

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

XXXI. OTDK Biológia Szekció

TDK dolgozat

In vitro androgenesis indukciója paprikában (*Capsicum annuum* L.)

Deli Márta
Biológus MSC II. éves szakos hallgató

Témavezető: Dr. Lantos Csaba
Tudományos munkatárs
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

Konzulens: Dr. Pécsváradi Attila
Egyetemi docens
SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Bevezetés	3
1. Irodalmi áttekintés.....	5
1.1. Androgenezis történeti áttekintése	5
1.2. Paprika portok- és mikrospóra tenyésztési tudományos háttere	6
1.3. A portok- és mikrospóratenyészetek előnyei, hátrányai	6
1.4. In vitro androgenezis sikerességének befolyásoló tényezői.....	7
1.4.1. A donor növények genotípusának és környezeti feltételeinek befolyásoló hatása ..	8
1.4.2. Virágbimbók és portokok fejlettsége morfológia alapján	8
1.4.3. Stressz kezelések	9
1.4.4. Indukciós táptalaj befolyásoló tényezői	9
1.4.5. Dajkatenyésztés	11
1.4.6. Antibiotikumok	11
1.4.7. Növényregeneráció.....	12
1.4.8. Ploidfok vizsgálatok	12
2. Anyagok és módszerek.....	14
2.1. Növényi alapanyag és a donor növények nevelési körülményei.....	14
2.2. A virágbimbó fejlettsége és a portokok izolálása.....	14
2.3. Mikrospóra izolálás és tenyésztés	14
2.4. Alaptáptalaj hatásának tanulmányozása.....	15
2.5. Antibiotikum hatásának vizsgálata.....	16
2.6. Növényregenerálás és Gerlite hatásának vizsgálata a növényregenerációra	16
2.7. Ploid fok vizsgálat.....	16
2.8. Statisztikai elemzés	17
3. Eredmények	21
3.1. Izolált mikrospóra tenyésztés kritikus lépései.....	21
3.2. Táptalaj és antibiotikum hatása a mikrospóra eredetű struktúrák mennyiségére.....	22
3.3. Gerlite hatásának vizsgálata a paprika mikrospóra eredetű struktúrák regenerálása során	25
3.3.1. Gyökeresedésre gyakorolt hatása	25
3.3.2. Hajtás fejlődésére gyakorolt hatása.....	26
3.4. Mikrospóra eredetű növények ploidfokának vizsgálata flow cytometriás méréssel	26
4. Eredmények kiértékelése, konklúzió	29
4.1. Indukciót befolyásoló tényezők	29
4.2. Indukciós táptalaj hatása az androgenezis hatékonyságára.....	30
4.3. Növényregeneráció és az eredmények gyakorlati alkalmazása	30
Összefoglalás	32
Irodalomjegyzék	33
Köszönetnyilvánítás	37
Nyilatkozat.....	38

Bevezetés

Az embriogenezis *in vivo* körülmények között megtermékenyített petesejtből indul ki. Azonban a fejlett biotechnológiai kutatások, melyek a sejtek totipotenciálját kihasználják, olyan módszereket dolgoztak ki, melyben számos más sejtől is képesek embriogenezist indukálni.

A mikrospórák azaz éretlen pollenszemek *in vitro* tenyésztése (androgenezis) napjainkban az egyik legfontosabb kutatási terület a növénynemesítésben alkalmazott biotechnológiai módszerek között. Ez a haploid technológiai eljárás lehetővé teszi a hím gamétákból keletkező haploid embriók/kalluszok regenerációját haploid illetve doubled haploid (DH) vagy kettőzött haploid növényekké. Több gazdaságilag fontos növény fajból DH növények előállítása lehetséges, melyet később szelekció útján további növénynemesítésre vagy egyéb kutatási célra (pl.: genetikai térképezés) lehet felhasználni.

Paprika esetében az indukált androgenezis első módszere a portoktenyésztés a '70-es években kezdődött el, de napjainkban is fontos alap- alkalmazott kutatási területnek számít. A portoktenyésztés számos hátránya (1, munkaigényes 2, szomatikus és haploid szövetek közös tenyésztése) miatt az izolált mikrospóra tenyésztés lett az az eljárás, mely szintén a kutatás homlokterébe került az utóbbi öt-hat évben.

A mikrospóra eredetű növények előállítása során számos befolyásoló tényezővel kell számolni. A sikeres indukció érdekében figyelembe kell venni a donor növények felnevelését, a mikrospórák fejlettségi állapotát, az előkezeléseket a portokkultúrákban és a mikrospóra tenyészetekben egyaránt, az alkalmazott tápoldat összetevőit valamint fajtól függően az alkalmazott dajkatenyésztés során felhasznált ovárium, mint dajka indukciós hatásait. Továbbá fontos tényezőként kell számon tartani az antibiotikum koncentráció mennyiségét, minőségét. Mai napig is olyan publikációk jelennek meg melyekből kitűnik, hogy a paprika mikrospóra eredetű növényi regenerálási módszer protokollja még fejlesztéseket igényel.

TDK dolgozatom során célul tűztük ki a módszer további optimalizálását. Célkitűzéseim közé tartozik:

1. Az izolált paprika mikrospóra tenyésztés kritikus lépéseinek (indukció, dajkatenyésztés és növényregenerálás) nyomon követése.

- 2. Tanulmányozni különböző összetételű (makro-, mikroelemek és antibiotikumok) tápoldatok hatását mikrospóra tenyészetben fejlődő embrioidok mennyiségére.**
- 3. A regeneráció során alkalmazott gelrite koncentrációjának hatása a növényi szervfejlődésre.**
- 4. Mikrospóra eredetű növények ploid fokának meghatározása és a fertilis spontán DH növények kiválogatása a növénynemesítés számára.**

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Androgenezis történeti áttekintése

Növényi szövettenyésztési módszerek kidolgozása ma mára megvalósíthatóvá tették a növényi sejtek izolálását, fenntartását, felszaporítását, majd ezekből regenerálható növényeket fejlődését (in vitro növény-sejt-növény rendszer).

A növényi biotechnológia egyik fő kutatási területe az *in vitro* körülmények között megvalósuló haploid illetve DH növények előállítása. Több fajban több eljárást sikerült kidolgozni az utóbbi fél évszázadban, melyeknek eredményeképpen a növénynemesítésben lehetett új fajtákat előállítani a mezőgazdaság termelés sikeressége érdekében.

A nemesítés, fajta előállítás rendkívül hosszú folyamat, akár 8-10 évet, néha többet is igénybe vesz klasszikus nemesítési módszerekkel. Ahhoz, hogy ez a közel 10 éves generációs időt lecsökkentsék, különböző előállítási biotechnikák kidolgozása történt. A módszerek közül mára már az egyik legjelentősebb eljárások közé tartozik a **portoktenyésztés** (*in vitro* androgenezis). Portoktenyészetekkel való kutatás már az 1930-as években elkezdődött, amikor is még csak a gametogenezis vizsgálata volt a fő cél. Az első portoktenyészetből származó haploid növény majd 30 évvel később sikerült előállítani, a *Datura innoxia* portokulturájából (Guha és Maheswary 1964). Később több számos növényfajból, pl. rizsből (Niizeki 1968) és más haszonnövényekből állítottak elő haploid eredetű növényeket. Az 1980-as években kezdődtek azok a kutatások, amelyek az **izolált mikrospóra** eredetű növények létrehozásáról számoltak be. A módszer óriási előrelépést jelentett a nyolcvanas években, hiszen először tudtak szomatikus szövetektől (portok fala) teljesen mentesen, csak haploid sejtekből álló sejtenyészetet létre hozni, melyből haploid illetve DH növényeket lehetett előállítani. Lichter (1982) volt, az a kutató, aki először hozott létre ilyen növényeket *Brassica napus* éretlen pollenjeiből. Azóta számos növényfajból sikerült előállítani haploid növényeket, mint pl. dohányból (Touraev és mtsai 1996) vagy számos gabonaféléből, tritikáléből (Pauk és mtsai 2000, Eudes és Amundsen 2005), durum búzából (Cistue és mtsai 2006).

Napjainkig már mintegy 80 nemzettség csaknem 300 növényfajának mikrospórájából sikerült indukcióval legalább embriót, több esetben növényt is előállítani. (Dudits és Heszký 2000).

1.2. Paprika portok- és mikrospóra tenyésztési tudományos háttere

A fűszerpaprika termesztése már több évszázadra nyúlik vissza hazánkban és a világon is. A növénynemesítők számára a paprika *in vitro* tenyésztési módszerek alkalmazása kiemelkedő fontosságú. Az első paprika portok eredetű haploid növények előállítása egy időben 3 különböző laboratóriumnak sikerült 1973-ban: George és Narayanaswamy kutatóknak Indiában, Wang és mtsainak szintén még ebben az évben Kínában, valamint Kuo és mtsainak is. Azóta számos fejlesztést sikerült megfigyelni, mellyel növelhető volt a regenerálható növények mennyisége. A mikrospóra eredetű paprika növények kutatási háttere még nem annyira gazdag, ezért a portok tenyészetek eredményeire kell elsősorban hagyatkozni. Kétlépcsős rendszert dolgozott ki 1979-ben Sibi és mtsai, melyet később Dumas de Vault és mtsai optimalizáltak (1981), miszerint a portok kultúrát először magas hormon koncentrációjú táptalajon tenyésztették hő sokk mellett, majd a tenyészeteket később átrakták egy kisebb hormon koncentrációt tartalmazó táptalajra. 2006-ban Supena és mtsai kidolgoztak egy olyan módszert, mely a portokokból kiszóródott mikrospórák tenyésztésén alapul, gyakorlatilag ez az eljárás is portoktenyésztésnek tekinthető (Supena és mtsai 2006a). Ez az úgynevezett úsztatott portoktenyésztés vagy kiszóródott mikrospórák tenyésztése. A harmadik publikált módszer a szomatikus szövetektől teljesen elkülönített, izolált mikrospórák tenyésztése. E módszer alkalmazásáról Supena és mtsai tettek először említést (2006a), azonban Kim és mtsai írták le először részletesen az eljárást (2008). Dolgozatom során is ezt az eljárást fogom tanulmányozni.

1.3. A portok- és mikrospóratenyészetek előnyei, hátrányai

Az androgenezis útja során az indukált mikrospóra, ha optimális feltételek mellett izoláljuk és tenyésztjük, a normál gametofiton fejlődési folyamatról a sporofiton fejlődési útvonalra tér át, amelyből embrió keletkezik és haploid vagy DH növény fejlődik. Míg a

legtöbb korai DH előállítási publikáció a portokultúrákkal foglalkozik, az utóbbi időben az izolált mikrospóra áll a paprika haploid kutatás középpontjában.

Mindhárom eljárás (portoktenyésztés, úsztatott portoktenyésztés és izolált mikrospóra tenyésztés) előnyeként említhető:

- A teljes homozigóta állapot (vonallal) létrehozásának ideje 8-10 generációról 1 generációra csökkenthető.
- A haploid és DH növényekben lehetőség nyílik a különben esetleg rejtve maradó recesszív tulajdonságok gyors fenotípusos megjelenésére.
- Mivel genetikailag tiszta vonalakat kapunk, ezért géntérképezésre, és molekuláris markerezéshez egyaránt használhatók.

A mikrospóra tenyészetek előnyei a portokultúrákkal szemben:

- A portoktenyészetekben (ide értve az úsztatott portoktenyészeteket is) egyszerre található n és $2n$ sejtek, diploid szövetek úgymint a portok fala vagy a csatló. A regenerált növény eredete nehezen azonosítható, a portokfal szöveiteiből vagy a mikrospórából származó növények nehezen megkülönböztethetők. Az izolált mikrospóra tenyészetekben biztos a haploid eredetűség.
- A mikrospórák közvetlenül érintkeznek a regeneráló táptalajjal, így a különböző kezelések hatása közvetlen a célsejteket éri.
- A mikrospóra kultúrákban sokkal jobban vizsgálható a mikrospóra embrióvá fejlődése, jól nyomon követhetők a változások a mikrospóra embriogenezis során

1.4. In vitro androgenézis sikerességének befolyásoló tényezői

A módszer alkalmasságát több tényező is egyszerre befolyásolhatja úgymint:

- donor növények genotípusa és
- donor növények felnevelési feltételei
- a mikrospórák optimális fejlettségi állapota
- stressz faktorok indukciós szerepe az androgenézisben
- indukciós tápoldat összetétele
- dajkatenyésztés

- antibiotikum koncentrációja
- növényregenerációs táptalaj összetétele

1.4.1. A donor növények genotípusának és környezeti feltételeinek befolyásoló hatása

A genotípus, az első olyan faktor, mely befolyásolhatja nagymértékben a DH növények kialakulását paprika portok-, úsztatott portok és mikrospóra tenyészetben egyaránt (Mitkyó és mtsai. 1995, Supena és mtsai. 2006a, Lantos és mtsai. 2009). A tenyészetekben indukálódott androgenézis sikeressége, majd a regenerálódó növények létrejötte függ a donor növények életkorától, a levegő hőmérsékletétől, a megvilágítástól. Különös gondot kell fordítani a donor növények gondos felnevelésére beleértve a rendszeres tápanyag utánpótlást, fitotechnikai munkákat és a növényvédelmet is.

1.4.2. Virágbimbók és portokok fejlettsége morfológia alapján

A sikeres androgenézis érdekében a virágbimbó fejlettségi állapota is fontos tényezőként van jelen. Külső morfológia alapján már be lehet határolni, mely stádiumú fejlődésben van a mikrospóra (Kim és mtsai. 2004). Természetesen ezt kis mértékben módosítja a donor növény kora illetve időjárási körülmények, így a fejlettségi állapot mikroszkópos ellenőrzése mindig javasolt. A virágbimbók tanulmányozása szerint, hogy melyek alkalmasak tenyészetek kialakítására, a legfontosabb paraméter a csésze és szíromlevelek egymáshoz viszonyított aránya, valamint a portokok színe. Természetesen ez az indirekt karakterizálás megközelítő pontosságú a genotípusok és morfológiai tulajdonságok között, a különböző növényvonalaknál kisebb eltérések lehetnek.

A mikrospórák fejlődésének van egy olyan állapota, amikor a gametogenezis determinációja még nem következett be, ezért a mikrosporgenezisnek nincs meghatározva a fejlődés iránya, ami lehetővé teszi a sporofita fejlődést az ontogenezis irányába (Dudits és Heszky 2000). Az átmenet néhány órától néhány napig tarthat a fajtól, hőmérséklettől, a sporofita fejlődés típusától, stb. függően. Ez az állapot több gabonafélében egysejtes vakuólumostól és korai kétsejtes állapotig tart (Jahne és Lörz 1995), a búzában és árpában közép és késői egymagvas (Mejza és mtsai 1993), míg pl. a rizsben egymagvas és korai

kétmagvas állapot az ideális (Datta és mtsai 1990). Paprika esetében sikeresen lehetett növényt regenerálni, ha a mikrospóra késői egymagvas és korai kétmagvas állapotban van (Lantos és mtsai 2009). A sporofita osztódások során minden esetben több leánysejtet tartalmazó struktúrák alakulnak ki a pollen falán belül. Jelenleg módszertani ismereteink szerint nem lehet indukálni embriót illetve növényt minden egyes sejtéből, így két feltétele van a sikeres androgenzisnek:

- egy, hogy a tenyészetben legyenek sporofita fejlődési útvonalra determinált mikrospórák illetve,
- ezen sejtek fejlődési programját indukálni és realizálni lehessen (Dudits és Heszky 2000)

1.4.3. Stressz kezelések

A stressz kezeléseknek is döntő befolyása van az androgenézis folyamatában. 1981-ben alkalmaztak először magas hőmérsékletű előkezelést a portoktenyészetek során (Dumas de Vaulx és mtsai 1981). Későbbi tanulmányok is arról számoltak be, hogy a magas hőmérsékleten (32-35°C) előkezelt portokokból nagyobb arányban lehet élő, mikrospóra embriogenezisre alkalmas mikrospórákat izolálni (Kim 2004). Továbbá az ozmotikus stressz és éheztetés androgenézisre gyakorolt pozitív hatásáról is beszámoltak paprika izolált mikrospóra tenyészetben (Gémes és mtsai. 2009, Lantos és mtsai 2009).

1.4.4. Indukciós táptalaj befolyásoló tényezők

A fentiekből jól látszik, hogy a regenerált haploid növények mennyiségére és minőségére az indukciós tápközegek több komponensének is nagy befolyásoló hatása van. *In vitro* kultúrák esetében, a sejteknek szükségük van minden biológiai és fizikai összetevőkre, melyek a növekedésükhöz, fejlődésükhöz egyaránt fontosak.

Hat különböző csoportba sorolhatók azon komponensek, melyek szükségesek az *in vitro* tenyészetekben lévő sejtek növekedéséhez:

- makroelemek
- mikroelemek
- vasforrás

- vitaminok
- cukorforrás
- növekedési faktorok

Makroelemek, mint a neve is utal rá, nagy mennyiségben kell jelen lenni az adott tápközegekben, hogy biztosítja a növény számára a megfelelő növekedést. Ezek közé tartozik a nitrogén, foszfor, kálium, kalcium, foszfor, magnézium és a kén.

Mikroelemek, azok az nyomelemek, amelyekre a növénynek csak kis mennyiségben van szüksége. Ilyen nyomelem pl.: mangán, jód, réz, vas, molibdén, cink.

Vasforrást biztosítunk a növény számára etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) és vasszulfát oldatával.

Cukorforrásként leggyakrabban alkalmazott a szacharóz, bár egyéb cukorforrások is rendelkezésre állnak (glükóz, maltóz, galaktóz), melyek ugyanolyan esetleg jobb hatással rendelkezhetnek, mint a szacharóz. Fajtól is függhet, hogy melyik a legalkalmasabb cukorforrás. Több faj izolált mikrospóra tenyésztésében a maltózt preferálják.

Vitaminok kis mennyiségben igényelt, az életfolyamatokhoz elengedhetetlen vegyületek. Egyes szervek működését serkentik, szabályozzák. Hiányukra a szervezet működésében rendellenességek lépnek fel.

A növények növekedés szabályzó komponensek kritikus elemei közé tartozik a tápoldatnak. Ilyen regulátorok a növényi hormonok (melyek lehetnek endogén, a növény által kibocsájtott vagy exogén hormonok is egyaránt) és szintetikus analógjai. 5 növényi hormont szokás általában növényi sejt kultúrában alkalmazni:

- auxin
- citokinin
- gibberellin
- abszcizinsav
- etilén

Auxin az egyik olyan hormon, amely elősegíti a növényi sejtosztódást, valamint a növényi sejtek növekedését. A természetben előforduló indolecetsavat (IAA) csak korlátozott mennyiségben használatos, mert könnyen bomlik, ezért a stabilabb szintetikus változatát használják, amely a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2,4-D). Az androgenezis indukciója során kulcs szerepet játszik több faj hatékony mikrospóra-növény rendszerében.

Citokininek a sejtosztódást segítik elő. Szövettenyészetekben leginkább a zeatint és a kinetint használják. Továbbá a citokininek az embriószerű struktúrák növényregenerálásában játszanak fontos szerepet.

A tenyészetek során alkalmazott hormonok mennyisége befolyásolja a tápoldat tenyészetekre való alkalmasságát. Több tanulmány is foglalkozik a hormonok koncentrációjának a tenyészetekben betöltött szerepével. Az úsztatott portoktenyészetknél leginkább a zeatin és IAA (Supena és mtsai 2006), az izolált mikrospóra tenyészeténél pedig a 2,4-D és a kinetin együttes kombinációját használták (Lantos és mtsai 2011) akárcsak portoktenyészetben (Dumas de Vault és mtsai. 1981). Mindkettő esetében sikerült regenerálni növényeket.

1.4.5. Dajkatenyésztés

Egyes fajoknál, mint pl.: árpa, repce dohány, az izolált mikrospóra tenyészetekből keletkező embrió könnyen előállítható-természetesen a megfelelő kezelések révén. (Davies és Morton 1998, Coventry és mtsai 1988, Touraev és mtsai 1996). Azonban vannak olyan fajok, mint pl. durum búza, búza (Mejza és mtsai 1993, Cistue és mtsai 2006) ahol az izolált mikrospóra tenyészethez az ugyanabból a fajból izolált ováriumot (megtermékenyítetlen állapotú termő) hozzáadva szignifikánsan nagyobb arányú mikrospóra eredetű embriót és növényt kaphatunk. Azonban egyes fajok esetében, mint a paprika nem valósul meg ez az eredmény. Kísérlet bizonyítja, hogy az idegen fajból (legtöbb esetben búza ovárium bizonyult a legjobbnak) izolált ovárium az izolált mikrospóra tenyészetéhez adva javítja az androgenezis hatékonyságát (Lantos és mtsai. 2009). Az ovárium hatásának kulcsa részleteiben nem ismert, az ováriumban található arabinogalaktánoknak és arabinogalaktán proteineknek tulajdonítanak jelentős szerepet (Letarte és mtsai. 2006). Ezen ováriumok a mikrospóra eredetű struktúrák növekedését elősegítő anyagokat bocsájtanak ki.

1.4.6. Antibiotikumok

Az embriók fejlődésének egy sikeres előfeltétele, hogy a mikrospóra tenyészet egészséges, fertőzésmentes legyen. Mint ismeretes a belső, endogén fertőzés az egyik komoly probléma a növényi szövettenyésztés során, különösen a paprika androgenezis esetében

(Supena és mtsai 2006b). Az utóbbi 50 év során, az *in vitro* technikák metodikai fejlesztése és a széles körben alkalmazott fertőtlenítőszeres és antibiotikumok jelentősen csökkentették a mikroorganizmusok megjelenését az *in vitro* kultúrákban. Azonban a sejt- és szövettenyészetekben az alkalmazott antibiotikumoknak toxikus hatásai is megjelenhetnek, nevezetesen az androgenezis hatékonyságát negatív módon befolyásolhatják.

Timentin és a rifampicin baktericid hatása miatt már sikeresen alkalmazták paprika úsztatott portoktenyészetekben (Supena és mtsai 2006b). Timentin aktív hatása elsősorban a Gramm-negatív baktériumokkal szemben van, míg a rifampicin sokkal hatásosabb Gramm-pozítív baktériumokkal szemben. A cefotaxime antibiotikumot hazai kutatók alkalmazták paprika mikroszpóra tenyészetben (Lantos és mtsai. 2009).

A Plant Preservative Mixture (PPM)-t, már több mint 10 éve alkalmazzák szövettenyészetekben (Guri és mtsai 1998). A PPM széles spektrumú oldat, mely nem csak a baktériumokkal szemben nyújt védelmet, hanem a gombák ellen is kiváló ellenszer. Azonban mint ismeretes az antibiotikumok koncentrációja is egy meghatározó pont a tenyészetek során. Túl nagy mennyiségben a sejtekre akár letális is lehet.

1.4.7. Növényregeneráció

A mikroszpórák direkt és indirekt útvonalon fejlődhetnek tovább embrióvá. Az indirekt útvonal magába foglalja a szabálytalan, aszinkronban osztódó sejteket, amiből később kallusz fejlődhet és organogenezisen keresztül haploid embriókat eredményezhet. A direkt és egyben preferált útvonal az *in vivo* zigotikus embriófejlődéshez hasonló, ahol az embrió globuláris, szív-, torpedó-, és szikleves stádiumon megy keresztül. Ezen fejlődési stádiumon áteső embriókból nagyszámú növény regenerálható (Dudits és Heszky 2000)

1.4.8. Ploidfok vizsgálatok

A regenerált növények ploid szintjét, több módszerrel is ki lehet mutatni, köztük a flow cytométer alkalmazása a legelterjedtebb és elfogadottabb eljárás. Néhány esetben bekövetkezhet spontán rediploidizáció, ami homozigóta DH növényeket eredményez. Ha nem következik be spontán duplázódás, akkor a haploid növények kromoszóma készletét kémiai

kezeléssel kell megduplázni. Az őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) alkaloidja, a kolhicin, alkalmas erre a kezelésre.

Morfológiai különbségeket lehet észrevenni a két különböző ploid szinttel (n és $2n$) rendelkező androgenezis eredetű paprika növények között. Dolcet-Sanjuan és mtsai 1997-ben diploidoktól megkülönböztették a haploidokat olyan morfológiai jellegek szerint, mint pl. az internódiumok mérete, levelek nagysága.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Növényi alapanyag és a donor növények nevelési körülményei

„Szegedi 80” magyar fűszerpaprika genotípust használtuk kísérleteink során. A steril magokat MS₀ táptalajon 25°C-on 16/8 órás megvilágítás mellett csíráztattuk növénynevelő szobában, és neveltük a donor növényeket 4 leveles korig (1. táblázat). Az *in vitro* csíráztatás a donor növények gondos nevelésének a része volt, de nem szükségszerű alkotóeleme a protokollnak. Egy hónappal növénynevelés után üvegházi kiültetésre került sor, a virágföldbe palántázott növényeket további 1 hónappal később az üvegház talajába ültettük, ahol csepegtető öntözéssel, rendszeres tápanyag-utánpótlással (Ferticare) és preventív növényvédelemmel gondoskodtunk a donor növények fejlődéséről

2.2. A virágbimbó fejlettsége és a portokok izolálása

A virágbimbókat fejlettségük, csésze és szíromleveleik 2:1 aránya, portokok színe (2/3-3/4 része antociános) és a mikrospóra fejlettségi állapota alapján lettek begyűjtve, ilyenkor a mikrospórák késői egymagvas és korai kétmagvas állapotúak, ami optimális mikrospóra tenyésztéshez. A bimbókat 20 percig NaOCl 2 %-os csapvizetes oldatában, 1 csepp Tween-20 detergens hozzáadásával lettek fertőtleníttve. Húsz perces kezelést követően háromszor steril vízzel öblítettük a bimbókat. A portokokat üveg Petri csészékbe (55 mm átmérőjű) izoláltuk (1 bimbó/Petri csésze), melyek 4ml 0,3M mannitol oldatot és 0,1-0,2% PPM (Plant Preservative Mixture) oldatot tartalmazott a fertőzések megelőzése végett. A portokokat 32°C-os termosztátban 1 hétig előkezeltük.

2.3. Mikrospóra izolálás és tenyésztés

A portokok egy hetes előkezelését követően a mikrospórák izolálását végeztük el. A mikrospóra izolálásnak több módszere is ismert, sűrűség gradiens centrifugálás módszerét alkalmaztuk kísérleteink során.

Az izolálás folyamata a következő lépésekből állt:

1. Az előkezelt portokokat egy steril szűrőn keresztül egy üvegpálcával 0,3M mannitol oldatban eldörzsöltük.
2. A így kapott szuszpenziót centrifugálásra alkalmas üvegcsövekbe szétosztottuk.
3. A centrifugálás szobahőmérsékleten (21°C) 600 fordulat/perc sebességgel történt.
4. A centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, majd az alján lévő üledéket 0,5ml 0,3M mannitol oldatban felszuszpendáltuk.
5. A szuszpenziót rétegeztük 30% -os maltóz tetejére.
6. A maltózra rétegzett szuszpenziót ismét centrifugáltuk 21°C-on 600 fordulat/perc sebességgel 10 percig.
7. A mannitol/maltóz gradiens centrifugálás módszere szerint az élő mikospórák egy fehér csíkban jelennek meg a két oldat határán.
8. Ebből a rétegből pipettáztuk ki a mikospórákat 4-6 ml 0,3 M mannitol oldatba.
9. Az így kapott szuszpenziót ismét centrifugáltuk 5 percig szobahőmérsékleten 600 fordulat/perc sebességgel.
10. A centrifugálás után ismét eltávolítottuk a felúszót, majd az alján összegyűlt immár élő mikospórákra indukciós tápoldatot szuszpendáltunk.
11. A mikospórák sűrűségét $3-3,5 \times 10^4$ értékre állítottuk be Bürker kamrával. Petri csészénként 1,5 ml mikospóra szuszpenziót tenyésztettünk közösen 7 db búza ováriummal. A Petri csészéket kb. 2 hónapig 28 °C-on sötétben tartottuk.

A dajkatenyésztés során felhasznált donor növény (tavaszi búza, genotípusa szerint „CY 45”) az üvegházban növekedett (16 órás fényellátás, nappal 18-20°C és éjszaka 12-15°C mellett).

2.4. Alaptápoldat hatásának tanulmányozása

Munkánk során két féle indukciós tápoldattal tenyésztettük a paprika mikospórákat, az alap B5 tápoldat (Gamborg és mtsai 1968) mellett a ½ B5 tápoldat hatását vizsgáltuk a

tenyészetekben fejlődött embrioidok száma alapján. A $\frac{1}{2}$ B5 tápoldat fele annyi koncentrációban tartalmazta a makro,- mikroelemeket és vitaminokat egyaránt. A 2. táblázat mutatja a tápoldatok összetételét.

2.5. Antibiotikum hatásának vizsgálata

A mikrospóra tenyésztés során fertőzés léphet fel az endogén kórokozók következtében, ezért több lépcsős rendszeren keresztül csökkentettük az endogén fertőzések kockázatát. Portokok előtenyésztése során ezért a 0,3M-os mannitol oldathoz PPM oldatot adtunk (lásd fenn).

Az izolált mikrospóra tenyészetekben teszteltük a 0,025%; 0,05% és 0,1% PPM, a 200 mg/l cefatoxime, illetve a 100 mg/l timentin és 20 mg/l rifampicin antibiotikum kombináció hatását a fejlődött embrioidok száma alapján.

.

2.6. Növényregenerálás és Gerlite hatásának vizsgálata a növényregenerációra

A gelrite-t, mint szilárdító ágenszt alkalmas szilárd táptalaj készítésére. A mikrospóra kultúra eredetű struktúrákat regeneráló táptalajra helyeztük, amelyek 3, 4, 5 illetve 6 g/l gelrite hozzáadásával készültek (3. táblázat). A struktúrákon 1-2 hét elteltével megvilágítás mellett hajtás és gyökérfejlődés indult meg, melyek felvételezésével ellenőriztük a gelrite hatását a növényregenerációra. A regenerált növényeket MS₀ táptalajt tartalmazó üvegcsövekbe helyeztük. A jól gyökeresedett növényeket üvegházba kiültettük, és polietilén zacskóval takartuk az akklimatizációs periódus alatt (kb. 1 hét).

2.7. Ploid fok vizsgálat

Ploid fok meghatározáshoz a felnevelt növények friss leveleit használtuk fel. A leveleket borotvapengével apró törmelékké daraboltuk fel LBO1 pufferban, és 40 µm átmérőjű nylon szűrőn keresztül leszűrtük. A kapott szuszpenziókat propidium jodiddal festettük. Az így kapott sejtszuszenziók ploidfok meghatározását PARTEC 1 flow cytométerrel végeztük a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban. Kontrollnak egy azonos korú paprika donor növény leveleit használtuk. A spontán diploid növényekről a fertilis bogyók

begyűjtésével közvetlenül DH vonal nyerhető, míg a haploid növények esetében a kolchicin kezelés elengedhetetlen. A növények kolchicin kezelése azonban már nem képezte részét a jelen dolgozatnak.

2.8. Statisztikai elemzés

A kísérleteket legalább három ismétlésben végeztük el. Az eredményeket a Microsoft Excell program segítségével értékeltük ki. A statisztikai számításokat, a tápoldatok és antibiotikumok összefüggéseit kéttényezős varianciánálízis segítségével, a regeneráció során a gelrite hatását az embriodokból fejlődő gyökér és hajtás számra egytényezős varianciánálízis segítségével végeztük el.

1. táblázat A csíráztató táptalaj

Összetevők	<i>MS₀ táptalaj (mg/L)</i>
Makroelemek	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ *2H ₂ O	440
MgSO ₄ *7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikroelemek	
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6
KI	0,83
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
Vasforrás	
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,85
Na-EDTA	37,3
Vitamin	
Glicin	2
Myoinozitol	100
Nikotinsav	0,5
Pyridoxin	0,5
Thiamin	0,1
Cukor	
Szacharóz	30 000
pH	5,8
Gerlite	2800

2.táblázat A felhasznált indukciós tápoldatok

Összetevők	B5 (mg/L)	½ B5 (mg/L)
Makroelemek		
KNO ₃	2500	1250
CaCl ₂ *H ₂ O	150	75
MgSO ₄ *7H ₂ O	250	125
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	67
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	150	75
Mikroelemek		
KI	0,75	0,375
H ₃ BO ₃	3	1,5
MnSO ₄ *H ₂ O	10	5
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2	1
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	0,125
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,0125
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,0125
Vasforrás		
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,87	27,87
Na-EDTA	37,3	37,3
Vitaminok		
miioinozitol	100	50
nikotinsav	1	0,5
pyridoxin	1	0,5
tiaminsav	10	5
Cukor		
maltóz	90000	90000
Hormon		
kinetin	0,1	0,1
2,4 D	0,1	0,1
pH	5,8	5,8

3.táblázat : Növényregeneráló tápközeg összetevői

Összetevők	B₅K₁S₂₀G (mg/L)
Makroelemek	
KNO ₃	2500
CaCl ₂ *H ₂ O	150
MgSO ₄ *7H ₂ O	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	150
Mikroelemek	
KI	0,75
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄ *H ₂ O	10
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
Vasforrás	
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,87
Na-EDTA	37,3
Vitaminok	
mioinozitol	100
nikotinsav	1
pyridoxin	1
tiaminsav	10
Cukor	
szacharóz	20000
Hormon	
kinetin	0,1
2,4 D	0,1
pH	5,8
Gelrtie	2800

3. Eredmények

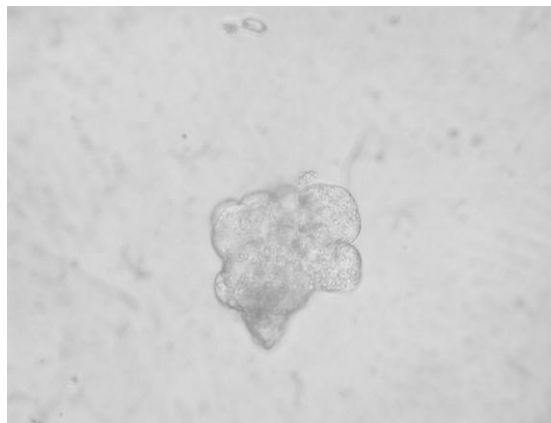
3.1. Izolált mikrospóra tenyésztés kritikus lépései

A sikeres androgenezis első kritikus pontjaként lehet megemlíteni a mikrospórák fejlettségi állapotát. A virágbimbók morfológiája alkalmas arra, hogy még az izolálás előtt megközelítőleg meghatározzuk a portokok és az azokban fejlődő mikrospórák fejlettségi állapotát. Ideális bimbónak lehet mondani azokat, melyeknek a csésze- és szíromlevelei 2 : 1 arányban látszanak. Az ezekből izolált portokok színe részlegesen már antociános/lila színű volt, a mikrospórák pedig kései egysejtmagvas illetve korai kétsejtmagvas állapotban voltak.

A portokok 1 hetes előkezelése során alkalmazott PPM széles spektrumú antibiotikum használata elengedhetetlen volt, hogy fertőzésmentes portok tenyészeteket kaphassunk. A 2 féle koncentrációban használt PPM oldat közül a 0,1%-os PPM koncentrációjú mannitol oldatban találtunk életképes mikrospórákat. A 0,2%-os PPM kiegészítésű mannitol oldatban a portokokból kiszóródott mikrospórákat többnyire elpusztult sejtekként figyelhattuk meg.

Az izolált mikrospóra tenyészeteket teszteltük többféle koncentrációjú (0,25%; 0,05% és 0,1% PPM) PPM oldat kiegészítéssel. Azt tapasztaltuk, hogy a PPM minden tesztelt koncentrációja letálisan hatott az izolált mikrospórákra.

A fentebb leírtak (Anyag és módszer) szerint a paprika mikrospórákat búza ováriummal közösen tenyésztettük, azonban vizsgáltunk olyan izolált mikrospóra tenyészeteket, ahol nem alkalmaztunk ováriumos dajkatenyésztést. Azt tapasztaltuk, hogy habár elindult sikeresen az androgenezis, azonban néhány sejtosztódás után leállt és e kezelésben nem számolhatunk be embrioidok fejlődéséről. Ahol azonban ováriumot alkalmaztunk, sikeresen tudtunk 10 nap után fejlődő mikrokolóniákat megfigyelni (1. ábra).



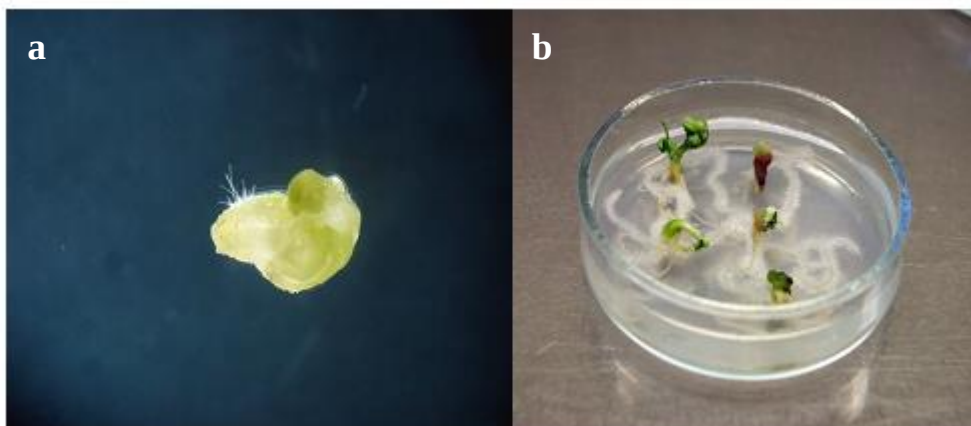
1. ábra: Mikrospóra eredetű mikrokolóniák.

A mikrospóra embriogenezis lépéseit nyomon követtük, a zigótikus embrió fejlődéséhez hasonló fejlődési állapotokat figyeltünk meg a mikrospóra eredetű embrioidok fejlődési stádiumai során (2. ábra). A búza ováriumos dajkatenyésztés kulcs fontosságú volt a további kísérletek során is.



2. ábra: Mikrospóra eredetű struktúrák: a) gömb stádiumra emlékeztető, b) kétpólusú mikrospóra eredetű struktúra, c) szív stádiumra emlékeztető és d) torpedó stádiumra emlékeztető struktúra.

5 héttel az indukció után regeneráló táptalajra embrioidokat tudtunk kihelyezni. A regeneráló táptalajra kihelyezett embrioidok 1 hét után jelentősen megnagyobbodtak, és gyökérfejlődés volt megfigyelhető többségükön (3.a ábra) .



3. ábra: Mikrospóra eredetű embrioid struktúra és belőle fejlődő abnormalis fejlődésű növény

A hajtásfejlődés gyakran abnormalitást (rozettás levél) mutatott (3.b ábra). A hajtás és gyökér fejlődés adatait alább kísérletenként részletezve olvasható.

3.2. Tápoldat és antibiotikum hatása a mikrospóra eredetű struktúrák mennyiségére

A kísérleteinkben a szakirodalmi adatok alapján kiválasztott 2 különböző összetételű tápoldat, egy antibiotikum és egy antibiotikum kombináció hatását vizsgáltuk az embrioidok

számának a függvényében. Ezen tápoldatok a B5 és ½B5 volt, amelyek cefotaxime illetve rifampicin/timentin antibiotikum kombináció kiegészítéssel készültek. A tápoldat és antibiotikum(ok) hatását kéttényezős variancia analízissel értékeltük.

Az eredmények statisztikai elemzése során az antibiotikum szignifikáns hatását kimutattuk, amíg a két tesztelt tápoldat között nem találtunk nagymértékű különbséget (4. táblázat). A kísérletekben antibiotikum × tápoldat interakciót figyeltünk meg

4. táblázat: Az antibiotikum és a tápoldat hatásának elemzése kéttényezős variancia analízissel az embrioidok száma alapján.

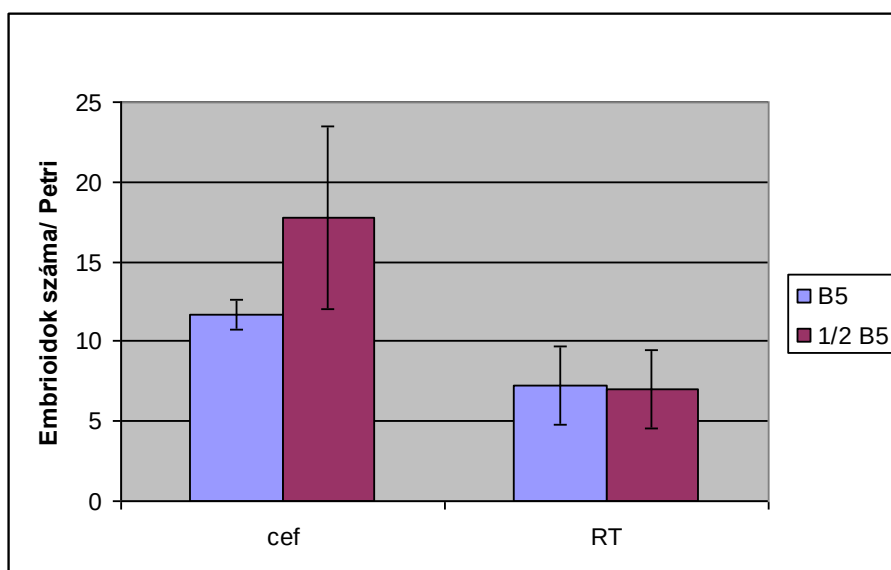
	SS	df	MS	F
antibiotikum	230,0278	1	230,0278	20,27173***
tápoldat	34,02778	1	34,02778	2,998776ns
Kölcsönhatás	40,11111	1	40,11111	3,534884*
Hiba	136,1667	12	11,34722	

***, szignifikáns különbség P=0,1% szinten

*, szignifikáns különbség P=10%szinten

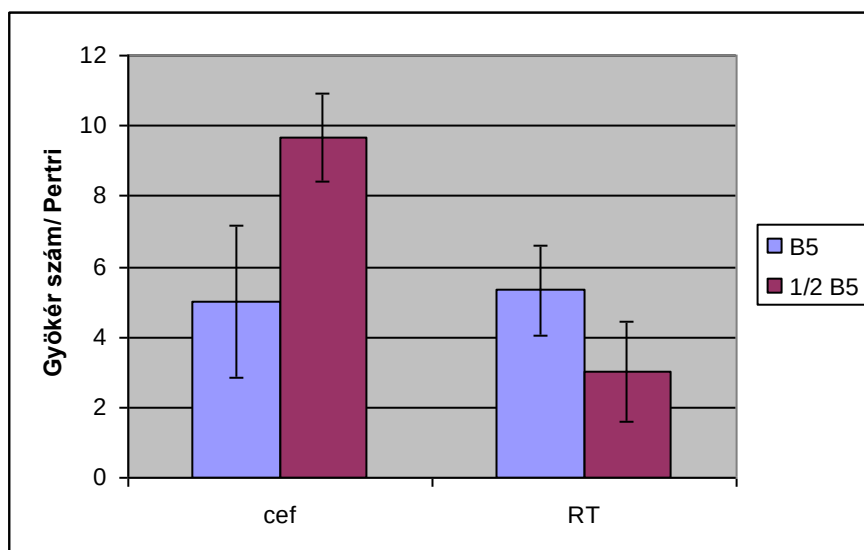
ns, nincs szignifikáns különbség

A 4. ábra alapján elmondható, hogy a ½ B5 tápoldatban jelentősen több embrioid fejlődött, mint a B5 tápoldatban cefotaxime antibiotikum jelenlétében. Ez a nagy különbség már nem volt kimutatható rifampicin és timentin antibiotikumok alkalmazásakor. Az antibiotikumok hatását tanulmányozva azt látjuk, hogy a cefotaxime antibiotikum alkalmazása mellett magasabb volt az embrioidok száma, ami a rifampicin/timentin antibiotikum kombináció mikroszpóra embriogenezis gátló hatására utal.



4. ábra: B5 és ½ B5 cefotaxime (200mg/l) és timentin (100mg/l)/rifampicin (20mg/l) antibiotikum keverékkel kiegészített indukciós tápoldatok hatásai az embrioidok számára .

Az indukciós tápoldatokban fejlődött embrioidokat regeneráló táptalajokra lettek kirakva. Ott fejlődésnek indultak. Összeszámoltuk azon embrioidokat, amelyeken gyökérfejlődés volt megfigyelhető, és összefüggést kerestünk az indukciós táptalajon növekedett embrioidok és a gyökérfejlődésre kifejtett hatásuk között.



5. ábra: A gyökérképződés a B5 és ½ B5 cefotaxime (200mg/l) és timentin (100mg/l)/rifampicin (20mg/l) antibiotikum keverékkel kiegészített indukciós tápoldatokon.

A 5. ábra alapján elmondható, hogy a cefotaxime antibiotikum kiegészített ½ B5 indukciós tápoldaton fejlődött majd a regeneráló táptalajra kihelyezett embrioidoknál sokkal több gyökérképződést figyelhattunk meg. A B5 tápoldatban növekedett embrioidok nem

mutattak olyan jelentős különbséget a különböző antibiotikummal kiegészített tápoldatok között.

3.3. Gelrite hatásának vizsgálata a paprika mikrospóra eredetű struktúrák regenerálása során

A növényregenerálás során gelrite szilárdító anyagot különböző koncentrációban alkalmaztunk, és tanulmányoztuk a táptalajra kirakott embrioidok regenerálását. Vizsgáltuk a gyökér és hajtás fejlődésére gyakorolt hatását.

3.3.1. Gyökeresedésre gyakorolt hatása

Az embrioidok gyökeresedési erélyét vizsgáltuk először (5. táblázat). A statisztikai elemzés alapján nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a kezelések között.

5. táblázat: A gelrite gyökér fejlődésére kifejtett hatásának elemzése egytényezős variancia analízissel.

	SS	df	MS	F
kezelés	0,312139	3	0,104046	0,632612ns
hiba	7,894603	48	0,164471	

ns, nincs szignifikáns különbség

Az eredményeket részleteiben vizsgálva láthatjuk, hogy a 3%-ban alkalmazott gelrite-tel kiegészített táptalajon kevesebb gyökér fejlődött. A 4-6%-ban alkalmazott gelrite szignifikáns különbséget nem okozott ugyan a megjelenő gyökeresedett embrioidok számában, azonban nagyobb arányban voltak gyökeresedett embrioidok megfigyelhetők (6. táblázat).

6. táblázat: A mikrospóra eredetű struktúrák gyökeresedési aránya különböző gelrite koncentráció függvényében.

	3%	4%	5%	6%
gyökeresedési erély (gyökeresedett embrioid/ embrioid szám)	0,37234	0,648649	0,695652	0,542857

3.3.2. Hajtás fejlődésére gyakorolt hatása

Vizsgáltuk a gyökeresedés mellett a hajtás képződését majd fejlődését is. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a különböző koncentrációban alkalmazott gelrite hasonlóan alacsony hajtás számot mutatott (7. táblázat). A varianciaanalízis során sem mutatott szignifikáns különbséget a képződő hajtások mennyisége a táptalajok között (8. táblázat).

7. táblázat: A mikrspóra eredetű struktúrák hajtás fejlődési aránya különböző gelrite koncentráció függvényében.

	3%	4%	5%	6%
hajtás fejlődés (fejlődött hajtás/ embrioid szám)	0,0297	0,0244	0	0,0256

8. táblázat: A gelrite hajtás fejlődésére kifejtett hatásának elemzése egytényezős variancia analízissel.

	SS	df	MS	F
kezelés	0,044686	3	0,014895	0,783567ns
hiba	1,292653	68	0,01901	

ns, nincs szignifikáns különbség

3.4. Mikrspóra eredetű növények ploidfokának vizsgálata flow cytometriás méréssel

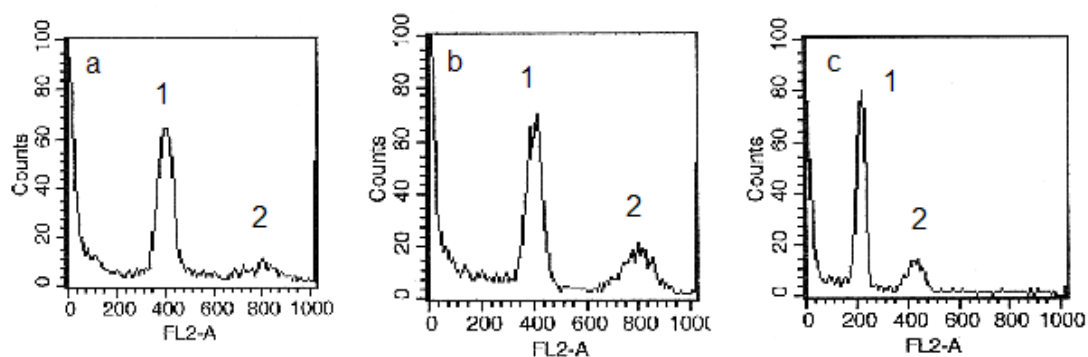
A sikeresen regenerált növényeket a regeneráló táptalajról kiültetésre kerültek az üvegházba. Korábbi kísérletekből származó mikrspóra eredetű növények ploid fokát határoztuk meg flow cytometriás méréssel (6. ábra). 27 vizsgálati növényen végeztük el a flow cytometriás vizsgálatot, négy haploid és 23 spontán DH növényt azonosítottunk.



6. ábra: Ploid fok meghatározásában felhasznált mikrospóra eredetű növények.

A spontán diploid növények a szegedi fűszerpaprika hibrid nemesítési programba integrálódnak a következő évtől, míg a haploid növények kolchicin kezelése szükséges a kromoszóma készlet megduplázásához.

A cytometriás vizsgálat eredményét az alábbi ábra (7. ábra) mutatja.



7. ábra: Flow cytometriás vizsgálat a mikrospóra eredetű kontroll (a), haploid (b) és spontán diploid (c) növényeknek.



8. ábra: Fertilis spontán DH (a) és haploid (b) mikrospóra eredetű fűszerpaprika növény

Természetesen a flow cytometria (precíz mérés) mellett fenotípusosan is meg lehet állapítani a haploid és DH növények ploid fokát, ez azonban pontatlan módszer (8. ábra). Látható az ábrán, hogy a fertilis spontán DH növény nagyobb levelekkel és internódiumokkal rendelkezik, mint a haploid növény. Továbbá bogyótermése nagyobb és a bogyók felnyitása után csíráképes szemekkel rendelkezik.

4. Eredmények kiértékelése, konklúzió

4.1. Indukciót befolyásoló tényezők

A sikeres androgenezis indukciója mikrospóra tenyészetek kezdeti szakaszában dől el. Az indukció fontos részét képezi, hogy a megfelelő genotípusú donor növényt válasszuk ki, és a portokok előkezelésük során nagy arányban biztosítsanak élő mikrospórákat a tenyésztéshez. Az előkezelés során fontos lépésnek kell tekinteni a tenyészetek fertőzés mentességét (Supena és mtsai 2006b). Munkánk során 2 féle PPM koncentrációjú antibiotikum (0,1-0,2%) hatását vizsgáltuk, elsősorban a fertőzés elkerülése végett. A mannitol oldathoz 0,1% koncentrációban hozzáadott PPM mutatott életképes mikrospórákat. A nagyobb koncentrációban alkalmazott PPM (0,2%) már káros hatású volt az előtenyésztés során. Ezért fontos, kritikus lépése az antibiotikumok megfelelő koncentrációjának a beállítása már az előtenyésztéskor, nem elég csak a fertőzés ellen védekezni, de különös tekintettel kell lenni az antibiotikumok fitotoxikus hatására is.

A portokból sűrűség gradiens centrifugálási eljárással nagyszámú élő mikrospórát lehet izolálni (Lantos 2009). A dajkatenyésztés jótékony hatását már korábban megfigyelték (Mejza 1993). Búzában az ováriumos dajkatenyésztés növeli a keletkező embrioidok számát és életképességét, androgenezis indukciójának hatékonyságát (Hu és Kasha 1997), később a mikrospóra eredetű struktúrákból sikeresen lehet növényt regenerálni. Természetesen vannak olyan növényfajok, ahol nem szükséges dajkatenyésztést alkalmazni (pl.: repce, árpa), más fajoknál azonban hatékony eljárás (pl.: búza, durum búza és tritikálé). Dajkatenyésztés során lehetséges azonos fajú és idegen fajú ováriumot felhasználni. Paprika esetében az idegen fajú ovárium, leginkább búza ovárium, használata már korábbi tanulmányokból kiderült, javította az androgenezis hatékonyságát (Lantos és mtsai 2009). Kísérleteink során állítottunk elő olyan mikrospóra tenyészeteket, ahol nem alkalmaztunk idegen fajú ováriumot. Az inkubációs idő alatt az androgenezis néhány sejtosztódás után leállt, azonban azokban a tenyészetekben, ahol használtunk, ott sikeresen folytatódott az androgenezis, és néhány hét múlva embrioidokat lehetett regeneráló táptalajra kirakni. Korábbi szakirodalmi adatokkal egyetértésben a dajkatenyésztés fontos kulcs lépésnek számított a paprika *in vitro* mikrospóra tenyésztése során.

4.2. Indukciós tápoldat hatása az androgenezis hatékonyságára

Az izolált mikrospórákat 2 féle (B5 és $\frac{1}{2}$ B5) indukciós tápoldatban tenyésztettük. A tápoldatokban különböző antibiotikumokat (PPM, cefotaxime, rifampicin/timentin kombinációja) alkalmaztunk. A Supena (2004) által portoktenyészeteknél alkalmazott PPM hatását teszteltük a kísérleteink során, mert ezen keverék használata eredményezett sikeres embriogenezist úsztatott- portok tenyészetben. Azonban a mi kísérletünkben izolált mikrospóra tenyészeteknél letalitáshoz vezetett a PPM keverék. A másik két antibiotikum kiegészítés használatakor már sikeresen tudtunk embrioidokat előállítani. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk a két felhasznált antibiotikum hatásában. Sokkal több embrioid számot kaptunk a cefotaxime kiegészítéssel készült tápoldatokban, mint a kombinált kezelésben, amit szintén portoktenyészetben alkalmaztak sikeresen (Supena és mtsai. 2006). Az alacsonyabb embrioid szám valószínűleg a kettős antibiotikum androgenezis/embriogenezis gátló hatásában keresendő.

Korábban sikeresen alkalmazott B5 indukciós tápoldatot (Lantos és mtsai 2012) választottunk mi is a vizsgálatainkhoz. Összehasonlítást végeztünk a fele annyi makro-, mikroelemet és vitamint tartalmazó indukciós tápoldattal ($\frac{1}{2}$ B5). A tápoldatok közötti összefüggéseket megvizsgálva nem mutattunk ki hatásukban szignifikáns különbséget, azonban nagyobb embrioid produkciót sikerült elérni a $\frac{1}{2}$ B5 cefotaxime antibiotikummal kiegészített tápoldatban. További összefüggést kerestünk a regeneráló tápoldat és gyökeresedésre hajlamos embrioidok között és azt tapasztaltuk, hogy a $\frac{1}{2}$ B5 cefotaxime antibiotikummal kiegészített tápoldatban indukálódott embrioidok nagyobb arányban mutattak gyökérfejlődést. Növényregenerálási folyamat során a B5 és a $\frac{1}{2}$ B5 indukciós tápoldat közül a $\frac{1}{2}$ B5 tápoldat bizonyult jobbnak. A korábbi eredményekkel összehasonlítva, azt a következtetést tudjuk levonni, hogy az indukciós közeg megválasztása további kísérleteket igényel.

4.3. Növényregeneráció és az eredmények gyakorlati alkalmazása

A regenerációhoz felhasznált gelrite befolyásolja a fejlődő növényi szövetek, szervek vízháztartását és így a növényregenerációt is, ezért teszteltük mi is a növényregeneráció során a hatását (Gugsa és Kumlehn 2011). Négy féle gelrite koncentráció hatását vizsgáltuk, és megfigyeltük az embrioidok regenerálódási hatékonyságát. A magasabb gelrite koncentráció

elősegítette ugyan a növény szervfejlődést (főleg gyökérfejlődését), azonban eredmények azt mutatják, hogy egy kisebb koncentrációban alkalmazott gelrite azonos hatást fejtett ki a regenerálódó növényekre, mint egy nagyobb gelrite koncentrációban alkalmazott táptalaj. Mind a gyökérfejlődésre és mind hajtásfejlődésre nem adott szignifikánsan nagyobb hatékonyságot. Tehát az eredmények alapján elmondható, hogy a növények növekedéséhez nem szükséges nagyobb gelrite koncentrációjú táptalajon regeneráltatni.

Korábbi kísérletekből regenerált paprika növények ploid fokát flow cytometriás vizsgálattal állapítottuk meg. A 27 vizsgált növény közül 4 bizonyult az eredmények alapján haploidnak, melyet kolhicin kezelés révén majd diploid növényekké alakítanak. Ez a munkafolyamat azonban már nem tartozik a dolgozatom keretébe. A további 23 fertilis spontán diploid növényeket azonban azonosítottuk, melyek a Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő Nonprofit Közhasznú Kft., Szegedi Osztályán kerülnek felhasználásra a hibrid nemesítési programjukban.

Összefoglalás

Az *in vitro* androgenezis folyamatán alapuló izolált mikrospóra (éretlen pollen) tenyésztés módszerével DH vagy kettőzött haploid növényeket lehet létrehozni. Ezen eljárást a növénynemesítők előszeretettel alkalmazzák, hogy a nemesítés folyamatának szelekciós idejét 6-8 generációról 1 regenerációra csökkentsék. Ezen alapuló haploid technikát alkalmaztuk a 'Szegedi 80' genotípusú fűszerpaprika esetében is. A sikerét több tényező is befolyásolja, úgymint a genotípus, donor növények felnevelése, mikrospórák fejlettségi állapota, stressz kezelése, indukciós tápoldat és a regenerációs táptalaj összetétele. A tenyésztés során alkalmazott búza ováriumos dajkatenyésztés létfontosságú volt, hogy a mikrospórákból androgenezis indukció révén embrioidokká fejlődjenek.

PPM, olyan széles spektrumú antibiotikum, amely szükséges a steril portoktenyészetek létrejöttéhez, azonban nagy koncentrációban (0,2%) való alkalmazása már fitotoxikus hatást fejtett ki az előtenyésztés során. Izolált mikrospóra tenyészetekben is alkalmaztuk, de már csökkentett százalékban (0,25 %) hozzáadott PPM is letális hatást váltott ki.

Mikrospóra tenyészetekben összehasonlítottuk a B5 és $\frac{1}{2}$ B5 indukciós tápoldatokat. Szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a tápoldatok között. Azonban különböző antibiotikum (cefotaxime és rifampicin/timentin kombináció) kezelések közül hatékonyabb antibiotikumnak bizonyult a cefotaxime. Antibiotikum és tápoldat összefüggésben is szignifikáns különbséget sikerült kimutatni, több embrioid keletkezett $\frac{1}{2}$ B5 cefotaxime kiegészítésű indukciós tápoldatban. A regeneráló táptalajon növekedett, a cefotaxime kiegészítéssel készült $\frac{1}{2}$ B5 tápoldatból származó embrioidok regenerálták a legtöbb gyökeret.

Regeneráció során a táptalajhoz hozzáadott gelrite felhasználása elősegítette a növényi szervek megjelenését. Azonban különböző koncentrációban (3-6%) alkalmazott gelrite nem mutatott szignifikánsan nagyobb rátát a szervfejlődésre.

Ploidfok vizsgálatot végeztünk mikrospóra eredetű növényekből. A vizsgálat során azonosított haploid növényeket kolchicin kezelése már nem képezte a dolgozat részét. A fertilis spontán DH növények a Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő Nonprofit Közhasznú Kft., Szegedi Osztályán kerülnek felhasználásra a hibrid nemesítési programjukban.

Irodalomjegyzék

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

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

Datta S.K. Datta K. és Potrykus I (1990) Embriogenesis and plant regeneration from microspores of both „Indica” and „Japonica” Rice (*Oryza sativa*) Plant Sci. 67: 83-88

Davies P. A. és 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

Dolcet-Sanjuan R., Claveria E. és 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

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

Dumas de Vaulx R., Chambonnet D. és 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.

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

Ferrie, A. M. R, és Caswell, K. L (2010): Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss Organ Cult 104:301-309

Gamborg OL, Miller RA, és Ojima K. (1968): Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158

Gémesné JA, Vági P, Kristóf Z, Lantos C és Pauk J (2009): In Vitro Anther and Isolated Microspore Culture as Tools in Sweet and Spice Pepper Breeding. *Acta Horticulturae* 829: 61-64

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

Gugsa L. és Kümhlehner J. (2011): Somatic embryogenesis and massive shoot regeneration from immature embryo explants of tef. *Biotechnology Research International*. DOI: 10.4061/2011/309731

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

Guri A. Z. és Patel K.N. (1998): Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. United States Patent 5,750,402

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

Irinkova T, Grozeva S, és Rodeva V (2011): Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Physiol Plant* 33:1559-1570

Jahne A, és Lörz H (1995): Cereal microspore culture. *Plant Sci.* 109:1-12

Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI, és Lee KM (2008): Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 27:425-434

Kim M, Park EJ, An D, és Lee Y (2012): High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult DOI 10.1007/s11240-012-0222-x

Kim M., Kim J., Yoon M., Choi D. I. és 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

Kuo J. S., Wang Z. Z., Chien N. F., Ku S. J., Kung M. L. és 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

Lantos C, Gémes Juhász A, Somogyi Gy, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, és Pauk J (2009): Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper and wheat. Plant Cell Tissue Org Cult 97(3):285-293

Lantos C, Gémes Juhász A, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, és Pauk J (2012): Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Biotechnology reports 6: 123-132 DOI:10.1007/s11816-011-0205-0

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

Lichter R (1982): Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z Pflanzenphysiol 105:427-434

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

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

Niizeki, H és Oono K. (1968): Induction of haploid rice plant from anther culture. Japan Acad 44:554-557

Pauk J, Poulimatka M, Lökös Tóth K és Monostori T (2000): *In vitro* androgenesis of triticales in isolated microspore culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 61:221-29

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

Supena E D J (2004): Innovations in microspore embryogenesis in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) and *Brassica napus* L. PhD dissertation

Supena EDJ, Muswita W, Suharsono S, és Custers JBM (2006b) Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) in local conditions of Indonesia . Sci Hortic 107: 226-232

Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, és Custers JBM (2006a) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 25:1-10

Touraev A., Ilham A., Vicente O. és Heberle-Bors E. (1996): Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. Plant Cell Reports 15 (8): 561-56

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

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Lantos Csabának, a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. tudományos munkatársának, aki szakmai tudásával és tanácsaival segítette e dolgozat elkészítését.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Pécsváradi Attila, egyetemi docens úrnak, hogy figyelemmel kísérte munkámat az egyetem felől.

Köszönettel tartozom Dr. Pauk Jánosnak, a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. kutatási igazgatóhelyettesének, hogy lehetőséget biztosított számomra a dolgozat elkészítéséhez, és tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Somogyi Györgynek és Bráj Róbertnek - Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő Nonprofit Közhasznú Kft., Szegedi Osztály - a kísérletekhez felhasznált növényanyag biztosítását.

Továbbá köszönettel tartozom a labor munkatársainak, hogy szakmai és gyakorlati tanácsaikkal segítették labormunkámat.

Nyilatkozat

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez:

Alulírott Deli Márta a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- donor növény magok csíráztatását
- portokok izolálását
- mikrospórák izolálását
- növényregenerálást
- ploid fok meghatározásához mintavétel készítését
- statisztikai elemzést

végeztem el.

Deli Márta

2012. november 5.