

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
MEZŐGAZDASÁGI KAR
NÖVÉNYTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETVÉDELMI INTÉZET**

**IN VITRO ANDROGENEZIS INDUKCIÓJA ROZSBAN (*SECALE
CEREALE* L.)**

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Készítette:
GIETH EVELIN
3. évfolyam**

**Belső konzulens:
DR. MONOSTORI TAMÁS
intézetvezető, főiskolai tanár**

**Külső konzulens:
DR. LANTOS CSABA
laborvezető, Biotechnológiai laboratórium
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft**

**HÓDMEZŐVÁSÁRHELY
2024**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A rozs származása, termesztése és jelentősége	6
2.2. A DH növények szerepe és jelentősége a növénynemesítésben	7
2.3. Az androgenezis indukciója	8
2.4. A haploidia története	9
2.5. A haploid rozs történetének áttekintése	9
2.6. A portoktenyésztésre hatással lévő tényezők	10
2.6.1. A genotípus hatása	10
2.6.2. A donor növények és a mikrospórák fejlettségi állapota	10
2.6.3. A stresszek szerepe	11
2.6.4. Tenyésztési körülmények	12
2.6.5. A dajkatenyésztés szerepe	13
2.7. Ploidia fok meghatározás	14
3. Anyag és módszer	16
3.1. Növényanyag, felnevelési körülmények	16
3.2. A donorhajtások begyűjtése	16
3.3. Stressz előkezelések	16
3.4. <i>In vitro</i> androgenezis indukciója	18
3.4.1. Portoktenyészetek indítása	18
3.4.2. Dajkatenyésztés hatásának vizsgálata	18
3.5. Növényregenerálás, gyökeresítés	18
3.6. Üvegházi kiültetés, akklimatizáció	20
3.7. Áramlási citometria	20
3.8. Statisztikai elemzés	22
4. Eredmények	23

4.1. <i>In vitro</i> androgenezis indukciója rozs portoktenyészetben	23
4.2. Előkezelés hatása Wibro rozsfajta portoktenyészetében	25
4.3. Dajkatenyésztés hatása Wibro rozsfajta portoktenyészetében.....	25
4.4. Portoktenyészet eredetű növénykéak akklimatizációja és ploidia fokuk azonosítása áramlási citometriás vizsgálat alapján	26
5. Következtetések, javaslatok.....	29
5.1. Előkezelés hatása Wibro rozsfajta portoktenyészetében	29
5.2. Az ováriumos dajkatenyésztés hatása Wibro rozsfajta portoktenyészetében	30
5.3. A portoktenyészet eredetű növénykéak ploiditásának meghatározása	32
6. Összefoglalás	33
7. Irodalomjegyzék	35
8. Köszönetnyilvánítás.....	39

1. Bevezetés

A 20. században és azt követően a természettudományok jelentős mértékű fejlődésnek indultak, különösképpen a genetikában és a biotechnológiában értek el nagy sikereket a felfedezéseknek köszönhetően.

Napjainkban a biotechnológiának kulcsfontosságú szerepe van a mezőgazdaságban is, mivel a rohamosan növekedő fogyasztási igények kielégítése egyre nagyobb problémát jelent. A megváltozott környezeti feltételek mellett is bőven termő fajtákat kell előállítani, amelyek kórokozók és kártevők elleni ellenállósága is kiváló. A hagyományos növénynemesítési módszerek mellett egyre gyakoribb az *in vitro* módszerek alkalmazása, ilyen például a DH, azaz doubled haploid vagy kettőzött haploid növények előállítása. A DH növény előállítás egyik formája az *in vitro* androgenezis, amely során haploid, illetve DH egyedeket állítanak elő portoktenyészetekből vagy izolált mikrospóra tenyészetekből. A spontán vagy indukált (kolhicin kezelés) kromoszóma duplikációt követően a kapott növények minden tulajdonságukra nézve homozigóták. A DH növény előállítás előnye, hogy lehetővé teszi az új fajták létrehozását lényegesen kevesebb idő- és munkaráfordítással, mint a klasszikus növénynemesítés esetén.

Habár az 1970-es évek óta foglalkoznak DH rozsnövények előállításával, a rozs esetében az *in vitro* növényelőállítási módszerek hatékonysága messze elmarad a többi jelentős gabonafélétől, mint például a búza, a tritikálé, rizs vagy az árpa esetében. Az *in vitro* androgenezis hatékonyságát számos tényező befolyásolja, ilyen a különböző stresszelőkezelések vagy tápközegek alkalmazása.

Tudományos Diákköri Dolgozatom kísérleteit a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Laboratóriumában végeztem. Duális hallgatóként számos gabonanövény DH kutatási programjában vehettem részt, köztük foglalkoztam a mikrospóra eredetű rozs növényké előállításával is.

Tudományos Diákköri Dolgozatom célitűzései:

1. Különböző előkezelések hatásának vizsgálata az *in vitro* androgenezis hatékonyságára rozsban
2. Dajkatenyésztés hatásának vizsgálata az *in vitro* androgenezis hatékonyságára rozsban
3. Az előállított növénykéek ploidia fokának vizsgálata

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A rozs származása, termesztése és jelentősége

A kultúrrozs (*Secale cereale* L.) Ázsiából származik. Gécenctruma Kis-Ázsiában, Délnyugat-Ázsiában, a Kaukázuson, Afganisztánban, illetve Irán területén található. Európába a termesztett búza importálása során hurcolták be. Vad őse a *Secale ancestrale*.

Rendszertani besorolása alapján a Gramineae család, és a *Secale* nemzetség tagja. A nemzetség fajai általában könnyen keresztezhetők egymással, az ide tartozó legtöbb faj ivarsejtjeinek a kromoszómaszáma 7 (Antal és mtsai. 2005). A termesztett rozsfajták általában diploidok, de előfordulnak tetraploid változatok is. A tetraploid rozs (*Secale cereale*, var. *multicaule*) termesztésének számos előnye van a diploid rozssal szemben. Nagyobb termőképesség jellemzi, mivel az ezerszemtömege 25-30%-kal nagyobb. Szárszilárdsága is nagyobb, így kevésbé hajlamos a megdőlésre. A tetraploid rozs magjai nagyobb fehérje tartalommal rendelkeznek, mint a diploid változatoké (Gordej és mtsai. 2019, Vejražka és mtsai. 2011).

A *Secale* nemzetség kétféle ágazik. Az *Agrestes*-be tartozó fajok a kultúrroztól jelentősen eltérnek, apró mag jellemzi őket, ezek a vadfüvek. A másik ág a *Cerealía*, ebbe tartozik maga a kultúrrozs, a rokon vadfajai, illetve egyes gyomformái (Antal és mtsai. 2005). Napjainkban fontos gabonaféle, a legnagyobb rozstermesztők közé tartozik Közép-és Kelet Európa, Oroszország és Fehéroroszország (Zieliński és mtsai. 2020).

A rozst elsősorban gyengébb minőségű talajokon termesztik, azaz homoktalajokon, sekély termőrétegű talajokon. Ennek gazdasági oka, hogy a jó minőségű talajokon legfőképp búza és tritikálé termesztése folyik. Élettani szempontból kedvezőbbek az alacsonyabb nitrogén tartalmú talajok, mivel nagy mennyiségű nitrogénellátottság esetén a növény szárszilárdsága romlik, így hajlamossá válik a megdőlésre. Rendkívül jól adaptálódik a talaj-, illetve az éghajlati viszonyokhoz (Antal és mtsai. 2005).

A rozst a világon 2022-ben 4 016 433 ha termésterületen, 3,27 t/ha termésátlaggal termesztették, össztermése 13 143 054 tonna volt (fao.org). Ugyanebben az évben Magyarországon a rozst 20 089 hektáron termesztették, termésátlaga 2,94 t/ha, össztermése 59 156 tonna volt (ksh.hu).

Hazánkban a termelt rozs több, mint 80%-át takarmányozási célra használják fel. Etethető abrak, illetve zöldtakarmány formájában. Humán táplálkozásban elsősorban kenyérgabonaként jelentős. Egyre inkább elterjedt a rozskenyér, illetve a rozsos kenyér fogyasztása. A rozskenyér 10-12% fel nem szívódó szénhidrátot tartalmaz, ezek a cukrok,

illetve a különböző zsírsavak felszívódását akadályozzák. A rozsból készült ételek fogyasztása élettani szempontból jelentős, mivel a rozs aminosav-összetétele a szervezet számára kedvező, valamint magas a lizin tartalma. Emellett nagy mennyiségben tartalmaz B₁, B₂ vitaminokat, magnéziumot és káliumot is (Antal és mtsai. 2005).

A rozsnak jelentős szerepe lehet a talajvédelemben, valamint a tápanyag-visszapótlásban is. A homokos, deflációra hajlamos területeken a talaj megkötése céljából vetik.

További felhasználása, hogy zöldtrágyaként is alkalmazható (Antal és mtsai. 2005). Ezeken felül a rozsnak fontos szerepe van a búzanemesítésben is, mivel genomját már több, mint 50 éve használják a búza kórokozókkal és a kártevőkkel szembeni ellenállóképességének növelése érdekében (Zieliński 2021).

A növekvő piaci igények hatására a fajta-előállító növénynemesítés során egyre nagyobb mértékben alkalmaznak különböző biotechnológiai eljárásokat, ilyen az *in vitro* doubled haploid (DH) növény előállítás is (Zieliński 2021).

2.2. A DH növények szerepe és jelentősége a növénynemesítésben

A haploid növények egyszeres kromoszómaszerelvénnyel rendelkeznek, akárcsak az ivarsejtek. Az ilyen növények kisebbek, kevésbé életképesek, mint a diploid növények. Ezen felül sterilek, mivel a meiózis során a kromoszómáik nem tudnak párba állni. Ahhoz, hogy ezek a növények termékenyek legyenek, a kromoszóma készletük duplikációjára van szükség. Ez történhet spontán módon, de indukálható mesterségesen is (Murovec és Bohanec 2012). Indukált kromoszóma duplikáció esetében a kolhicin kezelés a legelterjedtebb módszer. A kolhicin egy alkaloid, mely a mitózis során a magorsófonalak kialakulását meggátolja, ennek következtében késlelteti a centromerek szétválását. A folyamat eredményeként a kromoszómaszám megduplázódik (Navarro-Alvarez és mtsai. 1994).

Az így kapott DH növények minden lókuszban homozigóták, felhasználhatóak fajta-előállító nemesítésben, vagy a hibrid-előállítás során szülői beltenyésztett vonalakként (Murovec és Bohanec 2012).

Napjainkban a növénynemesítés folyamatában a DH technológiának nagyon fontos szerepe van. Alkalmazásának előnye, hogy a DH növény előállítás során a homozigóta állapot egy generáció alatt elérhető, így nincs szükség több generáción át történő öntermékenyülésre ahhoz, hogy genetikailag tiszta vonalakat állítsunk elő. Így a nemesítési folyamatokat évekkel meg lehet rövidíteni (Murovec és Bohanec 2012).

A DH technológiának a kutatásban is nagy szerepe van, mivel segítséget nyújt a növényi genom térképezésében, valamint az *in vitro* embriogenezis vizsgálatában (Maluszynski és mtsai. 2003).

Gabonafélék esetében többféle módszer létezik DH növények előállítására. Ilyenek például az androgenezisen és a ginogenezisen alapuló módszerek (Murovec és Bohanec 2012).

2.3. Az androgenezis indukciója

Androgenezis során a redukált, haploid kromoszómaszámú éretlen pollenszemekből (mikrospórákból) közvetlenül haploid növényeket állítunk elő. Az androgenezis folyamata során megtermékenyítés nem történik. Az androgenezis *in vitro* körülmények között indukálható portok vagy mikrospóra kultúrában. Fontos, hogy a portokok vagy a mikrospórák izolálása a mikrospórák megfelelő fejlődési stádiumában történjen. Ez az egysejtmagvas, vakuólumos fejlettségi állapot, valamint a mikrospórák első mitózisa közötti időszak (1. ábra). Ilyenkor a pollen anyasejt meiózisa során kialakult mikrospórák fejlődésének útja már meghatározott, de stressz kezeléssel még átprogramozható. A megfelelő feltételek biztosításával (például előkezelések, stresszek, táptalajok) az izolált mikrospórák fejlődése gametofitikus helyett sporofitikus fejlődési irányba terelhető. Így nem érett pollen alakul ki belőlük, hanem haploid embriók, kalluszek, amelyekből haploid növények regenerálhatók (Heszky 2005).



1. ábra. Mikrospóra egysejtmagvas vakuólumos fejlettségi állapotban. (Saját fotó)

2.4. A haploidia története

Az első haploid növényt Blakeslee írta le 1922-ben a csattanó maszlag (*Datura stramonium* L.) növényfaj esetében, ezt követően megfigyelték a jelenséget dohány (*Nicotiana tabacum* L.) és búza (*Triticum aestivum* L.) növények között is (Murovec és Bohanec 2012). Az első haploid növényt *in vitro* körülmények között 1964-ben állította elő Guha és Maheshwari portoktenyésztés útján (Murovec és Bohanec 2012).

A módszert rövid időn belül elkezdtek alkalmazni a növénynevelés során. Az első DH repcenövényt (*Brassica napus* L.) Maris Haplona állította elő a 70-es években, majd 1980-ban Mingo árpafajtában hozta létre ezzel a technológiával az első árpát (*Hordeum vulgare* L.) (Forster és mtsai. 2007). Napjainkban már több mint négyszáz növényfaj esetében alkalmazták a módszert, és állítottak elő *in vitro* körülmények között haploid növényeket (Segui-Simarro és mtsai. 2021).

2.5. A haploid rozs történetének áttekintése

A DH rozsnövények előállításával kapcsolatos kutatások 1974-ben kezdődtek meg Wenzel és Thomas munkája során.

Tapasztalatok alapján a DH növény előállítás rozsban nem olyan sikeres, mint búza vagy árpa növények esetében. Az első DH rozsnövényt 1974-ben Wenzel és munkatársai állították elő portoktenyésztés útján (Wenzel és mtsai. 1974). Későbbiekben Wenzel és Thomas (1975) kalluszkat, embriókat és zöld növényeket állított elő a *Secale. cereale* L. és *Secale vavilovii* Grossh téli hibridjének mikrospóra tenyésztése útján. Az 1990-es években Flehinghaus-Roux és munkatársai (1995), valamint Immonen és Anttila (1996) regenerált először nagy mennyiségben zöld rozsnövényeket portok kultúrából (Immonen és Anttila 1999). Az eddig leírt kísérletek szilárd táptalajon történtek, rozs portoktenyésztéshez először Immonen és Anttila (2000) alkalmazott folyékony táptalajt. A kutatásokban nagy sikert hozott a táptalajok továbbfejlesztése. Az új táptalajok hatására növekedett az indukciós hatékonyság, valamint a növények regenerálhatósága is az évelő rozs (*Secale cereanum* L.) esetében. Zuang és Xu, valamint Ouyang és munkatársai kutatási eredményei alapján a rozs androgenézis indukciójához a legmegfelelőbb táptalajnak a 190-2, és a W-14 bizonyultak (Zieliński és mtsai. 2020).

Egy alternatív módszer a haploid és DH növények előállítására a távoli fajkeresztelés egy másik gabonanemzetségbe tartozó növény pollenjével. A módszer alkalmazása során történik megtermékenyítés, de az embriók korai fejlődési szakaszaiban az idegen kromoszómák eliminálódnak. Zenkteler és Nitsche (1984) *Secale cereale* L. és *Dactylis glomerata* L., *Festuca*

glauca L., *Hordeum bulbosum* L., valamint *Zea mays* L. keresztezésekkel állítottak elő hibrid embriókat. Laurie és munkatársai (1990) leírása szerint a *Secale cereale* L. x *Zea mays* L. keresztezésből létrejött embriók a növekedésük kezdeti szakaszában már elpusztultak. Ezzel szemben Deimling és munkatársai, (1994) valamint Altenhofer és munkatársai (1997) a módszer alkalmazása során növényeket tudtak felnevelni az embriókból (Deimling és mtsai. 1994, Altenhofer és mtsai.1997).

2.6. A portoktenyésztésre hatással lévő tényezők

2.6.1. A genotípus hatása

A legtöbb gabonaféle, így a rozs esetében is a donor növény genotípusa az egyik legmeghatározóbb a válaszdó képesség kialakítása szempontjából. Általánosságban elmondható, hogy a rozs válaszdó képessége gyenge. Egyes fajták vagy beltenyésztett vonalak azonban jobban reagálnak a portoktenyésztés során. Ilyen gyakran alkalmazott genotípus az L318 vagy az L22 (Targon'ska és mtsai. 2013).

A rozs portok- vagy izolált mikrospóra tenyészet esetében a genotípus is befolyásolja a kalluszképződést, az embriók kialakulását, valamint az ezekből regenerált zöld és az albínó növények arányát is (Marcínska és mtsai. 2018).

2.6.2. A donor növények és a mikrospórák fejlettségi állapota

A donor növények felnevelési körülményei jelentős hatást gyakorolnak az androgenezésre, mivel befolyásolják a mikrospórák számát, valamint válaszdóképességét, ezáltal a regenerálható növények mennyiségét is. Datta különböző kutatásai során megfigyelte, hogy azokból a búza, illetve árpa donornövényekből, amelyeket október és december között termesztettek nagy számú mikrospórát nyertek, amelyeknek a válaszdó képességük kiváló volt. Rizs esetében megfigyelése szerint azok a növények adták a legjobb androgenesis reakciót, amelyeket száraz időszakban termesztettek (Datta 2005).

A donornövények származhatnak szántóföldről, de nevelhetjük őket ellenőrzött, kontrollált környezetben is. Ilyen a fitotron, amelyben a hőmérséklet, a páratartalom és a fénymennyiség szabályozható. A különböző kártevők megjelenése, illetve a betegségek fellépése könnyebben elkerülhető, mint a szántóföldi körülmények között (Datta 2005).

2.6.3. A stresszek szerepe

Az *in vitro* androgenezis indukciója során alkalmazott különféle stresszkezelések pozitív hatással lehetnek a kalluszképződésre, valamint az embriók kialakulására. Ilyen stresszkezelések például a hideg kezelés, hősokk, az éheztetés, a magas ozmotikus koncentráció vagy különböző vegyületek alkalmazása. Tenhola-Roininen és munkatársai Immonen és Anttila kísérletei alapján megállapították, hogy rozs esetében a portokok 4 °C-on történő hidegkezelése, valamint mannit oldatban történő inkubálása jelentősen javította az androgenezis hatékonyságát (Tenhola-Roininen 2005, Anttila 1999).

Zhuang és Xu kutatásai alapján a zöld növénykéek regenerációjának sikerességét jelentősen növeli, ha a kalászokat is hidegkezelésnek vetjük alá 4 °C-on (Zhuang és Xu 1983), ezt követően a portokokat pedig 32 °C-on előkezeljük 190-2 táptalaj alkalmazása mellett (Zieliński és mtsai. 2020).

Y. -D. Guo és munkatársai (2000), valamint A. Jacquard és munkatársai (2009) szerint az androgenezis indukcióját leginkább a mannit oldat magas koncentrációban történő alkalmazásával lehet kiváltani. A mannit oldattal történő előkezelés módosítja számos gén, illetve fehérje kifejeződését, amelyek fontos anyagcsere folyamatokban, valamint jelátviteli folyamatokban vesznek részt. Ez elengedhetetlen ahhoz, hogy a mikrospórák fejlődésmenetét megváltoztassuk (Zieliński és mtsai. 2020).

Zieliński és munkatársai (2020) erre alapozva újabb kísérleteket végeztek, majd eredményül azt kapták, hogy a legjobb hatást akkor lehet elérni, ha a mannit oldatos előkezelést kiegészítik redukált glutation hozzáadásával. A glutation egy fontos antioxidáns. Tritikáléval végzett kutatások alapján megállapították, hogy az oxidatív stresszel szembeni ellenállóképesség meghatározza az androgenezis hatékonyságát. Az oxidatív stresszt az anyagcsere folyamatok során felszabaduló szabadgyökök, elsősorban oxigén szabadgyökök váltják ki, melyek számos fontos sejtfolyamat zavarát okozzák. Az antioxidánsok megvédik a sejteket ezeknek a molekuláknak a káros hatásaitól, így az antioxidánsok alkalmazása kedvezően hat az andogenezisre, valamint a növénykéek regenerálhatóságára (Zieliński és mtsai. 2020).

2.6.4. Tenyésztési körülmények

Popelka és Altpeter (2001) kutatásaik során arra a következtetésre jutottak, hogy roszban a különböző genotípusú egyedek portoktenyésztési eltérő válaszadó képességgel rendelkeznek. Emellett megállapították, hogy az *in vitro* androgenezisre jelentős hatással van a táptalaj ásványi anyag tartalma, a szénhidrát-forrás, az auxin koncentráció, az alkalmazott szilárdító ágens, a CuSO₄ koncentráció és a megvilágítás is (Targon'ska és mtsai. 2013).

A táptalaj - azon felül, hogy tápanyagot szolgáltat a mikrospóráknak - meghatározza az embriók fejlődésmenetét. Fontos, hogy az androgenezis szakaszai során a táptalaj-összetételt az adott igényeknek megfelelően alakítsuk. Szükség esetén a táptalajt pótolni, frissíteni kell, így pótoljuk a felhasznált tápanyagokat, valamint helyreállítjuk a pH-t. A folyékony tápközegekre jellemző, hogy az embriók fejlődésének megindulásával a tápoldat pH-ja jelentősen eltolódhat (Datta 2005).

A táptalajok által biztosított szén-és energiaforrást a cukrok jelentik, valamint szerepük van az ozmotikus szabályozásban is. A gabonafélék *in vitro* androgenezise során különböző szénforrásokat használnak, a legelterjedtebb a maltóz és a szacharóz (Guo 2000). Búza és árpanövények androgenezise során az indukciós táptalajhoz kiegészítésképp Ficollt adnak, ez befolyásolja a tápoldat viszkozitását és ozmotikus tulajdonságait. Ennek köszönhetően megakadályozza, hogy a folyékony tápközegben fejlődő embriók, kalluszk a tápoldatba süllyedjenek (Zhou és mtsai. 1992).

A táptalaj nitrogén összetételének jelentős szerepe van az androgenezis indukciójában. A legtöbb gabonaféle esetében a glutamin mennyiségének növelése, valamint az ammónium-nitrát csökkentése jótékonyan hatott az *in vitro* androgenezis hatékonyságára (Datta 2005). Szilárdító ágensként általában agar-agart, valamint Gelritet alkalmaznak.

Az izolált mikrospóra tenyészetek különösen érzékenyek a tápközeg ozmotikus tulajdonságaira. A nem megfelelő ozmotikus nyomás hatására a mikrospórák elsüllyednek, vagy megtörhetnek, ami a pusztulásukhoz vezet. A tápközeg ozmotikus tulajdonságát meghatározzák a benne oldott szervesetlen sók és cukrok (Guo 2000).

Az *in vitro* androgenezissel történő DH növény előállítás egyik kritikus tényezője az albínó növénykéek nagy mértékű regenerálása (2. ábra). Az albínó növénykéek sejtjei nem tartalmaznak zöld színtesteket, így a növény nem képes a fotoszintézisre, kiültetést követően hamarosan elpusztul. Az androgenezis során az albinizmus kialakításáért felelős tényezők részletei a mai napig feltáratlanok maradtak. Az albínó növénykéek gyakorisága a legtöbb növényfaj esetében csökkenthető azzal, ha az indukciós táptalajhoz réz-ionokat adunk. A réz szükséges a növények fejlődéséhez. A sejt réz tartalmának több, mint a fele a kloroplasztiszbán

található, részt vesz a fotoszintézisben. A réz-ionokat réz-szulfát formájában keverik a táptalajba (Makowska et al. 2017).



2.ábra. Albínó rosnövényke. (Saját fotó)

2.6.5. A dajkatenyésztés szerepe

Az izolált mikrospóra tenyészetekben a dajkák jelenléte kulcsfontosságú lehet a mikrospórák embriogenezeise során, ugyanis az embriogenezis hatékonyságát növelik, valamint kedvezően hatnak a zöld növénykék regenerálhatóságára is búza izolált mikrospóra tenyészetben (Mejza és mtsai. 1993). Dajkaként különböző növényi részeket használnak, mint például ováriumot, pelyvát vagy magát az egész virágot (Pauk és mtsai. 1999, Castillo és mtsai. 2015), de a leggyakoribb az ovárium alkalmazása.

Broughton (2008) leírta az ováriumok alkalmazásának előnyeit közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) androgenezise során *in vitro* portoktenyésztetben. Durumbúza esetében (*Triticum durum* L.) az ováriumok alkalmazása serkentette az *in vitro* androgenezis indukcióját, illetve az embrioidok fejlődését, de a zöld növények regenerációjára nem volt hatással (Broughton 2008). Munkája folyamán az alkalmazott ováriumok genotípusa általában megegyezett a portokokéval.

Számos publikáció megjelent a dajkatenyésztés alkalmazásával, valamint előnyeivel kapcsolatban. A kutatók még napjainkban is keresik a választ arra, hogy az ováriumok által kibocsátott anyagok közül melyek hatnak a mikrospórák embriogenezisére, valamint ezeknek

az anyagoknak a hatásmechanizmusa részleteiben még ismeretlen (Letarte és mtsai. 2006, Castillo és mtsai. 2015). Letarte és munkatársai kutatásaik keretében búzanövények (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* androgenezise során az ováriumos dajkatenyésztés, valamint a dajkatenyésztés során alkalmazott arabinogalaktán fehérje *in vitro* androgenezisre gyakorolt hatását hasonlították össze. Megállapították, hogy az arabinogalaktán fehérje alkalmazásával a dajkatenyésztés során megközelítőleg ugyanannyi embrioidot, valamint zöld növénykét tudtak kinyerni a portoktenyészetekből, mint azokban az esetekben, ahol ováriumos dajkatenyésztést végeztek. Feltehetően az ováriumok által kibocsátott arabinogalaktán fehérje serkentette az *in vitro* androgenezis indukcióját, az embrioidok fejlődését (Letarte és mtsai. 2006).

2.7. Ploidia fok meghatározás

A ploidia fok meghatározásának fontos szerepe van a DH előállítási programokban (Bohanec és mtsai. 2003). Ennek lényege, hogy növénykéek fejlődésének kezdeti állapotában megállapítjuk a ploidia fokot, azaz el tudjuk különíteni a haploid, valamint a DH növényeket egymástól. A haploid egyedek sterilek, azaz nem hoznak termést, így felnevelésük nem indokolt. A haploid növények kisselektálásával a DH program keretein belül nagy mennyiségű forrást takaríthatunk meg (Molenaar és mtsai. 2019).

A ploidia fok meghatározását végezhetjük direkt és indirekt módon. Direkt mód a kromoszómák megszámlálása. A kromoszómaszámlálás folyamata nagy odafigyelést, és sok időt vesz igénybe. Indirekt módszerek közé tartozik az áramlási citometria, a morfológiai megfigyelések, valamint a sztómák méretének meghatározása (Bohanec és mtsai. 2003). A sztómák mérete összefügg a növény ploidia fokával (Molenaar és mtsai. 2019). Ezt a módszert általában kukorica (*Zea mays* L.), valamint árpa (*Hordeum vulgare* L.) esetében alkalmazzák. Morfológiai megfigyelések során megállapítható, hogy a haploid növények kevésbé életképesek, növekedésük lassabb, valamint alacsonyabbak, mint a DH vagy tetraploid növények (Klimek-Chodacka és Baranski 2013).

Az áramlási citometria napjainkban a leggyakrabban alkalmazott módszer a növényi sejtek DNS tartalmának mérésére (Doležal és mtsai. 2007). Ezen felül információt nyújthat a sejt ploiditásáról, illetve, hogy a sejt a sejtciklus melyik szakaszában van (Darzynkiewicz és mtsai. 2011).

Az áramlási citométer tartalmaz egy fluoreszcenciamikroszkópot, ami elemzi a szuszpenzióban lévő sejtek optikai tulajdonságait, valamint tartalmaz még optikai berendezéseket, különböző folyadékokat, elektronikai berendezéseket (Ochatt 2008). A mérés során az áramlási citométerben a sejtmagok egyesével kerülnek megvizsgálásra (Doležal és

mtsai. 2007). Ezt a citométer úgy éri el, hogy a mintákat a köpeny folyadékba fecskendezi, majd ezt egy nagyon vékony kapillárison keresztül nagy sebességgel áramoltatja át. Ennek átmérője 50-300 μm közötti. A köpeny folyadék révén a sejtek a folyadékáramlat közepébe kerülnek, ezt hidrodinamikai fókuszálásnak nevezik.

A fluoreszcens festékekkel megfestett részecskék, sejtek lézersugárral történő megvilágítás hatására a fényt szórják, emittálják. A dikroikus tükrök a fluoreszcens jelet a szűrők felé terelik, melyeken áthalad, és a számítógép a kapott adatokat feldolgozza, végül hisztogramokon kerülnek ábrázolásra (Ochatt 2008).

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag, felnevelési körülmények

Kísérleteinkben a GK Wibro lengyel eredetű őszi rozsfajtát alkalmaztuk, mely 1999-ben került honosításra. A fajtát gyors növekedési erély jellemzi, a talajban mélyre hatoló gyökérzettel rendelkezik, így az altalajból is képes felvenni a vizet és a tápanyagokat. Nagy szemű rozsfajta (Bóna 2004).

A rozsnövényeket üvegházi körülmények között neveltük a Gabonakutató Nonprofit Kft. üvegházában. Az üvegházi növények több gondoskodást igényelnek, mint a szabadföldiek, mivel nekünk kell biztosítani számukra a megfelelő hőmérsékletet és páratartalmat, valamint gondoskodnunk kell a rendszeres vízpótlásról is. Az üvegházi növényeket speciális földkeverékbe vetettük, amelynek összetétele virágföld- tőzeg-homok 1-1-1 arányú keveréke.

3.2. A donorhajtások begyűjtése

Az üvegházi donorhajtásokat március második felében, míg a szántóföldi alapanyagokat április első felében gyűjtöttük be. Fontos, hogy a begyűjtött kalászok portokjaiban található mikrospórák középső vagy kései egy sejtmagvas vakuólumos állapotban legyenek. A levágott donorhajtásokat 580 milliliteres vízzel megtöltött befőttes üvegekbe tettük. A hajtásokat tartalmazó üvegekre polietilén zacskókat húztunk, így biztosítottuk a magas páratartalmat. Kísérletsorozatunk magába foglalta háromféle stressz előkezelés vizsgálatát.

3.3. Stressz előkezelések

A kísérleteket nyolc ismétlésben végeztük el. Az első előkezelés során a portokokat 3 napra 0,7 M mannitot, valamint CaCl_2 -ot tartalmazó előkezelő közegre helyeztük 24 °C-on (1. táblázat). A második előkezelésben a portokok a mannitos közegre kerülése előtt a donorhajtások tíznapos hidegkezelésben részesültek 4 °C-on. Ezt követően a fent említett előkezelő közegre történt az izolálás szintén 24 °C-on 3 napig. A harmadik előkezelés során a mannitos közeget nem alkalmaztuk, a donorhajtások két hétig hidegkezelésnek voltak kitéve 4 °C-on (2. táblázat). A mannitot tartalmazó közegen történő előkezelések során 55 mm átmérőjű Petri-csészéket alkalmaztunk. Ott, ahol nem történt mannitos előkezelés a portokokat a hidegkezelést követően az indukciós táptalajra izoláltuk.

Az izolálást megelőzően a donor kalászok sterilizálására került sor. A hajtásról leválasztott kalászokat 250 milliliteres üvegekbe helyeztük. A kalászokat ezt követően 2%

nátrium-hipoklorit oldatban, és 1 csepp Tween 80 detergens hozzáceppentésével rázóasztalon sterilizáltuk 80 fordulatszámon. 20 perc elteltével a kalászokat steril fülkében háromszor leöblítettük steril desztillált víz használatával.

A portokok izolálását steril körülmények között végeztük lamináris boxokban. A munka kezdetekor a fülkét alkohollal fertőtlenítettük. Ezt követően a csipeszek sterilizálására került sor. A csipeszeket alkoholban áztattuk, majd gázégő segítségével leégettük róluk az alkoholt. Az izolálás során első lépésként a steril kalászok kalászkáinak külső-, és belső virágpelyvát eltávolítottuk csipeszek segítségével, majd az így láthatóvá vált három darab portokot a megfelelő táptalajra helyeztük.

1. táblázat. Mannitot tartalmazó előkezelő közeg összetevői

Komponensek	g/l
Mannit	127,4
CaCl ₂ x 2H ₂ O	5,88
Agar	8

2. táblázat. Stressz előkezelések az *in vitro* rozs portoktenyészetekben

Növényi alapanyag	Hajtás	Izolált portokok <i>in vitro</i> előkezelése			<i>In vitro</i> portoktenyészet
Kezelés sorszám	Hideg kezelés 4 °C	Előkezelő közeg	Előkezelés időtartama	Előkezelés hőmérséklete	Indukciós tápoldat
1.	-	0,7 M mannit + 40mM CaCl ₂ ×2H ₂ O	3 nap	24 °C	W ₁₄ mf
2.	10 nap	0,7 M mannit + 40mM CaCl ₂ ×2H ₂ O	3 nap	24 °C	W ₁₄ mf
3.	14 nap	-	-	-	W ₁₄ mf

3.4. *In vitro* androgenezis indukciója

3.4.1. Portoktenyészetek indítása

A portoktenyészeteket steril körülmények között indítottuk. 55 mm átmérőjű Petri-csészékbe steril transzfer pipetta segítségével 5 ml W₁₄mf indukciós folyékony tápoldatot juttattunk. Az előkezelések végeztével a portokokat az indukciós táptalajra helyeztük. A tenyészeteket 28 °C-on tartottuk.

3.4.2. Dajkatenyésztés hatásának vizsgálata

Kísérletsorozatunk során a hidegkezelésen előzetesen átesett donor hajtásokat három csoportra osztottuk a dajkatenyésztés hatásának vizsgálata céljából. A dajkatenyésztés vizsgálata során búza (15 db ovárium/Petri-csésze), illetve rozs ováriumokat (15 db ovárium/Petri-csésze) alkalmaztunk, valamint kialakítottunk olyan csoportot is, ahol az előkezelést követően nem adtunk ováriumokat a tenyészetekhez, ez volt a kontroll. Az ováriumokat az indukciós táptalajra helyeztük a portokok izolálását követően.

3.5. Növényregenerálás, gyökeresítés

Regeneráló táptalajként 190-2Cu-t használtunk (3. táblázat). A tenyészeteket megfigyelés alatt tartottuk, majd azokat az embrioidokat, melyek elérték az 1-2 mm nagyságot erre a szilárd táptalajra helyeztük át csipeszek segítségével, steril körülmények között. A növényregeneráláshoz műanyag, 92 mm átmérőjű Petri-csészéket használtunk, amelyek a klimatizált tenyésztő helyiségben kerültek elhelyezésre 22 °C-on 16 órás megvilágítás mellett.

Azokat a növénykéket, amelyek megfelelő méretű hajtással rendelkeztek gyökeresítés céljából egyesével üvegfiolákba helyeztük át. Gyökeresítő táptalajnak ½ MS₀-t használtunk (3. táblázat). A regenerált albínó növénykéek számát feljegyeztük, majd kidobásra kerültek.

3. táblázat. Alkalmazott táptalajok összetevői

Komponensek	190-2Cu regeneráló táptalaj (mg/l)	W ₁₄ mf indukciós tápközeg (mg/l)	½ MS ₀ gyökeresítő táptalaj (mg/l)
KNO ₃	1000	2000	950
(NH ₄) ₂ SO ₄	200	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	100	-	-
KH ₂ PO ₄	300	-	85
MgSO ₄ ×7H ₂ O	200	200	90,27
KCl	40	-	-
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,85	27,8	-
Na ₂ EDTA	37,25	37,3	-
FeNaEDTA	-	-	18,35
MnSO ₄ ×4H ₂ O	8	8	8,45
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	3	3	4,3
H ₃ BO ₃	3	3	3,1
KI	0,5	0,5	0,415
Glicin	2	-	1
Tiamin-HCl	1	2	0,05
Piridoxin-HCl	0,5	0,05	0,25
Nikotinsav	0,5	0,05	0,25
Myo-inozitol	100	-	50
NAA	0,5	-	-
Kinetin	0,5	0,5	-
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,5	0,025	0,0125
Szacharóz	30 000	-	20
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	380	-
NH ₄ NO ₃	-	-	825
CaCl ₂ × 2H ₂ O	-	140	166, 01
CoCl ₂ × 6H ₂ O	-	0,025	0,0125
Na ₂ MoO ₄ × 4H ₂ O	-	0,005	0,125
K ₂ SO ₄	-	700	-
Maltóz	-	80000	-
2,4-D	-	2	-
Ficoll	-	100000	-
pH	5,8	5,8	5,8
Gelrite	2800	-	2,8

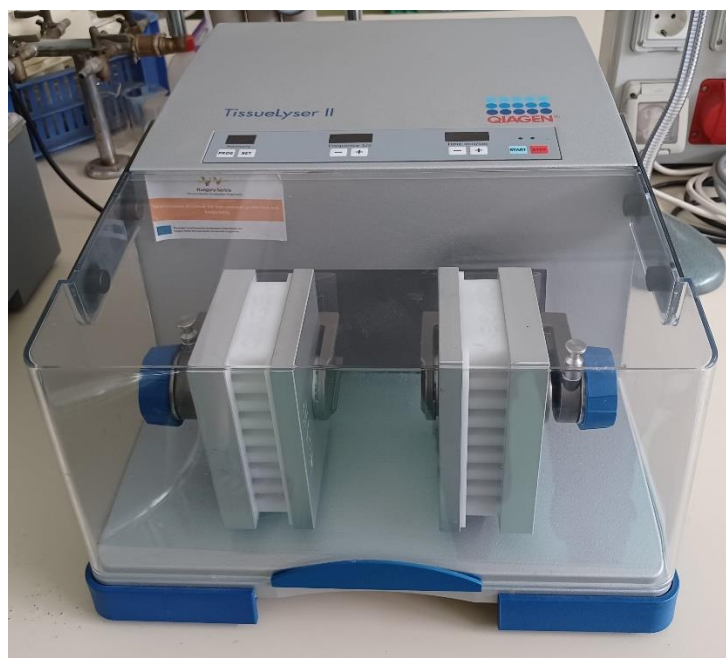
3.6. Üvegházi kiültetés, akklimatizáció

Azokat a növénykéket, melyek erős, nagyméretű gyökérzettel rendelkeztek, az üvegházban az üvegfiolákból kiültettük PVC csövekbe, melyeknek átmérője 50 mm volt. A kiültetéshez felhasznált közeg virágföld- tőzeg-homok 1-1-1 arányú keveréke volt. A növénykéket tartalmazó csöveket átvittük a fitotronba, egyesével lefedtük polietilén zacskóval, hogy megőrizzük a magas páratartalmat, amelyeket három nap elteltével eltávolítottunk róluk. A növénykéek akklimatizációja a fitotronban történt 15 °C-on, 16 órás megvilágítás mellett.

A megerősödött, jól akklimatizálódott növénykéket az üvegházban növénynevelő konténerekbe ültettük. Első lépésként a növénynevelő konténereket megtöltöttük virágföld-tőzeg-homok 1-1-1 arányú keverékével, majd alaposan belocsoltuk azt. Ezt követően a növénykéket egyesével kiültettük a PVC csövekből a növénynevelő konténerekbe, és újból meglocsoltuk őket.

3.7. Áramlási citometria

A már megerősödött, jól akklimatizálódott növények ploidia fokát áramlási citometriával határoztuk meg. 2 ml-es centrifugacsövekbe 1 ml Galbraith-puffert (Galbraith és mtsai. 1989) pipettáztunk automata pipettával. A centrifuga csövekbe két darab homogenizáló golyót tettünk, ezek rozsdamentes acélból készültek. Minden növény leveléből három darab fél centiméteres darabot vágtunk, ezeket a centrifugacsövekbe helyeztük. A homogenizálást QIAGEN TissueLyser II homogenizáló berendezéssel (3. ábra) végeztük 1 percen keresztül 10 Hz-en. Az így készült szuszpenziók 20 µm-es szűrőkön kerültek átszűrésre. A szűrés végeztével minden szuszpenziót tartalmazó centrifugacsőbe 10 µl RNase oldatot pipettáztunk, így a szuszpenziókban az RNS-ek lebontásra kerültek. Az RNase hozzáadását követően 1 órán át hűtőben tartottuk a szuszpenziókat. A DNS festését centrifugacsövenként 40 µg propidium-jodid fluoreszcens festékkel végeztük, amelyet Vortex (4. ábra) segítségével a szuszpenzióval teljesen összekevertünk. Ezt követően a ploidia fok meghatározást CytoFLEX áramlási citóméterrel végeztük el (5. ábra).



3. ábra. QIAGEN TissueLyser II homogenizáló berendezés (Saját fotó)



4. ábra. Vortex berendezés (Saját fotó)



5. ábra. CytoFLEX áramlási citométer (Saját fotó)

3.8. Statisztikai elemzés

Munkánk során vizsgáltuk háromféle különböző előkezelés, valamint az ováriumos dajkatenyésztés hatását *in vitro* rozs portoktenyészetekben az embrioidok fejlődésére, valamint a zöld -és albínó növénykéek regenerálására. A kísérleteket nyolc ismétlésben végeztük el. A statisztikai elemzés során az adatokat egytényezős varianciaanalízissel dolgoztuk fel, a kapott eredményeket 100 portokra vonatkoztattuk. Az eredmények Microsoft Excel 2007 segítségével kerültek értékelésre.

4. Eredmények

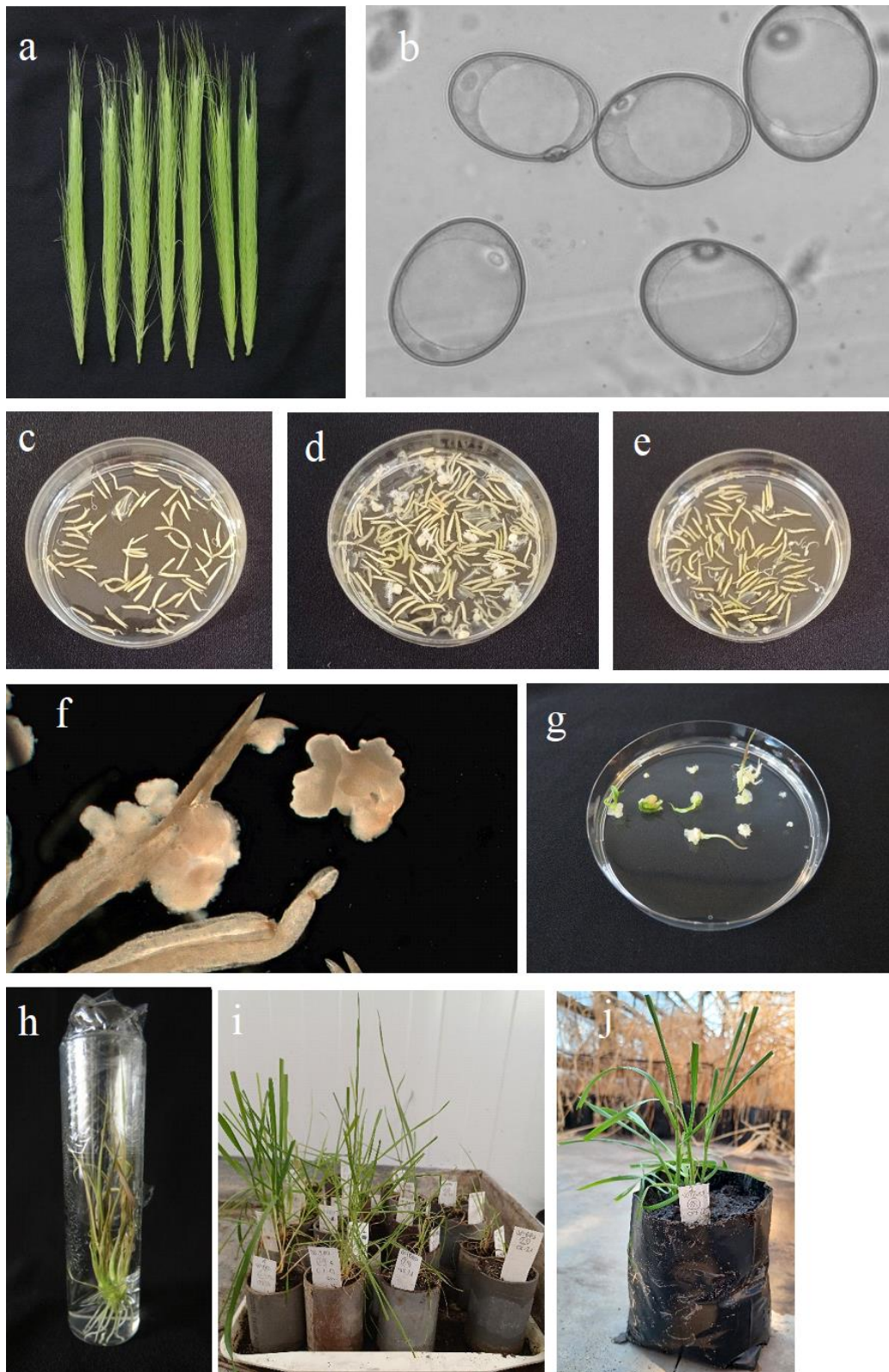
Kísérleteinkben vizsgáltuk a különböző előkezelések, valamint az ováriumos dajkatenyésztés hatását rozs portoktenyészetekben az embrioidok fejlődésére, valamint az albínó- és zöld növénykéek regenerálására. A kiültetett zöld növénykéek ploidia fokát áramlási citometria segítségével meghatároztuk.

4.1. *In vitro* androgenezis indukciója rozs portoktenyészetben

A donorhajtások hideg előkezelését követően (első kezelésben anélkül) a megfelelő fejlettségű mikrospórákat tartalmazó kalászokat kiválasztottuk (6.a ábra), és a kalászokat sterilizáltuk. A portokokat a megfelelő előkezelő közegre vagy indukciós tápközegre izoláltuk kezeléstől függően. A portokok izolálása előtt mikroszkóp segítségével ellenőriztük, hogy a portokokban található mikrospórák középső vagy kései egy sejtmagvas vakuólumos állapotban legyenek (6.b ábra). Az eltérő előkezelések végeztével a portokokat $W_{14}mf$ indukciós tápoldatra helyeztük (6.c ábra).

A dajkatenyésztés hatásának vizsgálata során az indukciós tápoldatra a portokok közé búza (6.d ábra) vagy rozs ováriumokat helyeztünk (6.e ábra). Másfél hónap elteltével az indukciós tápoldatban embriószerű struktúrák jelentek meg (6.f ábra). Az 1-2 mm-es nagyságot elért embrioidokat a 190-2Cu regeneráló táptalajra helyeztük át. A regeneráló táptalajon az embrioidokból zöld, illetve albínó növénykéek fejlődtek (6.g ábra). Azokat a zöld növénykéket, amelyek legalább 1 cm hosszúságú hajtással rendelkeztek $\frac{1}{2}$ -MS₀ gyökeresítő táptalajra helyeztük. Az erőteljes gyökérszettel rendelkező növénykéket (6.h ábra) az üvegházban egyesével PVC csövekbe ültettük (6.i ábra), majd polietilén zacskót húztunk rájuk. Három nap elteltével a polietilén zacskót levettük a növénykékről.

Azoknak a zöld növénykéeknek amelyek sikeresen alkalmazkodtak az *in vivo* körülményekhez, a ploiditását meghatároztuk. Ezt követően a növénykéket az üvegházban növénynevelő konténerekbe ültettük (6.j ábra).



6. ábra. *In vitro* androgenezis indukciója rozs portoktenyészetben: (a) Donorkalászkok. (b) Mikrospórák középső vagy kései egy sejtmagvas vakuólos állapotban. (c) Izolált portokok indukciós tápoldatban. (d) Búza ovárium alkalmazása a portoktenyészetben. (e) Rozs ovárium alkalmazása a portoktenyészetben. (f) Embrioidok. (g) Regenerált növénykék. (h) Gyökeresített növénykék. (i) Kiültetett növénykék az üvegházban. (j) Növénynevelő konténerbe ültetett rozs növényke.

4.2. Előkezelés hatása Wibro rozsfajta portoktenyésztésében

Kísérleteink során három előkezelés hatását vizsgáltuk Wibro rozsfajta portoktenyésztésében. Az eredmények egytényezős varianciaanalízissel kerültek kiértékelésre (4. táblázat). Az eredmények 100 portokra vonatkoztatva kerültek értékelésre.

Az embrioidok számát tekintve megállapítható, hogy a 3-as előkezelés hatására, ahol kizárólag hideg előkezelést alkalmaztunk sikerült kinyerni a legtöbb embrioidot (30,67/100 portok). Azokban az esetekben, ahol mannitos éheztetést is alkalmaztunk, tehát az 1-es, valamint a 2-es számú előkezelés esetében az embrioid-kihozatal ennél szignifikánsan gyengébb volt (0,00/100 portok).

A legtöbb zöld növényke regenerálására szintén a 3-as számú előkezelés bizonyult a legmegfelelőbbnek (7,50/100 portok), a többi előkezelés értékei szignifikánsan nem tértek el egymástól (0,00/100 portok). Mindeközben előkezelések között nem volt szignifikáns különbség az albínó növénykéek regenerálását tekintve.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az 1-es, valamint a 2-es számú előkezelésben alkalmazott éheztetés negatív hatással van mind az androgenezis indukciójára, az embrioid kihozatalra, mind a regenerált zöld növénykéek számára.

4. táblázat. A különböző előkezelések hatása az embrioidok, valamint a zöld-és albínó növénykéek számára. Az ns a szignifikánsan különbség hiányát mutatja a vizsgált tulajdonságon belül az azonos kisbetűkkel jelölt értékek (a, b) szignifikánsan különböznek egymástól.

Kezelés	Embrioidok száma	Zöld növénykéek száma	Albínó növénykéek száma
1	0,00 b	0,00 b	0,00 ns
2	0,00 b	0,00 b	0,00 ns
3	30,67 a	7,50 a	0,67 ns

4.3. Dajkatenyésztés hatása Wibro rozsfajta portoktenyésztésében

A dajkatenyésztés hatásának vizsgálata során a rozs portoktenyészetekhez a portokok izolálását követően búza-, illetve rozs ováriumokat adtunk. A kontroll csoporthoz nem adtunk ováriumokat. Az eredmények egytényezős varianciaanalízissel kerültek kiértékelésre 100 portokra vonatkoztatva (5. táblázat).

Megállapítható, hogy az embrioid-kihozatal szempontjából a kontroll bizonyult a leghatásosabbnak (30,67/100 porok), az ováriumok alkalmazása szignifikánsan alacsonyabb értékekhez vezetett. A legtöbb zöld növényt szintén a kontroll esetében tudtuk regenerálni (7,50/100 portok). Az ováriumok alkalmazása itt is alacsonyabb értékekhez vezetett, valamint

az alkalmazásukkal kapott eredmények egymástól nem tértek el szignifikánsan. Az albínó növénykéek kihozatalára nem volt szignifikáns hatással a különböző ováriumos dajkatenyésztés alkalmazása.

Megállapítható, hogy a búza- és a rozs ováriumok alkalmazása negatívan hatott a fejlődő embrioidok számára, valamint a regenerált zöld növénykéek számára is, ugyanis lényegesen kevesebb embrioidot kaptunk, valamint kevesebb zöld növénykét tudtunk regenerálni az alkalmazásukkal, mint a kontroll esetében.

5. táblázat. Az ováriumos dajkatenyésztés hatásának vizsgálata az embrioidok, valamint a zöld-és albínó növénykéek számára. Az ns a szignifikánsan különbség hiányát mutatja a vizsgált tulajdonságon belül, az azonos kisbetűkkel jelölt értékek (a, b) szignifikánsan nem eltérők.

Kezelés	Embrioidok száma	Zöld növénykéek száma	Albínók növénykéek száma
kontroll	30,67 a	7,50 a	0,67 ns
rozs ov.	8,17 b	1,00 b	1,00 ns
búza ov.	6,83 b	0,50 b	1,33 ns

4.4. Portoktenyésztet eredetű növénykéek akklimatizációja és ploidia fokuk azonosítása áramlási citometriás vizsgálat alapján

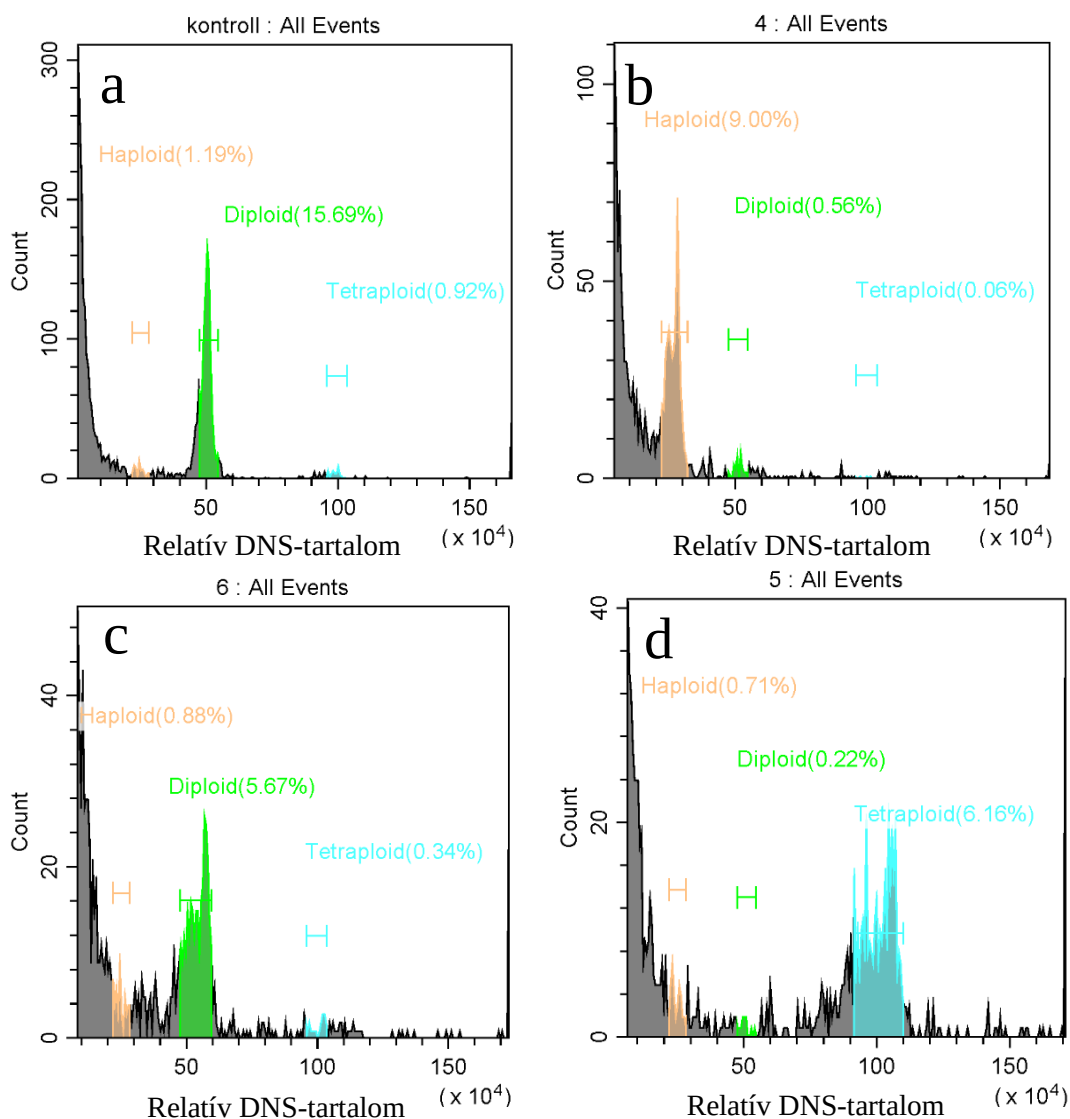
Azokat a zöld növénykéket, melyek erős, jól fejlett gyökérzettel rendelkeztek kiültettük, majd akklimatizációjukra a fitotronban került sor (7. ábra). Összesen 26 darab portoktenyésztet eredetű növénykét ültettünk ki. A kiültetett növénykéek közül 20 darab akklimatizálódott sikeresen, 6 darab elpusztult, tehát a növénykéek körülbelül 77%-a élte túl az akklimatizációs időszakot, 23%-a nem tudott megfelelően akklimatizálódni.

A növénykéek akklimatizációja után a növénykéek ploidia fokának meghatározására került sor áramlási citometriás vizsgálat útján. A növénykéek ploidia foka hisztogramokról került leolvasásra (8. ábra). Összesen 20 növényke ploidia fokának azonosítását végeztük el. Az áramlási citometria során 6 növénykét haploidnak, 12 növénykét diploidnak, valamint 2 növénykét tetraploidnak mértünk (6. táblázat). Megállapítható tehát, hogy a mért növénykéek 30%-a haploid, 60%-a diploid, valamint 10%-a tetraploid volt.

A sikeresen akklimatizálódott növénykéket egyesével növénynevelő konténerekbe ültettük. Összesen 15 darab növényke élte túl az akklimatizációs időszakot, valamint a ploidia fok meghatározást, ami az összes növényke 75%-át jelenti. Az akklimatizációs időszak, valamint a ploidia fok meghatározás folyamata során a növénykéek 25%-a elpusztult.



7. ábra. Kiültetett növények akklimatizációja a fitotronban.



8. ábra. Rozs növények ploidia fokát ábrázoló hisztogramok. (a) kontrol diploid növény, (b) haploid növény, (c) spontán diploid növény, (d) tetraploid növény

6. táblázat. Ploidia vizsgálatok eredménye. Használt jelölések: (n) haploid, (2n) spontán diploid, (4n) tertraploid növény.

Növényke sorszáma	Ploidia fok
1.	n
2.	2n
3.	n
4.	n
5.	4n
6.	2n
7.	2n
8.	2n
9.	n
10.	2n
11.	2n
12.	4n
13.	2n
14.	2n
15.	2n
16.	2n
17.	2n
18.	n
19.	n
20.	2n

5. Következtetések, javaslatok

5.1. Előkezelés hatása Wibro roszfajta portoktenyésztésében

A rosz portoktenyésztési kísérletsorozatunkban háromféle előkezelést alkalmaztunk Wibro fajta felhasználásával. Vizsgáltuk a hidegkezelés, az éheztetés, valamint kombinációjuk hatását az *in vitro* androgenezisre. Kísérleteink során különböző szakirodalmakban megjelent eljárásokat, és tapasztalatokat is alkalmaztunk.

Immonen és Anttila (1999) kutatásaik során vizsgálták a hidegkezelés hatását rosz *in vitro* portoktenyészetekben. Kísérleteikben két tavaszi (Jo02 és Hännilä), valamint két őszi (Hja7052/Warko és Jo8603/ Jo8708) roszfajtát alkalmaztak. A donorhajtásokat 2-4 hétig 4 °C-on előkezelték. Egyes kísérleteikben alkalmaztak az előkezelések során mannitos éheztetést is. Azokban az esetekben, ahol hideg előkezelést alkalmaztak, szinte minden esetben szignifikánsan több zöld növénykét tudtak regenerálni, mint ahol nem alkalmaztak hideg előkezelést. A legnagyobb mennyiségű zöld növénykét a Jo02 fajta esetében tudták regenerálni, három hétig történő hideg előkezelés mellett. Ez 30,6 zöld növényke volt 100 portokra vonatkoztatva.

Habár a legtöbb jelentős gabonanövény esetében, mint például kukorica, kenyérbúza, és árpa (Emons és mtsai. 1993, Echávarri és Cistué 2016) a mannitos éheztetés az embriogenezisre serkentő hatással bír. Azon kísérletekben, ahol mannitos éheztetést is alkalmaztak az előkezelések keretében ott azt tapasztalta Immonen és Anttila (1999), hogy az éheztetés a portokok válaszó képességét jelentősen rontotta.

Ezeket felül kísérleteikben arra a következtetésre jutottak, hogy a regenerált albínó növénykéik számát szignifikánsan nem befolyásolták a különböző alkalmazott előkezelések (Immonen és Anttila 1999).

Guo és Pulli (2000) kísérleteikben vizsgálták a mannitos stresszelőkezelés hatását *in vitro* rosz portoktenyészetekben. Összesen 21 féle őszi- és tavaszi roszfajtát alkalmaztak donornövényként a vizsgálat során. Mikroszkóp segítségével megállapították a mikrospórák fejlettségi állapotát, majd, ha ezek középső vagy kései egy sejtmagvas vakuólumos állapotban voltak a donorhajtásokat maximum 1 hétig 4 °C-on sötétben tárolták vízzel teli üvegekben. A hideg előkezelés lejárta után következett a mannitos stresszelőkezelés. A portokokot 0,3 M mannitot tartalmazó előkezelő közegre izolálták, amelyen a portokokot 10-12 °C-on 4-7 napon keresztül tartották. Ezt követően 3-5 hét eltelté után a fejlődő embrioidokat 190-2Cu regeneráló táptalajra helyezték át. Az eredmények értékelésekor Guo és Pulli (2000) megállapították, hogy azokban a portoktenyészetekben, ahol mannitos stresszelőkezelést alkalmaztak szignifikánsan

több embrioidot tudtak előállítani. Azt is megállapították, hogy a regenerált zöld növénykéek számát a mannitos stresszelőkezelés nem befolyásolta szignifikánsan. Legjobb eredményeket a Florida 401 rozsfajtával érték el, ahol a mannit alkalmazásával megközelítőleg Petri-csészénként 220 darab embrioidot tudtak előállítani, míg e stresszkezelés nélkül ez 167 darab volt. Ugyanez a fajta esetén a mannitos előkezelés alkalmazásával Petri-csészénként megközelítőleg 2,7 zöld növénykét regeneráltak, míg az előkezelés alkalmazása nélkül ez a szám 2,9 volt. Egy Petri-csésze átlagosan 30 darab portokot tartalmazott (Guo és Pulli 2000).

Kísérleteink eredményei leginkább Immonen és Anttila kutatási eredményeit igazolják, ugyanis a mi esetünkben is igaz volt az, hogy azokban az esetekben, ahol nem alkalmaztunk mannitos előkezelést, csak hideg előkezelést stresszkezelésként, abban az esetben regeneráltuk a legtöbb embrioidot, és kaptuk a legtöbb zöld növénykéket a portoktenyészetekből. Szintén közös a két kísérlet eredményeiben az, hogy a mannit alkalmazása minden esetben szignifikánsan csökkentette a portokok válaszóó képességét, azaz lényegesen kevesebb embrioidot regeneráltunk, és zöld növénykét kaptunk.

A kapott eredmények alapján *in vitro* rozso portoktenyészetekben stressz előkezelésként a hideg előkezelést javasoljuk.

5.2. Az ováriumos dajkatenyésztés hatása Wibro rozsfajta portoktenyészetében

Kísérleteinkben a dajkatenyésztés hatását is vizsgáltuk Wibro rozsfajta azon portoktenyészeiteiben, amelyek előzetesen csak hideg előkezelésben részesültek. Rozso esetében az *in vitro* androgenezis korántsem olyan sikeres, mint más jelentős gabonanövények, például búza esetében. A rozso portoktenyészetekben alkalmazott dajkatenyésztésről nagyon kevés a fellelhető szakirodalom, ezért a kísérlet során más gabonanövényekkel szerzett tapasztalatokat vettük alapul. A dajkatenyésztés során búza, illetve rozso ováriumokat alkalmaztunk. A kontrollhoz nem adtuk ováriumokat.

Számos gabonaféle esetében, mint például búza és az árpa, a dajkatenyésztés jelentősen növeli az *in vitro* androgenezis hatékonyságát. Növeli az embrioidok számát, valamint a zöld növénykéek számára is kedvezően hat (Broughton 2008).

Castillo és munkatársai (2015) kísérleteik során *in vitro* kenyérbúza portoktenyészetekben vizsgálták a dajkatenyésztés hatását. Két tavaszi búzafajtát alkalmaztak a Pavon, és a Caramba fajtát. Miután mikroszkóp segítségével megállapították, hogy a portokokban lévő mikrospórák megfelelő állapotban vannak a portokokat az ováriumokat is tartalmazó tápközegre izolálták.

Kísérleteik végeztével azt az eredményt kapták, hogy a dajkatenyésztésben alkalmazott fajtaazonos búza ováriumok szignifikánsan befolyásolták az androgenezis hatékonyságát az *in vitro* portoktenyészetekben. A Caramba ováriumok alkalmazása bizonyult a legsikeresebbnek, ugyanis ebben az esetben sikerült elérniük mind az embrioidok, mind a kapott zöld növénykék számának körülbelül kétszeres növekedését (Castillo és munkatársai 2015).

Broughton (2008) kutatásai során vizsgálta a dajkatenyésztés androgenezisre gyakorolt hatását tavaszi búza *in vitro* portoktenyészetekben. Kétféle tavaszi búzafajtát alkalmazott, amelyek a Tammarin Rock, illetve a Westonia voltak. A portokok izolálásával egy időben adta hozzá a tenyészetekhez a búza ováriumokat, majd az így kapott portoktenyészeteket 4-6 héten keresztül sötétben inkubálta 28 °C-on. Az 1-2 mm nagyságú embrioidokat megszámlálták, és regeneráló táptalajra helyezték, majd 4 hét elteltével megszámlálták a kifejlődött zöld- és albínó növénykéket is. Az eredmények kiértékelésekor megállapították, hogy a tápközeghez adott ováriumok jelentősen növelték a portoktenyészetekből regenerált embrioidok számát, valamint a kapott zöld- és albínó növénykék számát is. Azokban a portoktenyészetekben, ahol alkalmaztak dajkatenyésztés keretében búza ováriumokat, ott a portokonkénti embrioidszám 7,6-ről 50-re emelkedett, míg a portokonkénti zöld növényke szám 0,6-ről 8,9-re (Broughton 2008).

A fenti kísérletekből láthatjuk, hogy a dajkatenyésztés keretében a portoktenyészetekben alkalmazott ováriumok az *in vitro* androgenezis hatékonyságát nagy mértékben növelik. Ezt az elméletet mi rozsnövények esetében vizsgáltuk. Kísérleteink eredményeit kielemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy rozsnövények esetében az ováriumok alkalmazása szignifikánsan csökkentette az androgenezis hatékonyságát. A fajtaazonos rozs ováriumok, valamint a búza ováriumok dajkaként való alkalmazásával lényegesen kevesebb embrioidot tudtunk regenerálni, valamint zöld növénykéket gyökeresíteni, mint a kontrol esetében, ahol nem alkalmaztunk ováriumokat.

Az eredményeink alapján nem javasoljuk az ováriumok dajkaként való alkalmazását rozsnövények *in vitro* androgenezise hatékonyságának javítása céljából.

5.3. A portoktenyészet eredetű növénykéek ploiditásának meghatározása

A sikeresen akklimatizálódott növénykéek ploidia fokát áramlási citometria segítségével meghatároztuk.

Mind a 20 darab rozsnövényke ploidia fok meghatározása sikerrel járt, a mérések eredményei egyértelműek voltak. A haploid növények sterilek, azaz nem hoznak termést és kevésbé életképesek, mint a diploid és a tetraploid növények, ezért felnevelésük nem indokolt (Murovec és Bohanec 2012). A kromoszómakészlet duplikációja történhet indukált módon kolhicin kezeléssel is. A kolhicin egy alkaloid, amely gátolja a mitózis során a magorsófonalak kialakulását, így késlelteti a centromerek elválását. Ennek következményeként bekövetkezik a kromoszómaszám duplikációja (Navarro-Alvarez és mtsai. 1994). A kolhicin kezelés alkalmazását olyan esetekben célszerű alkalmazni, ahol kevés növényt sikerült előállítani, így ezek között növelhető a dibloid egyedek száma.

Kísérleteink során a sikeresen akklimatizálódott növénykéek legnagyobb arányban diploidok, és tetraploidok voltak a haploid növénykéekhez képest.

6. Összefoglalás

Kísérleteink megtervezésekor három célkitűzést fogalmaztunk meg. Kísérleteink alapanyagaként Wibro roszfajtát használtunk, amely egy lengyel eredetű őszi roszfajta (Bóna 2004). A kísérleti alapanyagként felhasznált rozsnövényeket üvegházi körülmények között neveltük fel. Indukciós tápközegeként minden kísérletben W₁₄mf folyékony tápoldatot használtunk.

Az első célkitűzés keretében megvizsgáltuk háromféle különböző előkezelés hatását az *in vitro* androgenezisre nézve. A hideg előkezelés hatását, a mannitos éheztetés hatását, valamint ezek kombinációját. Az egyes előkezelések között szignifikáns különbséget tapasztaltunk a portoktenyészetekből regenerált embrioidok, valamint a fejlődő zöld növénykéék és az albínó növénykéék számát tekintve. Az eredményeinket egytényezős varianciaanalízissel értékeltük ki, valamint összehasonlítottuk őket más kutatók szakirodalmaiban leírt kísérleti eredményeivel. Ebben a kísérletsorozatban az Immonen és Anttila (1999) által végzett kutatás eredményeihez hasonló következtetésre jutottunk. A legtöbb embrioidot a 3-as számú előkezelés során kaptuk (30,67/100 portok). A legtöbb zöld növénykét szintén a 3-as számú előkezelés alkalmazásával regeneráltuk (7,50/100 portok). Megállapítottuk, hogy Wibro roszfajta esetében a legmegfelelőbb előkezelés a donorhajtások két hétig történő hideg előkezelése 4 °C-on.

Munkánk második célkitűzése az ováriumos dajkatenyésztés hatásainak vizsgálata volt, amelynek során búza -és rosz ováriumokat helyeztünk az izolált portokok közé az indukciós táptalajba. Az eredményeket ebben az esetben is egytényezős varianciaanalízissel értékeltük ki. Az eredményeket összehasonlítottuk más kutatók munkájával, és megállapítottuk, hogy habár a gabonanövények *in vitro* androgenezisének indukciójára a dajkatenyésztés kedvező hatással bír, az ováriumok dajkatenyésztésben történő alkalmazása az általunk használt roszfajta esetében inkább negatívan befolyásolja az androgenezist.

Az androgenezis során létrejött embrioidokat 190-2Cu regeneráló táptalajra helyeztük át. A regenerált embrioidokból fejlődő zöld növénykéket ½MS₀ gyökeresítő táptalajra helyeztük át. A fejlődő albínó növénykéket Petri-csészénként megszámláltuk, számukat összesítettük, majd kidobtuk őket. A sikeresen gyökeresített növénykéket először PVC csövekbe, majd a sikeres akklimatizációt követően növénynevelő konténerbe helyeztük, ahol tovább fejlődtek. A harmadik célkitűzésünk értelmében az életben maradt növénykééknek a ploidia fokát áramlási citometria útján meghatároztuk. A növények ploidia foka hisztogramokon került ábrázolásra.

Ezt követően összesítettük a kísérleteink során előállított haploid, spontán diploid, és a tetraploid növénykéek számát. 6 növénykét haploidnak, 12 növénykét diploidnak, valamint 2 növénykét tetraploidnak mértünk.

7. Irodalomjegyzék

1. **ALTENHOFER, P. - OERTEL, C. - MATZK, F. (1997):** Chromosome elimination in wide crosses of Poaceae. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. International Symposium held at Tulln, Austria, February 21–22, pp. 310–317.
2. **ALVAREZ, W. N.- BAENZIGER, P. S.-ESKRIDGE, K.M.- HUGO, M.- GUSTAFSON, V.D. (1994):** Addition of Colchicine to Wheat Anther Culture Media to Increase Doubled Haploid Plant Production. *Plant Breeding* 112. pp. 192-198.
3. **ANTAL J. (szerk.) (2005):** Növénytermesztés tan 1. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 187., 188., 190.
4. **BOHANEC, B. (2003):** Ploidy determination using flow cytometry, in: *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 397-403.
5. **BÓNA, L. (2004):** Tritikále és rozs nemesítés; in: Sági, F. (szerk.): *A nyolcadik évtizedben...*, Agroiinform Kiadó. p. 162.
6. **BROUGHTON, S. (2008):** Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 95, pp. 185–195.
7. **CASTILLO, A. M. - SÁNCHEZ-DÍAZ, R. A. - VALLÉS M. P. (2015):** Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. *Frontiers in Plant Science* pp 1-12.
8. **CHODACKA, M. K. - BARANSKI, R. (2013):** Comparison of haploid and doubled haploid sugar beet clones in their ability to micropropagate and regenerate. *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (2). pp. 1-10.
9. **DARZYNKIEWICZ, Z.- DOROTA HALICKA, H. - ZHAO, H. (2011):** Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 676: pp. 137-147.
10. **DATTA, S. K. (2005):** Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science* 89. pp. 1870–1878.
11. **DEIMLING, S. - FLEHINGHAUS-ROUX, T. - ROBER, F. - SCHECHERT, A. - ROUX, S.R. - GEIGER, H.H. (1994):** Doubled haploid production-now reproducible

- in rye. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, June 12–17, pp. 95.
12. **DEIMLING, S. - FLEHINGHAUS-ROUX, T. (1997):** Haploidy in rye. In *Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 181–204.
 13. **DOLEZEL, J. - GREILHUBER, J. - SUDA, J. (2007):** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* VOL.2 NO.9. pp. 2233-2244.
 14. **ECHÁVARRI, B. – CISTUÉ, L. (2016):** Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 125 (1). pp. 11-22.
 15. **EMONS, A. M. C. – SAMALLO – DROPPERS, A. – van der TOORN, C. (1993):** The Influence of Sucrose, Mannitol, L-Proline, Absciscic Acid and Gibberellic Acid on the Maturation of Somatic Embryos of *Zea mays* L. from Suspension Cultures. *Elsevier* Vol 142, Issue 5 pp. 597-604.
 16. **FORSTER, B.P. - HEBERLE-BORS, E. – KASHA, K.J. – TOURAEV, A. (2007):** The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci* 12. pp. 368
 17. **GALBRAITH, D.W. – HARKINS, K.R. – MADDOX, J.M. – AYRES, N.M. – SHARMA, D.P. – FIROOZABADY, E. (1983):** Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220. pp. 1049–1051.
 18. **GORDEJ, I. S. - LYUSIKOV, O. M. - GORDEJ, I. A. (2019):** Zygotic Autopolyploidization of Rye (*Secale cereale* L.). *Cytology and Genetics* Vol. 53 No. 5, pp. 357-362.
 19. **GUO, Y. D. - PULLI, S. (2000):** Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.) *Plant Cell Reports* (2000). Cell biology and morphogenesis, Springer pp. 875-880.
 20. **HESZKY, L.- FÉSŰS, L.- HORNOK, L. (2005):** *Mezőgazdasági biotechnológia*, Agroinform Kiadó, Budapest. pp. 146-147.
 21. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (letöltve 2024.06.25.)
 22. https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0074.html (letöltve 2024. 06. 25.)
 23. **IMMONEN, S. - ANTTILA, H. (1999):** Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Volume 57, pp. 121-127.

24. **IMMONEN, S. - ANTTILA, H. (2000):** Media Composition and Anther Plating for Production of Androgenetic Green Plants from Cultivated Rye (*Secale cereale* L.), Journal of Plant Physiology Volume 156, Issue 2, Elsevier pp. 204-210.
25. **LETARTE, J.- SIMION, E. - MINER, M.- KASHA, K. J. (2006):** Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. Plant Cell Rep 24, pp. 691–698.
26. **MA, R.- GOU, Y-D.- PULLI, S. (2004):** Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale*). Kluwer Academic Publishers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: pp. 147.
27. **MAKOWSKA, K. – OLESZCZUK, S. – ZIMNY, J. (2017):** The effect of copper on plant regeneration in barley microspore culture. Czech J. Genet. Plant Breed. 53. pp. 17–22.
28. **MALUSZYNSKI, M. – KASHA, K.J. – FORSTER, B.P. – SZAREJKO, I. (2003):** Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer Academic Publisher, Dodrecht, the Netherlands pp. 95.
29. **MARCIŃSKA, I.-CZYCZYŁO-MYSZA, I. - SKRZYPEK, E. - WARCHOŁ, M. - ZIELIŃSKI, K. - DUBAS, E. (2018):** Obtaining of Winter Rye (*Secale Cereale* L. ssp. *Cereale*) Haploid Embryos through Hybridization with Maize (*Zea Mays* L.). Cereal Research Communications pp. 521-532.
30. **MEJZA, S. J. - MORGANT, V.- DIBONA, D. E., WONG, J. R. (1993):** Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. Plant Cell Rep. 12, pp. 149–153.
31. **MOLENAAR, W. S. - OLIVEIRA COUTO, de E. G. - PIEPHO, H. P. - MELCHINGER, A. E. (2019):** Early diagnosis of ploidy status in doubled haploid production of maize by stomata length and flow cytometry measurements. Plant Breeding, Blackwell Verlag GmbH 2019. pp. 1-11.
32. **MUROVEC, J.- BOHANEK, B. (2012):** Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, Plant Breeding, Dr. Ibromkhim Abdurakhmonov (szerk.). InTech, Croatia, pp. 87-106.
33. **OCHATT, S. (2008.):** Flow cytometry in plant breeding. Cytometry Part A, 73A pp. 581-598.
34. **PUOLIMATKA, M. - PAUK, J. (1999):** Impact of explant type, duration and initiation time on the co-culture effect in isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Plant Physiol. 154, pp. 367–373.

35. **SEGUÍ-SIMARRO J. M.- MORENO J. B.- FERNÁNDEZ M. G. AND MIR R. (2021):** Species with Haploid or Doubled Haploid Protocols. In: Segui-Simarro, J. M. (szerk.) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2288. Humana, New York, NY. pp. 41-103.
36. **TARGON'SKA, M. - JUDYCKA, A. H. - BRĄGOSZEWSKA, H. B. - TROJANOWSKA, M. R. (2013):** The specificity and genetic background of the rye (*Secale cereale* L.) tissue culture response. *Plant Cell Rep.* (2013) pp. 1-9.
37. **TEIJA TENHOLA-ROININEN, T. - TANHUANPÄÄ, P. - IMMONEN, S. (2005):** The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes. *Euphytica* 145 pp. 1-9.
38. **VEJRAŽKA, K. - FAMĚRA, O. - KOCOURKOVÁ, Z. (2011):** Selected grain physical properties of different rye varieties (*Secale cereale*) and milling quality. Conference: 6th International Congress FLOUR-BREAD '11At: Opatia, Croatia pp. 461-466.
39. **ZHOU, H. - BALL, S. T., KONZAK, C. F. (1992):** Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30. Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp. 77-83.
40. **ZIELIŃSKI, K. (2020):** The effect of glutathione and mannitol on androgenesis in anther and isolated microspore cultures of rye (*Secale cereale* L.). Springer: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* (2020). pp. 577-592.
41. **ZIELIŃSKI, K. (2020):** β -1,3-glucanases and chitinases participate in the stress-related defence mechanisms that are possibly connected with modulation of arabinogalactan proteins (AGP) required for the androgenesis initiation in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Science. Elsevier.* pp. 1-48.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Karának, hogy lehetőséget biztosított számomra a Tudományos Diákköri Konferencián való részvételhez, valamint a Gabonakutató Nonprofit Kft. Biotechnológiai laboratóriumának, hogy biztosította dolgozatom kísérleteinek szakmai és tárgyi feltételeit.

Köszönettel tartozom a külső konzulensemnek, aki segítette a dolgozat létrejöttét szakmai tanácsaival- és útmutatásával, valamint segítséget nyújtott a statisztikai elemzésekben. Köszönöm belső konzulensemnek a dolgozat megírásához nyújtott szakmai segítséget és támogatást.

Szívből köszönöm Markó Ferencnek, hogy kiemelt figyelemmel kísérte a munkámat, és támogatását dolgozatom megírása során is, szakmai segítségét, és tanácsait, valamint hatalmas türelmét- és odaadását.

Szeretném megköszönni családomnak a sok támogatást és türelmet!