékonyságára, mint az exogén PAA hormonnal vagy a 2,4-D és kinetin hormonkombinációval elkészített tápoldat (Pauk és mtsai 2000). A hormonmentes tápoldat pozitív hatását Oleszczuk és mtsai (2004) is megerősítették. Eudes és Amundsen (2005) 2,4-D és BAP hormonkiegészítést alkalmazott a tenyészetekben.

A búza és tritikálé mikrospóra tenyészetben általánosan alkalmazott szénforrás a maltóz. Az alaptápoldatok és hormonok tekintetében nem ilyen egységes a kép, több megközelítés is eredményes volt búza és tritikálé mikrospóra tenyésztésben.

2. 3. 1. 6. A dajkatenyésztés szerepe a búza és tritikálé izolált mikrospóra tenyésztésben

Az első izolált mikrospóra tenyészet eredetű búza növényeket ovárium dajkatenyésztéssel állították elő (Mejza és mtsai 1993). Alig van olyan publikáció, amely dajkatenyésztés nélkül állított elő izolált mikrospóra

tenyészet eredetű növényeket. Az ovárium nélküli tenyésztés esetén a mikrospórák többsége befejezi a fejlődést a tenyésztés 14. napja előtt, a fejlődő struktúrák nem képesek a mikrospóra falát áttörni (Puolimatka és mtsai 1996, Hu és Kasha 1997a). A dajka jelenléte ugyan nem szükséges az androgenezis indukciójához és a legelső sejtosztódásokhoz, azonban fontos az osztódó mikrospórák, proembriók és embriók indukciójához (Puolimatka és mtsai 1996). A dajkatenyésztés növeli az osztódó mikrospórák arányát, az embriók tenyészetenkénti számát és a növényregeneráció hatékonyságát (Hu és Kasha 1997a).

Búza izolált mikrospóra tenyészetben dajkaként többféle növényi explantátumot (búza ovárium, búza pelyva, búza portok) is teszteltek, de az ováriumnak volt a legpozitívabb hatása az androgenezisre (Puolimatka és Pauk 1999). Az ovárium eredetét tekintve a búza ováriumot árpa vagy zab ováriummal helyettesítve is hasonló eredményeket értek el (Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Konzak és mtsai 2000, Liu és mtsai 2002b). A búza ováriumok genotípusa sem befolyásolta a dajkahatás eredményességét (Zheng és mtsai 2001, Liu és mtsai 2002b). Az ováriumok mennyiségére vonatkozólag nem egységes az irodalom, eltérő ajánlásokat találunk: 10 ovárium/ml indukciós tápoldat (Hu és Kasha 1997a, Puolimatka és Pauk 1999), 3-5 ovárium/ml (Hansen és Andersen 1998b, Holme és mtsai 1999, Indrianto és mtsai 1999, Mentewab és mtsai 1999, Kunz és mtsai 2000, Letarte és mtsai 2006), illetve 1 ovárium/ml (Zheng és mtsai 2001, Liu és mtsai 2002a, 2002b). Búza izolált mikrospóra tenyészetben az első mikrospóra eredetű embriók leszedését követően az ováriumok és a tápoldat frissítésével jelentős mértékben növelhető volt a multicelluláris struktúrák és proembriók száma (Liu és mtsai 2002a). Az ováriumok hideg kezelése (7 nap) nem befolyásolta a dajkatenyésztés hatékonyságát (Hu és Kasha 1997a). Ez lehetővé teszi az ovárium donor kalászok tárolhatóságát is, ami munkaszervezési okokból előnyös.

Az ovárium dajkatenyésztés időtartama is kritikus faktor, ugyanis az öt nappal késleltetett dajkatenyésztés szignifikánsan csökkentette a mikrospóra tenyészetben a mikrospórából fejlődő proembriók gyakoriságát, és a túl korán eltávolított ováriumok (15 napos dajkatenyésztés) káros hatással voltak a struktúrák fejlődésére (Puolimatka és Pauk 1999).

Néhány nem válaszadó genotípus esetében az ovárium dajkatenyésztés sem elegendő az embriók fejlődéséhez, vagy csak csekély számú embrió fejlődik a tenyészetekben. Ilyen esetekben az OVCM lehetővé teszi, illetve jelentős mértékben emeli a mikrospóra eredetű embriók számát (Zheng és mtsai 2002). Kondicionált tápoldatok alkalmazásakor a kondicionálás mértéke és ideje (10 ovárium/ml, 7-10 nap) jóval fontosabb, mint az ovárium genotípusa (Zheng és mtsai 2002).

Tritikálé esetében az első két jelentős publikációban nem alkalmaztak dajkatenyésztést az izolált mikrospóra tenyésztéséhez (Pauk és mtsai 2000,

Oleszczuk és mtsai 2004.). Eudes és Amundsen (2005) megfigyelései szerint tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben az ovárium dajkatenyésztés javította az embriók minőségét és emelte az embriók tenyészetenkénti számát. Zur és mtsai (2008) szintén alkalmazták a dajkatenyésztést tritikálé mikrospóra tenyészetben. Az említett két kutatócsoport munkájában az ováriumok mennyisége 3-4 illetve 10 ovárium/ml indukciós tápoldat volt (Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008).

Az ovárium dajkatenyésztés pozitív hatásáról bár sok publikáció jelent meg, azonban keveset tudunk arról, hogy milyen kémiai, esetleg fizikai hatás áll a hátterében. A búza mikrospórák androgenezisét több kémiai anyag köztük az arabinogalaktánok (Larcoll) és az arabinogalaktán fehérjék (gumiarábikumban jelen van) is serkentik. Az indukciós tápoldathoz adott Larcoll jelentősen növelte a búza mikrospórák életképességét, míg a gumiarábikum a proembriók és embriók gyakoriságát növelte, valamint a zöld növényregenerációt javította (Letarte és mtsai 2006). Ováriummentes izolált búza mikrospóra tenyészetekben a Larcoll és gumiarábikum alkalmazásával jelentős mennyiségű mikrospóra eredetű embriót sikerült felnevelni és zöld növényeket regenerálni, de a hatás elmaradt az ovárium dajkatenyésztéshez képest. Az említett arabinogalaktán és arabinogalaktán fehérje hatását ovárium dajkatenyésztéssel kombinálva egy hatékonyabb mikrospóra tenyésztési eljárást fejlesztettek ki (Letarte és mtsai 2006).

A dajkatenyésztés régóta jól ismert eljárás búza izolált mikrospóra tenyésztésben (Mejza és mtsai 1993). Megfigyelték, hogy az izolált zigóták *in vitro* felnevelése során szintén jótékony hatású a dajkatenyésztés (Bakos és mtsai 2003b). Az izolált zigóták *in vitro* neveléséhez dajkaként alkalmazott izolált ováriumok kevésbé hatékonyak, mint az izolált mikrospórák (Bakos és mtsai 2003a, 2003b).

2. 3. 1. 7. Növényregenerálás

A búza és tritikálé mikrospóra tenyésztés többi lépéséhez képest a növényregenerálás egyszerű feladat, amennyiben sikerül érett *in vitro* mikrospóra eredetű embriókat előállítani. A tenyészetekben fejlődött 2 mm-es méretű struktúrákat hétről hétre szilárd növényregeneráló táptalajra helyezik. A legtöbb kutatócsoport a 190-2 alaptápoldatot alkalmazza búza mikrospóra eredetű embriók növényregenerálására (Tuvesson és Öhlund 1993, Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Holme és mtsai 1999, Liu és mtsai 2002a, 2002b), azonban az MS (Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Hu és Kasha 1999, Kunz és mtsai 2000) és az A2R táptalajon is sikeresen regeneráltak zöld növénykéket (Indrianto és mtsai 1999, 2001, Shariatpanahi és mtsai 2006). A regeneráció során nem feltétlenül szükséges exogén hormonok alkalmazása a jól fejlett embriók regenerálásához (Mejza és mtsai 1993, Tuvesson és Öhlund

1993, Gustafson és mtsai 1995a, Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Hu és Kasha 1999). Búza mikrospóra eredetű struktúrák regnerációjára a 0,5 mg/l naftil-ecetsav (NAA) és 0,5 mg/l kinetin hormon kombinációt (Puolimatka és mtsai 1996, Puolimatka és Pauk 1999, Lantos és mtsai 2005), valamint a PAA, kinetin és gibberellinsav (GA_3) hormonkiegészítést sikeresen alkalmazták (Kasha és mtsai 2003, Letarte és mtsai 2006). A regeneráció szobahőmérsékleten 16 órás megvilágítás mellett történt, ahol 2 hét múlva *in vitro* növénykék regenerálódtak.

Tritikálé mikrospóra eredetű struktúrák regenerálásához szintén a 190-2 tápoldatot alkalmazzák hormonkiegészítésssel (Pauk és mtsai 2000, 2003, Oleszczuk és mtsai 2004, Zur és mtsai 2008). Eudes és Amundsen (2003, 2005) a GEM elnevezésű tápközeget alkalmazta mikrospóra eredetű embriók regenerálására.

Búza és tritikálé mikrospóra tenyésztés gyakorlati felhasználásának fő korlátozó tényezője a nagyfokú albinizmus. Búza izolált mikrospóra tenyészetekben jó regeneráló képességgel rendelkező embriók fejlődtek, azonban egyes genotípusoknál a regenerált növények döntő többsége portok és mikrospóra tenyészetben is albínó volt (Liu és mtsai 2002b). A genotípus befolyásolja az albinizmus mértékét izolált mikrospóra tenyészetben, de az albinizmus jelensége nem magyarázható csak a genetikai háttérrel. Egyszikűeken végzett kísérletek bizonyítják, hogy az alkalmazott haploid technika (portoktenyésztés, izolált mikrospóra tenyésztés) szinte minden egyes eleme – a donor növények fejlettsége, az előkezelés, a tenyésztő tápoldat összetevői (szénforrás, hormonok, burgonya kivonat) – befolyásolja a növényregeneráció hatékonyságát (Ouyang és mtsai 2004, Labbani és mtsai 2005, Jacquard és mtsai 2006, Oleszczuk és mtsai 2006, Broughton 2008, Redha és mtsai 2008). A kloroplasztisz DNS degenerációja is okozhat albinizmust (Carreda és mtsai 2000, Clement és Pacini 2001). Egyes hipotézisek szerint az *in vitro* tenyésztési körülmények olyan stresszt jelentenek a fejlődő struktúrák számára, amely a kloroplasztiszokban transzkripció és transzláció csökkenéséhez vagy a riboszómák teljes inaktivációjához vezethet (Trop és Andersen 2009).

2. 3. 1. 8. A ploidia fok vizsgálata és a kromoszóma duplikáció

A mikrospóra tenyésztés során – hasonlóan a portoktenyésztéshez – spontán előforduló jelenség a rediploidizáció; így a növények egyrésze diploid lesz, míg a többi haploid marad. A legtöbb vizsgálat a legelső sejtosztódáskor bekövetkező sejtmagfúzióra terjedt ki, de a spontán rediploidizáció bármikor megtörténhet a tenyésztés során (Kasha és mtsai 2001b, Testillano és mtsai 2004, González-Melendi és mtsai 2005, Shim és mtsai 2006). A diploid növények felnevelése után közvetlen magot foghatunk, míg a haploid növények

csupán steril kalászt hoznak. Fiatal növény vagy növényke korban szükség van a regeneránsok ploidia fok szerinti szétválogatására, hogy a haploid növények azonosításával és kémiai kezelésével (indukált rediploidizáció) még több fertilis diploid növényhez jussunk.

A mikrospóra eredetű növények ploidia fokának meghatározására több lehetőség is rendelkezésre áll: kromoszómaszámlálás, áramlási citometria, zárósejtek mérése, zárósejtek kloroplasztiszainak számlálása és morfológiai megfigyelések (Bohanec 2003). Az említett technikák hatékonyságáról megoszlanak a vélemények. A morfológiai bélyegek alapján történő ploidia fok meghatározás a legpontatlanabb eljárás. A zárósejtek színtestjeinek számlálása nagy számú növénynél nehezen alkalmazható eljárás. A kromoszómaszámlálás, munkaigényessége mellett, a legpontosabban mutatja meg az adott növény ploidia fokát és az esetleges kromoszómaszámbeli eltéréseket. Az áramlási citometriás eljárás, bár költséges, rutinszerűen alkalmazható a ploidia fok meghatározására. A sztómamérés nagyszámú populáció esetén is rutinszerűen alkalmazható megfelelő pontosságú módszer.

A haploid növények genomjának indukált duplikációjához kémiai ágenst alkalmaznak, leggyakrabban kolchicint vagy kaffeint (Zheng 2003). A kolchicin, mint sejtosztódás gátló, nem engedi a kromoszómapárokat szétválni a mitotikus osztódás során, így endomitózison keresztül a kromoszóma készlet megduplázásához vezet (Levan 1938, Bartels és Hilton 1973). A kolchicin kezelés hátránya, hogy az alkaloid karcinogén hatású. A kaffein kevésbé toxikus, de hatékonysága rosszabb, mint a kolchiciné. A legelterjedtebb genom duplikációs eljárás a fiatal növények gyökerének néhány órás kolchicin kezelése (Metz és mtsai 1988).

A DH növény gyakoriság emelésének egy alternatív megoldását jelenti a mikrospórák kolchicin kezelése még a tenyésztés elején (portoktenyésztés, izolált mikrospóra tenyésztés). Több kutatócsoport is felismerte, hogy rövid idejű kolchicin kezelés esetén a tenyészetenkénti embriók száma ugyan csökken, azonban a fertilis DH növények gyakorisága emelhető búza portoktenyészetben (Navarroalvarez 1994, Redha és mtsai 1998, Zamani és mtsai 2000, 2003, Soriano és mtsai 2007, Redha és Talaat 2008) és izolált mikrospóra tenyészetben (Hansen és Andersen 1998b, Soriano és mtsai 2007).

2. 3. 2. Az *in vitro* androgenezist befolyásoló tényezők paprika portok- és izolált mikrospóra tenyészetben

A paprika izolált mikrospóra tenyésztés története rövidebb múltra tekint vissza, mint azt a búza vagy tritikálé esetében láttuk, így a befolyásoló tényezők tárgyalásakor indokolt a portoktenyésztésben elért eredményeket részletesebben figyelembe venni. A paprika DH növények előállítását is számos tényező befolyásolja. A kísérletek során alapvető fontosságú a jó válaszadó képességű

genotípusok alkalmazása a különböző fizikai és kémiai kezelések hatásának pontos teszteléséhez. A végső cél olyan módszer kialakítása, amely a lehető legkisebb mértékben függ a genotípustól.

2. 3. 2. 1. Genotípus hatás

Portoktenyészetben és úsztatott portoktenyészetben is kimutatták a genotípusok válaszadó képességének különbségét (Mitykó és mtsai 1995, Mitykó és Gémes 2006, Supena és mtsai 2006a). Az első részletes izolált mikrospóra tenyésztési közlemény egy paprika genotípus ('Milyang-jare') androgeneziséről számolt be (Kim és mtsai 2008). Ebből adódóan nincs publikált eredmény a paprika mikrospóra tenyésztés genotípus kapcsolatról.

2. 3. 2. 2. A donor növények nevelése és a mikrospórák fejlettségi állapota

Búza és tritikálé haploid indukciós eredményekkel szemben alapvető különbség, hogy paprika portoktenyészetben, úsztatott portoktenyészetben és izolált mikrospóra tenyészetben is a legtöbb kutatócsoport a donor növények üvegházi felnevelését részesítette előnyben a szabadföldi alapanyag használattal szemben (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Buyukalaca és mtsai 2004, Kim és mtsai 2004, 2008, Supena és mtsai 2006a, 2006b). A donor növények gondos üvegházi felnevelése megkönnyíti a steril laboratóriumi munkát. Alapvető fontosságú a donor növények számára a megfelelő tápanyagellátás, vízellátás és növényápolás, valamint az optimális hő (25 ºC/20 ºC) és fényviszonyok (16 órás megvilágítás) biztosítása. Speciális igényekről senki sem számolt be ezen a téren.

A mikrospórák fejlettségi állapota portoktenyészetben alapvetően befolyásolta az androgenezis hatékonyságát (Kim és mtsai 2004). A legtöbb kutatócsoport kései egysejtmagvas vakuólumos állapotú mikrospórákat alkalmazott portoktenyészetben (Gyulai és mtsai 1999, 2000, Buyukalaca és mtsai 2004, Ercan és mtsai 2006). Supena és mtsai (2006a) úsztatott portoktenyészetben és izolált mikrospóra tenyészetben is főként egysejtmagvas állapotú mikrospórákat alkalmaztak kevés korai kétsejtmagvas állapotú mikrospórákkal. Kim és mtsai (2008) olyan donor portokokat használtak fel, amelyek kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas mikrospórákat tartalmaztak.

2. 3. 2. 3. A stressz szerepe a paprika androgenezis indukciójában

Paprika portoktenyészetben a hőstressz (35 ºC, 8 nap) alkalmazása jelentős előrelépést jelentett a módszer sikeres kidolgozásában (Dumas de Vaulx és mtsai 1981). Azóta a magas hőmérséklet (35 ºC) széleskörűen alkalmazott stresszor (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Buyukalaca és mtsai 2004, Kim és mtsai 2004, Bárány és mtsai 2005). Egyéb stresszorok alkalmazása eddig nem kapott lényeges teret a paprika haploid indukciós rendszerekben, habár az indukciós táptalajba adagolt $AgNO_3$, mint kémiai stresszor, megemelte az embriók számát a portoktenyészetekben (Buyukalaca és mtsai 2004).

Izolált mikrospóra tenyészetben több napos éheztetés előzte meg az androgenezis sikeres indukcióját (Supena és mtsai 2006a, Kim és mtsai 2008). Supena és mtsai (2006a) a dohány mikrospóra tenyésztés irodalmából ismert B oldatot (Kyo és Harada 1986, Touraev és Heberle-Bors 1999) alkalmazták a mikrospórák éheztetésére, míg Kim és mtsai (2008) árpa mikrospóra előkezelő oldatot használtak hősokkal kombinálva (Hoekstra és mtsai 1997). Mindkettő előkezelő oldat makroelemekkel kiegészített mannit oldat volt.

2. 3. 2. 4. A paprika mikrospórák izolálása és a tenyésztési sűrűség

Paprika mikrospórák izolálásakor a késes homogenizáló készüléket és a kémcsőrázatást kombinálva alkalmazták (Kim és mtsai 2008). A mikrospóra izolátumot többszöri mosással és centrifugálással tisztították. Az izolált mikrospóra szuszpenzió tisztasága Percoll grádiens centrifugálással volt növelhető (Supena és mtsai 2006a).

A legelső sikeres paprika izolált mikrospóra tenyésztésnél 40 000 mikrospóra/ml sűrűség mellett tenyésztették a mikrospórákat (Supena és mtsai 2006a). Kim és mtsai (2008) a mikrospórák sűrűségének hatását ellenőrizték, és a 80 000 – 100 000 mikrospóra/ml sűrűséget találták a legmegfelelőbbnek paprika izolált mikrospórák tenyésztésére.

2. 3. 2. 5. A tenyésztési körülmények hatása

Két publikáció esetében eltérő alaptápoldatokat alkalmaztak a kutatók. Supena és mtsai (2006a) a dohány mikrospóra tenyésztésre alkalmazott AT3 tápoldatot használták kísérleteikhez, míg Kim és mtsai (2008) a repce mikrospóra tenyésztésnél alkalmazott NLN alaptápoldatot alkalmazták hormonkiegészítés nélkül.

Paprika portoktenyésztés irodalmában kettő alternatív megközelítésről olvashatunk a külsőleg adott hormonok tekintetében. (1) Portoktenyészetben az

indukciós táptalajhoz (CP) alacsony mennyiségű külsőleg adott auxin és citokinin hormonkiegészítés (0,01 mg/l 2,4-D és 0,01 mg/l kinetin) alkalmazását több kutatócsoport ajánlotta (Dumas de Vaulx és mtsai 1981, Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 1999, 2000, Bárány és mtsai 2005). Az indukciót követően emelt mennyiségű exogén citokinin (0,1 mg/l kinetin) segíti a növényregenerálást. (2) Más megközelítésben magasabb mennyiségű hormonkombináció ajánlott az indukciós tápközegben. Buyukalaca és mtsai (2004) 4 mg/l NAA és 0,1 mg/l BAP hormonkiegészítést alkalmaztak szilárd tápközegű portoktenyészetben, majd a növényregeneráció során a hormon kiegészítést nélkülözték. Úsztatott portoktenyészetben 5 µM (0,9 mg/l) indol-ecetsav (IAA) és 2,5 µM (0,55 mg/l) zeatin hormonkombináció váltotta ki a legnagyobb tenyészetenkénti embriószámot az indukciós tápközegben (Supena és mtsai 2006a), és a növényregenerálás során kisebb mennyiségű citokinint (0,1 µM = 0,023 mg/l BAP) alkalmaztak.

Paprika portoktenyészetben, úsztatott portoktenyészetben valamint izolált mikrospóra tenyészetben egyaránt szacharózt alkalmaznak szénforrásként szemben a búza vagy tritikálé tenyésztési eljárásoknál alkalmazott maltózzal (Sibi és mtsai 1979, Dumas de Vaulx és mtsai 1981, Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Buyukalaca és mtsai 2004, Kim és mtsai 2004, 2008, Bárány és mtsai 2005, Ercan és mtsai 2006, Supena és mtsai 2006a, 2006b).

2. 3. 2. 6. Növényregenerálás

A növényregeneráció hatékonyságát több tényező befolyásolja: a megfelelő hőmérséklet (25 ºC), a megvilágítás (16/8 h), a tápközeg összetétele, a szilárdító ágens és a hormonok. A regenerációs táptalajok összetételét tekintve több kutatócsoport is a Dumas de Vaulx és mtsai (1981) által kifejlesztett agarral szilárdított R1 tápközegen végezte a növényregenerációt (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 1999, 2000, Bárány és mtsai 2005). Emellett sikeresen alkalmazták a Phytagellel szilárdított MS alapú regenerációs táptalajt is (Ercan és mtsai 2006, Supena és mtsai 2006a, 2006b).

Az alkalmazott indukciós tápközeg alapvetően befolyásolta a növényregenerációs stratégiát portoktenyészetben. A Dumas de Vaulx és mtsai (1981) által kifejlesztett rendszerben a kevés külsőleg adott hormont tartalmazó indukciós táptalajon (CP) indukálódott embriók növényregenerációját az agarral szilárdított R1 táptalajhoz adagolt kinetin segíti. Mások az indukciós tápközegben magasabb hormon koncentrációt alkalmaztak, és a regeneráció során csökkentették a külsőleg adott hormon mennyiségét (Buyukalaca és mtsai 2004, Supena és mtsai 2006a).

Izolált mikrospóra tenyészetben a hormonok hatását még nem tanulmányozták részletesen sem az indukció, sem a növényregeneráció során.

Kim és mtsai (2008) hormonmentes tápközeget alkalmaztak az indukció és a növényregeneráció során is. A külsőleg adott hormonok optimális mennyiségének meghatározása további kutatások tárgyát képezheti.

2. 3. 2. 7. A ploidia fok vizsgálata és a kromoszóma duplikáció

A portoktenyészet eredetű növények ploidia fokának meghatározásához főleg áramlási citometriás vizsgálatokat alkalmaztak (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Bárány és mtsai 2005, Ercan és mtsai 2006, Supena és mtsai 2006a), illetve a zárósejtek színtestjeinek számlálását (Supena és mtsai 2006b). Az áramlási citometriás vizsgálatok alapján a regenerált növények döntő többsége haploid (Gyulai és mtsai 2000, Ercan és mtsai 2006, Supena és mtsai 2006a). A haploid és spontán diploid növények mellett előfordultak tetraploid és aneuploid növények is (Gyulai és mtsai 2000).

A paprika portoktenyészetben a spontán rediploidizáció mértéke más fajokhoz hasonlóan alacsony, így az azonosítottan haploid egyedek genomjának duplikációja szükséges ahhoz, hogy a DH növények mennyiségét növeljük. A haploid növények kromoszóma számának duplázása hat napos *in vitro* körülmények között végzett kolchicin kezeléssel elérhető (Gémes és mtsai 2006). Szóródásos mikrospóra tenyészetekben a tenyésztés első hetében alkalmazott kolchicin kezeléssel sikerült növelni a DH növények gyakoriságát az embriók tenyészetenkénti számának jelentősebb csökkenése nélkül (Supena és mtsai 2006b).

2. 4. Az androgenezis felhasználása a nemesítési és kutatási módszerekben

Mind a fajtaelőállítás, mind a kutatás szempontjából rendkívül fontos tényező az idő. A DH technológiák alkalmazásával egy generáció alatt lehet előállítani homozigóta törzseket és vonalakat a nemesítés számára. Mértékadó vélemények szerint a DH technológia alkalmazása akár 50%-kal is csökkentheti a fajta előállítás idejét (Tuvesson és mtsai 2007).

2. 4. 1. A megkettőzött haploidok szerepe a nemesítésben

Manapság két módszer áll rendelkezésre a nagyszámú DH búza törzsek előállítására: a távoli fajkeresztezés (búza kukorica pollennel történő keresztezése) és a portoktenyésztés (Szakács és mtsai 2002, Inagaki 2003, Tuvesson és mtsai 2003). Európa több nemesítő intézetében a DH búza törzsek előállítása a nemesítés szerves részét képezi (Thomas és mtsai 2003, Tuvesson és mtsai 2007).

Az első portoktenyészet eredetű európai búzafajta ('Florin') előállítását követően (De Buyser és mtsai 1987) laboratóriumunk Európában másodikként kombinálta a hagyományos nemesítést és a portoktenyésztést, azaz államilag elismert DH búza fajtát ('GK Délibáb') állított elő búza portoktenyészetből (Pauk és mtsai 1995). Azóta számos hazai fajta és fajtajelölt született Martonvásáron ('Mv Pálma', 'Mv Szigma') és Szegeden ('GK Bán', 'GK Szinbád', 'GK Tündér'). Az izolált mikrospóra tenyésztés alkalmazását a búzanemesítésben még néhány faktor korlátozza (albinizmus, genotípus függőség).

Tritikálé esetében a rendelkezésre álló módszerek hatékonysága szerényebb, mint búzánál. Így fontosságuk ellenére kisebb teret nyertek a módszerek a nemesítésben. Franciaországban állítottak elő portoktenyészet eredetű tritikálé fajtákat (Thomas és mtsai 2003).

Paprika esetében a portoktenyésztés az a fő módszer, amellyel a nemesítők számára DH vonalat lehet jelentősebb mennyiségben előállítani. A módszer munkaigényes és genotípus függő, azonban a nemesítőknek évről évre állandó igényük van a homozigóta vonalakra, ami a módszer fejlesztésére és alternatív módszerek kidolgozására sarkallja a kutatókat. Hazánkban és külföldön is szorosan kapcsolódott a paprika DH növény előállítás a nemesítéshez (Thomas és mtsai 2003, Gémes és mtsai 2006, Mitykó és Gémes 2006).

A DH technológiával előállított növények szántóföldi vagy hajtatóházi teljesítménye (pl.: rezisztencia) MAS alkalmazásával kombinálva előrejelezhető. A kívánt allélkombinációk jelenléte már a DH_0 növényeken ellenőrizhető. A DH technológia és a MAS kombinálása ma még főleg árpában (Werner és mtsai 2005, 2007) és paprikában (személyes közlés Gémesné Dr. Juhász Anikó) alkalmazott nemesítési eszköz.

2. 4. 2. A haploid módszer jelentősége a térképezési populációk létrehozásában

A térképezési populációk előállítása az egyik legfontosabb területe a DH növények felhasználásának, amely elősegíti az agronómiai tulajdonságokért felelős gének, kromoszóma régiók azonosítását (Datta 2005). Búza és paprika esetében a portoktenyésztés módszere megfelelő technikának számít a térképezési populációk elkészítéséhez, és későbbiekben a kvantitatív tulajdonságok tanulmányozásához. Portoktenyészet eredetű térképezési populációkat alkalmaztak búzában a termésmennyiséget (Cuthbert és mtsai 2008) és a növénymagasságot meghatározó QTL-ek keresésére (Zhang és mtsai 2008). Intézményünkben Prof. Dr. Mesterházy Ákos osztálya intenzív kutatásokat folytat a fuzárium rezisztenciáért felelős QTL-ek azonosítására (Szabó-Hevér és mtsai 2008). Paprikában *Phytophthora capsaci* Leon.

rezisztenciáért felelős QTL-ek keresésére használtak portoktenyészet eredetű térképező populációt (Sugita és mtsai 2006, Minamiyama és mtsai 2007).

2. 4. 3. *In vitro* szelekció

A haploid sejt és szövettenyészetek felhasználásának egyik lehetősége a sejtszintű szelekció. Búza portoktenyészetben *in vitro* szelekcióval állítottak elő Al toleráns búza törzseket (Darkó és mtsai 2004, Bakos és mtsai 2008). F1 növények portoktenyészetében végzett *in vitro* szelekcióval fuzárium toleráns növényeket állítottak elő (Fadel és Wenzel 1993).

2. 4. 4. Haploidia és genetikai transzformáció

Egy hatékony haploid sejt- és szövettenyésztési rendszerbe integrálva a genetikai transzformációt, egy lépésben fixálható a bejuttatott transzgén homozigóta formában. A haploid mikrospóra eredetű struktúrák transzformációja egy jól kidolgozott rendszernek számít repce és árpa esetében.

Elektroporációval búza portoktenyészet eredetű embriókat transzformáltak, a transzformációs hatékonyság alacsony volt (Gustafson és mtsai 1995b). Izolált mikrospóra tenyészetben a részecske belövéses transzformációt alkalmazták (Mentewab és mtsai 1999, Folling és Olsen 2001). Folling és Olsen (2001) izolált mikrospóra tenyészet eredetű transzgénikus albínó növényeket állított elő. Búza haploid transzformációra alternatív megközelítést jelenthet a petesejtek mikroinjektálása; hazánkban is intenzív kutatások folynak ezen a területen (Pónya és mtsai 1999, Barnabás és mtsai 2000, 2001).

Tritikálé mikrospóra eredetű embriók transzformációjára a részecske belövéses transzformációt alkalmazták, de nem sikerült transzgénikus növényeket előállítani (Rubio és mtsai 2004).

Paprika esetében még szerényebb adatok állnak rendelkezésre a haploid sejtek és szövetek transzformációját illetően. Portoktenyészetben a transzgén öröklődését tanulmányozták transzgénikus donor növények felhasználásával (Kim és mtsai 2007).

Jelenleg a búza, tritikálé és paprika esetében nem áll rendelkezésre hatékony haploid transzformációs rendszer, amellyel jelentős számú transzgénikus DH vonalat lehet előállítani. A leghatékonyabban két lépésben (genetikai transzformáció, DH növény előállítás) lehet transzgénikus DH növényeket előállítani az említett fajokban.

2. 4. 5 . Haploidia és indukált mutáció

Mutációs nemesítés során a kezelést követő második, harmadik generációban azonosíthatók fenotípusosan a mutáns recesszív alléleket hordozó egyedek. A kezelt M1 növények (kezelést követő generáció) portok és mikrospóra tenyésztése kiváló eszközt nyújt mutánsok szelekciójára. Az indukált mutációval keletkezett recesszív tulajdonságok fenotípusosan homozigóta formában jelennek meg. Az *in vitro* haploid tenyészetben alkalmazott mutagén kezelés elvileg jó lehetőséget kínál a mutációs kísérletekre.

Búzában szerény irodalma van a haploidia és a mutagenezis kombinálásának (Ling és mtsai 1991, Khan és mtsai 2001). A haploid technikák és a mutagenezis kombinálása leginkább repcében, árpában és rizsben volt eddig sikeres (Szarejko 2003).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. A kísérletek növényanyaga

A jó válaszadó képességű ’CY-45’ tavaszi búza (*Triticum aestivum* L.) genotípust használtuk alapanyagként búza mikrospóra tenyésztési kísérleteinkben, mivel tavaszi növekedési típusa meggyorsítja a donor növények felnevelési idejét. Az első kísérleteket követően kilenc hazai őszi búzafajta (’GK Mini Manó’, ’GK Garaboly’, ’GK Hargita’, ’GK Csongrád’, ’GK Délibáb’, ’GK Élet’, ’GK Kata’, ’GK Bán’ és ’Mv Palotás’) válaszadó képességét teszteltük izolált mikrospóra tenyésztésben.

Hat hexaploid tavaszi tritikálé (X *Triticosecale* Wittmack) genotípus donor növényeit használtuk tritikálé mikrospóra tenyésztési kísérleteinkben. A genotípusok között három fajta (’Kargo’, ’GK Gabo’ és ’Rex’) és három F_5 generációban lévő populáció (’AT314’, ’AT322’ és ’EMBR17⁄S2001’) szerepelt. A genotípusokat Dr. Bóna Lajos, a Gabonakutató Kft. tritikálé nemesítője biztosította a kísérletekhez.

A paprika (*Capsicum annuum* L.) izolált mikrospóra tenyésztés rendszerének kidolgozásához és fejlesztéséhez három magyar (‘Szegedi 80’, ‘Szegedi 178’ és ‘Remény’) és három spanyol (‘Jeromin’, ‘Jariza’ és ‘Jaranda’) fűszerpaprika fajtát használtunk. Az említett genotípusok fontos forrását képezik a hazai kutatásoknak és a hibrid nemesítési programoknak. A paprika alapanyagokat Dr. Somogyi György, osztályvezető (Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő Kht. Szegedi Kutatási Osztály) és munkatársai biztosították.

3. 2. A növényi alapanyag előállításának körülményei

Mindhárom faj izolált mikrospóra tenyésztési rendszerének fejlesztéséhez felhasznált donor növényeket félautomata Hensler üvegházban neveltük fel (automatizált hőmérsékletszabályozás, ventilláció és árnyékolás). Kivételt csak az őszi búzafajták képezték, melyeket a Gabonakutató Kft. Kecskés telepi tenyészkertjéből gyűjtöttük be.

A magról nevelt paprika palántákat egy, míg a kalászos növényeket három növény/polietilén tasakba ültettük (100 x 180 mm), amely 50-50 térfogatszázalékban összekevert tőzeg és homok keverékét tartalmazta. A növényeket természetes megvilágítás mellett neveltük fel. Az üvegházban a paprika növények számára 20-28 °C nappali és 15-19 °C éjszakai hőmérsékletet biztosítottunk, míg kalászosok esetében a nappali hőmérsékletet 20 °C, az éjszakai hőmérsékletet 16 °C alatt tartottuk. A donor növények tápanyag

utánpótlására Volldünger® (N:P:K:Mg/14:7:21:1 és 1 % mikroelem, úgymint B, Cu, Fe, Mn, Zn) műtrágyát használtunk, melyet kéthetente vízben feloldva (0,2 g/l) adagoltunk. A kalászos növényeket a donor hajtások begyűjtéséig tartottuk a nevelő edényekben. A paprika donor növényekről a bimbók begyűjtését folyamatosan végeztük a tenyészidő alatt.

3. 3. A növényi alapanyagok begyűjtése

A búza és tritikálé hajtásokat akkor gyűjtöttük be, amikor a kalászok középső részén lévő portokokban a mikrospórák középső és kései egysejtmagvas vakuólumos állapotúak voltak. Minden levelet eltávolítottunk a zászlóslevél kivételével. A donor hajtásokat csapvizet tartalmazó Erlenmeyer lombikba helyeztük, és polietilén zacskóval takartuk le, hogy magas páratartalmat biztosítsunk számukra. A donor hajtásokat két hétig 3-4 °C hőmérsékleten hideg kezeltük. Hideg előkezelés után, a donor kalászokat 20 percig sterileztük 2% nátrium-hipoklorit oldatban 2-3 csepp 'Tween 20' oldat jelenlétében. A kalászokat steril vízzel háromszor öblítettük le.

A paprika bimbók mérete, a portokok mérete és színe jó markere a mikrospórák fejlettségi állapotának. A bimbókat fejlettségi állapotuk alapján csoportosítottuk, hogy teszteljük a mikrospórák fejlettségi állapotának hatását az androgenezis indukciójára. A donor bimbókat a kalászokhoz hasonlóan sterileztük, majd steril vízzel háromszor öblítettük le *in vitro* körülmények között.

3. 4. A donor portokok előkezelése

A steril kalászokból (búza és tritikálé) 150-150 portokot izoláltunk 55 mm átmérőjű üveg Petri csészékbe, melyek 5 ml 0,3 M mannit oldatot és 200 mg/l antibiotikumot (cefotaxime) tartalmaztak. Az izolált portokokat 3 napig 32 °C hőmérsékleten sötétben előtenyésztettük. Az előkezelés során a hő stresszt (32 °C) és az éheztetést (0,3 M mannit oldat) kombinálva alkalmaztuk.

A sterilezett paprika bimbókból 20-25 portokot izoláltunk 55 mm átmérőjű üveg Petri csészébe, amelyek a fenti mennyiségű 0,3 M mannit oldatot és az antibiotikumot tartalmazták. A paprika portokok mikrospóráinak előtenyésztése sötét termosztátban 32 °C-on hét napig tartott.

3. 5. A mikrospórák izolálása előkezelt portokokból

A mikrospórák izolálására a macerálás kíméletes módszerét választottuk, a szuszpenziót szénhidrát grádiens centrifugálással tisztítottuk. Az izoláláskor lényeges különbség volt, hogy 21%-os maltóz (Sigma) oldat helyett 30%-os maltóz oldatot használtunk paprika mikrospórák izolálásakor.

Az izolálás fő lépései a következők:

1. Az izolált portokok előkezelését követően, a portokokat *in vitro* körülmények között egy steril üvegrúddal 150 µm-es szűrőn eldörzsöltük 0,3 M mannit oldatban.

2. A szuszpenziót steril, üveg centrifugacsövekbe pipettáztuk, és a csöveket 5 percig szobahőmérsékleten (22 ºC) centrifugáltuk 600 fordulat/perc sebességgel (d= 0,15 m).

3. A centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, és az összegyűjtött üledéket 2 ml 0,3 M mannit oldatban felvettük.

4. Ezt a szuszpenziót óvatosan rétegeztük 21%-os maltóz (paprika esetében 30%-os) oldat tetejére.

5. A centrifugacsöveket 600 fordulat/percen (d= 0,15 m) 22 °C-on 10 percig centrifugáltuk. Az élő mikrospórák jól elkülönülő fehér csíkban gyűltek össze a két oldat határán (0,3 M mannit oldat és 21/30%-os maltóz). Az összegyűjtött élő mikrospórákat 0,3 M mannit oldatot tartalmazó centrifugacsövekbe pipettáztuk, és 10 percig állni hagytuk.

6. A mikrospóra izolátumot szobahőmérsékleten (22 ºC) 600 fordulat/perc sebességgel (d= 0,15 m) 5 percig centrifugáltuk.

7. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk és az összegyűjtött mikrospórákat felvettük 1 ml indukciós tápoldatban.

8. Az izolált mikrospórák sűrűségét Bürker kamrával meghatároztuk és a végső sűrűséget 30 000 – 35 000 mikrospóra/ml sűrűségre állítottuk be mindhárom faj esetében.

3. 6. Az izolált mikrospórák tenyésztése

A mikrospórákat 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészékben tenyésztettük, amely 1,5 ml indukciós tápoldatot tartalmazott. A tenyészeteket sötétben, 28 °C hőmérsékleten tartottuk. A mikrospórák fejlődését és a mikrospóra eredetű kolóniák növekedését CK-2 Olympus inverz mikroszkóppal nyomon követtük.

Két mikrospóra tenyésztő tápoldat (A2 és CHB) és két portoktenyésztő alaptápoldat (W14 és P4) módosított változatát hasonlítottuk össze ’CY-45’ búza mikrospóra tenyészetben. A búza mikrospóra tenyésztés szakirodalmában leggyakrabban alkalmazott A2 (Touraev és mtsai 1996b) és CHB (Chu és mtsai 1990) tápoldatokat választottuk az összehasonlító kísérlethez, valamint a portoktenyészetből ismert W14 (Ouyang és mtsai 1989, Jia és mtsai 1994) és P4 (Ouyang és mtsai 1983) tápoldatok mikrospóra tenyésztési változatát (W14mi és P4-m) is elkészítettük. A tápoldatok csak makro-, mikroelem és vitamin összetételükben különböztek egymástól (1. táblázat). A módosított tápoldatok ugyanannyi mennyiségű maltózt (9%), glutamint (1000 mg/l), 2,4-D-t (0,5 mg/l) és kinetint (0,5 mg/l) tartalmaztak Ficoll® nélkül, minden tápoldat kémhatását azonos értékre állítottuk be (pH= 5,8).

A mikrospóra tenyésztés kritikus lépéseinek ellenőrzésekor és az őszi búza genotípusok androgenezisének teszteléséhez a W14 módosított változatát a W14mi tápoldatot alkalmaztuk (1. táblázat). A búza mikrospórákat ováriumokkal közösen tenyésztettük. Tíz búza ováriumot tettünk minden Petri csészébe. Az ovárium donor hajtásokat két nappal az antézis előtt gyűjtöttük be.

A tritikálé mikrospórákat 190-0 (1. táblázat) tápoldatban tenyésztettük ováriummal és ovárium nélkül (Pauk és mtsai 2000). A dajkatenyésztés hatását a tavaszi tritikálé genotípusokkal tanulmányoztuk, hét ováriumot tettünk minden dajkatenyészetbe.

A paprika mikrospórákat módosított W14 tápoldatban (W14mi) tenyésztettük, amelyet búza mikrospórák tenyésztésére is alkalmaztunk. A dajkatenyésztés és idegen fajú dajkatenyésztés hatásának teszteléséhez 7-7 paprika illetve búza ováriumot (’CY-45’ genotípus) tettünk minden tenyészetbe.

3. 7. Növényregenerálás

Egy hónappal a tenyészetek indítása után rendszeresen ellenőriztük a szövetstruktúrák méretét, és hetente egyszer regeneráló táptalajra helyeztük a megfelelő nagyságú emrioidokat. A mikrospóra eredetű struktúrák (embriók, embrioidok) regenerálását fényszobában 24 ºC hőmérsékleten, napi 16 órás megvilágítás és 50 $\mu mol \times m^{-2} \times s^{-1}$ fényerősség mellett végeztük.

1. táblázat Alkalmazott tenyésztő tápoldatok

Tápoldat összetevők	**W14mi** mg/l	**A2** mg/l	**CHB_3** mg/l	**P4-m** mg/l	**190-0** mg/l
KNO_3	2000	1415	1 415	1150	1000
$NH_4H_2PO_4$	380	-	-	-	-
$MgSO_4 \times 7H_2O$	200	93	93	125	200
$CaCl_2 \times 2H_2O$	140	83	83	-	-
K_2SO_4	700	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	232	232	100	200
KH_2PO_4	-	200	200	200	300
KCl	-	-	-	35	40
$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	-	-	-	100	100
$MnSO_4 \times 4H_2O$	8	5	5	-	8
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	3	1	5	-	3
H_3BO_3	3	1,5	5	-	3
KI	0,5	0,38	0,4	-	0,5
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025	0,0125	0,0125	-	-
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025	0,0125	0,0125	-	-
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,025	0,0125	0,0125	-	-
$FeSO_4 \times 7H_20$	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Na_2EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
2–Nikotinsav	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Piridoxin–HCl	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Thiamin–HCl	2	5	2,5	1	1
Mezo–inozit	-	50	300	-	100
L–Glicin	-	-	1	-	2
D–Biotin	-	-	0,25	-	-
Ca–pantotenát	-	-	0,25	-	-
Aszkorbinsav	-	-	0,5	-	-
L–Glutamin	1000	1000	1000	1000	-
Burg. kivonat	-	-	-	10 %	-
2,4–D	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Kinetin	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Maltóz	90 000	90 000	90 000	90 000	
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

3. 7. 1. A búza és tritikálé növénykék regenerálása

A legalább 2 mm nagyságot elérő búza és tritikálé mikrospóra tenyészet eredetű szövetstruktúrákat Gerlite-tel (2,8 g/l) szilárdított 190-2Cu regeneráló táptalajra helyeztük (2. táblázat), amely 0,5 mg/l $CuSO_4 \times 5H_2O$ kiegészítéssel készült (Zhuang és Jia 1983, Pauk és mtsai 1991, Purnhauser és Gyulai 1993). Néhány nappal a regeneráció kezdete után a regeneráló embrioidokon megjelentek az első levélkezdemények.

A zöld növénykéket néhány leveles korban üvegcsőbe tettük, melyek szintén regeneráló táptalajt tartalmaztak. Két-három héttel később a jól gyökeresedett növényeket kiültettük üvegházba, és polietilén tasakkal takartuk le az akklimatizáció alatt (kb. három nap).

3. 7. 2. A fűszerpaprika növények regenerálása

Amikor a paprika mikrospóra eredetű embrioidok elérték a 3-4 mm-es nagyságot, 8-10 embrioidot helyeztünk 55 mm átmérőjű R1 táptalajt (2. táblázat) tartalmazó Petri csészékbe (Dumas de Vaulx és mtsai 1981). A növénykék három héten belül regenerálódtak. A növénykéket hormonmentes MS táptalajt tartalmazó csövekbe helyeztük. A jól gyökeresedett növénykék ploidszintjét 3-4 leveles korukban meghatároztuk.

A diploid növényeket közvetlenül, a haploidokat kolchicin kezelés után ültettük ki az üvegházba. Az akklimatizációs periódus alatt (7 nap) polietilén tasakkal takartuk le a növényeket. A regeneránsokat egyéni izolátor alatt neveltük és öntermékenyítettük.

3. 8. A ploidia fok meghatározása

A paprika regeneránsok ploidia fokát áramlási citometriás vizsgálattal ellenőriztük. A vizsgálathoz PARTEC I áramlási citométert (Partec GmbH, Münster, Germany) használtunk nagynyomású higanylámpával (Osram HBO 100W/2). A sejtmagot Doležel és mtsai (1989) módszere szerint izoláltuk. A körülbelül 0,5 cm^2 méretű levélszegmenseket 1 ml LBO1 pufferbe helyeztük és éles borotvapengével felaprítottuk. A kapott szuszpenziót egy 30 µm átmérőjű Trics/TM membránon (Partec GmbH, Münster, Germany) átszűrtük. A sejtmagokat tartalmazó mintákat DAPI oldattal jelöltük. Minden minta DNS tartalmát három ismétlésben mértük meg. A kontroll mintákat a donor diploid paprika növények leveleiből készítettük (Gémes és mtsai 2006).

2. táblázat Alkalmazott regeneráló táptalajok

Táptalaj összetevők	**190-2Cu** mg/1	**R1** mg/l
KNO_3	1 000	2150
$(NH_4)_2SO_4$	200	34
$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	100	50
KH_2PO_4	300	142
$MgSO_4 \times 7H_2O$	200	412
NH_4NO_3	-	1238
$CaCl_2 \times 2H_2O$	-	313
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	-	38
KCl	40	7
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,85	27,85
Na_2EDTA	37,25	37,25
$MnSO_4 \times 4H_2O$	8	20
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	3	3
H_3BO_3	3	1,5
KI	0,5	0,33
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	-	0,1
L–Glicin	2	0,1
Thiamin–HCl	1	0,55
Piridoxin–HCl	0,5	5
2–Nikotinsav	0,5	0,75
Mezo–inozit	100	50
Ca–pantotenát	-	0,5
D–Biotin	-	0,005
NAA	0,5	-
Kinetin	0,5	0,5
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,5	0,01
$CoCl_2 \times 6H_2O$	-	0,01
Szacharóz	30 000	30 000
pH	5,8	6,1
Oxoid agar 5.0	-	6 800
Gelrite	2 800	-

3. 9. A kromoszóma duplikáció paprikában

Az áramlási citometriás módszer alapján haploidnak mért növénykéket hormonmentes MS táptalajra helyeztük hat napra, mely 400 mg/l kolchicint tartalmazott. A kezelést követően a növénykék gyökerét 30 percig folyó csapvízben mostuk, majd a növényeket üvegházba ültettük ki. A kolchicin kezelés hatását a paprika növények bogyóterméseinek fertilitása alapján ellenőriztük.

3. 10. Citológiai és szövettani vizsgálatok

Az izolált mikrospórák életképességét és a legelső sejtosztódásokat fluoreszcein-diacetát (FDA) festéssel ellenőriztük (Heslop-Harrison és Heslop-Harrison 1970). A vizsgálatok az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében Dr. Fehér Attila és Dr. Ötvös Krisztina segítségével történtek.

A mikrospóra tenyészet eredetű embrioidokat szövettani elemzéseknek vetettük alá. A vizsgálatokat az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Növényszervezettani Tanszékén Dr. Kristóf Zoltán és Dr. Vági Pál végezték el.

3. 11. A tritikálé DH törzsek variabilitásának vizsgálata

Öt tavaszi tritikálé genotípus nyolc-nyolc DH törzsét szántóföldi körülmények között szaporítottuk. Hat tulajdonságot tanulmányoztunk a DH_3 generációban lévő DH törzseken (növénymagasság, kalászhossz, ezerszemtömeg, szemkeménység, fehérjetartalom, és hamutartalom). A növénymagasság és kalászhossz méréseket tíz ismétlésben, a többi tulajdonság mérését legalább három ismétlésben végeztük el.

A DH törzsek három minőségi tulajdonságának (szemkeménység, fehérjetartalom, hamutartalom) mérését a Gabonakutató Non-profit Közhasznú Kft. Lisztlaboratóriumának közreműködésével végeztük el. A szemkeménység mérése Morris és mtsai (1999), míg a fehérje tartalom meghatározása Takács és Pokorny (2004) módszere szerint történt. A hamutartalmat az ICC 104/1 szabvány szerint mértük.

3. 12. Statisztikai analízis

A kísérleteket legalább három ismétlésben végeztük el. A statisztikai elemzések a Microsoft® Excel 2002 szoftver segítségével készültek el.

Egytényezős variancia analízist alkalmaztunk az alaptápoldatok hatásának ellenőrzésekor búza izolált mikrospóra tenyészetben, valamint a genotípus hatás tesztelésekor búza, tritikálé és paprika mikrospóra tenyészetben. Az exogén hormonok tesztelésekor egytényezős variancia analízist és kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Kétmintás t-próbával teszteltük a fejlettségi állapot hatását paprika mikrospóra tenyészetben.

A tritikálé DH törzsek tulajdonságainak (növénymagasság, kalászhossz, ezerszemtömeg, szemkeménység, fehérjetartalom és hamutartalom) összehasonlítására az egytényezős variancia analízis egy változatát alkalmaztuk, ahol az egyes DH törzseket kezelésnek, a 8 DH törzsből és a kontrollból álló populációkat kezeléscsoportnak tekintettük. Az ’AT314’ és ’EMBR17/S2001’ esetében a csoportátlagot használtuk a kontroll helyett.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. Búza izolált mikrospóra tenyésztés

Búza mikrospóra tenyésztési kísérleteinkben a ’CY-45’ genotípussal ellenőriztük az izolált búza mikrospóra tenyésztés kritikus lépéseit, majd két-két mikrospóra- illetve portoktenyésztéshez alkalmazott alaptápoldat hatását hasonlítottuk össze. Több hazai genotípus válaszadó képességét vizsgáltuk izolált mikrospóra tenyészetben.

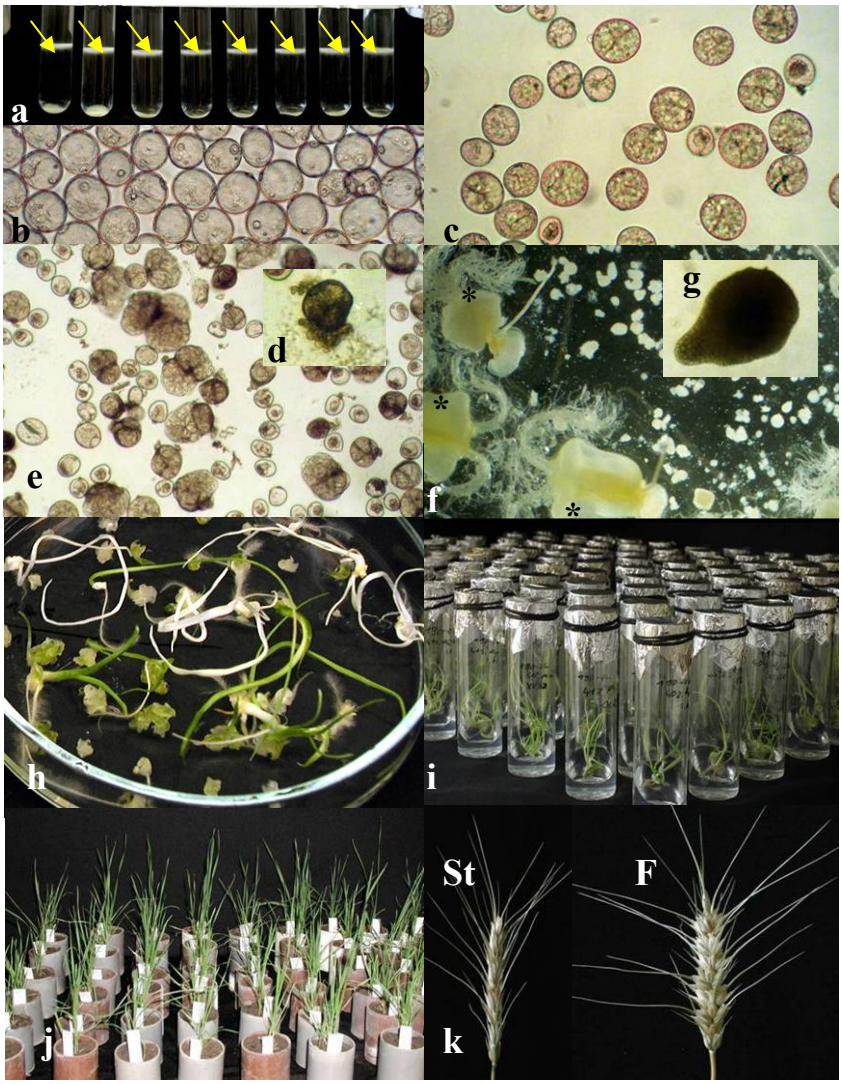
4. 1. 1. Búza izolált mikrospóráinak tenyésztése

A búza mikrospóra tenyésztés legkritikusabb lépéseit a ’CY-45’ tavaszi búza genotípus tenyésztésével követtük nyomon. A mikrospórák ideális fejlettségi állapota az első fontos lépés az androgenezis indukciójában. A begyűjtött donor hajtások középső és kései egysejtmagvas vakuólumos állapotú mikrospórákat tartalmaztak a kalászok középső részén.

Hideg kezelés után 0,3 M mannit oldatban három napig 32 °C-on előtenyésztettük a mikrospórákat. Az ozmotikus előkezelés és éheztetés megemelte az életképes izolált mikrospórák mennyiségét. A stressz előkezelések gátolták a gametofita fejlődésmenetet és kiváltották a sporofita fejlődési utat a mikrospórákban. A sikeres izolálást követően a mikrospórák kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas állapotban voltak a mikrospóra tenyésztés első napján (1.a és 1.b ábra).

Az első sejtosztódásokat a tenyésztés harmadik, negyedik napján figyeltük meg. A mikrospórák falán belüli leánysejtek fejlődése mikroszkóp alatt nyomon követhető volt a tenyésztés első hetétől (1.c ábra). Néhány struktúra elpusztult, amikor kiszabadultak a mikrospóra falából (1.d ábra), de jelentős mennyiségű soksejtes struktúra alakult ki a tenyésztés harmadik hetére (1.e ábra). Izolált mikrospóra tenyészetben az ovárium dajkatenyésztés kulcsfontosságú volt, amely megvédte a fejlődő struktúrákat a pusztulástól (1.f ábra). Egy hónap együtt tenyésztést követően mikrospóra eredetű embrioidok fejlődtek a folyékony tápoldatban. Az 1.g ábra szemléltet egy búza mikrospóra eredetű embriót.

Az indukált embrioidokat szilárd regeneráló táptalajra helyeztük, ahol zöld és albínó növénykék regenerálódtak két héten belül (1.h ábra). A zöld növénykéket egyedileg elkülönítve üvegcsövekben gyökereztettük (1.i ábra). A meggyökeresedett növénykéket üvegházba kiültettük és az akklimatizáció után érésig neveltük (1.j ábra). A betakarított kalászok között steril és fertilis kalászokat különböztettünk meg (1.k ábra).



1. ábra A búza mikrospóra tenyésztés lépései: (a) Az élő mikrospórák fehér csíkban (sárga nyilak) gyűltek össze a két oldat határán (0,3 M mannit oldat, 21% maltóz). (b) Ideális állapotú búza mikrospórák izolálás után (kései egysejtmagvas, korai kétsejtmagvas). (c) Több leánysejtes mikrospórák voltak megfigyelhetők a tenyésztés hetedik napján. (d) A mikrospóra falából kiszabaduló struktúrák egy része abortált a tenyésztés második hetében. (e) A 14 napos struktúrák többsége intenzíven növekedett. (f) Proembrioidok láthatók 21 napos búza mikrospórák ovárium (*) dajkatenyészetében. (g) Mikrospóra eredetű búza embrió. (h) A mikrospóra eredetű embriókból zöld és albínó növénykék hajtottak ki a regeneráló táptalajon. (i) Mikrospóra eredetű zöld növénykék egyedileg elkülönítve üvegcsövekben gyökeresedtek. (j) A zöld növények alkalmazkodtak az üvegházi körülményekhez. (k) Fertilis (F) és steril (St) kalászokat figyeltünk meg az akklimatizálódott búza növények között.

4. 1. 2. Az alaptápoldat hatása a búza mikrospórák tenyésztésére

Négy különböző alaptápoldatot (A2, CHB3, W14mi és P4-m) hasonlítottunk össze a ’CY-45’ genotípus mikrospóra tenyészeteiben. Az embrioidok, az albínó és a zöld növények száma alapján szignifikáns különbségeket mutattunk ki a tápoldatok hatása között (3. táblázat). Az embrioidok száma szignifikánsan magasabb volt a W14, A2 és CHB3 tápoldatokban, mint a P-4m tápoldatban.

A legtöbb albínó növénykét a W14mi, A2 és CHB3 tápoldatokban fejlődött embriókból regeneráltuk. A W14mi, A2 és P4-m tápoldatban fejlődött embriókból szignifikánsan több zöld növény regenerálódott, mint a CHB3 tápoldat eredetű embriókból.

Összesítve: a tenyészetekben fejlődött embrioidok száma és a regenerált zöld növények száma alapján a legjobb eredményeket a W14mi és A2 tápoldatokkal értük el. A két tápoldat között nem volt szignifikáns különbség. A további kísérletek során a W14mi tápoldatot alkalmaztuk, amellyel a legmagasabb embriószámot és zöld növény számot értük el tenyészetenként (3. táblázat).

3. táblázat Négy különböző tápoldat hatása az előállított embriók és embrioidok számára és a növényregenerálásra ’CY-45’ genotípus izolált mikrospóra tenyészetében. Az abc azonos betűi szignifikánsan nem különböző értékeket jelölnek az oszlopokon belül 95%-os megbízhatóság mellett.

Tápoldat	Embriók és embrioidok száma/ Petri csésze	Albínó növénykék száma/Petri csésze	Zöld növénykék száma/Petri csésze
W14mi	413,50 a	99,25 a	17,75 a
A2	361,25 a	85,25 a	14,00 a
CHB3	300,00 a	97,50 a	9,00 b
P4-m	66,25 b	43,00 b	11,75 a

A meggyökeresedett növénykéket üvegházba ültettük ki, ahol jól akklimatizálódtak. Kolchicin kezelést nem alkalmaztunk, a spontán rediploidizáció mértékét magfogással ellenőriztük. A kiültetett 120 növény 78,3%-áról (94 DH törzs) tudtunk érett szemeket betakarítani.

4. 1. 3. Izolált búza mikrospórák tenyésztése hazai búzafajták felhasználásával

A fent ismertetett mikrospóra tenyésztési rendszer hatékonyságát ellenőriztük kilenc hazai őszi búza fajtával és egy tavaszi búza genotípussal: ’GK Mini Manó’, ’GK Garaboly’, ’GK Hargita’, ’GK Csongrád’, ’GK Délibáb’, ’GK Élet’, ’GK Kata’, ’GK Bán’, ’Mv Palotás’ őszi búza és a ’CY-45’ tavaszi búza genotípus.

Minden genotípus esetében sikeresen indukáltuk az androgenezist izolált búza mikrospórák ovárium dajkatenyészetében. A mikrospórák intenzíven fejlődtek és fajtánként eltérő mennyiségű embrioid (31,75 – 413,5 embrioid/Petri csésze) fejlődött a tenyészetekben. A legjobb eredményeket a ’CY-45’ (413,5 embrioid/Petri csésze), ’GK Élet’ (289,25 embrioid/Petri csésze), ’GK Csongrád’ (224 embrioid/Petri csésze) és a ’GK Mini Manó’ (176,75 embrioid/Petri csésze) genotípusokkal értük el, de a többi fajta esetében is számos embrioid fejlődött (4. táblázat).

Az embrioidokat regeneráló táptalajra helyeztük és ellenőriztük a regenerációs hatékonyságot. Minden genotípusból regeneráltunk növénykéket. A legtöbb növényke a ’GK Élet’ (117,75 növényke/Petri csésze) és a ’CY-45’ genotípus (117 növényke/Petri csésze) mikrospóra eredetű struktúráiból regenerálódott. A növényregenerációs hatékonyság még jelentős volt a ’GK Mini Manó’ (46,75 növényke/Petri csésze), ’GK Délibáb’ (30,25 növényke/Petri csésze) és ’GK Csongrád’ (27 növényke/Petri csésze) esetében.

A regenerált növénykék többsége albinó volt (fajtától függően 60,33% – 100%). Hét genotípusból regeneráltunk zöld növénykéket (0,25 – 17,75 zöldnövényke/Petri csésze), míg három fajta (’GK Kata’, ’GK Bán’, ’Mv Palotás’) csak albinó növénykéket adott (4. táblázat). A ’CY-45’ genotípus (17,75 zöld növényke/Petri csésze) és a ’GK Délibáb’ (12 zöld növényke/Petri csésze) búzafajta esetében volt a legnagyobb a regenerált zöld növénykék száma tenyészetenként.

A portoktenyészet eredetű ’GK Délibáb’ és ’GK Bán’ fajta tenyészeteiben az embrioidok száma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a ’CY-45’ genotípus vagy több klasszikus nemesítésű fajta (’GK Élet’, ’GK Csongrád’ és ’GK Mini Manó’) mikrospóra tenyészetében (4. táblázat). A ’GK Délibáb’ fajta esetében volt a legmagasabb a zöld növények aránya, míg a ’GK Bán’ genotípusból csak albinó növénykéket tudtunk regenerálni. Tehát a portoktenyészetből származó genotípusok válaszadó képessége között is szignifikáns különbségek voltak, és válaszadó képességük nem emelkedett ki a hagyományos módszerrel nemesített fajták közül.

4. táblázat Néhány hazai búza genotípus válaszadó képessége izolált mikrospóra tenyészetben. A különböző betűk szignifikánsan különböző értékeket jelölnek az egyes oszlopokon belül 95%-os megbízhatóság mellett.

Genotípus	Embrioidok száma/ Petri csésze	Növénykék száma/ Petri csésze	Albínó növénykék száma/ Petri csésze	Zöld növénykék száma/ Petri csésze	Növény-regenerálás (%)	Albínó növénykék aránya (%)	Zöld növénykék aránya (%)
’CY-45’	413,50 a	117,00 a	99,25 a	17,75 a	28,29	84,80	15,20
’GK Mini Manó’	176,75 c	46,75 b	46,50 b	0,25 c	26,45	99,50	0,50
’GK Garaboly’	100,25 d	20,25 c	15,75 c	4,50 c	20,20	77,78	22,22
’GK Hargita’	88,75 d	21,50 c	20,75 c	0,75 c	24,23	96,50	3,50
’GK Csongrád’	224,00 bc	27,00 bc	24,25 bc	2,75 c	12,05	89,80	10,20
’GK Délibáb’	98,75 d	30,25 bc	18,25 c	12,00 b	30,63	60,33	39,67
’GK Élet’	289,25 b	117,75 a	117,00 a	0,75 c	40,71	99,36	0,64
’GK Kata’	65,00 d	3,00 c	3,00 c	0,00 c	4,60	100,00	0,00
’GK Bán’	31,75 d	8,00 c	8,00 c	0,00 c	25,20	100,00	0,00
’Mv Palotás’	72,75 d	4,50 c	4,50 c	0,00 c	6,20	100,00	0,00
$SzD_{5\%}$=	69,98	23,10	23,10	5,15			

Növényregenerálás = (növénykék száma/embrioidok száma) × 100
Albínó növénykék aránya = (albínó növénykék száma/növénykék száma) × 100
Zöld növénykék aránya = (zöld növénykék száma/növénykék száma) × 100

4. 2. A tritikálé izolált mikrospórák tenyésztése

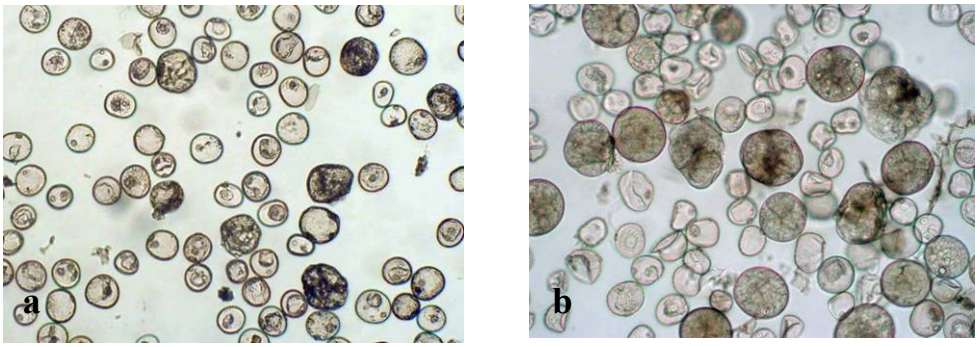
A tritikálé izolált mikrospóra tenyésztés fejlesztése során teszteltük a dajkatenyésztés hatásának jelentőségét. Hat tavaszi tritikálé genotípus válaszadó képességét hasonlítottuk össze izolált mikrospóra tenyészetben.

A hat genotípus közül ötből DH törzseket állítottunk elő. A DH_3 generációban lévő törzsek hat tulajdonsága (növénymagasság, kalászhossz, ezerszemtömeg, szemkeménység, fehérjetartalom és hamutartalom) alapján ellenőriztük az egyes DH törzsek és kontrolljaik közötti különbségeket.

4. 2. 1. Az ovárium dajkatenyésztés hatása tritikálé izolált mikrospóra tenyészetben

Az ovárium dajkatenyésztés hatását tanulmányoztuk három tavaszi tritikálé fajta (’Kargo’, ’GK Gabo’, ’Rex’), és három populáció (’AT314’, ’AT322’, ’EMBR17⁄S2001’) izolált mikrospóra tenyészetében. A mikrospórák izolálás után kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas állapotban voltak. Három nappal később a vakuólumok már nem voltak láthatóak. Az első sejtosztódásokat a tenyésztés negyedik - ötödik napján figyeltük meg minden genotípus esetében.

Ovárium hiányában a leánysejtek fejlődése megállt a tenyésztés második hetében, soksejtes struktúrákat nem figyeltünk meg a tenyészetekben (2.a ábra). A struktúrák fejlődése fenntartható volt ovárium dajkatenyésztés alkalmazásával (2.b ábra). A mikrospóra eredetű struktúrák gyorsan fejlődtek és egy hónappal később embrioidokat kaptunk a tenyészetekben.



2. ábra (a) A tritikálé mikrospóra eredetű struktúrák fejlődése megállt a tenyésztés második hetében, amikor nem alkalmaztunk ovárium dajkatenyésztést. (b) Ovárium dajkatenyészetben a struktúrák fejlődése folytatódott a második héten.

A mikrospóra eredetű embrioidok száma genotípusonként eltérő volt. A tenyészetenkénti legnagyobb embrioid számot az ’AT314’ (347 embrioid/Petri csésze) és ’AT322’ (344 embrioid/Petri csésze) genotípusok mikrospóra tenyészeteivel értük el. A tenyésztés második hónapját követően a struktúrákat regeneráló táptalajon számolás nélkül kiszélesztettük. A ’Rex’ fajta esetében figyeltük meg a legalacsonyabb embrioid számot (33 embrioid/Petri csésze). A hat genotípus átlagában az embrioidok száma 224,7 volt Petri csészénként (5. táblázat). Az embrioidok között néhány jól fejlett mikrospóra eredetű embrió struktúrája a szomatikus embriók struktúrájára emlékeztetett (3.a ábra).

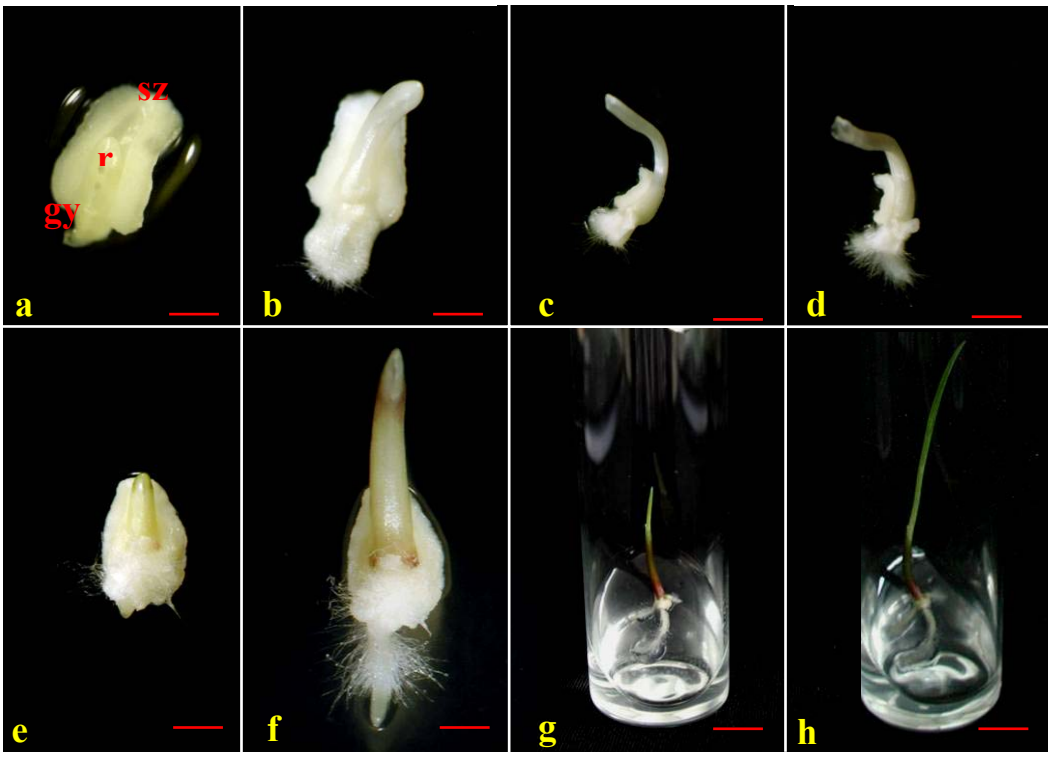
Minden genotípus esetében az embriókból zöld és albínó növénykék jöttek létre a regenerációs periódus első két hetében (3.a-3.h ábra). A legnagyobb zöld növényregenerálási arányt az ’AT314’ genotípus mikrospóra tenyészetével értük el (14 zöld növényke/Petri csésze), míg a ’Rex’ fajta embrioidjaiból csak 0,7 zöld növényke regenerálódott Petri csészénként.

A regenerálási időszakot (4 hét) követően a jól gyökeresedett növénykéket üvegházba kiültettük, ahol akklimatizálódtak. A spontán diploidok aránya genotípustól függően 41,46% és 82,14% között változott, kivéve a ’Rex’ fajtát, ahol a kettő akklimatizálódott növény steril kalászokat hozott (5. táblázat). A spontán rediploidizáció átlaga 60,59% volt, genotípusonként eltérő számú, 9-34 DH törzset neveltünk fel. Összesen 103 izolált mikrospóra tenyészet eredetű DH törzset állítottunk elő. A DH törzsek közül a legtöbb szemtermést hozó 8-8 törzset választottuk ki genotípusonként, hogy elegendő mennyiségű szem legyen a DH törzsek tulajdonságainak ellenőrzéséhez szántóföldi körülmények között.

5. táblázat Hat tavaszi tritikálé genotípus válaszadó képessége izolált mikrospóra tenyészetben. A különböző betűk szignifikánsan különböző genotípusokat jelölnek minden oszlopban (embrioidok: $SzD_{5\%}$=46,93; albínó növénykék: $SzD_{5\%}$=8,53; zöld növénykék: $SzD_{5\%}$=5,55).

Genotípus	Embrioidok száma / Petri csésze	Albínó növénykék száma / Petri csésze	Zöld növénykék száma / Petri csésze	Kiültetett növények száma (összesen)	Spontán diploidok száma (összesen)	Spontán rediploidizáció (%)
’Kargo’	143,20 d	22,20 a	6,5 b	39	20	51,30
’GK Gabo’	289,00 b	0,00 b	9,3 ab	28	23	82,14
’AT314’	347,00* a	0,70 b	14,0 a	42	34	80,95
’AT322’	344,00* a	3,00 b	6,0 bc	18	9	50,00
’EMBR17/S2001’	192,00 c	23,75 a	10,25 ab	41	17	41,46
’Rex’	33,00 e	0,30 b	0,7 c	2	0	-
Átlag	224,70	8,33	7,79	-	-	-
Összesen	-	-	-	170	103	60,59

*Nyolc hét után a fejlődött struktúrákat számolás nélkül regeneráló táptalajra szélesztettük ki.



3. ábra A mikrospóra eredetű embriók növényregenerálása. A regeneráló táptalajra helyezett embrió egy hét alatt albínó növénykét regenerált (a, 1. nap, b, 3. nap, c, 5. nap és d, 6. nap). Egy zöld növényke regenerálása mikrospóra eredetű embrióból (zöld: e, 3. nap, f, 4. nap, g, 6. nap és h, 9. nap). A mikrospóra eredetű embrión (a ábra) felismerhető a sziklevél (sz), rügyecske (r) és gyököcske (gy). Méretvonal = 1 mm (a, b, e és f); 3 mm (c és d); 1 cm (g és h).

4. 2. 2. A tritikálé DH törzsek variabilitásának vizsgálata

Két tavaszi tritikálé fajta ('GK Gabo', 'Kargo') és három populáció ('AT314', 'AT322', 'EMBR17/S2001') nyolc-nyolc DH eredetű törzsének és kontrolljaiknak (szuperelit) hat tulajdonságát (növénymagasság, kalászhossz, ezerszemtömeg, szemkeménység, fehérjetartalom és hamutartalom) hasonlítottuk össze. A DH törzsekből képzett csoportátlagok alapján hasonlítottuk össze az egyes genotípusokat. Szignifikáns különbségeket találtunk a genotípusok között mind a hat tulajdonság alapján, és a legtöbb esetben a DH törzsek között is az egyes genotípusokon belül, az alábbi pontok szerint.

4. 2. 2. 1. A DH törzsek növénymagasságának összehasonlítása

A különböző genetikai hátterű tritikálé genotípusok adatai alapján a ’Gabo’ és az ’AT314’ genotípus volt szignifikánsan a legmagasabb, míg a ’Kargo’ a legalacsonyabb. Az egyes genotípusokon belül is szignifikánsan eltérő magasságúak voltak a DH törzsek, és a kontrollhoz képest is jelentős eltérést mutatott néhány törzs. A legnagyobb különbségeket a ’Kargo’ genotípus esetében mértük (6. táblázat), míg az ’AT322’ genotípus DH törzsei között csak két szignifikánsan különböző csoportot tudtunk elkülöníteni.

6. táblázat Öt tavaszi tritikálé genotípusból előállított DH törzsek növénymagasságának (cm) összehasonlítása. A nyolc-nyolc DH törzs magasságának átlagából képzett csoportátlag jellemzi a genotípusok magasságát. A csoportátlagok közötti szignifikáns különbség 95%-os megbízhatóság mellett 1,7 ($SzD_{5\%}$= 1,7), míg a DH törzsek között 5,11 volt ($SzD_{5\%}$= 5,11). Az abc különböző nagy betűi jelzik a szignifikánsan eltérő csoportátlagokat, az abc különböző kis betűi pedig minden egyes csoporton belül a szignifikánsan különböző DH törzseket.

Gen.	’Gabo’	’Kargo’	’AT314’	’AT322’	’EMBR17/S2001’
DH1	76,6 bc	66,6 c	68,6 c	73,6 b	80,3 b
DH2	78,2 bc	55,7 d	86,9 a	76,0 b	66,7 d
DH3	80,1 b	61,5 cd	80,6 b	81,0 ab	73,1 c
DH4	82,3 b	58,8 d	83,2 a	80,3 ab	84,8 ab
DH5	90,0 a	61,6 cd	80,7 b	79,8 ab	66,7 d
DH6	84,9 ab	84,6 a	81,9 a	82,2 a	75,2 bc
DH7	82,5 b	76,2 b	86,9 a	78,4 ab	72,9 c
DH8	87,2 ab	83,9 a	85,7 a	78,4 ab	89,4 a
Kontroll	73,5 c	76,3 b	81,8 a	74,4 b	76,1 bc
Cs. átl.	82,7 A	68,6 D	81,8 A	78,7 B	76,1 C

4. 2. 2. 2. A tritikálé DH törzsek kalászhosszának statisztikai elemzése

Az öt genotípus kalászhosszúsága között kettő-kettő szignifikánsan eltérő értéket mutatott. A DH törzsek csoportátlaga alapján a ’Gabo’ és ’AT314’ kalászainak hosszúsága 95%-os megbízhatóság mellett felülmúlta a ’Kargo’ és az ’AT322’ genotípus kalászainak hosszúságát. Az ’EMBR17/S2001’ genotípus kalászhossza statisztikailag nem különbözött a többi négy genotípustól (7. táblázat).

Az egyes genotípusokon belül szignifikánsan eltérő kalászhosszúságúak voltak a DH törzsek, a kontrolljukhoz viszonyítva is eltérést mutattak. A ’Gabo’, a ’Kargo’ és az ’AT322’ genotípus DH törzsei között mértük a legnagyobb genetikai variabilitást. Itt három szignifikánsan eltérő csoport volt elkülöníthető, míg a többi genotípus esetében csak kettő (7. táblázat). Az ’EMBR17/S2001’ genotípusok esetében egy szignifikánsan nagyobb kalászhosszúságú törzset azonosítottunk. Az ’AT314’ genotípus egy DH törzse öt másiknál és a kontrollnál volt szignifikánsan rövidebb.

7. táblázat Öt tavaszi tritikálé genotípusból előállított DH törzsek kalászhosszúságának (cm) összehasonlítása. A nyolc DH törzs kalászhosszának átlagából képzett csoportátlag jellemzi a genotípus kalászhosszúságát. A csoportátlagok közötti szignifikáns különbség 95%-os megbízhatóság mellett 0,35 ($SzD_{5\%}$=0,35), míg a DH törzsek között 1,06 volt ($SzD_{5\%}$= 1,06). Az abc különböző nagy betűi jelzik a szignifikánsan eltérő csoportátlagokat, az abc különböző kis betűi pedig minden egyes csoporton belül a szignifikánsan különböző DH törzseket.

Gen.	’Gabo’	’Kargo’	’AT314’	’AT322’	’EMBR17/S2001’
DH1	10,3 b	10,5 b	10,4 a	9,5 b	10,1 ab
DH2	10,4 ab	9,4 c	10,4 a	10,3 ab	10,6 a
DH3	9,3 bc	9,3 c	10,5 a	10,2 ab	10,3 ab
DH4	10,2 bc	10,6 ab	10,3 a	9,6 b	9,0 b
DH5	9,2 c	9,2 c	10,0 ab	10,2 ab	9,8 ab
DH6	9,7 bc	8,6 c	9,7 ab	8,4 c	9,4 b
DH7	9,1 c	9,9 bc	10,1 a	8,3 c	8,9 b
DH8	11,4 a	9,2 c	9,0 b	9,7 b	9,5 b
Kontroll	9,6 bc	11,7 a	10,1 a	10,8 a	9,7 ab
Cs. átl.	10,0 A	9,6 B	10,0 A	9,5 B	9,7 AB

4. 2. 2. 3. Az ezerszemtömeg összehasonlítása tritikálé DH törzsek között

A DH törzsekből képzett öt tritikálé genotípus ezerszemtömege három statisztikailag elkülöníthető csoportba volt sorolható. Az ’AT322’ genotípus ezerszemtömege volt a legmagasabb, míg a ’Gabo’ genotípusé a legalacsonyabb (8. táblázat).

Az egyes genotípusokon belül a DH törzsek ezerszemtömege szignifikáns különbséget mutatott egymáshoz és a kontrollhoz képest. A vizsgált genotípusok esetében kisebb mértékű volt a genetikai variabilitás. Az egyes genotípusokon belül csak két statisztikailag elkülönülő szintet (a és b) találtunk (8. táblázat). A ’Gabo’ genotípus egyik DH törzsének (DH5) ezerszemtömege szignifikánsan magasabb volt a kontrollnál. A ’Kargo’ DH1 törzs hat másik ’Kargo’ DH törzs ezerszemtömegét múlta felül szignifikánsan, és az ’AT314’ genotípus esetében is csak egy törzs (DH7) múlta felül három másik DH törzs ezerszemtömegét. Az ’AT322’ genotípus három DH törzsének volt szignifikánsan nagyobb az ezerszemtömege, mint a kontrollé.

8. táblázat Öt tavaszi tritikálé genotípusból előállított DH törzsek ezerszemtömegének (g) összehasonlítása. A nyolc DH törzs ezerszemtömegének átlagából képzett csoportátlag jellemzi a genotípus ezerszemtömegét. A csoport átlagok közötti szignifikáns különbség 95%-os megbízhatóság mellett 1,83 ($SzD_{5\%}$= 1,83), míg a DH törzsek között 5,5 volt ($SzD_{5\%}$= 5,5). Az abc különböző nagy betűi jelzik a szignifikánsan eltérő csoportátlagokat, az abc különböző kis betűi pedig minden egyes csoporton belül a szignifikánsan különböző DH törzseket.

Gen.	’Gabo’	’Kargo’	’AT314’	’AT322’	’EMBR17/S2001’
DH1	38,5 ab	46,7 a	37,2 b	38,6 b	38,5 ab
DH2	37,9 ab	40,8 b	37,6 b	43,4 ab	39,2 ab
DH3	37,7 ab	36,0 b	42,5 ab	40,2 b	35,8 b
DH4	37,9 ab	38,6 b	41,2 ab	46,1 a	38,3 b
DH5	40,6 a	44,5 ab	42,7 ab	45,5 ab	39,2 ab
DH6	39,8 ab	39,7 b	38,6 b	46,9 a	44,0 a
DH7	37,0 ab	37,2 b	44,5 a	45,7 ab	43,4 ab
DH8	37,1 ab	39,0 b	42,9 ab	46,0 a	43,8 ab
Kontroll	34,9 b	45,6 ab	40,9 ab	38,4 b	40,3 ab
Cs. átl.	38,3 C	40,3 B	40,9 B	44,1 A	40,3 B

4. 2. 2. 4. A tritikálé DH törzsek szemkeménységének vizsgálata

A vizsgált genotípusok szemkeménységéről elmondható, hogy általában puhaszeműek voltak. Az ’Embr17/S2001’ genotípus szemkeménysége szignifikánsan magasabb volt, mint a többi genotípusé (9. táblázat). A legalacsonyabb szemkeménység értéket az ’AT322’ genotípus és a ’Gabo’ fajta DH törzsei érték el.

Nem volt szignifikánsan kimutatható különbség az ’AT322’ genotípus DH törzseinek szemkeménysége között egymáshoz és a kontrollhoz képest sem. A ’Kargo’ genotípus DH törzsei között három szignifikánsan különböző csoportot mértünk (a, b és c szint). Az ’AT314’ genotípus DH8 törzse szignifikánsan magasabb szemkeménységet mutatott, mint a DH2 és DH5 törzsek. Az ’EMBR17/S2001’ DH8 törzsének szemkeménysége 95%-os megbízhatóság mellett magasabb volt, mint két másik DH törzsé (DH3 és DH4). A ’Gabo’ DH2 és DH4 törzsének szemkeménysége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a ’Gabo’ DH5 törzsé (9. táblázat).

9. táblázat Öt tavaszi tritikálé genotípusból előállított DH törzsek szemkeménységének összehasonlítása. A nyolc DH törzs átlagából képzett csoportátlag jellemzi a genotípus szemkeménységét. A genotípusok közötti szignifikáns különbség 95%-os megbízhatóság mellett 2,0569 ($SzD_{5\%}$=2,0569), míg a DH vonalak között 6,1706 volt ($SzD_{5\%}$= 6,1706). Az abc különböző nagy betűi jelzik a szignifikánsan eltérő csoportátlagokat, az abc különböző kis betűi pedig minden egyes csoporton belül a szignifikánsan különböző DH törzseket.

Gen.	’Gabo’	’Kargo’	’AT314’	’AT322’	’EMBR17/S2001’
DH1	37,0667 ab	35,8000 c	39,5667 ab	38,4667 a	47,9000 ab
DH2	31,3000 b	41,4000 bc	36,4333 b	39,0000 a	47,5000 ab
DH3	34,8000 ab	38,5667 bc	37,6333 ab	35,2667 a	43,3000 b
DH4	34,4333 b	37,5000 bc	37,3667 ab	34,7000 a	40,9667 b
DH5	40,6333 a	56,1667 a	32,9333 b	35,9667 a	49,1000 ab
DH6	37,5000 ab	37,5333 bc	42,8667 ab	38,6667 a	47,7667 ab
DH7	39,4000 ab	42,0667 b	42,6000 ab	32,8333 a	48,1000 ab
DH8	40,0667 ab	41,2905 bc	43,2000 a	38,1000 a	52,7667 a
Kontroll	36,9000 ab	38,9000 bc	39,0750 ab	34,5300 a	47,1750 ab
Cs. átl.	36,9000 D	41,2905 B	39,0750 C	36,6250 D	47,1750 A

4. 2. 2. 5. A fehérjetartalom statisztikai vizsgálata tritikálé DH törzseken

A DH törzsek átlagából képzett öt csoportátlag fehérjetartalma között szignifikáns különbséget mutattunk ki. A legnagyobb fehérjetartalma az ’EMBR17/S2001’ genotípusnak volt, amíg az ’AT322’ genotípus 8 DH törzsénél mértük a legalacsonyabb fehérjetartalmat (10. táblázat).

A ’Gabo’ és az ’AT322’ genotípus estében három szignifikánsan eltérő csoportba sorolhatók a DH törzsek. Az ’EMBR17/S2001’ genotípus DH8 törzse szignifikánsan több fehérjét tartalmazott, mint másik hat törzs (DH1, DH3, DH4, DH5, DH6 és DH7). A ’Kargo’ genotípus kettő DH törzse tartalmazott kevesebb fehérjét, mint a többi DH törzs, illetve a kontroll (10. táblázat). Egy ’AT314’ törzs (DH3) szignifikánsan több fehérjét tartalmazott, mint másik három törzs (DH4, DH7 és DH8).

10. táblázat Öt tavaszi tritikálé genotípusból előállított DH törzsek fehérje tartalmának (%) összehasonlítása. A nyolc DH törzs fehérjetartalmának átlagából képzett csoportátlag jellemzi a genotípus fehérjetartalmát. A csoportátlagok közötti szignifikáns különbség 95%-os megbízhatóság mellett 0,2144 ($SzD_{5\%}$=0,2144), míg a DH törzsek között 0,6433 volt ($SzD_{5\%}$= 0,6433). Az abc különböző nagy betűi jelzik a szignifikánsan eltérő csoportátlagokat, az abc különböző kis betűi pedig minden egyes csoporton belül a szignifikánsan különböző DH törzseket.

Gen.	’Gabo’	’Kargo’	’AT314’	’AT322’	’EMBR17/S2001’
DH1	13,6000 a	12,8000 a	12,8667 ab	12,6333 bc	12,8667 b
DH2	12,1667 c	12,9667 a	12,6333 ab	11,4000 bc	13,2500 ab
DH3	12,2667 c	11,8333 b	13,2000 a	12,4667 bc	12,7667 b
DH4	12,8000 b	12,8667 a	12,4333 b	12,1000 c	12,8000 b
DH5	12,6000 b	12,9333 a	12,6333 ab	11,7333 c	12,8000 b
DH6	12,7000 b	11,8667 b	12,6000 ab	11,8000 c	12,6667 b
DH7	12,9667 ab	12,5500 a	12,3000 b	13,5333 a	12,7667 b
DH8	13,0000 ab	12,5452 a	12,2667 b	12,8000 b	13,6000 a
Kontroll	13,1500 a	12,4000 a	12,6200 ab	12,2000 bc	12,9433 b
Cs. átl.	12,7625 AB	12,5452 B	12,6167 B	12,3083 C	12,9396 A

4. 2. 2. 6. A tritikálé DH törzsek hamutartalmának összehasonlító vizsgálata

A minták hamutartalma alapján szignifikáns különbségeket mutattunk ki az egyes genotípusok között. A legnagyobb hamutartalmat a ’Kargo’ fajta esetében mértük, míg az ’AT322’ genotípus hamutartalma szignifikánsan a legalacsonyabb volt (11. táblázat).

Az ’AT322’ DH3 törzse szignifikánsan több hamut tartalmazott, mint négy másik törzs (DH4, DH5, DH6 és DH8). A mért hamutartalom szignifikánsan több volt az ’EMBR17/S2001’ genotípus DH6 törzsben, mint a DH1 és DH4 törzsekben. A ’Gabo’ DH2, DH3, DH4 és DH5 törzseinek hamutartalma szignifikánsan magasabb volt, mint a DH1, DH7 és DH8 törzseké illetve a kontrollé. Az ’AT314’ genotípus esetében három szignifikánsan elkülönülő csoportba tartoztak a DH törzsek hamutartalmuk alapján. A ’Kargo’ DH3 törzs hamutartalma szignifikánsan alacsonyabb, míg a DH4 törzs magasabb volt több DH törzshöz és a kontrollhoz viszonyítva (11. táblázat).

11. táblázat Öt tavaszi tritikálé genotípusból előállított DH törzsek hamutartalmának (%) összehasonlítása. A nyolc DH törzs hamutartalmának átlagából képzett csoportátlag jellemzi a genotípus hamutartalmát. A csoportátlagok közötti szignifikáns különbség 95%-os megbízhatóság mellett 0,042 ($SzD_{5\%}$=0,042), míg a DH törzsek között 0,1259 volt ($SzD_{5\%}$= 0,1259). Az abc különböző nagy betűi jelzik a szignifikánsan eltérő csoportátlagokat, az abc különböző kis betűi pedig minden egyes csoporton belül a szignifikánsan különböző DH törzseket.

Gen.	’Gabo’	’Kargo’	’AT314’	’AT322’	’EMBR17/S2001’
DH1	2,1067 c	2,4067 ab	2,3667 a	2,1133 ab	2,0900 b
DH2	2,3133 ab	2,2367 bc	2,3400 a	2,0400 b	2,2100 ab
DH3	2,3933 a	2,1267 c	2,0967 b	2,1733 a	2,1733 ab
DH4	2,3000 ab	2,4367 a	2,1000 bc	1,9833 b	2,0900 b
DH5	2,2667 b	2,4033 ab	2,3200 b	1,9967 b	2,1367 ab
DH6	2,1800 bc	2,3367 ab	2,2767 ab	1,9667 b	2,2533 a
DH7	2,1233 c	2,2000 bc	1,9933 c	2,0733 ab	2,1800 ab
DH8	2,1367 c	2,3067 b	2,1333 b	1,9867 b	2,1700 ab
Kontroll	2,0950 c	2,3033 b	2,2033 b	2,0500 ab	2,1629 ab
Cs. átl.	2,2275 B	2,3067 A	2,2033 BC	2,0417 D	2,1629 C

4. 3. A fűszerpaprika izolált mikrospóra tenyésztése

Paprika mikrospóra tenyésztési kísérleteink során teszteltük a mikrospórák fejlettségi állapotának hatását az androgenezis hatékonyságára. A saját illetve idegenfajú (búza) ovárium dajkatenyésztés hatását ellenőriztük. Exogén hormonok, illetve az egyes genotípusok hatását hasonlítottuk össze izolált mikrospóra tenyészetben. A mikrospóra eredetű struktúrák szövettani felépítését vizsgáltuk, és az embrioidok regenerációját teszteltük.

4. 3. 1. A mikrospórák fejlettségi állapotának hatása izolált mikrospóra tenyészetben

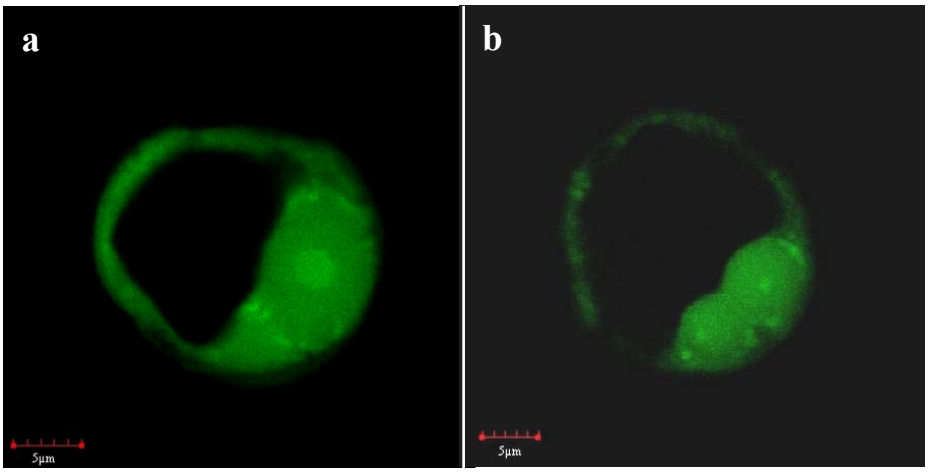
Két fűszerpaprika fajta (‘Remény’ és ‘Szegedi 80’) üvegházból begyűjtött donor bimbóit négy különböző csoportba osztottuk fejlettségi állapotuk alapján. A bimbók mérete, a portokok mérete és színe alkalmas megkülönböztető jegye a mikrospórák fejlettségi állapotának (4. ábra). A négy alkotott csoport:

1. A donor bimbók sziromlevél-kezdeményeit a csészelevelek teljesen eltakarták, a sárga portokban tetrádokat figyeltünk meg.
2. A begyűjtött bimbók sziromlevelei már látszódtak a csészelevelek között. Kései egysejtmagvas mikrospórákat tartalmaztak azok a portokok, amelyek optimális állapotúak portoktenyésztésre. Kevesebb mint 1/4 része volt antociános a portokoknak.
3. A bimbók csészeleveleinek és sziromleveleinek aránya 2 : 1. A portokok 2/3-4/5 részben antociánosak voltak, a mikrospórák 80%-a kései egysejtmagvas és 20%-a korai kétsejtmagvas állapotban volt.
4. A donor bimbók csészeleveleinek és sziromleveleinek aránya 1 : 1. Pollenszemeket tartalmaztak a teljesen antociános portokok.

A donor bimbók portokjait 1 hétig 32 °C-on 0,3 M mannit oldatban előkezeltük. Előkezelés után, a második és harmadik csoport portokjaiból tudtunk élő mikrospórákat izolálni, míg az első és negyedik csoport esetében az előtenyésztett portokok nem tartalmaztak élő mikrospórákat. Mindkét fajta esetében az izolált mikrospórák száma azonos volt a második és harmadik csoportban. Legalább 45 000 mikrospórát izoláltunk egy bimbóból, ami elegendő volt egy mikrospóra tenyészet (1 Petri csésze) elkészítéséhez.

4. ábra Kapcsolat a bimbók és portokok morfológiája, valamint a mikrospórák fejlettségi állapota között. A begyűjtött bimbókat négy különböző csoportba osztottuk fejlettségi állapotuk alapján, méretvonal = 5 mm (1a, 2a, 3a, 4a). A portokok mérete és színe jó megkülönböztető jegye a mikrospórák fejlettségi állapotának, méretvonal = 1 mm (1b, 2b, 3b, 4b). A mikrospórák fejlettségi állapotát konfokális mikroszkóp alatt ellenőriztük, méretvonal = 5 µm (1c, 2c, 3c, 4c). Az első csoport bimbóinak sárga portokjai tetrádokat tartalmaztak (1a-1c). A második csoport bimbóiban egysejtmagvas mikrospórákat tartalmazó portokok voltak, amelyek optimális állapotúak portoktenyésztésre (2a-2c). A harmadik csoport bimbóinak portokjai 80%-ban egysejtmagvas és 20%-ban kétsejtmagvas mikrospórákat tartalmaztak (3a-3c). A negyedik csoport portokjaiban érett pollenszemek voltak (4a-4c).

Izolálás után az előkezelt portokokban lévő mikrospórák fejlettségi állapotát ellenőriztük FDA festéssel (5a és 5b ábra). A második csoport mikrospóráinak 90%-a egysejtmagvas és 10%-a kétsejtmagvas állapotú volt (12. táblázat). A harmadik csoport előkezelt portokjaiból 50%-ban egysejtmagvas és 50 %-ban kétsejtmagvas állapotú mikrospórákat izoláltunk. Az egy hetes előkezelés alatt a mikrospórák fejlettségi állapota változott.



5. ábra Az FDA festés élénk zöld színe mutatja a pollenfejlődés folyamatának két karakterisztikus fejlettségi állapotát. Előkezelés után (0,3 M mannit oldat, 32 °C, egy hét), egysejtmagvas (a) és kétsejtmagvas (b) mikrospórákat izoláltunk a második és harmadik csoport portokjaiból. Az ábrán lévő méretvonal = 5 µm.

12. táblázat A második és harmadik csoport előkezelt portokjaiból izolált mikrospórák fejlettségi állapota (’Remény’ és ’Szegedi 80’) az izolált mikrospóra populációban.

	Egysejtmagvas mikrospórák (%)	Kétsejtmagvas mikrospórák (%)
2. csoport	90	10
3. csoport	50	50

Az izolált mikrospórákat W14mi tápoldatban tenyésztettük búza ováriumok jelenlétében. A harmadik csoport esetében az izolált mikrospórák tenyészetében sejtosztódások aránya magasabb volt (‘Remény’ 60%, ‘Szegedi 80’ 40%), mint a második csoportból izolált tenyészetekben (‘Remény’ 50%, ‘Szegedi 80’ 25%). A harmadik csoport esetében a mikrospóra tenyészetekből

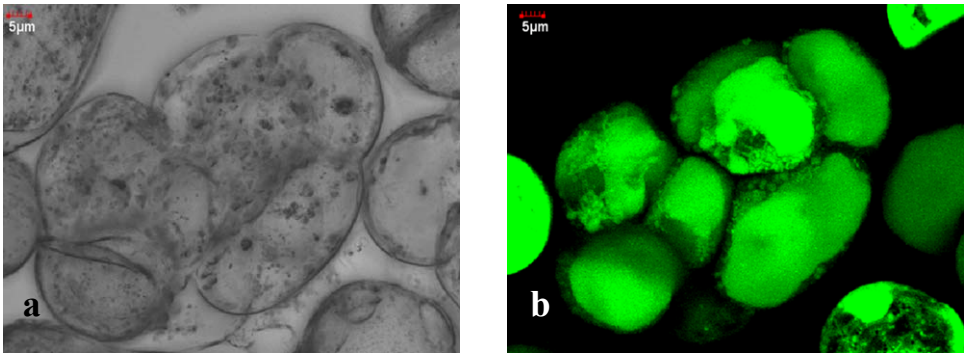
több soksejtes struktúra fejlődött, és az embrioidok száma is magasabb volt Petri csészénként (13. táblázat).

13. táblázat Az izolált mikrospórák fejlettségi állapotának hatása az androgenezis hatékonyságára izolált mikrospóra tenyészetben. A különböző betűk szignifikánsan különböző értékeket jelölnek (P= 0,05)

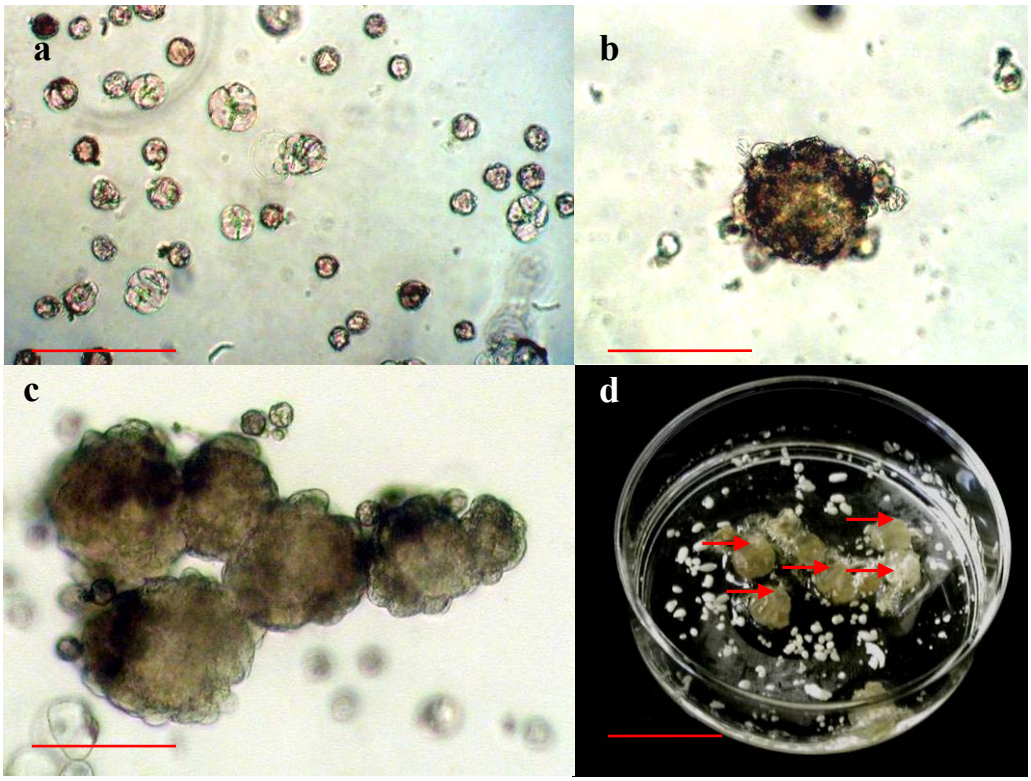
Genotípusok és fejlettségi csoportjaik	Sejt-osztódások (%)	Mikrospóra eredetű struktúrák száma/ Petri csésze	Embrioidok száma/ Petri csésze
’Remény’ 2. csoport	50 ± 2,51 b	2,5 ± 1,02 b	2 ± 1,05 b
’Remény’ 3. csoport	60 ± 3,21 a	30,0 ± 5,65 a	25 ± 6,11 a
’Szegedi 80’ 2. csoport	25 ± 2,21 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b
’Szegedi 80’ 3. csoport	40 ± 3,91 a	5,0 ± 1,82 a	4,2 ± 1,77 a

4. 3. 2. A különböző fajú ováriumok hatása fűszerpaprika fajták androgenezisére izolált mikrospóra tenyészetben

Az izolált paprika mikrospórákat W14mi folyékony tápoldatban tenyésztettük. Három alternatív utat választottunk a dajkatenyésztés hatásának tesztelésére: (1) ováriumok nélkül, (2) paprika ováriumokkal és (3) búza ováriumokkal. Kettő fűszerpaprika fajtát (‘Remény’ és ‘Szegedi 80’) használtunk a különböző fajú ováriumok hatásának tesztelésére négyismétléses kísérletben. Az első sejtosztódások mindhárom kezelésben megfigyelhetőek voltak a mikrospórák falán belül az első hét végén. A tenyésztés második hetében az osztódó mikrospórák soksejtes struktúrákká fejlődtek. Paprika vagy búza ováriumok jelenlétében a soksejtes struktúrák a mikrospórák falától szabaddá váltak (6. ábra), de a fejlődés megállt az ovárium nélküli tenyészetekben (7.a ábra). Ez a fejlődés a harmadik hétig folytatódott paprika ovárium dajkatenyészetben (7.b ábra), és a mikrospórákból proembrioidok fejlődtek, embrioidok nem (‘Remény’ 2 proembrioid/Petri csésze, ‘Szegedi 80’ 1,5 proembrioid/Petri csésze). Búza ovárium dajkatenyésztés alkalmazásával a struktúrák fejlődése fenntartható volt. A háromhetes struktúrák fejlődése folytatódott (7.c ábra), és a tenyésztés ötödik - hatodik hetére szabad szemmel is jól láthatóak voltak a mikrospóra eredetű embrioidok (7.d ábra).



6. ábra (a) Mikrospóra eredetű struktúra mikroszkópikus képe. (b) FDA festés mutatja a struktúra élő sejtjeit.



7. ábra Különböző fajú ováriumok hatása paprika mikrospórák fejlődésére. (a) Ovárium nélkül a mikrospórák fejlődése megállt az első sejtosztódások után. (b) Proembriókat figyeltünk meg a paprika ovárium dajkatenyészetekben, amelyek képtelenek voltak embrióvá fejlődni. (c) Mikrospóra eredetű proembrioidok intenzíven növekedtek (5 proembrió), és (d) embrioidok fejlődtek búza ováriumok jelenlétében (piros nyilak). Méretvonal = 100 µm (a-c ábra); 1 cm (d ábra).

Mind a hat fűszerpaprika fajta mikrospóra tenyészetében megfigyeltük az androgenezis indukcióját. Az izolált mikrospórákból embrioidok fejlődtek (‘Jariza’ 65,7 embrioid/Petri csésze, ‘Jaranda’ 33 embrioid/Petri csésze, ‘Jeromin’ 13,5 embrioid/Petri csésze, ‘Szegedi 80’ 5 embrioid/Petri csésze, ‘Remény’ 25 embrioid/Petri csésze, ‘Szegedi 178’ 3,75 embrioid/Petri csésze) búza ováriumok jelenlétében (14. táblázat). A mikrospóra eredetű embrioidokat R1 regeneráló táptalajra helyeztük. Az egyes genotípusok között szignifikáns különbségeket mutattunk ki a mikrospóra tenyészetben kapott embrioidok száma alapján.

14. táblázat Hat fűszerpaprika fajta növényregenerálása izolált mikrospóra eredetű embrioidokból. Az abc azonos betűi 95%-os biztonság mellett szignifikánsan nem különböző értékeket jelölnek minden oszlopon belül.

Genotípus	Embrioidok száma/ Petri csésze	Hajtások száma/ Petri csésze	Gyökeres *in vitro* növénykék száma/ Petri csésze	Akklimatizált növények száma/ Petri csésze
’Jariza’	65,70 a	7,25 a	1,25 a	1,00 a
’Jaranda’	33,00 b	3,75 ab	0,50 a	0,50 a
’Jeromin’	13,50 bc	0,25 b	0,00 a	0,00 a
’Szegedi 80’	5,00 c	1,50 b	0,75 a	0,25 a
’Remény’	25,00 bc	1,50 b	0,75 a	0,00 a
’Szegedi 178’	3,75 c	0,00 b	0,00 a	0,00 a
SzD5%=	25,82	4,57	1,37	1,3

4. 3. 3. Az exogén hormonok hatása az embrioidok számára izolált mikrospóra tenyészetben

Hormonok hatását tanulmányoztuk fűszerpaprika izolált mikrospóra tenyészetben. Három különböző kezelést hasonlítottunk össze: (1) a W14mi0 tápoldat nem tartalmazott hormonokat, (2) a W14mi tápoldat 0,5 mg/l 2,4-D-vel és 0,5 mg/l kinetinnel volt kiegészítve, míg a (3) W14miPAA tápoldat 5 mg/l PAA-t tartalmazott. Három fűszerpaprika fajtát használtunk az exogén hormonok hatásának tesztelésére.

A tenyészetekben lévő embrioidok számát a tenyésztés hatodik hetében regisztráltuk. A három fajta átlaga alapján a mikrospóra eredetű embrioidok száma a W14mi tápoldatban volt a legmagasabb, majd a W14mi0 és a W14miPAA tápoldat követte (15. táblázat). A ‘Jaranda’ fajta eredményeinek statisztikai elemzése alapján az embrioidok száma a W14mi tápoldatban volt a

legmagasabb, a W14mi és a W14mi0 tápoldat embrioid mennyisége között nem volt szignifikáns a különbség. A ’Jeromin’ fajtánál az embrioidok mennyisége a W14mi0 és a W14mi tápoldatban volt a legmagasabb, de a különbség 95%-os biztonság mellett nem volt szignifikáns a két tápoldat között, azonban a W14miPAA tápoldatban fejlődött embrioidok száma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a másik két tápoldat esetében. A ‘Szegedi 178’ fajta mikrospóra tenyészeteit tekintve a W14mi0 tápoldatban fejlődött a legtöbb embrioid, több mint a W14mi és a W14miPAA tápoldatokban. A különbség a tápoldatok között nem volt szignifikáns. A három fajtán elvégzett kísérlet után – az embrioidok száma alapján – azt az eredményt kaptuk, hogy a W14mi és a W14mi0 tápoldat a legígéretesebb a tápoldatok közül szemben a W14miPAA tápoldattal (15. táblázat).

15. táblázat Az exogén hormonok hatása az embrioidok számára különböző fűszerpaprika fajták izolált mikrospóra tenyészetében. Az egyes sorokban lévő különböző betűk a szignifikánsan különböző értékeket mutatják 95%-os biztonság mellett.

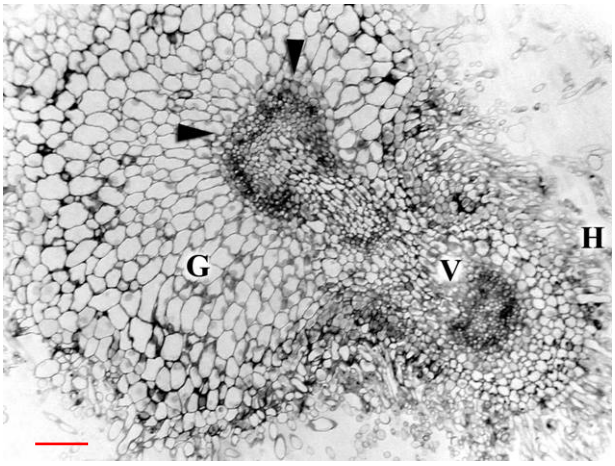
Genotípus	Mikrospóra eredetű embrioidok száma/ Petri csésze			
	W14mi0	W14mi	W14miPAA	$SzD_{5\%}$
’Szegedi 178’	6,75 a	3,75 a	2,50 a	4,35
’Jeromin’	12,40 a	11,80 a	2,00 b	8,095
’Jaranda’	14,25 a	34,50 a	-	ns
Fajták átlaga	11,13	16,68	2,25	

ns: nem szignifikáns a különbség

4. 3. 4. A mikrospóra eredetű embrioidok szövettani tanulmányozása és a fűszerpaprika növények regenerálása

A mikrospóra eredetű *in vitro* embrioidokat R1 regeneráló táptalajra helyeztük. A regenerációs periódus első hetének végén elkülönítettük a vizsgálandó embrioidokat szövettani vizsgálatra. A mikrospóra eredetű embrioidok struktúráját Olympus BH-2 epifluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk. A 8. ábra egy paprika mikrospóra eredetű embrioid hosszmetszetét mutatja be. A kissé megnyúlt embrioid hosszmetszete kettő határozottan elkülönülő pólust mutatott. A gyökér merisztémája kevésbé vakuolizált apró sejteket tartalmazott. Az edénynyalábok kialakulása is megtörtént a gyökérkezdeményben. Megfigyelhető, hogy a gyökérkezdemény a központi henger által a hajtáskezdeményhez kapcsolódik. Az embrioid

szemközti pólusán kettő egyenlően fejlett sziklevél kezdemény látható. A központi prokambium nyaláb folyamatos a hipokotiltól mindkét sziklevélig. A központi struktúra egy vékony alapszövettel volt fedve, ami hasonlít a kortikális réteghez. Az embrioidokat a szőrös epidermisz teljesen beborította. Az epidermisz szőrei sűrűn helyezkedtek el a gyökérkezdemény felszínén. A jól fejlett embrioidok felszíne zölddé vált a hajtáskezdemény pólusán, míg a másik póluson szabad szemmel is jól látható szőrös gyökérkezdemények jelentek meg a regenerációs periódus második hetében (9.a ábra).



8. ábra Mikrospóra eredetű fűszerpaprika embrioid hosszmetszete. A megvizsgált embrioid kettő határozottan elkülönülő pólust mutat, amely szőrös epidermisszel (H) borított. Az epidermisz szőrei sűrűn helyezkednek el a gyökérkezdemény felszínén. A gyökérkezdemény edénynyalábjának szövetei (V) kapcsolódnak a hajtáskezdemény központi edénynyaláb szöveteihez. A szemközti póluson kettő sziklevél kezdemény (nyilak) látható. A központi struktúra vékony kortikális szövettel borított (G). Méretvonal = 100 µm.

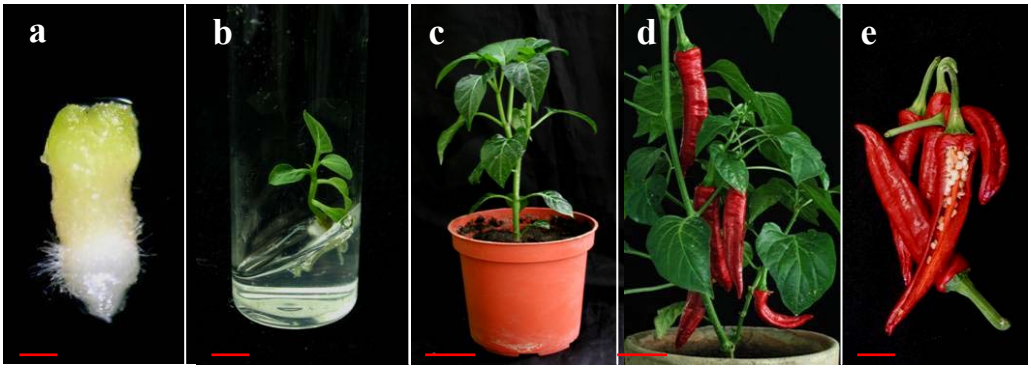
A mikrospóra eredetű embrioidok növényregenerálása kritikus lépésnek bizonyult fűszerpaprikában. Néhány struktúra normális *in vitro* hajtásokat regenerált három héten belül. A hajtások többsége amorf volt rozettás levelekkel, vagy nem hozott hajtást a regeneráló táptalajon.

Öt fajta *in vitro* embrioidjaiból sikerült hajtást regenerálni ('Jariza' 7,3 hajtás/Petri csésze, 'Jaranda' 3,4 hajtás/Petri csésze, 'Jeromin' 0,2 hajtás/Petri csésze, 'Remény' 1,5 hajtás/Petri csésze és 'Szegedi 80' 1,2 hajtás/Petri csésze) R1 regeneráló táptalajon. A genotípus befolyásolta a hajtások számát, azonban ez a hatás nem érvényesült a meggyökeresedett és akklimatizálódott növények számában (14. táblázat). A regenerált hajtások meggyökeresedtek és *in vitro* növénykévé fejlődtek négy fajta esetében ('Jariza' 1,33 növényke/Petri csésze,

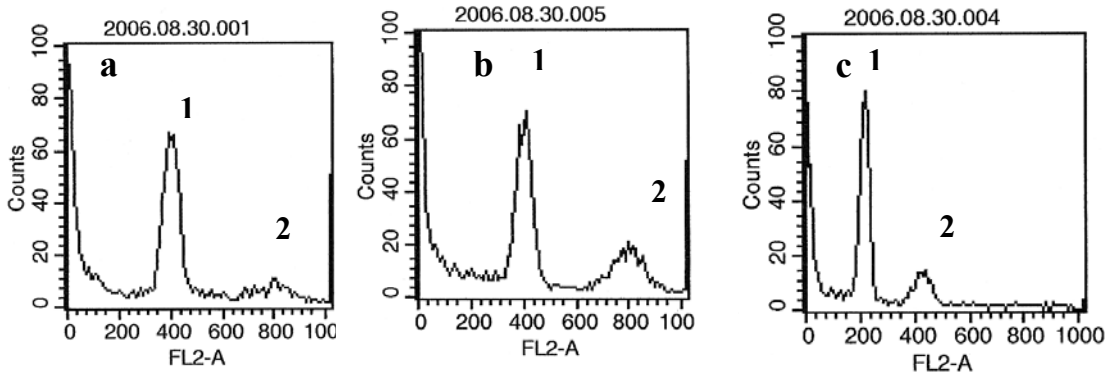
‘Jaranda’ 0,4 növényke/Petri csésze, ‘Remény’ 0,5 növényke/Petri csésze és ‘Szegedi 80’ 0,6 növényke/Petri csésze). A regenerált növénykéket MS_0 tartalmú csövekben tovább neveltük (9.b ábra).

Két héttel később a három-négy leveles növénykék ploidia fokát áramlási citometriás vizsgálattal ellenőriztük (10. ábra). Az analízis megmutatta, hogy három ‘Remény’, három ‘Szegedi 80’, három ‘Jaranda’ és három ‘Jariza’ spontán diploid növénykét regeneráltunk, valamint két ‘Jariza’ és egy ‘Jaranda’ haploid növénykét. A haploid növénykék ploid szintjét sikeresen megdupláztuk kolchicin kezeléssel. A spontán diploid növénykéket és a kolchicin kezelt növénykéket üvegházba kiültettük. A második kritikus lépés az akklimatizáció volt (9.c ábra). Három ‘Jaranda’, három ‘Jariza’ és egy ‘Szegedi 80’ diploid növény akklimatizálódott és fejlődött fertilis növénnyé. A növényeket egyedi izolátor alatt neveltük, majd virágzás után az érett bogyókat betakarítottuk (9.d, 9.e).

A DH vonalakat a hazai nemesítés számára átadtuk. A fűszerpaprika hibrid nemesítési programokban felhasználták a vonalakat a ’Délibáb’ fűszerpaprika hibrid előállításához.



9. ábra (a) Izolált mikrospóra eredetű embrió, mely *in vitro* növénykévé fejlődött. (b) A növényke üvegcsőben meggyökeresedett. (c) Az *in vitro* növényke adaptálódott az üvegházi körülményekhez, és (d) fertilis bogyót hozott virágzás után. (e) A fertilitást vizuálisan ellenőriztük. Méretvonal = 1 mm A ábrán; 1 cm B ábrán; 5 cm C és D ábrán; 1 cm E ábrán.



10. ábra Áramlási citometriás vizsgálata (a) egy kontroll paprika növénynek és egy izolált mikrospóra tenyészet eredetű (b) spontán diploid és (c) egy haploid regeneránsnak. Csúcsok: (a) 1-2C, 2-4C (b) 1-2C, 2-4C és (c) 1-1C, 2-2C.

5. MEGVITATÁS (KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

5. 1. Az androgenezis indukciójának értékelése

A haploid indukciós rendszerek fejlesztése több évtizede foglalkoztatja az alapkutatókat és nemesítőket. Intézményünkben is több évtizedes múltja van az androgenezis kutatásának. Búza haploid indukciós rendszerek között hazánkban a portoktenyésztés, nemeztközi tekintetben a portoktenyésztés és a távoli fajkeresztezés (búza kukorica pollennel történő megtermékenyítése) vált alkalmazottá a gyakorlatban (Laurie és Benett 1988, Pauk és mtsai 1995 Verma és mtsai 1999, Szakács és mtsai 2002, Inagaki 2003, Tuvesson és mtsai 2003). Tritikálé és paprika esetében a portoktenyésztés eredményeit használta fel a nemesítés (Thomas és mtsai 2003, Gémes és mtsai 2006, Mitykó és Gémes 2006). A gyakorlati alkalmazáson túl az *in vitro* haploid indukciós rendszerek lehetőséget adnak a mikrospóra embriogenezis tanulmányozására, sejtszintű szelekcióra és haploid transzformációra (Fadel és Wenzel 1993, Folling és Olsen 2001, Kumlehn és mtsai 2003, Szarejko 2003, Aionesei és mtsai 2006, Bakos és mtsai 2008).

A hazai és nemzetközi kutatások kiterjedtek az izolált mikrospóra tenyésztésre is, hiszen a mikrospóra embriogenezis folyamatainak sejtszintű tanulmányozására kiváló lehetőséget nyújt a módszer. Az *in vitro* szelekció során a szelekciós ágens közvetlen módon hat a mikrospórákra. Az izolált mikrospórák, a soksejtes struktúrák és a mikrospóra tenyészet eredetű embriók egyaránt választhatók a genetikai transzformáció explantatumának. Így mikrospóra tenyésztési rendszer fejlesztése során három fajjal dolgoztunk kísérleteinkben.

5. 1. 1. Búza izolált mikrospórák tenyésztése

A búza izolált mikrospóra tenyésztés jellemző lépéseit a ’CY-45’ modell genotípussal vizsgáltuk, amelynek jó regenerálóképességét először szomatikus tenyészetben igazolták intézményünk kutatói (Felföldi és Purnhauser 1992). Saját vizsgálataink alapján is jó válaszadó képességű és jó regeneráló képességűnek bizonyult ez a genotípus portoktenyészetben és szomatikus tenyészetekben is, emiatt nemcsak a haploid indukciós kísérleteknek jó alapanyaga, hanem genetikai transzformációra is alkalmas genotípus (Lantos és mtsai 2005, 2006, Mihály és Pauk 2007, Mihály és mtsai 2008).

Eredményeink harmóniában vannak a korábbi búza mikrospórás eredményekkel (Mejza és mtsai 1993, Indrianto és mtsai 2001). A donor

alapanyagok stresszkezelése (hideg kezelés, éheztetés, hősokk) és az optimális fejlettségi állapot (kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas) nagyon fontos az androgenezis indukciójához és a sikeres tenyésztéshez (Sunderland és mtsai 1984, Mejza és mtsai 1993, Hu és Kasha 1999, Tuvesson és mtsai 2000). Kísérleteinkben a búza mikrospórák gametofita fejlődési útja sporofita fejlődésmenettel folytatódott. A tenyészetekben kétpólusú embrioidokat figyeltünk meg, amelyek direkt embriogenezissel indukálódtak. Az ováriummal történő közös dajkatenyésztés szükséges volt a nagyszámú embrioid fejlődéséhez (Mejza és mtsai 1993). A tenyészetekben az indukciót követő ötödik héten jelentős számú embrioid (413,5 embrioid/Petri csésze) fejlődött, azonban a zöld növény regeneráció aránya (17,75 zöld növényke/Petri csésze) alacsony volt.

Szakirodalomi adatok alapján választottuk ki a leggyakrabban alkalmazott tápközegeket, hogy megvizsgáljuk hatásukat izolált mikrospóra tenyészetben. Négy alaptápoldatot hasonlítottunk össze a ’CY-45’ genotípus izolált mikrospóra tenyészetben. A szakirodalomból ismert CHB (Chu és mtsai 1990, Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Holme és mtsai 1999, Mentewab és mtsai 1999, Patel és mtsai 2004) és A2 (Indrianto és mtsai 1999, 2001, Shariatpanahi és mtsai 2006) mikrospóra tenyésztő alaptápoldat mellett két portoktenyésztő tápoldat, a W14 (Ouyang és mtsai 1989, Jia és mtsai 1994) és a P4 (Ouyang és mtsai 1983) mikrospóra tenyésztő változatát (W14mi és P4-m) készítettük el. Az embrioidok és regenerált növények száma alapján az A2 és W14mi tápoldat volt szignifikánsan a legjobb. A későbbiekben a legjobb eredményeket adó W14mi tápoldatot alkalmaztuk a kísérletekhez.

Az androgenezist sikeresen indukáltuk a vizsgált búzafajták izolált mikrospóra tenyészetében. Számos embrioid fejlődött a tenyészetekben, és hét fajta mikrospóra tenyészet eredetű embrioidjaiból zöld növénykéket regeneráltunk. A genotípus szignifikánsan befolyásolta a tenyészetenkénti embrioidok számát és a növényregenerációt (Agache és mtsai 1988). A portoktenyészet eredetű genotípusok (’GK Bán’ és ’GK Délibáb’) válaszadó képessége nem volt jobb, mint a klasszikus nemesítésű genotípusoké, ami a tulajdonság additív öröklődésével magyarázható (Lazar és mtsai 1984, Deaton és mtsai 1987, Szakács és mtsai 1988). A mikrospóra eredet nem biztosította a legjobb válaszadó képességet a vizsgált két portoktenyészet eredetű genotípusnak.

A mikrospóra tenyészet eredetű búza növénykék jelentős része albínó volt (genotípustól függően 60,33% – 100%), ami a gabonafélék mikrospóra tenyészetében ismert jelenség (Trop és Andersen 2009). Az albinizmus mértékét több tényező befolyásolja. A genotípus és a tenyésztési feltételek nemcsak az embrioidok számára, hanem az albínó és zöld növények gyakoriságára is hatással volt saját kísérleteinkben és a mások által publikált rendszerekben is (Ouyang és mtsai 2004, Labbani és mtsai 2005, Jacquard és

mtsai 2006, Oleszczuk és mtsai 2006, Broughton 2008, Redha és mtsai 2008). A jelenség magyarázatára több hipotézis létezik. A kloroplasztisz DNS degenerációját megfigyelték albínó növényekben (Carreda és mtsai 2000, Clement és Pacini 2001). Újabb publikációk szerint az *in vitro* tenyésztési eljárás a kloroplasztiszokban csökkent mértékű transzkripciót és transzlációt okoz, ami albínó fenotípust eredményez (Trop és Andersen 2009).

Hasonló folyamatot figyeltünk meg, és hasonló eredményeket értünk el mind a tíz genotípus esetében, így a mikrospóra tenyésztés használható módszerré válhatott mikrospóra eredetű zöld növények előállítására a fajták széles skáláján. A zöld növényregenerálás hatékonyságát még feltétlen emelni kell, hogy a búza portoktenyésztéshez hasonlóan nagy számú zöld növényt kapjunk. A tenyésztési feltételek fejlesztését követően ez az eljárás hatékony módszerré válhat a búzanemesítők kezében a portoktenyészethez hasonlóan.

5. 1. 2. Tritikálé izolált mikrospórák tenyésztése

Sikeres tritikálé izolált mikrospóra tenyésztésről laboratóriumunk számolt be elsőként a világon (Pauk és mtsai 2000), azonban a tritikálé haploid indukciós rendszerek ma még nem olyan kidolgozottak, mint búzában. Portoktenyésztéssel (Wang és mtsai 1973b), távoli fajkeresztezéssel (Wedzony és mtsai 1998) és mikrospóra tenyésztéssel (Pauk és mtsai 2000) is állítottak elő haploid és DH tritikálé növényeket, azonban csak a portoktenyésztés módszerével sikerült fajtákat előállítani (Thomas és mtsai 2003). A rendszerek hatékonysága mindhárom területen fejklsztésre szorul, egyiksem vált a nemesítési programok szerves részévé.

Izolált mikrospóra tenyészetben a stresszkezelés fontos szerepet játszott az androgenezis indukciójában. A hideg előkezelés egy általánosan alkalmazott stressz előkezelés izolált mikrospóra tenyésztés előtt (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008). Zur és mtsai (2008) hideg előkezelést követően 5 ºC-on 4 napig éheztették a mikrospórákat, majd macerálással izolálták. Kísérleteinkben a donor hajtások hideg előkezelését kombináltuk háromnapos éheztetéssel és hősokkal (0,3 M mannit oldat, 32 °C), ami az életképes mikrospórák izolálását segítette elő a macerálás során. A korábban publikált protokollt (Pauk és mtsai 2003) előtenyésztéssel (Zur és mtsai 2008) és dajkatenyésztéssel (Eudes és Amundsen 2005) kombinálva a tesztelt genotípusokban az androgenezist indukáltuk, és embrioidok fejlődését figyeltük meg.

Az első két jelentős publikált tritikálé mikrospóra tenyésztési protokoll szerzői nem alkalmaztak dajkatenyésztést (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004). Eudes és Amundsen (2005) használta először az ovárium dajkatenyésztés módszerét tritikálében, amely megemelte a mikrospóra eredetű embrioidok számát és minőségét. Hasonlóan a mi kísérleteinkben is javította az

androgenezis hatékonyságát a dajkatenyésztés. Továbbiakban a dajkatenyésztést alkalmaztuk a genotípusok összehasonlítására.

A genotípus jelentős faktornak bizonyult, amely befolyásolta az androgenezis hatékonyságát portoktenyészetben (Charmet és Bernard 1984, Hassawi és mtsai 1990, Balatero és mtsai 1995, Tuvesson és mtsai 2000) és izolált mikrospóra tenyészetben is (Eudes és Amudsen 2005). A hat tesztelt genotípus izolált mikrospóra tenyészetében az embrioidok száma (33 – 347 embrioid/etri csésze) és a zöld növények száma (0,7 – 14 embrioid/Petri csésze) genotípustól függően változott. Következésképpen a genotípus az egyik legfontosabb tényező, amely befolyásolja a hatékonyságot. A hat genotípus közül ötből legalább hat zöld növénykét regeneráltunk tenyészetenként. Az öt jó válaszadó képességű genotípus ('Gabo', 'Kargo', 'AT314', 'AT322', 'EMBR17/S2001') alkalmas a mikrospóra tenyésztési rendszer továbbfejlesztésére, illetve keresztezési partnerek lehetnek egy androgenezisre alkalmazott nemesítési programban.

A tesztelt genotípusok átlagában 224,7 embrioidot állítottunk elő tenyészetenként, amelyekből átlagosan 7,79 zöld növényt regeneráltunk. A regenerált növények egy része albínó volt, amely hasonló okokra vezethető, mint búza esetében (Balatero és mtsai 1995, Pauk és mtsai 2000, Eudes és Amundsen 2005, Gonzalez és mtsai 2005, Labbani és mtsai 2005, Jacquard és mtsai 2006, Oleszczuk és mtsai 2006, Trop és Andersen 2009). A korábbi publikált eredményekhez (Pauk és mtsai 2000, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008) képest több embrioidot kaptunk tenyészetenként, és javítottuk a növényregeneráció hatékonyságát. Kivételt képeznek a jó válaszadó képességű 'Bogo' fajtával elért eredmények (Oleszczuk és mtsai 2004). A regenerált növények jól alkalmazkodtak az üvegházi körülményekhez. Fertilitásukat magfogással ellenőriztük, ami alapján a spontán rediploidizáció átlagosan 60,59% volt. Kísérleteinkben ez az arány magasabb, mint más publikált eredmények esetében (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és Amundsen 2005).

Számos publikáció foglalkozik a tritikálé DH növény előállítási módszerek fejlesztésével, de kevés számol be a DH törzsek nemesítési értékéről. Arzani és Darvey (2002) F_1 és F_2 generációból előállított DH törzsek zöld tömege, szárazanyag tartalma, termése és teljes biomasszája között egy szélesebb variabilitást talált, mint amit szántóföldi szelekcióval el lehetett érni.

A fertilis DH törzsek közül (a DH_0 növények termése alapján) genotípusonként nyolcat-nyolcat választottunk ki. A DH törzsek hat tulajdonságát (növénymagasság, kalászhossz, ezerszemtömeg, szemkeménység, fehérjetartalom és hamutartalom) hasonlítottuk össze. Szignifikáns különbségeket találtunk az egyes genotípusok között mind a hat vizsgált paraméter tekintetében. Az egyes genotípusokon belül szintén szignifikáns eltéréseket találtunk a DH törzsek tulajdonságai között. Kivételt képezett az 'AT332' genotípus DH törzseinek szemkeménysége.

Összegezve: az izolált mikrospóra tenyésztés, hasonlóan más DH növény előállítási módszerekhez, alkalmas volt arra, hogy eltávolítsa a genetikai különbségeket az egyes genotípusokból és jobban kiegyenlítette tette a fajtákat, illetve genotípusokat. A tritikálé mikrospóra tenyésztés egy alternatív eszköz lehet a nemesítők kezében, hogy kiegyenlítette tegyék a genotípusaikat nemcsak a korai (F_1 és F_2), hanem későbbi generációkban is (F_5).

5. 1. 3. Paprika mikrospóra tenyésztés

A mikrospórák fejlettségi állapotának portoktenyészetben és izolált mikrospóra tenyészetben is jelentős hatása van az androgenezis indukciójára és hatékonyságára (Touraev és mtsai 1996a, Barnabás 2003, Touraev és Heberle-Bors 2003, Li és Devaux 2005). Különböző fejlettségi állapotokat ajánlanak paprika portoktenyésztésre, úsztatott portoktenyésztésre és izolált mikrospóra tenyésztésre. Portoktenyészetben a kései egysejtmagvas vakuólumos állapotot alkalmazzák a különböző kutatócsoportok (Gyulai és mtsai 1999, 2000, Buyukalaca és mtsai 2004, Ercan és mtsai 2006), míg Kim és mtsai (2004) korai kétsejtmagvas vakuólumos állapotú mikrospórákat ajánl portoktenyésztésre (kevesebb mint 75%). Az úsztatott portoktenyésztésről szóló cikk szerzői kései egysejtmagvas illetve korai kétsejtmagvas vakuólumos állapotú mikrospórákat alkalmaztak kísérleteik során, és ugyanezt használták izolált mikrospóra tenyészetben is (Supena és mtsai 2006a, 2006b). Kim és mtsai (2008) szintén kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas állapotú mikrospórákat alkalmaztak az első részletes mikrospóra tenyésztési rendszer kidolgozásához.

Az irodalomban talált eltérő adatok miatt célul tűztük ki a különböző fejlettségi állapotú mikrospórák hatásának tesztelését fűszerpaprika izolált mikrospóra tenyészetben. Kísérleteinkben a legjobb eredményeket azokkal az alapanyagokkal értük el, amelyekben a mikrospórák fejlettségi állapota begyűjtéskor 80%-ban kései egysejtmagvas és 20%-ban korai kétsejtmagvas vakuólumos állapotú volt. A donor bimbók csésze és szirom levelének aránya 2/3:1/3 volt, és a portokok 2/3:3/4 részben antociánosak voltak.

A portokok előkezelése fontos kulcs lépése volt a sikeres izolálásnak. Előkezelés (éheztetés) nélkül a mikrospórák grádiens centrifugálása sikertelen volt (kevés életképes mikrospóra volt a két oldat határán). Supena és mtsai (2006a) eredményeihez hasonlóan az egy hetes előkezelés (0,3 M mannit oldat) fontos volt az izolálható mikrospórák számának növeléséhez. Az előkezelést követően a mikrospórák 50-50%-os arányban egysejtmagvas és kétsejtmagvas állapotban voltak. A mikrospóra fejlettségi állapot tekintetében egy idősebb fejlettségi állapot volt a hatékonyabb kísérleteinkben, mint amit portoktenyészetben alkalmaznak. Az eredményeink harmóniában vannak más fajban (árpa, búza és tritikálé) tapasztalt eredményekkel (Olsen 1991, Hu és

Kasha 1997a, Oleszczuk és mtsai 2004), ahol eltérő fejlettségi állapotú mikrospórákat alkalmaznak portoktenyésztésre és izolált mikrospóra tenyésztésre.

Grádiens centrifugálással tisztíthatók és elválaszthatók az életképes protoplasztok (Harms és Potrikus 1978) és mikrospórák (Mordhorst és Lörz 1993) a sejt- és szövettörmelékektől. A mikrospórák grádiens centrifugálása egy alkalmas módszer az életképes mikrospórák összegyűjtésére (Supena és mtsai 2006a). Kísérleteinkhez a költségtakarékosabb mannit/maltóz grádiens centrifugálást választottuk, mely kis módosítással lehetővé tette az eredményes grádiens centrifugálást. Supena és mtsai (2006a) a Percoll grádiens centrifugálást alkalmazták. Mindkét módszer hatékonynak bizonyult az életképes mikrospórák elválasztásához, azonban az általunk alkalmazott módszer gazdaságosabb.

A paprika izolált mikrospóra tenyésztést FSOC módszerrel fejlesztettük tovább. Különböző fajú (paprika és búza) ováriumok hatását ellenőriztük paprika mikrospóra tenyészetben. Ováriumok hiányában a fűszerpaprika mikrospórák osztódása megállt a tenyésztés második hetében, további sejtosztódásokat nem figyeltünk meg ezt követően. Paprika ováriumok jelenlétében proembrioidok indukálódtak a tenyészetekben, azonban nem tudták folytatni növekedésüket. Több mm-es nagyságú szemmel látható struktúrákat a paprika mikrospórák idegen fajú (búza ovárium) dajkatenyészetében figyeltünk meg.

A mikrospóra tenyészetek hatékonyságának növelésére több alternatív megközelítés létezik, ilyen például az ovárium dajkatenyésztés. Az ovárium dajkatenyésztés szempontjából három különböző csoportot különíthetünk el a szakirodalom alapján, melyek a következők:

(1) A mikrospóra tenyésztés rendszere jól kidolgozott, ovárium nem szükséges a mikrospóra eredetű struktúrák előállításához és a növényregenerációhoz. Számos faj tartozik ebbe a kategóriába, úgymint az árpa (Davies és Morton 1998, Kasha és mtsai 2001a), a rozs (Guo és Pulli 2000), a rizs (Xie és mtsai 1995, 1996), az alma (Höfer és mtsai 1999), a kukorica (Büter 1997, Nageli és mtsai 1999), a repce (Coventry és mtsai 1988, Custers és mtsai 1994) és a dohány (Touraev és mtsai 1996a).

(2) Néhány faj esetében az ovárium dajkatenyésztés a mikrospóra tenyésztés hatékonyságát növeli. Az ovárium dajkatenyésztést alkalmazzák búza (Mejza és mtsai 1993), durum búza (Cistue és mtsai 2006) és tritikálé (Eudes és Amundsen 2005) esetében. Li és Devaux (2001) gyengén válaszadó árpa genotípusok mikrospóra tenyészetében javította ovárium dajkatenyésztéssel az androgenezis hatékonyságát.

(3) Az idegen fajú dajkatenyésztés módszere ismert néhány egyszikű faj esetében. Mikrospóra eredetű búza embriókat állítottak elő árpa ovárium dajkatenyésztéssel (Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996). Árpa ováriumok javították a kukorica mikrospórák életképességét (Szarka és mtsai 2001). Zheng és mtsai (2003) megfigyelései szerint a búza ováriumok jelentősen emelik a kukorica mikrospóra tenyésztés hatékonyságát. Búza ovárium dajkatenyésztés emelte a gyenge válaszadó képességű árpa genotípusok androgenezis reakcióját (Coronado és mtsai 2005).

Az ovárium dajkatenyésztés jól ismert módszer egyszikű fajok portoktenyészetében és mikrospóra tenyészetében, de kétszikű fajokban eddig nem alkalmazott eljárás. Elsőként alkalmaztuk sikeresen az idegen fajú dajkatenyésztés módszerét paprika mikrospóra tenyészetben.

Számos publikáció foglalkozik a dajkatenyésztés jelentőségével, típusaival (Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Puolimatka és Pauk 1999, Konzak és mtsai 2000, Zheng és mtsai 2001, 2002, Liu és mtsai 2002b), azonban keveset tudunk az ovárium dajkatenyésztés hátteréről. Letarte és mtsai (2006) számoltak be a búza ováriumok által kiválasztott arabinogalaktánokról és arabinogalaktán fehérjékről, amelyek kulcsszerepet játszanak a búza mikrospórák androgenezise során. Részlegesen helyettesíteni tudta a búza ováriumok hatását (Letarte és mtsai 2006).

A különböző *in vitro* haploid indukciós rendszerek (portoktenyésztés, úsztatott portoktenyésztés és izolált mikrospóra tenyésztés) összehasonlítása nehéz feladat az eltérő genotípusok és tenyésztési feltételek miatt. Portoktenyészetben genotípustól függően átlagosan 1-178,2 embrioidot állítottak elő 100 portokból (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Buyukalaca és mtsai 2004, Kim és mtsai 2004, Ercan és mtsai 2006). Úsztatott portoktenyészetben 40,8 embrioidot állított elő donor bimbónként Supena és mtsai (2006a). Kim és mtsai (2008) izolált mikrospóra tenyészetben 54 embrioidot neveltek fel egy bimbó körülbelül 100 000 mikrospórájából. Izolált mikrospóra tenyészetben idegen fajú (búza) dajkatenyésztéssel mikrospóra eredetű embrioidokat állítottunk elő. A legjobb eredményt a 'Jariza' genotípussal értük el (65,7 embrioid/Petri csésze), amíg a 'Szegedi 178' genotípus mikrospóra tenyészeteiben átlagosan 3,75 mikrospóra eredetű embrioid fejlődött egy Petri csészében (egy donor bimbó).

Saját adataink és a publikált eredmények alapján elmondható, hogy a különböző haploid indukciós rendszerek hatékonysága eltérő. Az embrioidok száma alapján a mikrospóra tenyésztés egy versenyképes technika a haploid indukciós rendszerek között, de még további kísérleteket és fejlesztéseket igényel.

Fűszerpaprika izolált mikrospóra tenyésztési kísérletekhez a W14 alaptápoldat módosított változatát (W14mi) választottuk. Ez az alaptápoldat

korábban jó eredményt adott portoktenyészetben (Ouyang és mtsai 1983) és izolált mikrospóra tenyészetben (Lantos és mtsai 2005). Paprika portoktenyészetben különböző hormonokat, hormonkombinációkat alkalmaznak az androgenezis indukciójára (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 1999, 2000, Kim és mtsai 2004, Bárány és mtsai 2005, Supena és mtsai 2006a). Portoktenyészetben a leggyakrabban alkalmazott a 2,4-D és kinetin hormonkombináció az indukciós táptalajban (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Ercan és mtsai 2006). Úsztatott portoktenyészetben zeatin és IAA hormonkombinációt, míg izolált mikrospóra tenyészetben hormonmentes tápoldatot alkalmaztak (Supena és mtsai 2006a, Kim és mtsai 2008). Kísérleteinkben egy hormonmentes tápoldat, egy hormon (PAA) és egy hormonkombináció (2,4-D és kinetin) hatását hasonlítottuk össze az embrioidok száma alapján. Mindegyik tápoldatban sikerült mikrospóra eredetű embrioidokat előállítani. A legjobb eredményeket a 2,4-D és kinetin hormonkombinációval és a hormonmentes tápoldattal értük el. Különböző exogén hormonok mennyiségének és hatásának tesztelése a későbbiekben egy fontos kutatási terület lehet.

A növényregenerálás a fűszerpaprika mikrospóra tenyésztés egyik kritikus lépése. Kísérleteinkben négy genotípusból állítottunk elő mikrospóra eredetű *in vitro* gyökeres növényeket (0,5–1,25 növényke/Petri csésze). Ezek az eredmények jobbak, mint Supena és mtsai (2006a) izolált mikrospóra tenyésztéssel elért eredményei (0,1 növény/bimbó), de szerényebbek mint Kim és mtsai (2008) mikrospóra tenyésztési eredményei a ‘Milyang-jare’ genotípussal (4 növény/bimbó). Portoktenyészetben a regenerált növények mennyisége genotípustól függően 0,29-75,8 növény/100 portok (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Ercan és mtsai 2006). A növényregenerálás hatékonysága 0,7-7,1 növény/bimbó úsztatott portoktenyészetben (Supena és mtsai 2006a). Supena és mtsai (2006a) számolt be a legjobb eredményekről, amit a ‘Galaxi’ genotípus úsztatott portoktenyésztésével ért el. Az embrioidok száma alapján az izolált mikrospóra tenyésztés versenyképes a portoktenyésztési rendszerekkel, azonban a rutinszerű alkalmazáshoz a genotípus függőséget csökkenteni és a növényregeneráció hatékonyságát növelni szükséges.

Három fajtából állítottunk elő mikrospóra eredetű fertilis növényeket (‘Jariza’, ‘Jaranda’ és ‘Szegedi 80’). A mikrospóra eredetű növényeket a magyar fűszerpaprika hibrid nemesítési programokba beépítettük. A fűszerpaprika DH vonalakat a Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő Kht. Szegedi Kutatási Osztálya használta fel a ‘Délibáb’ fűszerpaprika hibrid nemesítésében.

5.2. Az androgenezis indukciója a három vizsgált fajban izolált mikrospóra tenyészetében

Az izolált mikrospóra tenyésztési kísérleteinket három fajjal végeztük. Saját eredményeinket és a nemzetközi irodalmat tanulmányozva több hasonlóságot és különbséget figyelhetünk meg.

A stressz az androgenezis indukciójához szükséges (Sunderland és mtsai 1984, Hu és Kasha 1999), azonban az alkalmazott stressz fajtája illetve mértéke különbözött fűszerpaprika esetében (16. táblázat).

Mindhárom faj esetében az izolált mikrospórák kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas állapotban voltak a tenyésztés első napján, ami egy idősebb fejlettségi állapotnak felel meg, mint az a három faj portoktenyésztének irodalmából ismert (Mejza és mtsai 1993, Hu és Kasha 1997a, Hansen és Andersen 1998a, 1998b, Gyulai és mtsai 2000, Indrianto és mtsai 2001, Zheng és mtsai 2001, 2002, Pauk és mtsai 2002, 2003, Eudes és Amundsen 2005, Ercan és mtsai 2006, Letarte és mtsai 2006, Supena és mtsai 2006a, Kim és mtsai 2008, Zur és mtsai 2008).

A szénhidrát grádiens centrifugálás mellett, búza és paprika mikrospórák izolálásakor a Percoll grádiens centrifugálás is alkalmazott módszer az életképes mikrospórák elválasztására (Indrianto és mtsai 2001, Supena és mtsai 2006a). Kísérleteinkben szénhidrát grádiens centrifugálást alkalmaztunk, amit módosítani kellett paprika esetében (16. táblázat).

A dajkatenyésztés mindhárom faj esetében javította az androgenezis hatékonyságát. Búza mikrospóra tenyésztésben a saját fajú és idegen fajú ovárium dajkatenyésztés egyaránt ismert (Mejza és mtsai 1993, Bruins és mtsai 1996, Konzak és mtsai 2000, Liu és mtsai 2002b). Tritikálé esetében a saját fajú dajkatenyésztést alkalmazták eredményesen (Eudes és Amundsen 2005). Fűszerpaprikánál az idegen fajú (búza) dajkatenyésztés bizonyult hatékonynak.

Búza és tritikálé mikrospóra tenyészetben az indukciós tápoldat szénforrása maltóz, míg Kim és mtsai (2008) paprika mikrospóra tenyésztéshez a szacharózt ajánlják. Az alkalmazott exogén hormonok illetve hormonkombinációk tekintetében nem ennyire egységes a kép. Búza, tritikálé és fűszerpaprika esetében több kutatócsoport a hormonmentes tápoldatot javasolta (Indrianto és mtsai 1999, 2001, Pauk és mtsai 2000, 2003, Oleszczuk és mtsai 2004, Shariatpanahi és mtsai 2006, Kim és mtsai 2008). Búzában a 2,4-D és kinetin hormon kombinációt alkalmazzák a leggyakrabban (Tuvesson és Öhlund 1993, Puolimatka és mtsai 1996, Puolimatka és Pauk 1999, Kunz és mtsai 2000), de más hormonkombináció (PAA és kinetin) is ismert (Hu és Kasha 1997a, Letarte és mtsai 2006). Eudes és Amundsen (2005) 2,4-D és BAP kiegészítést alkalmazott tritikálé mikrospóra tenyészetben.

16. táblázat Hasonlóságok és különbségek a három faj izolált mikrospóra tenyésztésében

	Búza	Tritikálé	Paprika
Stressz	2 hét hideg (4 ºC) és 3 nap éheztetés (32 ºC, 0,3 M mannit)	2 hét hideg (4 ºC) és 3 nap éheztetés (32 ºC, 0,3 M mannit)	7 nap éheztetés (32 ºC, 0,3 M mannit)
Fejlettségi állapot	kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas	kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas	kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas
Izolálás	Percoll grádiens cf./ szénhidrát grádiens cf. (0,3 M mannit/ 21% maltóz)	szénhidrát grádiens cf. (0,3 M mannit/ 21% maltóz)	Percoll grádiens cf./ szénhidrát grádiens cf. (0,3 M mannit/ 30% maltóz)
Dajka-tenyésztés	saját/idegen fajú ováriummal	saját fajú ováriummal	idegen fajú ováriummal
Szénhidrát indukciós tápoldatban	maltóz	maltóz	szacharóz
Hormonok indukciós tápoldatban	hormonmentes/ 2,4-D és kinetin/ PAA és kinetin	hormonmentes/ 2,4-D és BAP	hormonmentes
Növény-regenerálás	gyors	gyors	lassú
Növény-regenerálás exogén hormonjai	hormonmentes/ IAA és kinetin	hormonmentes/ IAA és kinetin	hormonmentes/ kinetin/BAP
ploidia fok meghatározás	zárósejtek mérése/ áramlási citometria	áramlási citometria	áramlási citometria
kolchicin kezelés	*in vivo*	*in vivo/in nitro*	*iv vitro*

A búza és tritikálé mikrospóra eredetű struktúrákból történő növényregenerálás (albínó és zöld együttesen) egyszerű és gyors folyamat (Zheng 2003). A hajtáskezdemények már néhány nap elteltével megfigyelhetőek a mikrospóra eredetű struktúrákon, míg paprika esetében ez a folyamat lassabb (Kim és mtsai 2008).

A növényregenerálás során alkalmazott exogén hormonok tekintetében eltérő adatokat találunk az irodalomban. Paprika esetében hormonmentes tápközeget alkalmaztak (Kim és mtsai 2008) izolált mikrospóra tenyészet eredetű struktúrák regenerálására. A növényregenerálás során portoktenyészetben kinetint (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Bárány és mtsai 2005), úsztatott portoktenyésztést követően pedig BAP-t használtak (Supena és mtsai 2006a).

A ploidia fok meghatározására több lehetőség is adott, az áramlási citometria egy általánosan alkalmazható módszer az egyszikű és kétszikű növények ploidia fokának mérésére (Hu és Kasha 1997b, Bohanec 2003). Paprikában az áramlási citometriát alkalmazzák a leggyakrabban, míg búzában a zárósejtek mérése is egy elfogadott módszer a ploidia fok meghatározására (Mitykó és mtsai 1995, Gyulai és mtsai 2000, Bohanec 2003, Ercan és mtsai 2006, Supena és mtsai 2006a, 2006b).

A búza haploid növények kromoszóma készletének megduplázása *in vivo* körülmények között történik néhány órás kolchicin kezeléssel (Metz és mtsai 1988), míg a haploid paprika növénykéket 6 napig kezelik kolchicinnel *in vitro* körülmények között (Gémes és mtsai 2006). Tritikálé haploid növények kolchicin kezelését *in vivo* és *in vitro* körülmények között is alkalmazzák (Arzany és Darvey 2001, Slusarkiewicz-Jarzina és Ponitka 2003).

5. 3. Az androgenezis további vizsgálatai és fejlesztési irányai mikrospóra tenyészetben (javaslatok)

A mikrospóra tenyésztés módszere rutinszerűen alkalmazott eljárássá vált dohányban, repcében és árpában, ahol az alapkutatás mellett a nemesítés igényeit is szolgálja az *in vitro* technika (Coventry és mtsai 1988, Custers és mtsai 1994, Touraev és mtsai 1996a, Davies és Morton 1998, Kasha és mtsai 2001a).

A DH növények előállítására egyéb módszertani lehetőség is létezik, azonban az alapkutatásban különös figyelmet fordítanak a sejtszinten történő vizsgálatokra. Az említett fajokban a mikrospóra tenyésztés módszerét alkalmazzák haploid transzformációra *in vitro* szelekcióra és a mikrospóra embriogenezis részfolyamatainak tanulmányozására is (Poulsen 1996, Touraev és mtsai 1996a, Kumlehn és mtsai 2003, Szarejko 2003, Aionesei és mtsai 2006, Shim és mtsai 2006).

Az általunk vizsgált fajok esetében további fejlesztések szükségesek a rutinszerű alkalmazáshoz. Búza és tritikálé mikrospóra tenyésztésben mind a mikrospóra eredetű struktúrák száma, mind a növényregeneráció jelentős, azonban a regenerált növények számottevő része albínó. A búza mikrospóra tenyésztésben elért zöld növények aránya elmarad a portoktenyésztéshez képest, így a rendszer további fejlesztéseket igényel. Tritikálé mikrospóra tenyésztéssel nagyobb arányban tudtunk zöld növényeket előállítani, mint búzában. A tritikálé portoktenyésztés módszere kevésbé kidolgozott, mint a búzáé, így a mikrospóra tenyésztés hamarabb válhat versenyképes technikává a tritikálé haploid indukciós rendszerek között. Azonban itt is szükséges a zöld növény regeneráció arányának emelése. A genomikai, transzkriptomikai, proteomikai és metabolomikai vizsgálatok remélhetőleg olyan új információkkal fognak szogálni, amelyek a mikrospóra tenyésztés hatékonyságának emeléséhez hozzájárulnak (Cordewener és mtsai 2000, 2009, Malik és Krochko 2009, Munoz-Amatriaín és mtsai 2009, Trop és Andersen 2009). A paprika izolált mikrospóra tenyésztés új módszernek számít a paprika haploid indukciós rendszerek között. A mikrospóra eredetű struktúrák mennyisége alapján versenyképes a módszer a többi haploid indukciós rendszer (portoktenyésztés, úsztatott portoktenyésztés) között, azonban a struktúrák regeneráló képességét további fejlesztésekkel szükséges javítani.

5. 4. Új tudományos eredmények

Kísérleteink során három mezőgazdaságilag fontos növényfaj (búza, tritikálé és fűszerpaprika) izolált mikrospóra tenyésztésével foglalkoztunk. Az androgenezis folyamatának tanulmányozásakor számos paramétert kellett figyelembe venni, amelyek befolyásolják a haploid indukció hatékonyságát. Mindhárom fajnál fontos volt a mikrospórák fejlettségi állapota, ami alapvetően befolyásolta az androgenezis indukcióját. Kísérleteink során mindhárom faj esetében a dajkatenyésztés pozitív hatását tapasztaltuk. Az előállított DH növényeket a nemesítési programokba beépítettük. Kísérleteink során az alábbi új és újszerű eredményeket értük el:

1. A donor *alapanyagok genotípusa* alapvetően befolyásolta a mikrospóra tenyésztés hatékonyságát. Egy tavaszi búza és kilenc őszi búza genotípus (elismert vagy regisztrált fajta) válaszadó képességét hasonlítottuk össze izolált mikrospóra tenyészetben. Tritikálé esetében nemesítési szempontjából értékes genotípusokkal dolgoztunk. Paprika mikrospóra tenyésztésben szélesebb genetikai háttér (magyar és spanyol genotípusok) tesztelésére került sor, így elsőként számoltunk be a genotípus hatásáról paprika izolált mikrospóra tenyészetben.

2. A vizsgált fajokban a *mikrospórák fejlettségi állapota* alapvetően befolyásolta az androgenezis indukcióját. A paprika esetében teszteltük az egyes fejlettségi állapotok indukcióra gyakorolt hatását. A nemzetközi szakirodalmat és saját eredményeinket összevetve a sikeres indukcióhoz mindhárom faj esetében idősebb fejlettségi állapot választását javasoljuk izolált mikrospóra tenyésztésben, mint portoktenyészetben.

3. A *dajkatenyésztés* javította a mikrospóra tenyésztési rendszer hatékonyságát mindhárom vizsgált faj esetében. Búza és tritikálé mikrospóra tenyésztésben az ovárium dajkatenyésztés megemelte a tenyészetenkénti embrioidok számát és a regenerálási szempontból fontos minőségét. Fűszerpaprika mikrospóra tenyésztésben elsőként alkalmaztuk a dajkatenyésztést, nevezetesen az FSOC módszert, amely minden genotípus esetében lehetővé tette az embrioidok jobb indukcióját.

4. Tritikálé és paprika mikrospóra tenyésztésben értékes DH törzseket és vonalakat hoztunk létre. A DH anyagok egy részét *nemesítési program*jainkban továbbhasználtuk és néhány fűszerpaprika vonalunkat már nemesítő partnereinkkel hibrid ('Délibáb' fűszerpaprika hibrid) szülőpartnerként is felhasználtunk.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az izolált mikrospóra tenyésztés legfontosabb lépéseit búza, tritikálé és paprika izolált mikrospóra tenyészetben vizsgáltuk. Az ovárium dajkatenyésztés mindhárom faj esetében kulcsfontosságú volt a mikrospóra eredetű struktúrák indukciója során. Számos mikrospóra eredetű embrioidot állítottunk elő, amelyekből fajtól és fajtától függően zöld és albínó növénykéket regeneráltunk.

Búza izolált mikrospóra tenyészetben négy alaptápodat módosított változatát (A2, CHB, W14mi és P4-m) hasonlítottuk össze. Az A2 és W14mi tápoldat szignifikánsan jobb eredményt adott az embrioidok és a regenerált növénykék (zöld és albínó) száma alapján, mint a CHB és P4-m tápoldatok. A legnagyobb embrioid számot és növényregenerációs hatékonyságot a W14mi tápoldattal értük el. Egy tavaszi búza genotípus és kilenc hazai őszi genotípus válaszadó képességét (‘GK Mini Manó’, ‘GK Garaboly’, ‘GK Hargita’, ‘GK Csongrád’, ‘GK Délibáb’, ‘GK Élet’, ‘GK Kata’, ‘GK Bán’, ‘Mv Palotás’) teszteltük búza izolált mikrospóra tenyészetben. Minden genotípusból sikerült embrioidokat előállítani és növénykéket regenerálni. Hét genotípus mikrospóra eredetű embrioidjaiból regeneráltunk zöld növénykéket. A nemzetközi eredményekkel harmóniában magas volt az albínó növények száma.

Az ovárium dajkatenyésztés hatását ellenőriztük tritikálé mikrospóra tenyészetben hat tavaszi tritikálé genotípussal. Az ovárium dajkatenyésztés alkalmazása a mikrospóra tenyészetben megvédte a növekedő struktúrákat, embrioidok fejlődtek, amelyekből zöld és albínó növénykéket regeneráltunk. Tritikálé mikrospóra tenyészetben a genotípus hatását három fajtával (’GK Gabo’, ’Kargo’ és ’Rex’) és három populációval (’AT314’, ’AT322’ és ’EMBR17/S2001’) ellenőriztük. Minden genotípusból állítottunk elő embrioidokat és zöld növényeket, azonban a genotípus befolyásolta a hatékonyságot. Negyven DH törzs (genotípusonként 8-8) és kontrolljaik hat tulajdonságát (növénymagasság, kalászhossz, ezerszemtömeg, szemkeménység, fehérjetartalom és hamutartalom) vizsgáltuk szántóföldi körülmények között. Az egyes genotípusokon belül szignifikáns különbségeket mértünk a genotípusok között és a DH törzseik között. A pontos nemesítési érték megállapítása több szántóföldi kísérletet igényel, de az első adatok is bizonyítják, hogy a módszer a nemesítés fontos eszközévé válhat.

Az izolált mikrospóra tenyésztés a DH növény előállítás új módszere paprikában. Három magyar (‘Szegedi 80’, ‘Szegedi 178’ és ‘Remény’) és három spanyol (‘Jeromin’, ‘Jariza’ és ‘Jaranda’) fűszerpaprika fajtát alkalmaztunk a kísérleteink során, így elsőként bizonyítottuk a genotípus hatását izolált mikrospóra tenyészetben. A mikrospórák optimális fejlettségi állapotát is teszteltük izolált mikrospóra tenyészetben. A legjobb eredményeket azon portokokkal értük el, amelyek begyűjtésükkor 80% kései egysejtmagvas és 20% korai kétsejtmagvas állapotú mikrospórákat tartalmaztak. Az ovárium

dajkatenyésztés hatását az embrioidok száma alapján vizsgáltuk izolált mikrospóra tenyészetben. A paprika mikrospórák tenyésztése eredményesebb volt idegen fajú ováriumok (búza, ‘CY-45’ tavaszi búza genotípus) dajkatenyésztésével, mint paprika ováriumok dajkatenyésztésével vagy ováriumok nélkül. Búza ováriumok jelenlétében a tenyésztés ötödik hetében jól fejlett embrioidok voltak megfigyelhetőek. Exogén hormonok hatását teszteltük az indukciós tápoldatban. A hormonmentes tápoldat, a PAA hormont (5 mg/l) illetve a 2,4-D (0,5 mg/l) és kinetin (0,5 mg/l) hormonkombinációt tartalmazó tápoldat hatását hasonlítottuk össze: a legjobb eredményeket a 2,4-D és kinetin hormonkombinációval és a hormonmentes tápoldattal értük el. Zöld növénykéket regeneráltunk a mikrospóra eredetű embrioidokból, de az embrioidok egy része abnormális, rozettás leveleket fejlesztett. A meggyökeresedett növénykék ploidia fokát áramlási citometriás vizsgálattal ellenőriztük. A haploid növényeket kolchicin kezelés után, a diploidokat közvetlenül ültettük ki az üvegházba. Kísérleteink során három ‘Jariza’, három, ‘Jaranda’ és egy ‘Szegedi 80’ mikrospóra eredetű DH növényt állítottunk elő. A DH vonalakat a magyar fűszerpaprika nemesítési programba bekapcsoltuk, amely a ’Délibáb’ fűszerpaprika hibrid előállítása során használta fel azokat.

7. SUMMARY

The most important steps of microspore-plant system were studied in isolated microspore culture of wheat, triticale and spice pepper. The ovary co-culture was a key factor to produce microspore derived structures. A lot of microspore derived embryoids was produced via microspore embryogenesis and green and albino plantlets were regenerated from these structures depending on species and genotype.

Four liquid modified media (A2, CHB, W14mi and P4-m) was tested in isolated wheat microspore culture. A2 and W14mi media was significantly better than CHB and P4-m media based on number of embrioids and regenerated plantlets (green and albino). The highest embryoid production and green plantlet regeneration was achieved by using W14mi medium. Nine Hungarian genotypes ('GK Mini Manó', 'GK Garaboly', 'GK Hargita', 'GK Csongrád', 'GK Délibáb', 'GK Élet', 'GK Kata', 'GK Bán', 'Mv Palotás') were tested in isolated wheat microspore culture. Each genotype was responsive, embrioids were developed in microspore cultures. Plantlets were regenerated in case of every genotype. Green plantlets were produced from seven genotypes. The rate of albino plantlets was high in consistent with the international results.

In triticale microspore culture, the ovary co-culture was tested with six spring triticale genotypes. Developing structures were protected using ovaries and they produced embryoids and green plantlets. The effect of genotype was checked by microspore culture with ovary coculture of three spring cultivars ('GK Gabo', 'Kargo' and 'Rex') and three advanced lines ('AT 314', 'AT322' and 'EMBR17/S2001'). Each genotype was responsive and produced embryoids and green plants, with an efficiency depending on the genotype. Six agronomical parameters (plant height, spike length, thousand grain weight, hardiness, protein content and ash content) of 40 DH lines (8/genotype) and their controlls were compared in the nursery. Significant differences were obtained among the genotype and among DH lines of each genotype. The exact breeding value of these lines have to be determined by more field experiments, but these results predict the role of microspore culture in triticale breeding programmes.

The isolated microspore culture is a new alternative method for DH plant production in pepper. Three Hungarian ('Szegedi 80', 'Szegedi 178' and 'Remény') and three Spanish spice pepper varieties ('Jeromin', 'Jariza' and 'Jaranda') were used as basic materials. Genotype effect was observed at first in these experiments in isolated microspore culture of pepper. The optimal stage of microspores was determined for isolated microspore culture. Donor anthers containing 80% uni-nucleated and 20% bi-nucleated microspores gave the best results. The effect of ovary co-culture was monitored on embryo production of microspores. Isolated pepper microspores were more successfully cultured with

ovaries of foreign species (wheat ovaries, ‘CY-45’) than with pepper ovaries or without ovaries. When wheat ovaries were used in cultures, well-developed embryos were identified in the fifth week of cultivation. The effects of growth regulators in the induction medium were tested. Growth regulator-free medium, phenylacetic acid (5 mg/l) and a combination of 2,4-D (0.5 mg/l) and kinetin (0.5 mg/l) were compared: the best results were achieved with the combination of 2,4-D and kinetin and the growth regulator-free medium. Green plantlets were regenerated from microspore-derived embryos, but some of them were distorted with rosettes of leaves. The ploidy level of rooted plantlets was checked by flow-cytometry. The haploid plants were planted after colchicine treatment, and the diploid plants were planted directly in the greenhouse. In these experiments, three ‘Jariza’, three ‘Jaranda’ and one ‘Szegedi 80’ microspore-derived fertile plants were produced. The DH lines are integrated into Hungarien spice pepper breeding program, which used them to produce the ‘Délibáb’ spice pepper hybrid.

IRODALOMJEGYZÉK

Agache S., De Buyser J., Henry Y. and Snape J. W. (1988): Studies of the genetic relationship between anther culture response and somatic tissue culture abilities in wheat. Plant Breeding 100: 26-33.

Agache S., Bachelier B., de Buyser J., Henry Y. and Snape J. W. (1989): Genetic analysis of the anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. Theoretical and Applied Genetocs 77: 7-11.

Aionesei T., Hosp J., Voronin V., Heberle-Bors E. and Touraev A. (2006): Methotrexate is a new selectable marker for tobacco immature pollen transformation. Plant Cell Reports 25 (5): 410-416.

Arzani A. and Darvey N. L. (2001): The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica 122 (2): 235-241.

Arzani A. and N. L. Darvey, 2002: Comparison of doubled haploid lines and their mid-generation progenitors in forage and dual-purpose triticales under greenhouse hydroponic conditions. Euphytica 126**,** 219-225.

Bakos F., Darkó É., Pónya Z. and Barnabás B. (2003a): Application of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture and ovaries to raise wheat zygotes *in vitro.* Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45 (1): 107-110.

Bakos F., Darkó É., Pónya Z. and Barnabás B. (2003b): Regeneration of fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from isolated zygotes using wheat microspore culture as nurse cells. Plant Cell Tissue and Organ Culture 74 (3): 243-247

Bakos F., Darkó É, Ascough G., Gáspár L., Ambrus H. and Barnabás B. (2008): A cytological study on aluminium-treated wheat anther cultures resulting in plants with increased Al tolerance. Plant Breeding 127 (3): 235-240.

Balatero C. H., Darvey N. L. and Luckett D. J. (1995): Genetic-analysis of anther-culture response in 6X triticale. Theoretical and Applied Genetics 90 (2): 279-284.

Bárány I., Testillano P. S., Mitykó J. and Risueno, M. C. (2001): The switch of the microspore developmental programme in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. International Journal of Developmental Biology 45: S39-S40.

Bárány I., González-Melendi P., Fadón B., Mitykó J. and Risueno M. C. (2005): Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. Biology of Cell 97 (9): 709-722.

Barnabás B., Pónya Z., Finy P., Solymoss M., Tímár I., Fehér A. and Dudits D. (2000): Micromanipulation of gametic cells of cereals. Us of Agriculturally important genes in Biotechnology. NATO advanced science institutes series, series A, life sciences. 319: 76-79.

Barnabás B., Pónya Z., Szakács É., Tímár I., Obert B. and Pretova A. (2001): Biotechnology and micromanipulation of sexual processes in flowering plants. Biologia 56 (1): 7-12

Barnabás B. (2003): Anther culture of maize, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 103-108.

Bartels P. G. and Hilton J. L. (1973): Comparison of trifularin , oryzalin, pronamide, propham and colchicine treatments on microtubules. Pesticide Biochem. Physiol. 3: 462-472

Blakeslee A., Belling J., Farnham M. E. and Bergner A. D. (1922): A haploid mutant in Jimson weed *Datura stramonium*. Science 55: 646-647.

Bohanec B. (2003): Ploidy determination usin flow cytometri, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 397-403.

Boutilier K., Fiers M., Liu C. M. and Van der Geest A. H. M. (2005): Biochemical and molecular aspect of haploid embryogenesis. In: Palmer C. E., Keller W. A., Kasha K. J. (eds.): Haploid in Crop Improvement II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 73-95.

Broughton S. (2008): Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 95 (2): 185-195.

Bruins M. B. M., Rakoczy Trojanowska M. and Snijders C. H. A. (1996): Isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L): The effect of co-culture of wheat or barley ovaries on embryogenesis. Cereal Research Communications 24 (4): 401-408.

Büter B. (1997): *In vitro* haploid production in maize. In: *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants. Jain, S.M., S.K. Sopory and R.E. Veilleux (Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 37-71.

Buyukalaca S., Comlekcioglu N., Abak K., Ekbic E. and Kilic N. (2004): Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. European Journal of Horticulture Science 69 (5): 206-209.

Caredda S., Doncoeur C., Devaux P., Sangwan R. S. and Clement C. (2000): Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Sexual Plant Reproduction. 13 (2): 95-104.

Charmet G. and Bernard S. (1984): Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid triticale (× *Triticosecale*, Wittmack). Theoretical and Applied Genetics 55: 308-321.

Cho M. S. and Zapata F. J. (1990): Plant regeneration from isolated microspore of indica rice. Plant and Cell Physiology 31 (6): 881-885.

Chu C. C., Hill R. D. and Brule-Babel A. L. (1990): High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. Plant Science 66: 255-262.

Cistue L., Soriano M., Castillo A. M., Valles M. P., Sanz J. M. and Echavarri B. (2006): Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports 25 (4): 257-264.

Clement C. and Pacini E. (2001): Anther plastids in angiosperms. Botanical Review 67 (1): 54-73.

Cordewener J. H. G., Hause G., Gorgen E., Busink R., Hause B., Dons H. J. M., Van Lammeren A. A. M., Van Lookeren Campagne M. M. and Pechan P. (1995): Cnanges in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. Planta 196: 747-755.

Cordewener J. H. G., Bergevoet J. H. W. and Liu C. M. (2000): Changes in protein synthesis and phosphorilation during microspore ambryogenesis in Brassica napus. Journal of Plant Physiol. 156 (2): 156-163

Cordewener J., van der Wal F., Joosen R., Boutilier K. and America T. (2009): Proteomics in Rapeseed Microspore Embryogenesis, in: A Touraev, B. P. Forster and S. M. Jain (Eds.), Advances in Haploid Production in Higher Plants, Springer Science + Business Media B. V., pp 115-126.

Coronado M. J., Hensel G., Broeders S., Otto I. and Kumlehn J. (2005): Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. Acta Physiologiae Plantarum 27 (4B): 591-599.

Coventry J., Kott L. and Beversdorf W. D. (1988): Manual for microspore culture technique for Brassica napus. University of Guelph, Guelph.

Custers J. B. M., Cordewener J. H. G., Nollen Y., Dons H. J. M. and Campagne M. M. V. (1994): Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of Brassica-napus. Plant Cell Reports 13 (5): 267-271.

Cuthbert J. L. , Somers D. J., Brule-Babel A. L., Brown P. D. and Crow G. H. (2008): Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 117 (4): 595-608.

Darkó É., Ambrus H., Stefanovits-Bányai E., Fodor J., Bakos F. and Barnabás B. (2004): Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an

Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. Plant Science 166 (3): 583-591.

Datta S. K. and Wenzel G. (1987): Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. Plant Science 48: 49-54.

Datta S. K. (2005): Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science 89 (11): 1870-1878.

Davies P. A. and Morton S. (1998): A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. Plant Cell Reports 17 (3): 206-210.

Deaton W. R., Metz S. G., Amstrong T. A. and Mascia P. N. (1987): Genetic analysis of the anther culture response of three spring wheat crosses. Theoretical and Applied Genetics 74: 334-338.

De Buyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R. and Hespel A. (1987): Florin – a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. Plant Breeding 98 (1): 53-56.

Dolcet-Sanjuan R., Claveria E. and Huerta A. (1997): Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. Journal of the American Society for Horticultural Science 122: 468-475.

Doležel J., Binorova P. and Lucretti S. (1989): Analysis of nuclear-DNA content in plant-cells by flow-cytometry. Biologia Plantarum 31 (2): 113-120.

Dumas de Vaulx R., Chambonnet D. and Pochard E. (1981): Culture *in vitro* d'anthères du piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35 C. Agronomie 1: 859-864.

Ekiz H. and Konzak C. F. (1991a): Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat: I. analyses of alloplasmic lines. Crop Science 31: 1421-1427.

Ekiz H. and Konzak C. F. (1991b): Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat: III. Common wheat crosses. Crop Science 31: 1432-1436.

Ercan N., Sensoy F. A. and Sensoy S. (2006): Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). Scientia Horticulturae 110 (1): 16-20.

Eudes F., Acharya S., Laroche A., Selinger L. B. and Cheng K. J. (2003): A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 73: 147-157.

Eudes F. and Amundsen E. (2005): Isolated microspore culture of Canadian 6x triticale cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture 82 (3): 233-241.

Fadel F. and Wenzel G.(1993): *In vitro* selection for tolerance Fusarium in F1 microspore population of wheat. Plant Breeding 110 (2): 89-95.

Felföldi K. and Purnhauser L. (1992): Induction of regenerating callus from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. Cereal Research Communications 20: 273-277.

Finnie S. J. and Powel W. and Dyer A. F. (1989): The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Breeding 103: 110-118.

Folling L. and Olesen A. (2001): Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. Plant Cell Reports 20 (7): 629-636.

Gémes Juhász A., Sági Zs., Salamon P., Somogyi N., Zatykó L. and Venczel G. (1998): Experiences and results of *in vitro* haploid methods application in pepper breeding programme. Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Avignon, France, September 7-11. Proceedings: 201-203.

Gémes Juhász A., Venczel G., Sági Zs., Gajdos L., Kristóf Z., Vági P. and Zatykó L. (2006): Production of doubled haploid breeding lines in case of paprika, eggplant, cucumber, zucchini and onion. Acta Horticulture 725: 845-854.

George L. and Narayanaswamy S. (1973): Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma 78: 467-470.

Gonzalez J. M., Muniz L. M. and Jouve N. (2005): Mapping of QTLs for androgenetic response based on a molecular genetic map of x *Triticosecale* Wittmack. Genome 48 (6): 999-1009.

González-Melendi P., Ramírez C., Testillano P. S., Kumlehn J. and Risueno M. C. (2005): Three-dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis. Planta 222: 47-57.

Guha S. and Maheswary S. C. (1964): *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497.

Gustafson V. D., Baenziger P. S., Wright M. S., Stroup W. W. and Yen Y. (1995a): Isolated wheat microspore culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 42 (2): 207-213.

Gustafson V. D., Baenziger P. S., Mitra A., Kaeppler H. F., Papa C. M. and Kaeppler S. M. (1995b): Electroporation of wheat anther culture-derived embryoids. Cereal Research Communications 23 (3): 207-213.

Guo Y. D. and Pulli S. (2000): Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). Plant Cell Reports 19 (9): 875-880.

Gyulai G., Gémesné J. A., Sági Z., Venczel G., Pintér P., Kristóf Z., Törjék O., Heszky L., Bottka S., Kiss J. and Zatykó L. (1999): PCR-analysis of F_1 hybrid derived DH pepper lines. Capsicum & Eggplant 18: 40 - 43.

Gyulai G., Gémesné J. A., Sági Z., Venczel G., Pintér P., Kristóf Z., Törjék O., Heszky L., Bottka S., Kiss J. and Zatykó L. (2000): Doubled haploid development and PCR-analysis of F-1 hybrid derived DH-R-2 paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. Journal of Plant Physiology 156 (2): 168-174.

Hansen N. J. P and Andersen S. B. (1998a): Efficient production of doubled haploid wheat plants by in vitro treatment of microspores with trifluralin or APM. Plant Breeding 117 (5): 401-405.

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

Harms C. T. and Potrikus I. (1978): Fractionation of plant protoplast types iso-osmotic density gradient centrifugation, Theoretical and Applied Genetics 53: 57-63.

Hassawi D. S., Qi J. H. and Liang G. H. (1990): Effects of growth-regulator and genotype on production of wheat and triticale polyhaploids from anther culture. Plant Breeding 104 (1): 40-45.

He D. G. and Ouyang J. W. (1984): Callus and plantlet formation from culturedwheat anthers different developmental stages. Plant Sci. Letters, 33: 71-79.

Heberle-Bors E. (1985): *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. Theoretical and Applied Genetics 71: 361-374.

Heslop-Harrison J. and Heslop-Harrison Y. (1970): Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technology 45 (3): 115-120.

Hoekstra S., vanBergen S., vanBrouwershaven I. R., Schilperoort R. A. and Wang M. (1997): Androgenesis in Hordeum vulgare L: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. Plant Science 126 (2) 211-218

Höfer M., Touraev A. and Heberle-Bors E. (1999): Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. Plant Cell Reports 18 (12):1012-1017.

Holm, P. B., Knudsen, S., Mouritzen, P. Negri, D., Olsen, F. L. and Roué, C. (1994): Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. Plant Cell 6: 531-543.

Holm P. B., Olsen O., Schnorf M., Brinch-Pedersen H. and Knudsen S. (2000): Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. Transgenic Research 9: 21-32.

Holme I. B., Olesen A., Hansen N. J. P. and Andersen S. B. (1999): Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. Plant Breeding 118 (2): 111-117.

Hoekstra, S., Vanzijderveld M. H., Heidekamp F. and Vandermark F. (1993): Microspore culture of *Hordeum vulgare* L. – the influence of density and osmolality. Plant Cell Reports 12 (12): 661-665.

Hosp J., Tashpulatov A., Roessner U., Barsova E., Katholnigg H., Steinborn R., Melikant B., Lukyanov S., Heberle-Bors and Touraev A. (2007): Transcriptional and metabolic profiles of stress-induced, embryogenic tobacco microspores. Plant Molecular Biology 63: 137-149.

Hu T. C., Ziauddin A. and Kasha K. J. (1995): Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media. 1. Effect of pretreatment, isolation methods and hormones. In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 31 (2): 79-83.

Hu T. and Kasha K. J. (1997a): Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture, Plant Cell Reports 16 (1997) 520-525.

Hu T. and Kasha K. J. (1997b): Performance of isolated microspore-derived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L.). Canadian Journal of Plant Science 77 (4): 549-554.

Hu T. C. and Kasha K. J. (1999): A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome 42 (3): 432-441.

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

ICC Standard No. 104/1 Determination of Ash in Cereals and Cereal Products

Immonen S. and Robinson J. (2000): Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. Plant Science (1): 77-84.

Inagaki M. N. (2003): Doubled haploid production in wheat through wide hybridization, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 53-58.

Indrianto A., Heberle-Bors E. and Touraev A. (1999): Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. Plant Science 143 (1): 71-79.

Indrianto A., Barinova I., Touraev A. and Heberle-Bors E. (2001): Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta 212: 163-174.

Jacquard C., Asakaviciute R., Hamalian A. M., Sangwan R. S., Devaux P. and Clement C. (2006): Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. Plant Cell Reports 25 (5): 375-381.

Jia X., Zhuang J., Hu S., Ye C. and Nie D. (1994): Establishment and application of the medium of anther culture of intergeneric hybrids of

Triticum aestivum x *Triticum-Agropyron*. Sci. Agri. Sinica 27: 83-87.

Joosen R., Cordewener J., Supena E. D. J., Vorst O., Lammers M., Maliepaard C., Zeilmaker T., Miki B., America T., Custers J. and Boutilier K. (2007): Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. Plant Physiol. 144: 155-172.

Karsai I., Bedő Z. and Hayes P. M. (1994): Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 39 (1): 49-53

Karsai I. and Bedő Z. (1997): Effect of carbohydrate content on the embryoid and plant production in triticale anther culture Cereal Research Communications 25 (2): 109-116.

Kasha K. J., Ziauddin A. and Cho U. H. (1990): Haploids in cereal improvement – anther and microspore culture, 19th stadler genetics symp.: gene manipulation in plant improvement 2, mar. 13-15, 1989, Univ. Missouri Columbia, Columbia. Mo gene manipulation in plant improvement II. – 19th stadler genetics symposia series, 213-235.

Kasha K. J., Simion E., Oro R., Yao Q. A., Hu T. C. and Carlson A. R. (2001a): An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica 120 (3): 379-385.

Kasha K. J., Hu T. C., Oro R., Simion E. and Shim Y. S. (2001b): Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreament of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. Journal of Experimental Botany 52 (359): 1227-1238

Kasha K. J., Simion E., Miner M. Letarte J. and Hu T. C. (2003): Haploid wheat isolated microspore culture protocol. In: Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P. és Szarejko I. (eds.) Doubled haploid production in crop plants, a manual. Kluwer Academic, Dordrecht Boston London, pp 77-81.

Keller J. (1991): Influence of media conditioning on *in vitro* development in pollen suspensions of triticale. Biologisches Zentralbett 110: 207-214.

Khan A. J., Hassan S., Tariq M., and Khan T. (2001): Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. Euphytica 120: 409-414.

Kim M., Kim J., Yoon M., Choi D. I. and Lee K. M. (2004): Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 77: 63-72.

Kim Y. S., Kuk Y. I. and Kim K. M. (2007): Inheritance and expression of transgenes through anther culture of transgenic hot pepper. Zeitschrift für Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences. 63 (9-10): 743-746.

Kim M., Jang I. C., Kim J. A., Park E. J., Yoon M. and Lee Y. (2008): Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum*

L.) through isolated microspore culture, Plant Cell Reports 27 (3): 425-434.

Konzak C. F., Polle E. A., Liu W. and Zheng Y. (2000): Methods for generating doubled–haploid plants. Published international patent application. PCT/US/99/19498.

Kovács M., Barnabás B. and Kranz E. (1995) Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. Plant Cell Reports. 15: 178-180.

Kranz E. and Lörz H. (1993) *In vitro* fertilisation with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. Plant Cell 5: 739-746.

Kristiansen K. and Andersen S. B. (1993): Effect of donor plant-temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. Euphytica 67 (1-2): 105-109.

Kunz C., Islam M. S., Berberat J., Peter O., Büter B., Stamp P. and Schmid J. E. (2000): Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. Journal of Plant Physiology 156: 190-196.

Kumlehn J., Kirik V., Czihal A., Altschmied L., Matzk F., Lörz H. and Bäumlein, H. (2001): Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies. Sexual Plant Reproduction 14: 239-243.

Kumlehn J., Serazetdinova L., Becker D. and Loerz H. (2003): Agrobacterium-mediated transformation of barley pollen cultures. Plant Biotechnology 2002 and Beyond, pp. 545-547.

Kuo J. S., Wang Z. Z., Chien N. F., Ku S. J., Kung M. L. and Hsu H. C. (1973): Investigations on the anther culture *in vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Botanica Sinica 15: 43-47.

Kyo M. and Harada H (1986): Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. Planta 168 (4): 427-432.

Labbani Z., Richard N., De Buyser J. and Picard E. (2005): Chlorophyllian durum wheat plants obtained by isolated microspores culture: importance of the pre-treatments. Comptes Rendus Biologies 328 (8): 713-723.

Lantos C., Jancsó M. and Pauk J. (2005): Microspore culture of small grain cereals.Acta Physiologiae Plantarum 27 (4B): 631-639.

Lantos C., Páricsi S., Zofajova A. and Weyen J. (2006): Isolated microspore culture of wheat with Hungarian cultivars Acta Biologica Szegediensis 50 (1-2): 31-35.

Laurie D. A. and Benett M. D. (1988): The production of haploid wheat plants × maize crosses. Theoretical and Applied Genetics 76: 393-397.

Lazar M. D., Baezinger P. S. and Schaeffer G. W. (1984): Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. Theoretical and Applied Genetics 68: 131-134.

Leduc N., Matthys-Rochon E., Rougier M., Mogensen L., Holm P. B., Magnard J. L. and Dumas C. (1996): Isolated maize zygotes mimic in vivo embryonic development and express microinjected genes when cultured in vitro. Developmental Biology 177: 190-203.

Letarte J., Simion E., Miner M. and Kasha K. J. (2006): Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. Plant Cell Reports 24 (12): 691-698.

Levan A. (1938): The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. Hereditas 24: 471-486.

Li H. and Devaux P. (2001): Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Reports 20 (6):475-481.

Li H. and Devaux P. (2005): Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.), Acta Physiologiae Plantarum 27 (2005) (4B) 611-619.

Ling D. X., Luckett D. J., and Darvey N. L. (1991): Low-dose gamma irridation promotes wheat anther culture response. Aust. J. Bot. 39: 467-474.

Liu W., Zheng M. Y. and Konzak C. F. (2002a): Improving green plant production via isolated microspore culture in bred wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports 20: 821-824.

Liu W. G., Zheng M. Y., Polle E.A. and Konzak C. F. (2002b): Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Science 42 (3): 686-692.

Malik M. R., Wang F., Dirpaul J. M., Zhou N., Polowick P. L., Ferrie A. M. R. and Krochko J. E. (2007): Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in Brassica napus . Plant Physiol. 144:134-154.

Malik M. R. and Krochko J. E. (2009): Gene expression profiling of microspore embryogenesis in *Brassica napus*, in: A Touraev, B. P. Forster and S. M. Jain (Eds.), Advances in Haploid Production in Higher Plants, Springer Science + Business Media B. V., pp 115-126.

Maluszynski M., Kasha K. J. and Szarejko I. (2003): Published doubled haploid protocols in plant species. In Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P. and Szarejko I. (eds.): Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer Academic Publisher, Dodrecht, the Netherlands, pp 309-335.

Maraschin S. F., de Priester W., Spaink H. P. and Wang M. (2005): Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany 56: 1711-1726.

Maraschin S. D. F., Caspers M., Potokina E., Wulfert F., Graner A., Spaink H. P. and Wang M. (2006): CDNA aaray analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. Physiologia Plantarum 127: 535-550.

Marciniak K., Banaszak Z. and Wedzony M. (1998): Effect of genotype, medium and sugar on triticale (X *Triticosecvale* Wittmack) anther culture response. Cereal Research Communications 26 (2): 145-151.

Marciniak K., Kaczmarek Z., Adamski T. and Surma M. (2003): The anther culture response of triticale line × tester progenies. Cellular & Molecular Biology Letters 8: 343-351.

Mejza S. J., Morgant V., DiBona D. E. and Wong J. R. (1993): Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. Plant Cell Reports 12: 149-153.

Mentewab A., Letellier V., Marque C. and Sarrafi A. (1999): Use of anthocyanin biosynthesis stimulatory genes as markers for the genetic transformation of haploid embryos and isolated microspores in wheat. Cereal Research Communications 27 (1-2): 17-24.

Metz S. G., Sharma H. C., Amstrong T. A. and Mascia P. N. (1988): Chromosome doubling and aneuploidy in anther-derived plants from two winter wheat lines. Genome 30: 177-181.

Mihály R and Pauk J. (2007): Transzformált idegen gén (bar) szelekciója búza (*Triticum aestivum* L.) portoktenyészetben. Növénytermelés 56 (1-2): 13-25.

Mihály R., Konkoly M., Monostori T. and Pauk J. (2008): Funkcionális genomikai vizsgálatok megalapozása: markergén bejuttatása búzába. Agrár és vidékfejlesaztési szemle 3 (2): 156-162

Minamiyama Y., Tsuro M., Kubo T. and Hirai M. (2007): QTL analysis for resistance to Phytophthora capsici in pepper using a high density SSR-based map. Breeding Science 57 (2): 129-134

Mitykó J., Andrásfalvy A., Csilléry G. and Fáry M. (1995): Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Breeding 114 (1): 78-80.

Mitykó J., Szabó L. and Barnabás B. (1999): Colchicine induced ultrastructural changes in barley and pepper microspores. J. Slovak Acad.Sci. 54: 24-25.

Mitykó J. and Gémes Juhász A. (2006): Improvement in the haploid technique routinely used for breeding sweet and spice peppers in Hungary. Acta Agronomica Hungarica 54. (2): 203-219.

Monostori T., Pauk J. and Puolimatka M. (1998): Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) *in vitro* androgenesis in isolated microspore culture. Növénytermelés 47: 371-382.

Mordhorst A. P. and 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. Journal of Plant Physiology 14: 485-492.

Morris C. F., Demacon V. L. and Giroux M. J. (1999): Wheat grain hardness among chromosome 5D homozygous recombinant substitution lines using different methods of measurement. Cereal Chemistry 76, (2) 249-254.

Munoz-Amatriaín M., Svensson J. T., Castillo A. M., Cistue L., Close T. J. and Vallés M. P. (2006): Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. Physiologia Plantarum 127: 551-560.

Munoz-Amatriaín M., Svensson J. T., Castillo A. M., Cistue L., Close T. J. and Vallés M. P. (2009): Expression profiles in barley microspore embryogenesis, in: A Touraev, B. P. Forster and S. M. Jain (Eds.), Advances in Haploid Production in Higher Plants, Springer Science + Business Media B. V., pp 127-134.

Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.

Nageli M., Schmid J. E., Stamp P. and Buter B. (1999): Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. Plant Cell Reports 19 (2): 177-184.

Navarroalvarez W., Baenzinger P. S., Esridge K. M., Hugo M., and Gustafson V. D. (1994): Addition of colchicine to wheat anther culture media increase doubled haploid plant production. Plant Breeding 112 (3) 192-198.

Oleszczuk S., Sowa S. and Zimny J. (2004): Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. Plant Cell Reports 22: 885-893.

Oleszczuk S., Sowa, S. and Zimny, J. (2006): Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. Protoplasma 228 (1-3): 95-100.

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

Orlov P. A., Becker D., Shewe G. and Lorz H. (1999): Cytoplasmic effects on pollen embryogenesis induction in wheat micropore culture. Cereal Research Communications 27 (4): 357-363.

Ouyang J. W., Hu H., Chuang C. C. and Tseng C. C. (1973): Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. Scientia Sinica 16: 79-95.

Ouyang J. W., Zhou S. M. and Jia S. E. (1983): The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum* L. Theoretical and Applied Genetics 66: 101-109.

Ouyang J. W., Jia S. E., Zhang C., Chen X. and Fen G. (1989): A new synthetic medium (W14) for wheat anther culture. Annual Report, Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, pp. 91-92.

Ouyang J. W., Liang H., Zhang C., Zhao T. H. and Jia S. E. (2004): The effect of potato extract used as additive in anther culture medium on culture responses in *Triticum aestivum.* Cereal Research Communications 32 (4): 501-508.

Patel M., Darvey N. L., Marshall D. R. and Berry J. O. (2004): Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. Euphytica 140 (3): 197-204.

Pauk J., Manninen O., Mattila I., Salo Y. and Puli S. (1991): Androgenesis in hexaploid spring wheat F_2 population and their parents using a multiple-step regeneration system. Plant Breeding, 107: 18-27.

Pauk J., Kertész Z., Beke B., Bóna L., Csősz M. and Matuz J. (1995): New winter-wheat variety – GK-Délibáb developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. Cereal Research Communications 23 (3): 251-256.

Pauk J., Poulimatka M., Lökös Tóth K. and Monostori T. (2000): *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 61: 221-229

Pauk J., Mihály R., Monostori T. and Puolimatka M. (2003): Protocol of triticale (x *Triticosecale* Wittmack) microspore culture, in: M. Maluszynski M, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 129-134.

Pauls K. P., Chan J., Woronuk G., Schulze D. and Brazolot J. (2006): When microspores decide to become embryos – cellular and molecular changes. Can. J. Bot. Rev. Can. Bot. 84: 668-678.

Picard E. and De Buyser J. (1973): Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. á partir de cultures d'anthéres *in vitro*. C. R. Acad. Sci. Paris, 277: 1463-1466.

Picard E., Rode A., Doussinault G., Rousset M and Rives M. (1990): Wheat (*Triticum aestivum*): *in vitro* production and utilization of doubled haploids. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry: Haploids in Crop Improvement I. Vol. 12 (pp. 101-124) Springer-Verlag, New York

Pónya Z., Finy P., Fehér A., Mitykó J., Dudits D. and Baranbás B. (1999): Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of

wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection. Protoplasma 208 (1-4) 163-172.

Poulsen GB (1996): Genetic transformation of Brassica. Plant Breeding 115 (4): 209-225.

Punhauser L. and Gyulai G. (1993): Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 35: 131-139.

Puolimatka M., Laine S. and Pauk J. (1996): Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. Cereal Research Communications, 24: 393-400.

Puolimatka M. and Pauk J. (1999): Impact of explant type, duration and initiation time on the co-culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Physiology 154 (3): 367-373.

Redha A., Attia T., Buter B., Saisingtong S., Stamp P. and Schmid J. E. (1998): Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Plant Cell Reports 17 (12): 974-979.

Redha A. and Talaat A. (2008): Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. Plant Cell Tissue and Organ Culture 92 (2): 141-146.

Reynolds T. L. (1993): A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development. Am . J. Bot. 80: 569-576.

Reynolds T. L. and Crawford R. L. (1996): Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). Plant Molecular Biology 32 (5): 823-829.

Röber F. K., Gordillo G. A., Geiger H. H. (2005): In vivo haploid induction in maize - performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. Maydica 50: 275-283.

Roberts-Oehlschlager S. L and Dunwell (1990): Barley anther culture – pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 20 (3): 235-240.

Rubio S., Jouve N. and González J. M: (2004): Biolistic transfer of the uidA and its expression in haploid embryo-like structures of triticale. Plant Cell Tissue and Organ Culture 77: 203-209.

Schumann G. and Hoffmann B. (1989): Some pros and cons in using potato extract medium in anther culture of triticale and wheat. Archiv für Züchtungforschung 19: 21-27.

Seguí-Simarro J. M. and Nuez F. (2008): How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. Physiologia Plantarum. 134: 1-12.

Shariatpanahi M. E., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E. and Touraev A. (2006): Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Reports 25: 1294-1299.

Shim, Y. S. Kasha, K. J. Simion, E. and Letarte, J. (2006): The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. Protoplasma 228 (1-3): 79-86

Sibi M., Dumas de Vaulx R. and Chambonnet D. (1979): Obtention de plantes haploïdes par androgenèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum* L.). Ann. Amèlior Plantes 29:583-606.

Slusarkiewicz-Jarzina A. and Ponitka A. (2003): Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture. 31 (3-4): 289-296.

Soriano M., Cistué L., Vallés M. P. and Castillo A. M. (2007): Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant cell Tissue and Organ Culture 91: 225-234.

Sugita T., Yamaguchi K., Kinoshita T., Yuji K., Sugimura Y., Nagata R., Kawasaki S. and Todoroki A. (2006): QTL analysis for resistance to phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leon.) using an intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. Breeding Science 56 (2): 137-145.

Sun C. S., Wang C. C. and Chu C. C. (1973): Cytological studies on the androgenesis of Triticale. Acta Botanica Sinica 15: 145-154.

Sunderland, N., Huang, B. and Hills, G. J. (1984): Disposition of pollen *in situ* and its relevance to anther/pollen culture. Journal of Experimental Botany 35: 521-530.

Supena E. D. J., Suharsono S., Jacobsen E. and Custers J. B. M. (2006a): Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 25 (1): 1-10.

Supena E. D. J., Muswita W., Suharsono S. and Custers J. B. M. (2006b): Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. Scientia Horticulturea 107: 226-232.

Szabó-Hevér Á., Tóth B., Lehoczki-Krsjak S. and Mesterházy Á. (2008): Mapping of FHB resistance QTLs in the Mini Manó /Frontana and Frontana/ Remus DH populations. Cereal Research Communications 36: 271-275.

Szarejko I (2003): Doubled haploid mutant production, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 351-361.

Szakács É., Kovács G., Pauk J. and Barnabás B. (1988): Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports 7: 127-129.

Szakács É. and Barnabás B. (1995): The effect of colchicine treatment on microspore division and microspore-derived embryo differentiation in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Euphytica 83 (3): 209-213

Szakács É., Karsai I., Bedő Z. and Barnabás B. (2002): *In vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): theory and practice. Növénytermelés 51 (5): 603-612

Szarka B., Dévényi M. and Mórocz S. (2001): Fertile maize lines obtained from isolated microspores. Euphytica 122 (1): 53-60.

Takács G. and Pokorny T., 2004: Portable near-infrared transmission analyser for qualification of grains and flour, in Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th Internal Conference, Ed by A.M.C. Davies and A.Garrido -Varo, NIR Publications, Chichester,UK, pp. 93-98.

Testillano P. S., Coronado M. J., Seguí J. M., Domenech J., González-Melendi P., Raska I. and Risueno M. C. (2000): Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. Journal of Structural Biology 129: 223-232.

Testillano P., Georgiev S., Mogensen H. L., Coronado M. J., Dumas C., Risueno M. C. and Mathys-Rochon E. (2004): Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. 112 (7): 342-349.

Thomas W. T. B., Forster B. P. and Gertsson B. (2003): Doubled haploids in breeding, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 337-349.

Touraev A., Ilham A., Vicente O. and Heberle-Bors E. (1996a): Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. Plant Cell Reports 15 (8): 561-565.

Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O. and Heberle-Bors E. (1996b): Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation and high temperature. Sex. Plant Reprod. 9: 209-215.

Touraev A. and Heberle-Bors E. (1999): Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. In: Hall RD (ed.) Methods in molecular biology, vol. 111: Plant cell culture protocols. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp. 281-291.

Touraev A. and Heberle-Bors E. (2003): Anther and isolated microspore culture in tobacco, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 223-228.

Trop A. M. and Andersen S. B. (2009): Albinism in microspore culture, in: A Touraev, B. P. Forster and S. M. Jain (Eds.), Advances in Haploid Production in Higher Plants, Springer Science + Business Media B. V., pp 155-160.

Tsuwamoto R., Fukuoka H. and Takahata Y (2007): Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of Brassica napus. Planta 225: 640-652.

Tuvesson I. K. D. and Öhlund R. C. V. (1993): Plant regeneration through culture of isolated microspores *Triticum aestivum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 34: 163-167.

Tuvesson S., Ljungberg A., Johansson N., Karlsson K. E., Suijs L. W. and Josset J. P. (2000): Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. Plant Breeding 119 (6): 455-459.

Tuvesson S., von Post R. and Ljungberg (2003): Wheat anther culture, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 71-76

Tuvesson S., Dayteg C., Hagberg P., Manninen O., Tanhuanpaa P., Tenhola-Roininen T., Kiviharju E., Weyen J., Forster J., Schondelmaier J., Lafferty J., Marn M. and Fleck A. (2007): Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica 158 (3): 305-312.

Verma V., Bains N. S., Mangat G. S., Nanda G. S., Gosal S. S., Singh K. (1999): Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat × maize system. Crop Science 39: 1722-1727.

Wang C. C., Chu C. C., Sun C. S., Wu S. H., Yin K. C. and Hsu C. (1973a): The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers cultured *in vitro*. Acta Genetica Sinica 16: 218-222.

Wang Y. Y., Sun C. S., Wang C. C. and Chen N. F. (1973b): The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annum* from anther culture. Scientia Sinica 16: 147-151.

Wedzony M., Marcinska I., Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A. and Wozna J. (1998): Production of doubled haploids in Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) by means of crosses with maize (Zea mays L) using picloram and dicamba. Plant Breeding 117 (3): 211-215.

Werner K., Friedt W. and Ordon F. (2005): Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). Molecular Breeding 16: 45-55.

Werner K., Friedt W. and Ordon F. (2007): Localisation and combination of resistance genes against soil-borne viruses of barley (BaMMV, BaYMV) using doubled haploids and molecular markers. Euphytica 158 (3): 3223-329.

Xie J. H., Gao M. W., Cai Q. H., Cheng X. Y., Shen Y. W. and Liang Z. Q. (1995): Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth-regulator combination in Japonica rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 42 (3): 245-250.

Xie J. H., Gao M. W., Cai Q. H., Liang Z. Q. and Xue Q. Z. (1996): Effects of donor plant growth status and preculture temperature on isolated microspore culture ability in japonica rice (*Oryza sativa* L). Cereal Research Communications 24 (2): 133-138.

Zamani I., Kovács G., Gouli-Vavdinoudi E., Roupakias D. G. and Barnabás B. (2000): Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. Plant Breeding 119 (6): 461-465

Zamani I., Gouli-Vavdinoudi E,, Kovács G,, Xynias I., Roupakias D. and Barnabás B. (2003): Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F-1 hybrids. Plant Breeding 122 (4): 314-317.

ZarskyV., Garrido D., Eller N., Tupy J., Vicente O., Schoffl F. and Heberle-Bors E. (1995): The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. Plant Cell Environ. 18: 139-147.

Zhang Y. L. and Li D. S. (1984): Anther culture of monosomics in *Triticum aestivum*. Hereditas 6: 7-10.

Zhang K. P., Tian J. C., Zhao L. and Wang S. S. (2008): Mapping QTLs with epistatic effects and QTL x environment interactions for plant height using a doubled haploid populatiop in cultivated wheat. Journal of Genetics and Genomics 35 (2): 119-127.

Zhang H., Peng H., Li Y., Xu P., Wang X. and Wu X. (2006): Pattern of DNA methylation between haploids and corresponding diploids in rice. Chinese Science Bulletin 51 (14): 1721-1728.

Zhao J. P., Newcomb W. and Simmonds D. (2003): Heat-shock proteins 70 kDa and 19 kDa are not required for induction of embryogenesis of *Brassica napus* L. cv. topas microspores. Plant and Cell Physiology. 44 (12): 1417-1421.

Zheng Y., Liu W., Weng Y., Polle E. and Konzak C. F. (2001): Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspoeres treated with inducer chemicals. Plant Cell Reports 20 (8): 685-690.

Zheng M. Y., Weng Y., Liu W. and Konzak C. F. (2002): The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Cell Reports 20 (9): 802-807.

Zheng M. Y. (2003): Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum L.)* - doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73 (3): 213-230.

Zheng M. Y., Weng Y., Sahibzada R. and Konzak C. F. (2003): Isolated microspore culture in maize. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 95-102.

Zhou H. P. and Konzak C. F. (1989): Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. Crop Science 29: 817-821.

Zhuang J. J. and Jia X. (1983): Increasing differentiation freqencies in wheat pollen callus. In: Hu H., Vega M. R. (eds) Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science, Beijing, p 431.

Ziauddin A., Marsolais A., Simion E. and Kasha K. J. (1992): Improved plant – regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenilacetic acid (PAA). Plant Cell Reports 11 (10): 489-498.

Zur I., Dubas E., Golemic E., Szechynska-Hebda M., Janowiak F. and Wedzony M. (2008): Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (X *Triticosecale* Wittmack). Plant Cell Tissue and Organ Culture 94: 319-328.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Heszky László akadémikus úrnak – SZIE Genetika és Biotechnológia Intézet vezetőjének – és munkatársainak a sokéves oktatási tevékenységért, mellyel támogatták korábbi diplomadolgozatom és jelen doktori értekezésem elkészülését.

Köszönettel tartozom Dr. Pauk Jánosnak – Gabonakutató Kft. tudományos tanácsadójának – témavezetéséért, a munkafeltételek biztosításáért és hasznos tanácsaiért. Köszönöm Dr. Matuz János igazgató úrnak és a Gabonakutató Kft. többi dolgozójának tanulmányaim szakmai és erkölcsi támogatását! Külön köszönet közvetlen munkatársaimnak – Olasz Mária, Majer Petra, Fehérné Juhász Erzsébet, Kótai Éva, Mihály Róbert és Áy Zoltán – segítőkész és lelkiismeretes munkájukért.

Köszönöm Dr. Bóna Lajosnak és Dr. Ács Péternének a tritikálé mikrospóra tenyésztési kísérletekhez nyújtott segítségüket!

Köszönet illeti az együttműködő intézmények dolgozóit – Dr. Somogyi György és Táborosiné Ábrahám Zsuzsanna (Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő Kht. Szegedi Kutatási Osztály), Gémesné Dr. Juhász Anikó (Medimat Kft.), Dr. Fehér Attila és Dr. Ötvös Krisztina (SzBK), Dr. Kristóf Zoltán és Dr. Vági Pál (ELTE), Dr. Tanács Lajos (SZTE Mezőgazdasági Kar) – hatékony kooperációs munkájukért.

Köszönöm családom el nem múló türelmét és folytonos támogatását!

Köszönet az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok anyagi támogatásáért (OTKA TS 40887).

„Én mindent készen kaptam
Áldott elődi kézből,
Éppen csak a szivárvány
Hiányzott még az égről.
Vén vasoszlopokra
Szivárványként feszültem,
Egemet ők tartották
Mohosan és derülten:
Nincs semmi érdemem.”

idézet Reményik Sándor (1936)
„Elődeim emberségéből” című verséből