

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
MEZŐGAZDASÁGI KAR
NÖVÉNYTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETVÉDELMI INTÉZET

***IN VITRO* HAPLOID NÖVÉNY ELŐÁLLÍTÁSI MÓDSZEREK
HATÉKONYSÁGÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA TRITIKÁLÉBAN
(X *TRITICOSECALE* WITTMACK)**

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Készítette:

BORDÉ ÁDÁM

3. évf. nappali tagozatos hallgató

Belső konzulens:

DR. MONOSTORI TAMÁS

főiskolai tanár

Külső konzulens:

DR. LANTOS CSABA

tudományos munkatárs

Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

HÓDMEZŐVÁSÁRHELY

2012

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 A tritikále jelentősége	6
2.2. Az androgenézis indukciójának elmélete.....	7
2.3. A DH növények felhasználása és jelentőségük a növénynemesítésben és kutatásban	8
2.4. A haploidia történetének gyökerei	9
2.5. A tritikále androgenézis történetének áttekintése	9
2.6. A portoktenyésztést és az izolált mikrospóra tenyésztést egyaránt befolyásoló tényezők	10
2.6.1. A genotípus hatása	10
2.6.2. A donor növények és a mikrospórák fejlettségi állapota	11
2.6.3. Stresszek szerepe az androgenézis indukciójában	11
2.6.4. A tenyésztő közeg hatása az androgenézisre	11
2.7. Az izolált mikrospóra tenyésztést befolyásoló tényezők	12
2.7.1. A mikrospórák izolálási módszerei.....	12
2.7.2. A sűrűség hatása a mikrospórák tenyésztésére	13
2.7.3. A dajkatenyésztés szerepe tritikále izolált mikrospóra tenyésztésben	13
2.8. Növényregenerálás portok- és mikrospóra tenyésztés eredetű struktúrákból	13
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	15
3.1. Növényanyag	15
3.2. A donor növények felnevelése	15
3.3. A donor kalászok begyűjtése és sterilizálása	15
3.4. A portok izolálása	15
3.5. A portoktenyésztés folyamata és körülményei	16
3.6. A mikrospóra izolálása	16
3.7. Az izolált mikrospóra tenyésztés folyamata és körülményei.....	18
3.8. Növényregenerálás és az üvegházi akklimatizáció	18
3.9. Statisztikai elemzések	19
4. EREDMÉNYEK	20
4.1. Tritikále portoktenyésztés	20
4.2. Tritikále izolált mikrospóra tenyésztés	22
4.3. A portoktenyésztés és az izolált mikrospóra tenyésztés hatékonyságának összehasonlítása	26
4.4. Regenerált növények felnevelése a nemesítés számára	29
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	31
5.1. Tritikále portoktenyésztés	31
5.2. Tritikále izolált mikrospóra tenyésztés	32
5.3. A két növény előállítási módszer hatékonyságának összehasonlítása	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	36
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	41

Alkalmazott rövidítések jegyzéke

2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)	2,4-Diklórfenoxi-ecetsav
ABA (Absciscic acid)	Abszcizinsav
DH (Doubled Haploid)	kettőzött haploid
NAA (1-Naphtylacetic-acid)	Naftil-ecetsav
QTL (Quantitative Trait Locus)	menyiségi tulajdonság lókusza

1. BEVEZETÉS

A tudomány és a technika rohamos fejlődésének köszönhetően a XX. században robbanásszerűen nőtt meg bolygónk népessége és napjainkra több mint 7 milliárd ember él a Földön. A népesség növekedésével ellentétesen, a globális felmelegedésnek köszönhetően, a Föld művelhető mezőgazdasági területei viszont folyamatosan csökkennek, illetve a mezőgazdasági termelés a gyengébb minőségű talajokra szorul vissza. Az emberek számára a szükséges gabonát és az állatállomány takarmánybázisát egyre nehezebb feladat biztosítani. A hagyományos növényfajták olykor azonban kevésbé bizonyulnak alkalmasnak a megváltozott éghajlati körülményekhez való alkalmazkodásban, és ez nem csak a termés minőségében, hanem a termés mennyiségének csökkenésében is megmutatkozik.

A növénynemesítő szakemberek egyik legfontosabb feladata tehát a lehető legrövidebb idő alatt olyan új növényfajtákat előállítani, amelyek rugalmasan tudnak alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. A legújabb növénynemesítési, biotechnikai és biotechnológiai módszerek segítségével nem csak a termés mennyiségét és minőségét tudjuk növelni, hanem viszonylag rövid idő alatt tudunk létrehozni különböző biotikus vagy abiotikus rezisztenciával rendelkező növényfajtákat is.

Manapság, tehát egyre nagyobb kihívással kell szembenéznük a növénynemesítőknek és növénynemesítő cégeknek, ugyanis a mezőgazdaság igényeit kielégítő új növényfajtákat létrehozni, a piacon fennmaradni és a növénytermesztők bizalmát megtartani csak naprakész szakmai tudással és a legújabb növénynemesítési eljárások alkalmazásával lehetséges.

Egy új fajta előállítása klasszikus növénynemesítési eljárásokkal rendkívül sok időt és pénzt igényel. A növénynemesítők legfontosabb feladata tehát olyan új módszereket és eljárásokat kidolgozni, amelyek jelentősen lerövidítik egy új fajta előállításának idejét.

A nemesítők és kutatók munkája eredményeként jönnek létre a doubled haploid (DH) növények. Azokat a növényeket nevezzük DH növényeknek, amelyek egy haploid (n) genomból származnak, és kromoszóma készletük spontán vagy valamilyen indukált hatásra megduplázódott. A DH növények előnye, hogy egy generáció alatt homozigóta állományt tudunk létrehozni. Ennek a módszernek a segítségével jelentősen lerövidíthetjük egy fajta létrehozásának idejét. A DH növényekből előállított vonalak fontos sajátossága tehát a kiegyenlítettség, amely hazánkban és az egész világon is a fajtákkal és hibridekkel szemben támasztott egyik legfontosabb alapkövetelmény.

Az izolált mikrospóra tenyésztés és a portoktenyésztés az *in vitro* androgenezis (hím gamétából, éretlen pollenből indukált egyedfejlődés) indukciójára alkalmas eljárások. A két módszer eredményességét és technikai oldalát tekintve is jelentős különbségeket figyelhetünk meg. Ezen biotechnológiai eljárások alkalmazása során a szakemberek speciális szakmai tudást, infrastruktúrát és pénzügyi háttérrel igénylő munkát végeznek. Fontos tehát tisztában lennünk azzal, hogy melyik módszerrel milyen hatékonysággal tudunk előállítani doubled haploid növényeket.

Munkám során bekapcsolódhattam a szegedi Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Osztályán folyó kutatásba, ahol portok- és izolált mikrospóra eredetű tritikále (X *Triticosecale* Wittmack) növényeket állítottunk elő.

Dolgozatom **célkitűzései** a következők voltak:

1. *In vitro* androgenezis indukciója tritikále portoktenyészetekben.
2. *In vitro* androgenezis indukciója tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben.
3. Az izolált mikrospóra- és portoktenyésztés hatékonyságának összehasonlítása a fejlődött embrioidok, a regenerált növények, a regenerált zöld növények és az albínó növények száma alapján.
4. Akklimatizált izolált mikrospóra- és portoktenyészet eredetű tritikále DH növények előállítása a növénynevelés számára.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A tritikále jelentősége

A tritikále egy olyan fajhibrid, mely a búza és a rozs keresztezéséből jött létre. Latin neve is innen ered: *X Triticosecale* Wittmack (Kristó 2004). A tritikále létrehozásának az volt a célja, hogy a búza minőségi tulajdonságait és a rozs ellenállóképességét, szárazságtűrését egy fajban egyesítsék. A tritikálét Rimpau, német származású növénynemesítő állította elő először a 19. század végén, ez volt a primer tritikále. Növénytermesztési jelentősége azonban csak évtizedekkel később kezdett el növekedni. Az első tritikále törzsek állóképessége gyenge, termőképességük kicsi, szemtermései kicsinyek és zsugorodottak, száruk pedig magas és gyenge volt. Ezeket a növényeket az anyarozs (*Claviceps purpurea*) könnyen megfertőzte, termésátlaguk rendszerint alacsony volt. Az állatokban jobban értékesülő, magasabb fehérjetartalmú takarmány sem ellensúlyozta a kisebb termést. A növénynemesítők munkájának köszönhetően ma már megtalálhatók a termesztésben a jó termőképességű, betegségekkel szemben rezisztens, jó beltartalommal rendelkező tritikále fajták.

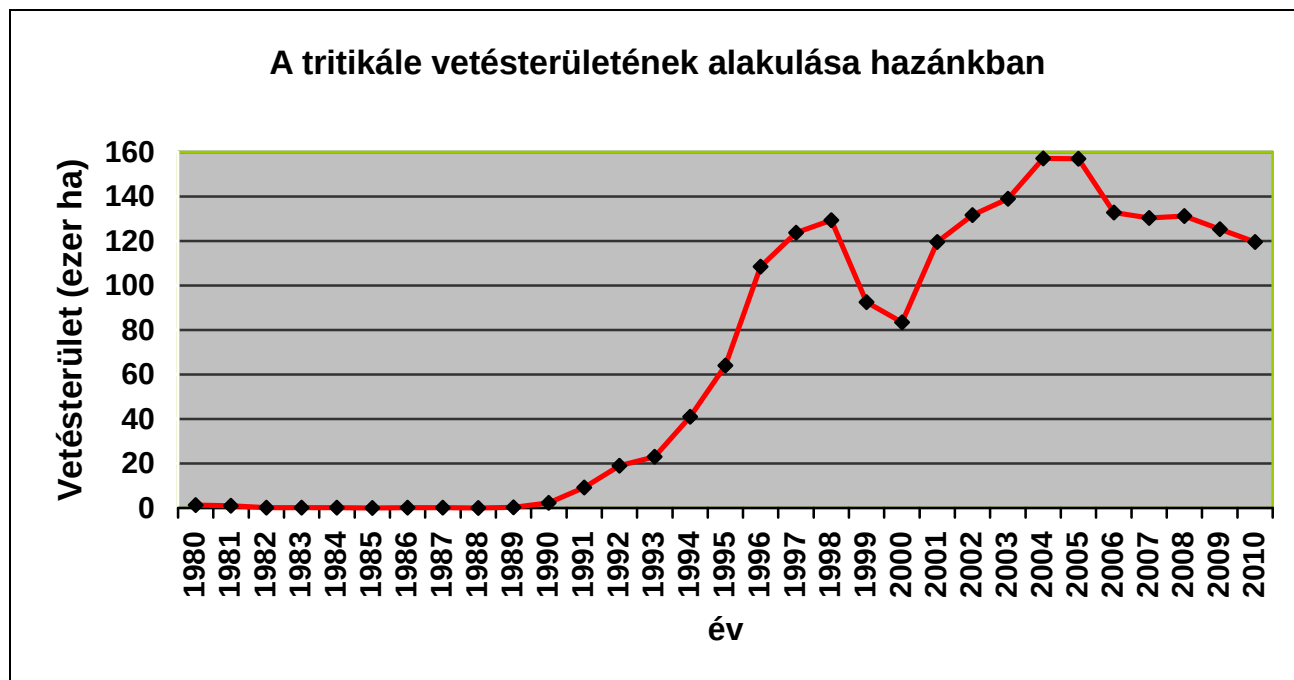
A tritikále sok kíváncsú agronómiai tulajdonsággal rendelkezik, jól hasznosítható és a humán táplálkozásba is kiválóan beilleszthető (Baier és Gustafson 1996). „Hungaricum”-nak vallhatjuk a tritikálét (*X Triticosecale* Wittm.), mert a magyar Kiss Árpád (1916-2001) munkásságának köszönhető alapvetően, hogy ez a gabonafaj ma felívelő pályát fut be a világ növénytermesztésében, nevéhez köthetjük az első gyakorlati jelentőséggel bíró tritikále fajták előállítását a világon. A tritikálét leginkább takarmánynövényként termesztik, de búzával keverve kenyérgabonaként is használják. A tritikále termesztetőségi és felhasználói szempontból is különleges, sok szempontból előnyös tulajdonságokkal rendelkező növényfaj, ezért a jövőben jelentőségének növekedésére számíthatunk. Szemtermése humán táplálkozásra és állati takarmányozásra egyaránt jól hasznosítható és a zöld növényből is értékes szálas takarmány, szilázs készülhet. Agronómiai szempontból nagy előny, gazdaságossági és környezetvédelmi szempontból is fontos, hogy extenzív viszonyok között is termelhető. Szemtermésének beltartalmi értéke (diétás rosttartalom, magas esszenciális aminosav-, Ca-, Mg-, Zn-, Cu- és Se-szint) arra utal, hogy a korszerű humán táplálkozás-kultúra egyre nagyobb mértékben fogja igényelni a klasszikus és minőségi búzakenyér mellett, mint rostokban gazdag, barna, rusztikus kenyér forrását (Bóna 2004).

A tritikále akár alkalmas lehet a búza és a rozs helyettesítésére is, kiváló alapanyagként szolgálhat különböző sütőipari termékek, reggeliző pelyhek és müzlik készítéséhez (Salmon és mtsai 2002, Bóna és mtsai 2002).

Míg a tritikále vetésterülete Magyarországon 1980-ban csak 1242 ha volt, addig a 2001-es évtől kezdve vetésterülete folyamatosan 100 ezer ha felett mozog (www.fao.org) (1.ábra). Termesztésének hazánkban a '80-as években lett jelentősége. A tritikále termesztését kezdetben a

gyengébb minőségű talajokon javasolták, később azonban kiderült, hogy a kedvezőbb talajadottságú területeken is megéri termesztani.

1. ábra. Az őszi és tavaszi tritikále összes vetésterületének alakulása hazánkban.



A gyakorlat számára újabb és újabb fajtákat kell előállítani klasszikus növénynemesítési módszerekkel, melyhez segítséget nyújthatnak a különböző biotechnológiai eljárások. Ide tartoznak például az androgenezis indukcióját felhasználó DH növény előállítási alkalmazások.

2.2. Az androgenezis indukciójának elmélete

Az androgenezis a haploid apomixis egyik fajtája, amely során egy redukált (n) pollenszemből, megtermékenyítés nélkül közvetlenül haploid (n) növények jönnek létre. Az *in vitro* androgenezist mikrospóra- és portoktenyészetekben indukálhatjuk. A tenyészetekben haploid embriók vagy kalluszok fejlődnek, amelyekből haploid növényeket regenerálhatunk. Az *in vitro* androgenezis indukciójára akkor nyílik lehetőségünk, amikor a fejlődő mikrospórákban még nincs meghatározva továbbfejlődésük iránya. Ekkor még egy indeterminált fejlődési szakaszon beszélhetünk. Ez a fejlődési szakasz az egymagvas vakuólumos pollenfejlődési fázis és az első pollenmitózis közötti és körüli időszakra tehető. Fontos tehát, hogy a donor növényekből a portokokat és a mikrospórákat a megfelelő fejlődési fázisban izoláljuk. Az androgenezis indukcióját követően a pollenszemekből soksejtes pollenek alakulnak ki, amelyekből haploid embriók vagy kalluszok fejlődhetnek. A haploid embriókból és kalluszokból pedig lehetőségünk nyílik haploid növények regenerálására (Heszky 2005).

2.3. A DH növények felhasználása és jelentőségük a növénynemesítésben és kutatásban

Növénynemesítési és kutatási szempontból is nagyon fontos szerepet játszik az idő. A DH módszerek alkalmazásával lehetőségünk nyílik egy generáció alatt homozigóta vonalakat előállítani, így egy új fajta nemesítésének az ideje akár a felére csökkenthető (Tuvešson és mtsai 2007).

Tritikále esetében három módszer ismert, amely perspektivikus a DH növény előállítás szempontjából: (1.) az idegen pollennel történő megtermékenyítés, (2.) a portoktenyésztés és (3.) az izolált mikrospóra tenyésztés.

Az idegen pollennel történő megtermékenyítést árpa (*Hordeum bulbosum*), de főleg kukorica (*Zea mays*) pollennel történő megporzással eredményesen alkalmazzák a tritikále haploid növény-előállításban (Pratap és mtsai 2006). A módszer lényege, hogy a megporzást követően a termékenyülés megtörténik, de a zigóta első osztódásai során a pollen donor faj genomja 100%-ban eliminál (Heszky 2005). A haploid embrioidok fejlődése viszont folytatódni tud *in vitro* laboratóriumi körülmények között és a kifejlett haploid növények kromoszóma számának indukált megduplázásával DH növényeket tudunk előállítani. A módszer költségessége miatt foglalkoznak más haploid előállítási módszerek (portok- és mikrospóra tenyésztés) fejlesztésével is a kutatók.

A portoktenyésztés során a donor portokokból az androgenezis indukcióját követően haploid vagy DH embrioidok fejlődnek. Az embrioidok regenerálásával előállított spontán DH növények vagy indukált (kolchicin kezelés) DH növények kiváló lehetőséget nyújtanak jelentős mennyiségű DH növény előállítására (Tuvešson és mtsai 2000).

Az izolált mikrospóra tenyésztés során a donor portokokból a megfelelő fejlődési fázisban lévő (középső- és kései egysejtmagvas vakuólumos állapot) mikrospórákat izoláljuk, majd tenyésztő tápoldatban tenyésztjük. Az izolált mikrospóra tenyészetekben az androgenezis indukcióját követően haploid embrioidok keletkeznek. A portoktenyésztéshez hasonlóan az embrioidok regenerálásával DH növényeket tudunk előállítani (Pauk és mtsai 2000).

A portoktenyésztést, mint hatékony DH technológiát eredményesen építették be számos növénynemesítési programba, ennek eredményeként állították elő az első portoktenyésztet eredetű európai búzafajtát, a 'Florin'-t (De Buyser és mtsai 1987). Pauk és mtsai (1995) hazánkban néhány évvel később előállították az első államilag elismert DH búzafajtát ('GK Délibáb'). Tritikále portoktenyésztés módszerével állítottak elő francia kutatók elismert fajtákat (Thomas és mtsai 2003).

Az *in vitro* androgenezis módszerét hatékonyan alkalmazhatjuk nemcsak a gazdasági szempontból fontos növények nemesítési eljárásaiban, hanem molekuláris biológiai kutatásokban, a

transzgénikus növénynemesítésben és számos más kutatási területen is (Jähne és Lörz 1995, Forster és Thomas 2003).

A doubled haploid növények felhasználásának egyik legfontosabb szerepe a különböző térképezési populációk előállítása. A térképezési populációkat eredményesen alkalmazzák a különböző mezőgazdasági szempontból fontos tulajdonságokat meghatározó gének felkutatásában és azonosításában (Datta 2005).

Az *in vitro* előállított haploid sejt- és szövettenyészeteket felhasználhatják bizonyos sejtszintű szelekciók, úgynevezett *in vitro* szelekciók végrehajtására is.

A különböző haploid sejt- és szövettenyészeteket hatékonyan tudják alkalmazni genetikai transzformációs eljárások során. Az eljárás során a bejuttatni kívánt transzgént akár egy lépésben, homozigóta formában fixálhatjuk a populáció génállományában. Mikrospóra eredetű tritikále embrioidok transzformációját próbálták végrehajtani génpuska alkalmazásával, a kísérlet során azonban sikertelen volt a transzgénikus fertilis zöld növények előállítása (Rubio és mtsai 2004).

A haploidia felhasználása az embriogenezis tanulmányozásában, az indukált mutáció és a mutációs nemesítés során is jelentős.

2.4. A haploidia történetének gyökerei

Az első természetben előforduló haploid növényeket *Datura stramonium* L. növények esetében figyelték meg és jegyezték le (Blakeslee és mtsai 1922). Guha és Maheswary (1964) több évtizeddel később előállították az első *in vitro* mikrospóra eredetű *Datura innoxia* L. növényeket, azóta csaknem háromszáz növényfaj esetében állítottak elő *in vitro* haploid növényeket. Az *in vitro* módszerek nem minden növényfaj esetében váltak hatékonyan alkalmazhatóvá, de számos növénynemesítési eljárás során eredményesnek tekinthetők.

2.5. A tritikále androgenezis történetének áttekintése

Az első haploid eljárást tritikále esetében két kutatócsoport publikálta (Wang és mtsai 1973, Sun és mtsai 1973), amely során portoktenyészet eredetű haploid tritikále növényeket állítottak elő. Azóta számos szakirodalomban olvashatunk tritikále portok tenyészetekben indukált androgenezisről (Balatero és mtsai 1995, Bernard 1980, Charmet és Bernard 1984, Keller 1991, Marciniak 1998). A szakirodalomban (Keller 1991) olvashatunk a donor portokok stressz-előkezelésének hatékonyságáról. Karsai és mtsai (1994) publikációjában az indukciós tápközeg optimális maltóz koncentrációjáról és pH értékéről olvashatunk.

Az első izolált mikrospóra eredetű tritikále növényekről a jelenlegi nevén Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai laboratóriumában számoltak be (Monostori és mtsai 1998, Pauk és mtsai 2000). A kísérlet során bizonyították a növekedésszabályozó anyagoktól

mentes indukciós tápoldatok használatának eredményességét tritikále mikroszpóra tenyészetekben. Oleszczuk és mtsai (2004) megerősítették a módszer hatékonyságát, amely során a 'Bogo' tritikále genotípust tesztelték izolált mikroszpóra tenyészetekben, egy viszonylag magas regenerált zöld növény arányról beszámolva. Eudes és Amundsen (2005) tritikále izolált mikroszpóra tenyészetekben a Ficoll[®] alkalmazásával hatékonyan növelték a képződött embrioidok számát, a növényregeneráció hatékonyságát és a válaszdó képesség erős genotípus függőségét állapították meg. Zur és mtsai (2008) különböző válaszdó képességgel rendelkező genotípusok izolált mikroszpóra tenyészeiben vizsgálták a genotípusok antioxidáns enzimszintjének változását és az endogén abszcizinsav (ABA) mennyiségét. Munkájuk során megállapították, hogy a gyengébb válaszdó képességű genotípusok esetében a különböző stresszek hatására megemelkedett az endogén ABA szintje, amely összefüggésbe hozható a gyenge válaszdó képességgel.

2.6. A portoktenyésztést és az izolált mikroszpóra tenyésztést egyaránt befolyásoló tényezők

2.6.1. A genotípus hatása

Az egyes tritikále fajták válaszdó képessége között mind portoktenyésztetben (Balatero és mtsai 1995, Marciniak és mtsai 1998), mind pedig izolált mikroszpóra tenyészetekben (Pauk és mtsai 2000, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008) szignifikáns különbségeket tapasztaltak. Az adott genotípus válaszdó képessége a genetikai adottságoktól függ. A válaszdó képességért felelős kromoszómákat, kromoszóma régiókat ma már különböző molekuláris genetikai eljárásokkal azonosítani tudják. Portoktenyésztet eredetű tritikále DH törzsek genetikai vizsgálata során megállapították, hogy bizonyos QTL-ek jelentősen befolyásolják az embrioidok indukcióját és a növényregeneráció hatékonyságát (Gonzalez és mtsai 2005). A különböző genotípusok tehát különböző válaszdó képességgel rendelkeznek, amely tulajdonság alapvetően meghatározza a DH növény előállítás hatékonyságát. A válaszdó képességet meghatározó gének azonosításával és piramidálásával, bármely genotípus válaszdó képességét javíthatjuk, amellyel végső soron javíthatjuk a DH növény előállítás hatékonyságát. Ez azonban komoly szakmai ismereteket igénylő feladat. A legtöbb esetben az egyes genotípusok közötti különbség, a genotípuson belül az egyes növényegyedek közötti különbség, illetve a növényegyedeken belül az egyes kalászok közötti különbség sokkal jelentősebb, mint az egyes előkezelések hatékonysága között észlelhető különbségek, amelyek sokszor megnehezítik az egyes előkezelések hatékonyságának összehasonlítását (Dunwell és mtsai 1987, Schumann 1990, Ryöppy 1997).

2.6.2. A donor növények és a mikrospórák fejlettségi állapota

A donor növények fejlettségi állapota döntően befolyásolja a portok- és izolált mikrospóra tenyészetek produktivitását. A donor portokokat ugyanis a virágzás megfelelő fázisában kell begyűjteni a portok- és izolált mikrospóra tenyészetek létrehozásához. A donor kalászok begyűjtése akkor történik, amikor a kalász középső részén elhelyezkedő portokokban a pollenszemek középső egysejtmagvas, illetve korai kétsejtmagvas vakuólumos állapotban vannak (Tu vesson és mtsai 2000, Marciniak és mtsai 2003, Lantos és mtsai 2005, Warzecha és mtsai 2005, Pratap és mtsai 2006, Zur és mtsai 2008, Dubas és mtsai 2010, Oleszczuk és mtsai 2011).

2.6.3. Stresszek szerepe az androgenezis indukciójában

Az androgenezis indukciójára a legtöbb esetben valamilyen stresszhatást alkalmaznak. Ezeket a stresszhatásokat leggyakrabban valamilyen előkezelés során fejtik ki. A stresszkezeléseknek *in vitro* és *in vivo* módszerei egyaránt ismeretesek. A különböző kezelések típusa és időtartama döntően befolyásolja a kezelés hatékonyságát. A stresszhatású kezelések alkalmazásával növelhetjük az embrioidok tenyészetenkénti számát, azok regeneráló képességét és ezáltal az előállítható DH növények számát.

Leggyakrabban valamilyen fizikai vagy kémiai kezelést alkalmaznak. A fizikai kezelések közül a hidegkezelés a legelterjedtebb, hatását azonban részletekig menően még nem ismerjük (Tu vesson és mtsai 2000). Bizonyos kutatók véleménye szerint a hidegkezelés lelassítja a sejtek metabolizmusát és lehetővé teszi, hogy a mikrospórák mitotikus sejtosztódása egyszerre következzen be. Az előkezelés során alkalmazott alacsony hőmérséklet (hidegkezelés) androgenezisre gyakorolt pozitív hatását tritikále portoktenyészetekben és izolált mikrospóra tenyészetekben is megfigyelték (Ponitka és mtsai 1999, Immonen és Robinson 2000, Lantos és mtsai 2005, Zur és mtsai 2008, Dubas és mtsai 2010). Egyesek szerint a sejtek éheztetésének van a legfontosabb szerepe az androgenezis indukciója során (Kasha és mtsai 1990).

2.6.4. A tenyésztő közeg hatása az androgenezisre

A tenyésztés során alkalmazott tápoldatok összetétele, így a különböző makro- és mikroelemek, szénforrások, vitaminok és hormonok jelenléte meghatározó az embrioidok képződése során. A tenyésztő közeg összetevői, tehát döntően meghatározzák a mikrospóra eredetű struktúrák fejlődését, az embrioidok számát és minőségét, és ezáltal a regenerált zöld növények arányát is.

Tritikále portoktenyészetekben sokféle különböző tenyésztő tápoldat alkalmazásáról olvashatunk a szakirodalomban. Tu vesson és mtsai (2000) a 190-2 alap tápoldatot alkalmazta tritikále portoktenyészetekben az androgenezis indukciójára. Arzani és mtsai (2001) három

különböző tápoldat eredményességét vizsgálták tritikále portoktenyészetekben, ezek voltak az MC17 és egy colchicin kiegészítéssel, illetve anélkül elkészített folyékony tápoldat. Egyes publikációkban C17 alapú tápoldat alkalmazásáról olvashatunk (Marciniak és mtsai 2003). Warzecha és mtsai (2005) az N6 és az SM (módosított 190-2 tápoldat) tápoldatok, Pratap és mtsai (2006) a Potato II tápoldat sikeres alkalmazásáról számoltak be.

Az első sikeres tritikále izolált mikrospóra tenyésztésnél alkalmazott tenyésztő közeg a 190-2 alaptápoldat volt (Pauk és mtsai 2000), ennek sikeres használatát később számos publikáció megerősítette. Eudes és Amundsen (2005) a CHB és NPB alaptápoldatok sikeres alkalmazásáról számoltak be és bebizonyították, hogy a tápoldathoz adott 100 g/l Ficoll segíti az embrioidok képződését és a növényregeneráció hatékonyságát

A különböző sejt-és szövettényészetekben leggyakrabban maltózt és szacharózt alkalmaznak szénforrásként. Tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben maltózt alkalmaztak szénforrásként (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és Amundsen 2005, Zur és mtsai 2008).

A tápoldatokhoz adagolt exogén hormonok a képződött embrioidok számára és minőségére is hatással vannak. Az alkalmazott exogén hormonok kombinációjában és mennyiségében jelentős különbségeket figyelhetünk meg a különböző publikációkban. Tritikále izolált mikrospóra tenyészetben a módosított 190-2 (190-0) hormonmentes tápközeg a leggyakrabban alkalmazott indukciós tápoldat (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Zur és mtsai 2008).

2.7. Az izolált mikrospóra tenyésztést befolyásoló tényezők

2.7.1. A mikrospórák izolálási módszerei

A mikrospóra tenyésztés előnyeire sorolható, tehát a mikrospórák szomatikus szövetektől való eltávolítása, így a haploid mikrospóra eredetű struktúrák elkülöníthetősége és fejlődésének tanulmányozása. Az izolált mikrospórák tisztasága fontos része a sikeres tenyésztésnek, ezért kerül sor az élettelen sejt- és szövettörmelékek eltávolítására

Jelenleg négy különböző módszert ismerünk a mikrospórák szomatikus szövetekből (portokokból) történő elkülönítésére: (1) kiszóródott mikrospórák összegyűjtése, (2) mágneses keverés, (3) macerálás és a (4) késes homogenizálás.

Az első esetben nem beszélhetünk valódi izolált mikrospóra tenyészetéről, hiszen csak a portokokból kiszóródott mikrospórákat gyűjtik össze tenyésztés céljából (Datta és Wenzel 1987). Tritikále izolált mikrospóra tenyészet létrehozására a késes homogenizálás (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004) és a macerálás módszere (Zur és mtsai 2008) egyaránt sikeresen alkalmazható.

2.7.2. A sűrűség hatása a mikrospórák tenyésztésére

Az izolált mikrospóra tenyészetek sűrűségét illetően nagy különbségeket figyelhetünk meg a különböző kutatók munkája során. Tritikále izolált mikrospóra tenyészetek létrehozásakor kezdetben magas sűrűségű (100 000 – 250 000 ezer mikrospóra/ml) sejtszuszpenziót alkalmaztak (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004). Későbbi kísérletek során alacsony sűrűség mellett is (10 000 – 70 000 mikrospóra/ml) számos embrioidot állítottak elő (Lantos és mtsai 2005, Zur és mtsai 2008).

2.7.3. A dajkatenyésztés szerepe tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben

A dajkatenyésztés során ováriumokat helyezünk a mikrospóra tenyészetekbe, ezáltal növelhetjük a mikrospóra tenyésztés eredményességét. Az ováriumok jelenléte bizonyítottan fontos szerepet játszik az osztódó mikrospórák és az embrioidok képződésében.

A dajkatenyésztés növeli az osztódó mikrospórák számát, az embriók tenyészetenkénti számát és a növényregeneráció hatékonyságát búzában (Hu és Kasha 1997). Eudes és Amundsen (2005) megfigyelései szerint tritikále izolált mikrospóra tenyészetben is az ovárium dajkatenyésztés javította az embriók minőségét és emelte az embriók tenyészetenkénti számát.

Annak ellenére, hogy az ovárium dajkatenyésztés pozitív hatásáról sok publikáció jelent meg, keveset tudunk a folyamat kémiai, fizikai és biokémiai hátteréről (Letarte és mtsai 2006).

2.8. Növényregenerálás portok- és mikrospóra tenyészet eredetű struktúrákból

Tritikále portoktenyészetekben az embrioidok regenerálására sokféle tenyésztő tápoldatot alkalmaznak. Warzecha és mtsai (2005) N6 tápközeget és 2,4-D-vel, illetve kinetinnel kiegészített SM (módosított 190-2) tápközeget alkalmaztak portoktenyészet eredetű embrioidok regenerálására. Pratap és mtsai (2006) kinetin és 2,4-D kiegészítéssel elkészített Potato-II tápoldatot alkalmaztak portoktenyészet eredetű embrioidok regenerálására. A 2 mm nagyságot elért portoktenyészet eredetű embrioidok regenerálására gyakran alkalmazzák a 190-2 (Tuvešson és mtsai 2000, Marciniak és mtsai 2003, Warzecha és mtsai 2005) és az MS (Warzecha és mtsai 2005, Pratap és mtsai 2006) regeneráló táptalajokat.

Tritikále mikrospóra eredetű embrioidok regenerálásához leggyakrabban a hormonkiegészítéssel (0,5 NAA mg/l és 0,5 kinetin mg/l) elkészített 190-2 tápoldatot alkalmazzák (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Zur és mtsai 2008). Eudes és Amundsen (2005) a GEM elnevezésű tápközeget használta izolált mikrospóra tenyészet eredetű embrioidok regenerálására.

A tritikále portoktenyészet és az izolált mikrospóra tenyészet eredetű embrioidok regenerálása során az albínó növények megjelenése általánosan gondot jelent. Az albínó növények kloroplasztisz nélkül vagy degenerált kloroplasztisszal fejlődnek ki, képtelenek a fotoszintézisre, így a természetes körülményekhez sem tudnak alkalmazkodni. Az albinizmus nagyobb gyakorisággal az izolált mikrospóra tenyésztés során jelenik meg. Az albinizmus mértékét a genotípus befolyásolja, de nem csak a genetikai háttér felelős érte. Bizonyos kísérletek bizonyítják, hogy az alkalmazott növény-előállítási módszer elemeinek jelentős része, így a donor növények felnevelése, fejlettsége, az előkezelések módja és ideje, valamint a tápoldatok összetevői is befolyásolják, a növényregenerációs hatékonyságot (Ouyang és mtsai 2004, Oleszczuk és mtsai 2006, Redha és mtsai 2008). Bizonyos feltevések szerint az *in vitro* tenyésztési körülmények olyan stressz hatást okozhatnak, melynek következtében a kloroplasztiszokban a transzkripció és transzláció erőteljesen lecsökken vagy teljesen megszűnik (Trop és Andersen 2009).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növényanyag

Munkánk során összesen nyolc tritikále genotípust használtunk. Ezek közül három a Gabonakutató Kft. által nemesített, államilag elismert fajta ('GK Szemes', 'GK Idus' és 'GK Rege'), valamint öt nemesített törzs ('Tc 13/5', 'Tc 10/7', 'Tc 23', 'Tc 10/1' és a 'Tc 8'). A portoktenyészetekben mind a nyolc genotípus válaszó képességét vizsgáltuk, míg a mikrospóra tenyészetekben csak a 'GK Rege' és a 'Tc 10/7'-es genotípus került összehasonlításra.

3.2. A donor növények felnevelése

A donor tritikále növényeket szabadföldön neveltük fel. A kísérlethez a donor kalászokat szolgáltató hajtásokat a Gabonakutató Kft. Kecskés telepi tenyészkerületéből gyűjtöttük be.

3.3. A donor kalászok begyűjtése és sterilizálása

A portok- és mikrospóra tenyészetek létrehozásához szükséges kalászok begyűjtésére május elején került sor, amikor a portokokban a mikrospórák a középső és kései egysejtmagvas vakuólumos állapotban voltak. A portokok izolálása előtt a kalászokat eltávolítottuk a szárról, majd a kalászok szállátlanítása után végeztük el a növényanyag sterilizálását. Az izolálásra kiválogatott kalászokat háztartási Hypo 50 %-os oldatában sterilizáltuk 1 csepp Tween 20 nedvesítőszer hozzáadásával, 20 percig rázóasztalon, 80 rpm fordulatszámon. A sterilizációt követően a kalászok háromszori steril vizes öblítését végeztük el.

3.4. A portok izolálása

A portokok izolálását steril fülkében, steril eszközökkel végeztük el. A kalászkát borító külső majd belső toklász eltávolítása után a kalászkában található három darab portokot csipeszek segítségével izoláltuk, majd megfelelő oldalra helyeztük. A portokokat mikrospóra tenyésztés esetében 12 ml 0,3 M mannit tápoldatra tettük, amelybe a fertőzések elkerülése végett 200 mg/l cefotaxime antibiotikumot is juttattunk. Portoktenyésztés esetében a portokokat 12 ml tápoldatra helyeztük, ez esetben nem alkalmaztunk antibiotikumot.

3.5. A portoktenyésztés folyamata és körülményei

A portoktenyésztéshez szükséges izolált portokokat 9 cm átmérőjű üveg Petri-csészékbe helyeztük, amelyekbe 12 ml $W_{14}F$ tápoldatot pipettáztunk (1. táblázat). A portok izolálás során minden Petri csészébe 250 portokot helyeztünk. A létrehozott portoktenyészeteket 3 napig 32 °C-on, majd 28 °C-on, sötétben tartottuk. A portoktenyészeteket ezután hetente ellenőriztük és a megfelelő nagyságot elért embrioidokat 190-2 Cu regeneráló táptalajra helyeztük.

3.6. A mikrospóra izolálás

A mikrospóra tenyésztéshez használt portokokat 3 napig, 0,3 M mannit oldatban, sötétben tenyésztettük elő 32 °C-on. A portokokból a mikrospórákat macerálással izoláltuk, majd a nyert szuszpenziót szénhidrát-grádiens centrifugálással tisztítottuk. A mikrospórák izolálását steril körülmények között, steril eszközökkel végeztük el. Az eljárás során a portokokat egy 150 μ m sűrű szövésű műanyag szűrőre borítottuk és egy üvegbot segítségével dörzsöltük szét őket 0,3 M mannit oldatban. A nyert szuszpenziót pipetta segítségével üveg centrifugacsövekbe juttattuk, ezután a csöveket szobahőmérsékleten (22 °C), 5 percre, 600 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk.

A centrifugálás után pipettával eltávolítottuk a felülúszót, majd a centrifugacső alján összegyűlt üledéket (élő és elpusztult sejtek, sejt- és szövettörmelékek) 2ml 0,3 M mannit oldatban felvettük. A mannit oldatban felvett szuszpenziót 21%-os maltóz oldat tetejére rétegeztük. A centrifugacsöveket ezután szobahőmérsékleten (22 °C), 10 percre, 600 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk.

A centrifugálást követően az élő sejtek a két oldat határán egy jól látható fehér sávban gyűltek össze. Az élő mikrospórákat pipetta segítségével 0,3 M mannit oldatot tartalmazó centrifugacsövekbe juttattuk, ezután 10 percre állni hagytuk. Az élő mikrospórákat tartalmazó szuszpenziót szobahőmérsékleten (22 °C), 5 percre, 600 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk.

A centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, majd az összegyűlt élő mikrospórákat 1 ml 190-0 mi vagy W_{14} mi indukciós tápoldatba juttattuk (1. táblázat). Végül az izolált mikrospórák sűrűségét 30 000-35 000 mikrospóra/ml sűrűségűre állítottuk be. Az 1,5 ml mikrospóra szuszpenziót tartalmazó Petri csészék megközelítőleg 50 portok felhasználásával készültek.

1. táblázat. Az alkalmazott tenyésztő tápoldatok összetétele.

Tápoldat összetevők	190-0 (mg/l)	W14mi (mg/l)	W14F (mg/l)
KNO ₃	1000	2000	2000
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	380	380
MgSO ₄ x7H ₂ O	200	200	200
CaCl ₂ x2H ₂ O	-	140	140
K ₂ SO ₄	-	700	700
(NH ₄) ₂ SO ₄	200	-	-
KH ₂ PO ₄	300	-	-
KCl	40	-	-
Ca(NO ₃) ₂ x4H ₂ O	100	-	-
MnSO ₄ x4H ₂ O	8	8	8
ZnSO ₄ x7H ₂ O	3	3	3
H ₃ BO ₃	3	3	3
KI	0,5	0,5	0,5
CuSO ₄ x5H ₂ O	-	0,025	0,025
CoClx6H ₂ O	-	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	-	0,025	0,025
FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
2-Nikotinsav	0,5	0,5	0,5
Piridoxin-HCl	0,5	0,5	0,5
Thiamin-HCl	1	2	2
Mezo-inozit	100	-	-
L-Glicin	2	-	-
D-Biotin	-	-	-
Ca-pantotenát	-	-	-
Aszkorbinsav	-	-	-
L-Glutamin	-	1000	-
Burg. kivonat	-	-	-
2,4-D	-	0,5	2
Kinetin	-	0,5	0,5
Maltóz	90 000	90 000	80 000
pH	5,8	5,8	5,8

3.7. Az izolált mikrospóra tenyésztés folyamata és körülményei

Az izolált mikrospórák tenyésztését 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészékben végeztük, amelyekbe 1,5 ml indukciós tápoldatot juttattunk. A tenyészetekben az osztódó mikrospórákat és a mikrospóra eredetű kolóniák fejlődését rendszeresen mikroszkóppal vizsgáltuk.

A mikrospóra tenyésztés során a 'GK Rege' és a 'Tc 10/7'-es genotípus válaszdó képességét hasonlítottuk össze. Mindkét genotípus esetén két mikrospóra tenyésztő tápoldatot használtunk, ezek a 190-0 (Pauk és mtsai 2000) és a W14 mi tenyésztő tápoldatok voltak.

3.8. Növényregenerálás és az üvegházi akklimatizáció

A portok-és mikrospóra tenyészet eredetű tritikále embrioidokat Gelrite-tel (1,5 g/l) szilárdított, 0,5 mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Zhuang és Jia 1983, Pauk és mtsai 1991, Purnhauser és Gyulai 1993) kiegészítéssel elkészített 190-2 Cu regeneráló táptalajra helyeztük (2. táblázat). Az embrioidok regenerálása tenyészszobában, 24 °C hőmérsékleten, napi 16 órás megvilágítás mellett történt.

A tenyészetek indukciója után harminc nappal elkezdtük a fejlődő struktúrák rendszeres ellenőrzését. A mikrospóra- és portoktenyészetekből a legalább 2 mm nagyságot elérő embrioidokat hetente kiválogattuk és 190-2 Cu regeneráló táptalajt tartalmazó Petri csészékbe helyeztük. A regeneráló táptalajra helyezett embrioidokon optimális esetben néhány nap múlva megjelentek a gyökér- és hajtáskezdemények. A megfelelő méretet elért zöld növénykéket a Petri-csészékből szintén 190-2 Cu regeneráló táptalajt tartalmazó üvegcsövekbe tettük. A növénykének néhány hét elteltével az üvegcsöveket is kinőtték és megerősödött gyökérzetük lehetővé tette az üvegházba való kiültetésüket.

A növényeket az üvegházban 50 mm átmérőjű PVC csövekbe ültettük majd egyesével műanyag tasakkal borítottuk. A jól akklimatizálódott növényekről a tasakokat néhány nap múlva eltávolítottuk.

2. táblázat. Az alkalmazott regeneráló táptalaj összetétele.

Tápoldat összetevők	190-2Cu (mg/l)
KNO ₃	1000
(NH ₄) ₂ SO ₄	200
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100
KH ₂ PO ₄	300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
KCl	40
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85
Na ₂ EDTA	37,25
MnSO ₄ ·4H ₂ O	8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3
H ₃ BO ₃	3
KI	0,5
L-Glicin	2
Thiamin-HCl	1
Piridoxin-HCl	0,5
2-Nikotinsav	0,5
Mezo-inozit	100
NAA	0,5
Kinetin	0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5
Szacharóz	30 000
pH	5,8
Gelrite	2800

3.9. Statisztikai elemzések

Kísérleteinket legalább négy ismételtsben végeztük el, mely során a tenyészetekben fejlődött embrioidok számát, valamint a belőlük regenerált zöld és albínó növények számát felvételeztük és statisztikailag értékeltük. A különböző kísérletek összehasonlíthatósága végett a kapott adatokat 100 portokra vonatkoztatva fejeztük ki.

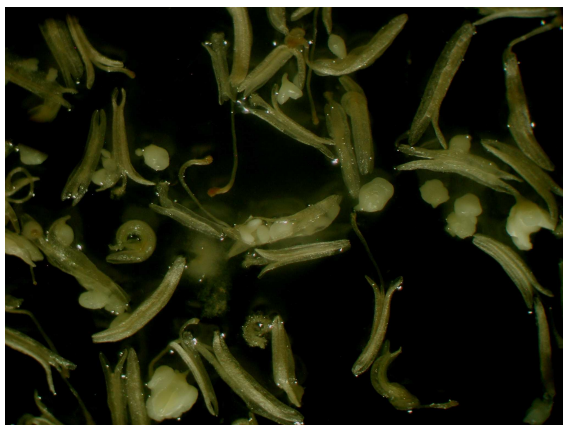
Portoktenyészetben a különböző genotípusok válaszadó képességének összehasonlítását varianciaanalízissel kivitelezttük, míg a genotípus és a tápoldat izolált mikrospóra tenyészetben mért hatásának elemzéséhez kéttényezős varianciaanalízist alkalmaztunk. A két haploid módszer (portok- és mikrospóra tenyésztés) összehasonlítását szintén kéttényezős varianciaanalízissel végeztük el. A statisztikai vizsgálatokhoz a Microsoft® Excel 2002 statisztikai programot használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Tritikále portoktenyésztés

Az androgenezis indukciója a tritikále portoktenyésztés esetében minden genotípusban sikeres volt. A portok tenyészetekben genotípusonként eltérő mennyiségű embrioid keletkezett (20,70 – 123,92 embrioid/100 portok). A legkimagaslóbb eredményeket a '13/5'-ös genotípus esetében érték el (123,92 embrioid/100 portok). Az embrioidok száma magas volt még a 'Rege' (55,60 embrioid/100 portok) és a '10/7'-es (55,44 embrioid/100 portok) genotípusok tenyészeiben is, de a többi genotípus esetében is számos embrioid fejlődött (3. táblázat).

A megfelelő nagyságot elért embrioidokat regeneráló táptalajra helyeztük és a növényregenerációs hatékonyságot vizsgáltuk (2a ábra). A növényregenerálás minden genotípus esetében sikeres volt (2b ábra). A regenerált növényeket egyedileg elkülönítve neveltük kiültetésig (2c és d ábra).



2. ábra. A tritikále portoktenyésztés lépései: (a) Az izolált portokok tenyészetében fejlődő embrioidok. (b) A regeneráló táptalajra helyezett embrioidok és a regenerált zöld növénykék. (c) A regeneráló táptalajt tartalmazó üvegcsövekbe helyezett zöld növénykék. (d) Az üvegházba kiültetett és akklimatizálódott növények.

Amint az embrioidok számában, úgy a növényregenerálás során is a '13/5'-ös genotípus volt a legeredményesebb (30 regenerált növény/100 portok). Emellett a '10/7'-es (21,36 regenerált növény/100 portok), a 'Rege' (18,90 regenerált növény/100 portok), és a 'Szemes' (16,96 regenerált növény/100 portok) genotípusok esetében is jó eredményeket értünk el. A legkevesebb növényt az 'Idus' fajta esetében regeneráltuk (7,68 regenerált növény/100 portok).

3. táblázat. A nyolc tritikále genotípus válaszdó képességének összehasonlítása portoktenyésztésben a keletkezett embrioidok, a regenerált növények, a zöld növények és az albínó növények száma alapján. Az abc azonos betűi szignifikánsan nem különböző értékeket jelölnek az egyes oszlopokon belül, 95%-os megbízhatóság mellett.

Genotípus	Embrioidok száma/100 portok	Regenerált növények száma/100 portok	Zöld növények száma/100 portok	Albínó növények száma/100 portok	Zöld és albínó növények aránya
13/5	123,92 a	30,00 a	20,88 a	9,12 ab	2,28
Rege	55,60 b	18,90 ab	18,50 ab	0,40 c	46,25
10/7	55,44 b	21,36 ab	15,12 ab	6,24 bc	2,42
Szemes	41,04 b	16,96 ab	2,48 b	14,48 a	0,17
Tc23	30,50 b	11,70 b	9,50 ab	2,20 bc	4,31
Tc10/1	26,16 b	11,12 b	5,84 b	7,00 b	0,83
Idus	24,24 b	7,68 b	7,12 ab	0,56 c	12,71
Tc8	20,70 b	9,30 b	7,50 ab	1,80 bc	4,16
Átlag	47,2	15,8775	10,8675	5,225	9,14
SzD5%=	54,036	16,404	14,955	6,033	-

A regenerált növények között zöld és albínó növények egyaránt fejlődtek. Munkánk során minden genotípusból sikerült zöld növényeket regenerálni (2,48 – 20,88 zöld növény/100 portok). A legtöbb zöld növényt a '13/5'-ös genotípus esetében regeneráltuk (20,88 zöld növény/100 portok). Jelentős számú zöld növényt regeneráltunk még a 'Rege' (18,50 zöld növény/100 portok) és a '10/7'-es (15,12 zöld növény/100 portok) genotípus esetében is. A zöld növény regenerálás a 'Szemes' fajta esetében volt a legkevesbé eredményes (2,48 zöld növény/100 portok).

A regenerált növények egy része minden genotípus esetében albínó volt (0,40-14,48 albínó növény/100 portok), az albinizmus arányát tekintve viszont jelentős eltéréseket tapasztalhattunk. A legkevesebb albínó növény a 'Rege' fajta portoktenyésztéseiben fejlődött (0,40 albínó növény/100 portok), míg a legtöbb albínó növényt a 'Szemes' genotípus tenyésztéseiből állítottuk elő (14,48 albínó növény/100 portok). A zöld és albínó növények arányában is jelentős különbségek mutatkoztak (3. táblázat).

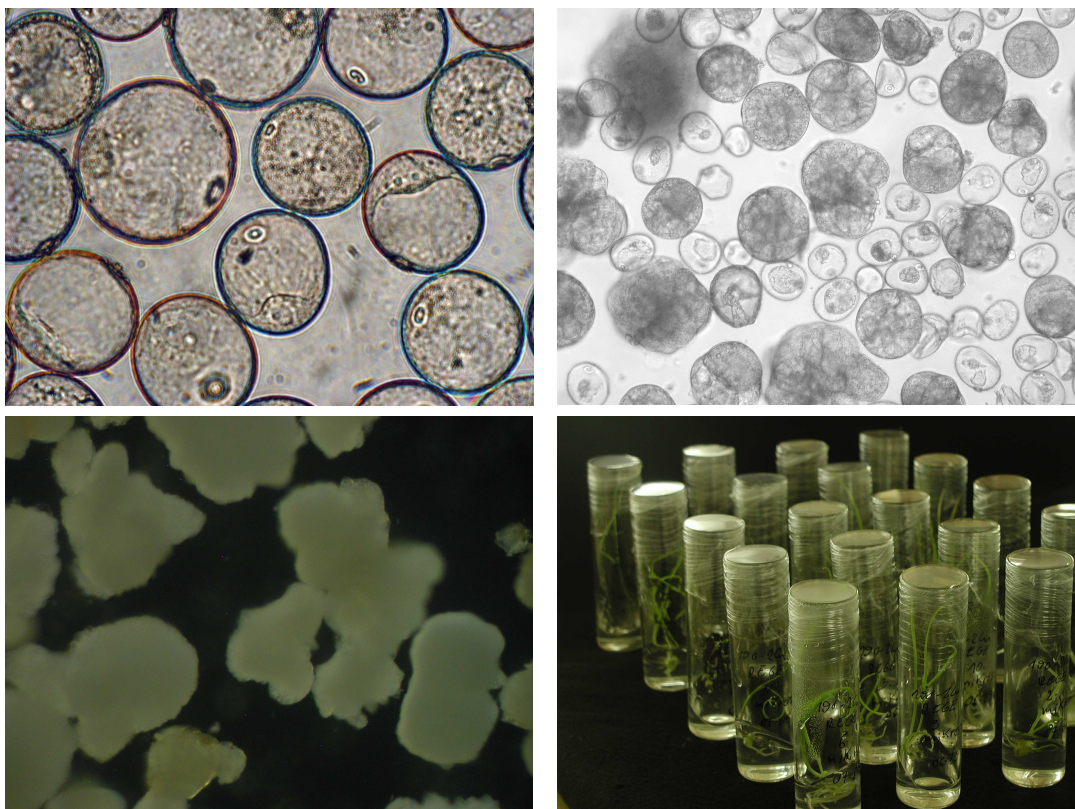
A számadatokat tekintve (3. táblázat) elmondhatjuk, hogy a portoktenyészetekben indukált *in vitro* androgenézis a '13/5'-ös genotípus esetében volt a legsikeresebb, hiszen itt sikerült a legtöbb portoktenyészet eredetű haploid, illetve spontán DH tritikále növényt előállítani. Legkevesbé mondható eredményesnek a 'Szemes' fajta, mert itt volt a legalacsonyabb az előállított zöld növények száma. Ez leginkább a genotípusban megjelenő magas arányú albinizmusnak köszönhető.

Összességében elmondhatjuk, hogy mind a nyolc genotípus esetében sikeres volt az androgenézis indukciója portoktenyészetben, habár a genotípusok válaszdó képessége között szignifikáns különbségek voltak. A különbségek az embrioidok, a regenerált növények, a zöld növények és az albínó növények számában voltak kimutathatók.

4.2. Tritikále izolált mikrospóra tenyésztés

A tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben az *in vitro* androgenézis indukciója sikeres volt (3. ábra). Munkánk során a 'Rege' és a '10/7'-es genotípus válaszdó képességét vizsgáltuk izolált mikrospóra tenyészetekben. Az izolált mikrospóra tenyésztéshez a mikrospórákat korai- és kései egysejtmagvas vakuólumos állapotban izoláltuk a portokokból (3a ábra). Az osztódó mikrospórákat és az embrioidok fejlődését mikroszkóppal vizsgáltuk (3b és 3c ábra). A tenyészetekben fejlődött embrioidokat a tenyésztés 8. hetéig rendszeresen ellenőriztük és hetente regeneráló táptalajra helyeztük, majd ezt követően (8. hét után) a többi embrioidot regeneráló táptalajra kiszélesztettük. Az embrioidokból kifejlődött és megfelelő nagyságot elért zöld növénykéket regeneráló táptalajt tartalmazó üvegcsövekbe helyeztük (3d ábra).

A mikrospóra tenyészetekben két tenyésztő tápoldat eredményességét hasonlítottuk össze. Kéttényezős variancia analízissel tanulmányoztuk a két tápoldat illetve a genotípus hatását izolált mikrospóra tenyészetben a tenyészetben fejlődött embrioidok, a regenerált növények, a zöld növények és az albínó növények száma alapján. Megállapítottuk, hogy a genotípusnak szignifikáns hatása volt mind a négy vizsgált paraméterre, míg a tápoldat a regenerált növények számát és az albínók számát befolyásolta szignifikánsan. Genotípus × tápoldat interakciót figyeltünk meg az embrioidok és a regenerált növények száma tekintetében (4. táblázat).



3. ábra. A tritikále mikrospóra tenyésztés lépései: (a) Frissen izolált mikrospórák. (b) Osztódó mikrospórák a tenyésztés 21. napján. (c) Szabad szemmel is látható mikrospóra eredetű embrioidok. (d) Mikrospóra eredetű regenerált zöld növények egyedileg elkülönítve üvegcsövekben.

A mikrospórák mindkét genotípus esetében intenzíven fejlődtek, azonban a 8. hétig fejlődött embrioidok számát illetően jelentős különbségeket tapasztalhattunk (5. táblázat). A 'Rege' a 190-0 (783,6 embrioid/100 portok) és a W14 (638,4 embrioid/100 portok) mikrospóra tenyésztő tápoldat esetében is jobb eredményeket mutatott, mint a '10/7'-es genotípus. A képződött mikrospóra eredetű embrioidok száma azonban a '10/7'-es genotípus tenyészteteiben is viszonylag magas volt. A '10/7'-es tenyészteteiben a 190-0 (318,0 embrioid/100 portok) és a W14 (384,0 embrioid/100 portok) tenyésztő tápoldatban közel azonos számú embrioid fejlődött.

4. táblázat. A tápoldat és a genotípus hatásának vizsgálata izolált mikropóra tenyészetben kéttényezős variancia analízissel.

Tényezők	SS embrioid	SS reg. növ.	SS zöld növ.	SS albínók	df	MS embrioid	MS reg. növ.	MS zöld növ.	MS albínók
Genotíp.	648000,0	4971,76	121,69	6649,09	1	648000,0***	4971,76***	121,69**	6649,09***
Tápoldat	7840,8	11360,56	43,02	10005,36	1	7840,8ns	11360,56***	43,02ns	10005,36***
Kölcsönh.	55756,8	3397,36	17,42	3901,36	1	55756,8*	3397,36***	17,42ns	3901,36ns
Hiba	185286,4	4335,47	189,87	3634,67	16	11580,4	270,97	11,87	227,17

***, **, * Szignifikánsan különbözik P=0,1%, P=1% illetve P= 5% szinten.
ns, szignifikáns hatás nem volt kimutatható

5. táblázat. A táblázat egyes oszlopaiban szereplő SzD értékek egyaránt alkalmasak a fajták illetve a tápoldatok páronkénti összehasonlítására.

Genotípus	Tápoldat	Embrioidok száma/100 portok	Regenerált növények száma/100 portok	Zöld növények száma/100 portok	Albínó növények száma/ 100 portok
Rege	190-0	783,6	17,2	4,4	12,8
	W14	638,4	38,8	9,2	29,6
10/7	190-0	318,0	22,7	1,3	21,3
	W14	384,0	96,4	2,4	94,0
SzD5%		223,9	55,26	3,27	59,22

A megfelelő nagyságot elért embrioidokat regeneráló táptalajra helyeztük és az embrioidok regenerációs hatékonyságát vizsgáltuk. Mindkét genotípus esetében sikeres volt a növényregenerálás, viszont a regenerált növények számában szignifikáns különbségeket tapasztaltunk (5. táblázat). Annak ellenére, hogy a képződött embrioidok száma a 'Rege' tenyészteteiben magasabb volt, a növényregenerációs hatékonyság a '10/7'-es genotípus esetében jobbnak mutatkozott. A legtöbb növénykét a '10/7'-es genotípus W14 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidjaiból regeneráltuk (96,4 regenerált növényke/100 portok). A számok alapján (5. táblázat) elmondhatjuk, hogy a W14 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidoknak mindkét genotípus esetében jobb volt a regenerációs hatékonysága. A legkevesebb növényt a 'Rege' 190-0 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidjaiból sikerült regenerálni (17,2 regenerált növényke/100 portok).

Mindkét genotípus esetében sikerült zöld növényeket regenerálni, a regenerált zöld növények számában azonban jelentős különbségeket figyeltünk meg. A legtöbb zöld növényt a 'Rege' W14 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidjaiból regeneráltuk (9,2 regenerált zöld növény/100 portok). Az eredmények alapján a két tenyésztő tápoldatot összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a W14 tápoldatban fejlődött embrioidokból mindkét genotípus esetében nagyobb számú zöld növényt sikerült regenerálni. A zöld növény regenerációs hatékonyság a '10/7'-es genotípus 190-0 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidjai esetében volt a legkevésbé eredményes.

A regenerált növények egy része mindkét genotípus esetében albínó volt, melynek mértéke 12,8 – 94,0 albínó növény/100 portok között változott (5. táblázat), az albinizmus arányát tekintve szignifikáns különbségeket tapasztalhattunk. A legtöbb albínó növény a '10/7'-es genotípus W14 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidjaiból regenerálódott (94,0 albínó növény/100 portok). Ez a szám magasnak tekinthető. A számadatok alapján elmondhatjuk, hogy az albinizmus aránya a W14 tenyésztő tápoldatban fejlődött embrioidok regenerálása során sokkal magasabb volt, mint a 190-0 tápoldat esetében. A legkevesebb albínó növény a 'Rege' 190-0 tápoldatban fejlődött embrioidjaiból regenerálódott (12,8 albínó növény/100 portok).

A számadatok alapján elmondhatjuk, hogy a két tritikále genotípus közül a 'Rege' eredményesebbnek mutatkozott, hiszen embrioidjaiból mindkét tenyésztő tápoldat esetében több zöld növényt sikerült előállítani, mint a '10/7'-es nemesítési alapanyag esetében.

Munkánk során, tehát az *in vitro* androgenezis indukciója tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben sikeres volt, a két használt genotípus válaszó képessége között azonban jelentős különbségeket tapasztaltunk. A két genotípus válaszó képességének különbözősége a képződött embrioidok, a regenerált növények, a zöld növények és az albínó növények számában mutatkozott meg.

4.3. A portoktenyésztés és az izolált mikrospóra tenyésztés hatékonyságának összehasonlítása

Munkánk során az *in vitro* androgenezis indukciója tritikále portoktenyészetekben és izolált mikrospóra tenyészetekben egyaránt sikeres volt. A mikrospóra- és portoktenyészetekben is számos embrioid keletkezett és mindkét eljárás során sikerült akklimatizált zöld növényeket előállítanunk. A két módszer eredményességének összehasonlítására a 'Rege' és a '10/7'-es genotípusokat választottuk ki. A képződött embrioidok, a regenerált növények, a zöld növények és az albínó növények száma alapján a két módszer közötti különbségeket vizsgáltuk.

A kapott eredményeket kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük (6. táblázat), mely alapján szignifikáns különbségeket mutattunk ki az alkalmazott módszerek között. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a tenyésztés módjának szignifikáns hatása volt mind a négy vizsgált paraméterre. A genotípus az embrioidok, a regenerált növények és az albínó növények számát befolyásolta szignifikánsan. Genotípus $\times$ tenyésztés módja interakciót figyeltünk meg az embrioidok, a regenerált növények és az albínó növények száma esetében (6. táblázat).

A keletkezett embrioidok száma alapján a mikrospóra tenyésztés és a portoktenyésztés között szignifikáns különbséget figyelhettünk meg. Az embrioidok száma az izolált mikrospóra tenyészetekben a 'Rege' (638,4 embrioid/100 portok) és a '10/7'-es (384,0 embrioid/100 portok) genotípus esetében egyaránt lényegesen magasabb volt, mint portoktenyészetben. A számadatokat tekintve kijelenthetjük, hogy az előállított embrioidok száma alapján a mikrospóra tenyésztés sokkal eredményesebbnek tekinthető (7. táblázat). Mindkét tenyésztés esetében szilárd regeneráló táptalajra helyeztük a megfelelő méretű embrioidokat és a növényregeneráció hatékonyságát vizsgáltuk. A 100 portokra jutó regenerált növények száma szintén a mikrospóra tenyészetekben volt magasabb ('Rege': 38,8 regenerált növény/100 portok, '10/7': 96,4 regenerált növény/100 portok). A mikrospóra- és portoktenyészetekben a regenerált növények között zöld és albínó növények egyaránt fejlődtek. A zöld növény regeneráció hatékonysága egyértelműen jobb volt a portoktenyészet eredetű embriók esetében. A 'Rege' (18,5 zöld növény/100 portok) és a '10/7'-es (15,1 zöld növény/100 portok) genotípus esetében is a portoktenyészetekben sikerült több zöld növényt regenerálni.

6. táblázat. Az alkalmazott DH növényelőállítási módszer és a genotípus hatásának elemzése kéttényezős variancia analízissel.

Tényezők	SS embrioid	SS reg. növ.	SS zöld növ.	SS albínók	df	MS embrioid	MS reg. növ.	MS zöld növ.	MS albínók
Genotíp.	81000,99	4509,01	129,54	6167,07	1	81000,99***	4509,01**	129,54ns	6167,07***
Teny.mód.	1038221,0	11267,0	606,10	17099,55	1	1038221,0***	11267,0***	606,10*	17099,55***
Kölcsönh.	80797,47	3800,52	14,62	4286,59	1	80797,47***	3800,52**	14,62ns	4286,59***
Hiba	60348,03	5476,15	1266,17	3464,51	16	3771,75	342,26	79,14	216,53

***, **, * Szignifikánsan különbözik P=0,1%, P=1% illetve P= 5% szinten.

ns, szignifikáns hatás nem volt kimutatható

7. táblázat. A portoktenyésztés és a mikrospóra tenyésztés hatékonyságának összehasonlítása két tritikále genotípusban.

A táblázat egyes oszlopaiban szereplő SzD értékek egyaránt alkalmasak a fajták illetve a tápoldatok páronkénti összehasonlítására.

	Genotípus	Embrioidok száma/100 portok	Regenerált növények száma/100 portok	Zöld növények száma/100 portok	Albínó növények száma/100 portok
Portoktenyésztés	Rege 10/7	55,6	18,9	18,5	0,4
		55,4	21,4	15,1	6,2
Mikrospóra tenyésztés	Rege 10/7	638,4	38,8	9,2	29,6
		384,0	96,4	2,4	94,0
SzD5%		269,5	58,45	8,43	62,07

A portoktenyészet eredetű embrioidok regeneráló képessége az arányokat tekintve sokkal jobbnak bizonyult, mint mikrospóra tenyésztés esetében. A 8. táblázatban láthatjuk, hogy a portoktenyészet eredetű embriók regeneráló képessége (átlagosan 36,3 %) százalékos arányban sokkal magasabb volt, mint a mikrospóra eredetű embrióké (átlagosan 15,6 %).

A mikrospóra- és portoktenyészetekben zöld és albínó növények egyaránt fejlődtek. A zöld növény regeneráció hatékonysága egyértelműen jobb volt a portoktenyészet eredetű embriók esetében. A 'Rege' (18,5 zöld növény/100 portok) és a '10/7'-es (15,1 zöld növény/100 portok) genotípus esetében is a portoktenyészetekben sikerült több zöld növényt regenerálni.

A zöld növények számát döntően befolyásolja az albinizmus gyakorisága. A mikrospóra- és portoktenyészetek között az albínó növények számát tekintve jelentős különbséget tapasztalhattunk. A számadatok alapján kijelenthetjük, hogy a mikrospóra tenyészetekben magasabb volt az albinizmus aránya (átlagosan 14,6 %), mint a portoktenyészetekben (átlagosan 6,0%). A legtöbb albínó növény a '10/7'-es genotípus mikrospóra tenyészeiben fejlődött ki (94,0 albínó növény/100 portok), míg a legkevesebb albínó növényt a 'Rege' portoktenyszeiből regeneráltuk (0,4 albínó növény/100 portok).

8. táblázat. Embrioidok regeneráló képességének összehasonlítása.

	Genotípus	Regenerált növények (%)	Regenerált zöld növények (%)	Albínó növények (%)
Portoktenyésztés	Rege	34,0	33,3	0,7
	10/7	38,6	27,3	11,2
	átlag	36,3	30,3	6,0
Mikrospóra tenyésztés	Rege	6,1	1,4	4,6
	10/7	25,1	0,6	24,5
	átlag	15,6	1	14,6

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a portoktenyésztés és az izolált mikrospóra tenyésztés egyaránt alkalmas volt akklimatizálódott tritikále növények előállítására. A két módszer eredményességét összehasonlítva jelentős különbségeket tapasztaltunk a képződött embrioidok, a regenerált növények, a zöld növények és az albínó növények számában is.

4.4. Regenerált növények felnevelése a nemesítés számára

Munkánk egyik fő célkitűzése az volt, hogy portok- és izolált mikrospóra eredetű tritikále növényeket állítsunk elő a növénynemesítés számára. Célkitűzéseinknek megfelelően minden genotíusból tudtunk zöld növénykéket regenerálni. A zöld növény regenerálás a portoktenyészetekben és az izolált mikrospóra tenyészetekben egyaránt sikeres volt. Portoktenyészetekben nyolc genotípus válaszdó képességét vizsgáltuk. Mind a nyolc genotípus tenészeteiben fejlődtek embrioidok, amelyek egy részéből sikeresen tudtunk zöld növényeket regenerálni. Izolált mikrospóra tenyészetekben két genotípus hatékonyságát vizsgáltuk, amely során mindkét genotípus tenészeteiből sikeresen regeneráltunk zöld növénykéket.

Munkánk során összesen 1040 darab zöld növénykét állítottunk elő *in vitro* androgenezis indukciójával (9. táblázat). Az 1040 darab regenerált zöld növény közül 998 darab növény portoktenyészet eredetű, míg 42 darab izolált mikrospóra tenyészet eredetű. A legtöbb zöld növényt a '13/5'-ös genotípus portoktenészeteiből regeneráltuk (261 db zöld növényke), de a '10/7'-es (189 db zöld növényke) és a 'Rege' (185 db zöld növényke) portoktenészetei is számos zöld növényt szolgáltatottak. A legkevesebb zöld növényt a '10/7'-es genotípus mikrospóra tenészetei szolgáltatották (8 db zöld növényke). A megfelelően gyökeresedett növényeket kiültettük az üvegházba. Az 1040 darab regenerált zöld növény közül 118 darab nem tudott normálisan meggyökeresedni, így az üvegházba 922 darab növényt ültettünk ki. A legtöbb kiültetett növény a '13/5'-ös genotípus portoktenészeteiből származott (241 db kiültetett növény), míg a legkevesebb számú kiültetett növényt '10/7'-es mikrospóra tenészetei szolgáltatották (7 db kiültetett növény).

A kiültetett növények nagy része megfelelően tudott akklimatizálódni az üvegházi körülményekhez. Összesen 853 darab akklimatizálódott portok- és izolált mikrospóra eredetű tritikále növényt sikerült előállítanunk a növénynemesítés számára. Az előállított növények további felnevelése, ploidfokának vizsgálata, haploid növények kolchicin kezelése a dolgozat elkészítésének időpontja után kerül elvégzésre, így az nem képezi részét a dolgozatnak.

9. táblázat. A nyolc tritikále genotípus hatékonyságának összehasonlítása a regenerált növénykék, a kiültetett növénykék és az akklimatizálódott növények száma alapján.

Genotípus	Alkalmazott módszer	Regenerált zöld növénykék (db)	Kiültetett növénykék (db)	Akklimatizált növények (db)
13/5	portoktenyésztés	261	241	226
Rege	portoktenyésztés	185	171	160
Rege	mikrospóra tenyésztés	34	32	26
10/7	portoktenyésztés	189	169	159
10/7	mikrospóra tenyésztés	8	7	7
Szemes	portoktenyésztés	31	26	21
Tc23	portoktenyésztés	95	78	71
Tc10/1	portoktenyésztés	73	64	61
Idus	portoktenyésztés	89	79	68
Tc8	portoktenyésztés	75	55	54
Összesen	-	1040	922	853

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

5.1. Tritikále portoktenyésztés

Szakirodalomban leírt módszerek (Tu vesson és mtsai 2000, Arzani és mtsai 2001, Marciniak és mtsai 2003, Warzecha és mtsai 2005, Pratap és mtsai 2006) és tapasztalatok felhasználásával sikeresen indukáltuk az *in vitro* androgenezist tritikále portoktenyészetekben.

A portoktenyészetek létrehozásakor a portokokat félig folyékony W14F tenyésztő tápoldatra helyeztük (Pauk 2005). A portoktenyészetekben nyolc tritikále genotípus válaszóó képességét hasonlítottuk össze. A W14F tápoldat alkalmazása minden genotípus esetében sikeresnek bizonyult, minden genotípus tenyészeteiben számos embrioid fejlődött. A képződött embrioidok számában azonban jelentős különbségeket figyelhattunk meg. Munkánk során portoktenyészetben csak egy tenyésztő tápoldatot alkalmaztunk. Arzani és mtsai (2001) három különböző tenyésztő tápoldatban vizsgálták az egyes tritikále genotípusok válaszóó képességét, amely során jelentős különbségeket tapasztaltak a különböző genotípus $\times$ tápoldat interakciók megfigyelésekor. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy a tenyésztő tápoldat is meghatározhatja egy genotípus válaszóó képességét.

A genotípusok között a képződött embrioidok, a regenerált növények, a regenerált zöld növények és az albínó növények száma tekintetében szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. Az egyes genotípusok válaszóó képessége közötti különbség más kutatók publikációiban is megfigyelhető (Arzani és mtsai 2001, Marciniak és mtsai 2003, Pratap és mtsai 2006). Pratap és mtsai (2006) kísérletei során egyes tritikále genotípusok portoktenyészeteiben egyetlen kallusz sem fejlődött. Kísérletünk eredményei és más szakirodalmak adatai alapján tehát arra következtethetünk, hogy a genotípus döntően befolyásolja a portoktenyészetekben produkált válaszóó képességet, javasolt jó válaszóó képességgel rendelkező genotípusok alkalmazása.

A képződött embrioidok száma (embrioid/100 portok) más szakirodalmi adatokhoz hasonló volt (Arzani és Darvey 2001, Marciniak és mtsai 2003), a növényregenerálás során a 100 portokra eső albínó növények száma azonban egyes szakirodalmi adatoknál (Arzani és mtsai) magasabb volt.

Kísérletünk során átlagosan **10,86** darab zöld növényt tudtunk 100 portokból regenerálni, amely eredményesnek tekinthető, hiszen felülmúlja korábbi publikációk eredményét. Tu vesson és mtsai (2000) átlagosan 4,9 zöld növényt, Arzani és mtsai (2001) a legjobban szereplő tenyésztő tápoldatban átlagosan 1,9 zöld növényt, Warzecha és mtsai (2005) genotípustól függően 0,1 – 4,7 zöld növényt, Pratap és mtsai (2006) búza $\times$ tritikále hibridek esetén átlagosan 8,2, míg tritikále $\times$ tritikále hibridek esetén átlagosan 4,0 zöld növényt tudtak 100 portokból előállítani. A szakirodalomban egy-két

kiugróan magas eredményről is olvashatunk, de csak egy-egy genotípus esetében. Marciniak és mtsai (2003) egyes tritikále hibridek portoktenyészetéből magas számú (27,9 zöld növény/100 portok) zöld növényt tudtak előállítani.

Kísérleteink eredményeit tekintve mind az alkalmazott módszerek, tritikále genotípusok, mind a tenyésztő tápoldat egyaránt eredményesnek bizonyultak. Használatukat portoktenyészetekben indukált *in vitro* androgenezis indukciójára javasoljuk.

5.2. Tritikále izolált mikrospóra tenyésztés

A szakirodalomban leírt módszerek felhasználásával (Pauk és mtsai 2000, Lantos 2005) sikeresen indukáltuk az *in vitro* androgenezist tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben. Szakirodalmi adatok alapján (Monostori és mtsai 1998, Pauk és mtsai 2000) a tritikále mikrospóra tenyészetekben exogén növekedésszabályozó anyagok alkalmazása nélkül is indukáltuk az androgenezist.

A mikrospórák tenyésztése során a 190-0 és a W14mi tenyésztő tápoldatokat alkalmaztuk. A két alkalmazott tenyésztő tápoldat közül a 190-0 nem tartalmazott semmilyen növekedésszabályozó anyagot, a W14mi 0,5 mg/l 2,4-D (2,4-diklórfenoxi-ecetsav) és 0,5 mg/l kinetin kiegészítéssel készült. A 190-0 tenyésztő tápoldat sikeres alkalmazásáról számos szakirodalomban olvashatunk (Pauk és mtsai, 2000, Monostori és mtsai 2003, Lantos és mtsai 2005). A W14mi tenyésztő tápoldat alkalmazása leginkább búza mikrospóra tenyésztés esetében elterjedt. Kísérleteink során a 190-0 és a W14mi tenyésztő tápoldat alkalmazása egyaránt sikeresnek bizonyult. Mindkét tápoldat esetében közel azonos számú embrioid keletkezett, szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. A tenyészetekben az embrioidok intenzíven fejlődtek, a képződött embrioidok száma más publikációk eredményeinek megfelel (Eudes és Amundsen 2005). A mikrospóra tenyészetben képződött embrioidok regenerációs hatékonysága kevésbé mutatkozott eredményesnek, mely probléma jól ismert a nemzetközi szakirodalomból. Ez a nehézség a regenerált növények számában és albínó növények magas arányában mutatkozott meg. Az alacsony növényregenerációs hatékonyság és az albínó növények magas aránya nemcsak a mi kísérleteink során jelentkezett problémaként, más kutatók publikációiban is olvashatunk róluk (Pauk és mtsai 2000, Oleszczuk és mtsai 2004, Eudes és Amundsen 2005).

A mikrospóra tenyészetekben a 'Rege' és a '10/7'-es genotípus válaszó képességét hasonlítottuk össze. A 'Rege' mindkét tenyésztő tápoldat alkalmazása esetében eredményesebbnek mutatkozott. Az embrioidok és a regenerált zöld növények számát tekintve is hatékonyabb volt. Kísérleteink számadatai alapján arra következtethetünk, hogy mikrospóra tenyésztés esetében a genotípus döntően befolyásolja a módszer hatékonyságát. Az adott genotípus válaszó képessége pedig az embrioidok és a regenerált növények számát, tehát a növény előállítás hatékonyságát

határozza meg. Tu vesson és mtsai (2000) szerint a genotípus hatása egyértelműen befolyásolja a direkt embrioid képződésen alapuló módszerek hatékonyságát.

Az előzőekben leírtakból kiderült, hogy a mikrospóra tenyésztés egy még sok technikai fejlesztést és finomítást igénylő *in vitro* haploid növény előállítási módszer. A mikrospóra tenyésztés hatékonyságát az embrioidok regeneráló képességének növelésével és az albinizmus arányának csökkentésével tudnánk növelni, ezen problémák megoldása azonban egyenlőre a jövő kihívása marad (Bernard 1980, Sozinov és mtsai 1980, Eudes és Amundsen 2005).

5.3. A két növény előállítási módszer hatékonyságának összehasonlítása

A két módszer kísérletes összehasonlításáról szakirodalmi adatot nem találtunk. Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy a mikrospóra- és portoktenyésztés egyaránt alkalmas tritikále DH növények előállítására. A két módszer hatékonysága között azonban jelentős különbségeket tapasztalhatunk. A portoktenyésztés esetében a képződött embriók száma jelentősen kevesebb, mint mikrospóra tenyészetek esetében. A portoktenyésztés eredetű embrioidok regenerációs hatékonysága azonban sokkal jobbnak mutatkozik, tehát kisebb számú embrioidból több zöld növényt tudunk előállítani a növénynemesítés számára. A mikrospóra tenyésztés ugyanakkor ígéretes lehetőségnek mutatkozik számunkra, hiszen az embrioidok regeneráló képességének javításával és az albinizmus arányának csökkentésével jelentősen tudnánk növelni a módszer hatékonyságát. Jelenlegi ismereteink, tapasztalataink és a különböző szakirodalmi adatok birtokában tehát kijelenthetjük, hogy a portoktenyésztés ma eredményesebb módszernek bizonyul a tritikále nemesítés számára, mint az izolált mikrospóra tenyésztés. Az előzőekben leírtakra támaszkodva tritikále DH növények előállítására a portoktenyésztést javasoljuk, hiszen ez a módszer egyszerűbbnek és eredményesebbnek bizonyult.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy mindkét módszer egyaránt rendelkezik hátrányokkal és előnyökkel. Ezeket az előnyöket és hátrányokat megvilágítva lehetőségünk nyílik e módszerek céltudatos és hatékony alkalmazására, valamint speciális szakmai ismereteinket felhasználva képesek lehetünk eredményességük növelésére.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzéseinknek megfelelően sikeresen indukáltuk az *in vitro* androgenezist tritikále portok- és izolált mikrospóra tenyészetekben. A portoktenyésztés során nyolc tritikále genotípus, az izolált mikrospóra tenyésztés során pedig kettő tritikále genotípus válaszdó képességét hasonlítottuk össze.

Tritikále portoktenyészetekben egy tenyésztő tápoldat eredményességét vizsgáltuk. Az egyes genotípusok válaszdó képességét és a tápoldat eredményességét a portoktenyészetekben fejlődött embrioidok, a regenerált növények, a regenerált zöld növények és az albínó növények száma alapján hasonlítottuk össze.

Tritikále izolált mikrospóra tenyészetekben két tenyésztő tápoldat eredményességét hasonlítottuk össze. Kéttényezős variancia analízissel tanulmányoztuk a két tápoldat illetve a genotípus hatását izolált mikrospóra tenyészetben a tenyészetben fejlődött embrioidok, a regenerált növények, a regenerált zöld növények és az albínó növények száma alapján.

Munkánk fő célkitűzését megvalósítva összehasonlítottuk a tritikále portok- és izolált mikrospóra tenyésztésének hatékonyságát a tenyészetekben keletkezett embrioidok, a regenerált növények, a regenerált zöld növények és az albínó növények száma alapján.

Kísérletünk során mindkét tenyésztési módszerrel és minden genotípusban sikerült embrioidok képződését indukálni. Az embrioidok mind a portoktenyészetekben, mind az izolált mikrospóra tenyészetekben intenzíven fejlődtek. A képződött embrioidok számát tekintve nemcsak a két növény-előállítási módszer között, hanem az egyes genotípusok között is szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. Ez alapján megállapítottuk, hogy a genotípus nagyban befolyásolja a portok- és mikrospóra tenyészetekben produkált válaszdó képességet. Az izolált mikrospóra tenyészetekben jelentősen magasabb számú embrioid képződött, mint a portoktenyészetekben, az embrioidok regeneráló képességét tekintve azonban a portoktenyészet eredetű embrioidok mutatkoztak eredményesebbnek.

Munkánk során mindkét növény-előállítási módszerrel és minden genotípus tenyészeiből sikerült zöld növényeket regenerálnunk. A regenerált növények egy része azonban mind a portoktenyészetekben, mind pedig az izolált mikrospóra tenyészetekben albínó volt. A mikrospóra tenyészetekben tehát több embrioid képződött, de ezek jelentős részéből albínó növények fejlődtek. Az albinizmus aránya sokkal magasabb volt a mikrospóra tenyészetekben.

Kísérletünk során a portoktenyészetekből és az izolált mikrospóra tenyészetekből, minden genotípusból sikerült zöld növényeket előállítani. A zöld növények számát tekintve a portoktenyésztés eredményesebbnek mutatkozott, a regenerált növények jelentős részét portoktenyészet eredetű embrioidokból állítottuk elő. A megfelelően meggyökeresedett izolált mikrospóra- és portoktenyészet eredetű zöld növényeket kiültettük az üvegházba, ahol a növények jelentős része megfelelően akklimatizálódott.

Célkitűzésünknek megfelelően 853 darab akklimatizálódott portoktenyészet és izolált mikrospóra tenyészet eredetű haploid, illetve spontán DH tritikále növényt állítottunk elő a növénynemesítés számára, melyek felnevelése tovább folytatódik ezen dolgozat elkészítését követően.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a portoktenyésztés és az izolált mikrospóra tenyésztés egyaránt alkalmas volt haploid és spontán DH tritikále növények előállítására. A két módszer hatékonyságát tekintve azonban jelentős különbségeket tapasztalhattunk. A portoktenyésztés, mint (jól bevált) haploid növény-előállítási módszer alkalmas nagyszámú H/DH vonal előállítására. Az izolált mikrospóra tenyésztés főként az albinizmus magas aránya miatt pillanatnyilag nem tekinthető kellően eredményesnek, azonban a magas embrioid szám ígéretes lehetőségeket rejteget. A módszer hatékonyságának növelése egyelőre a jövő kutatóinak kihívása marad.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Antal J. (2005):** Növénytermesztés I. A növénytermesztés alapjai. Gabonafélék. Mezőgazda Kiadó, Budapest: 238-243p.
2. **Arzani, A., Darvey, N.L. (2001):** The effect of colchicine on tritcale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. *Euphytica* 122: 235-241p.
3. **Baier, A.C., Gustafson, JP (1996):** Breeding strategies for tritcale. *Triticale: today and tomorrow*, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 563-569p.
4. **Balatero, C.H., Darvey, N.L., Luckett, D.J. (1995):** Genetic analysis of anther-culture response in 6x tritcale. *Theoretical and Applied Genetics* 90 (2): 279-284p.
5. **Bernard, S. (1980):** *In vitro* androgenesis in hexaploid tritcale: determination off physical conditions increasing embryoid and green plant production. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*. 85: 308-321p.
6. **Blakeslee, A., Belling, J., Farnham, M.E., Bergner A.D. (1922):** A haploid mutant in *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647p.
7. **Bona, L., Purnhauser, L., Acs, E., Beke, B., Aniol, A., Boros, D., Cyran, M. (2002):** Yield and protein content of winter versus spring tritcale genotypes. In E. Arseniuk, ed. *Proc. 5th Int. Triticale Symp.*, Radzikow, Poland, 30 June-5 July 2002, Vol. II.: 433-438p. Radzikow, Poland, Plant Breeding and Acclimatization Institute.
8. **Charmet, G., Bernard, S. (1984):** Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid tritcale (X *Triticosecale* Wittmack). *Theoretical and Applied Genetics* 55: 308-321p.
9. **Datta, S.K. (2005):** Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science* 89 (11): 1870-1878p.
10. **Datta, S.K., Wenzel, G. (1987):** Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis of *Triticum aestivum* L. *Plant Science* 48: 49-54p.
11. **De Buyser, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R., Hespel, A. (1987):** Florin – a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding* 98 (1): 53-56p.
12. **Dubas, E., Wedzony, M., Petrovska, B., Salaj, J., and Zur, I. (2010):** Cell structural reorganization during induction of androgenesis in isolated microspore cultures of tritcale (X *Triticosecale* Wittm.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52/1: 73-86p.

13. **Dunwell, J.M., Francis, R.J., Powell, W. (1987):** Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore callus production and differentiation. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 60-64p.
14. **Eudes, F., Amundsen, E. (2005):** Isolated microspore culture of Canadian 6x triticales cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82: 233-241p.
15. **Forster, B.P., Thomas, W.T.B. (2003):** Doubled haploids in genetics mapping and genomics. In: Maluszynski M., Kasha KJ., Forster BP., Szarejko I (eds) *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/Boston/London: 367-390p.
16. **Gonzalez, J.M., Muniz, L.M., Jouve N. (2005):** Mapping of QTLs for androgenetic response based on a molecular genetic map of X *Triticosecale* Wittmack. *Genome* 48 (6): 999-1009p.
17. **Guha, S., Maheswary, S.C. (1964):** *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497p.
18. **Heszky, L., Fésüs, L., Hornok, L. (2005):** *Mezőgazdasági biotechnológia*. Agroinform Kiadó, Budapest: 146-151p.
19. **Immonen, S., Robinson, J. (2000):** Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticales anther culture. *Plant Science* 150: 77-84p.
20. **Jähne, A., Lörz, H. (1995):** Cereal microspore culture. *Plant Science* 109: 1-12p.
21. **Karsai, I., Bedő, Z., Hayes, P.M. (1994):** Effect of induction medium pH and maltose concentration on *in vitro* androgenesis of hexaploid winter triticales and wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39 (1): 49-53p.
22. **Kasha, K.J., Ziauddin, A., Cho, U.H. (1990):** Haploids in cereal improvement – anther and microspore culture, 19 th stadler genetics symp.: gene manipulation in plant improvement 2, mar. 13-15, 1989, Univ. Missouri Columbia. Mo gene manipulation in plant improvement II. – 19 th stadler genetics symposia series: 213-235p.
23. **Keller, J. (1991):** Influence of media conditioning on *in vitro* development in pollen suspensions of triticales. *Biologisches Zentralblatt* 110: 207-214p.
24. **Kristó, I. (2004):** *Növénytermesztés II. A gabonafélék termesztése (főiskolai jegyzet, Hódmezővásárhely):* 50-55p.
25. **Lantos, C., Jancsó, M., Pauk, J. (2005):** Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiologiae Plantarum* 27 (4B): 631-639p.
26. **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 Reports* 24 (12): 691-698p.

27. **Marciniak, K., Banaszsak, Z., Wedzony, M. (1998):** Effect of genotype, meddium and sugar on tritcale (X *Triticosecale* Wittmack) anther culture. *Cereal Research Communications* 26: 145-151p.
28. **Marciniak, K., Kaczmarek, Z., Adamski, T., Surma, M. (2003):** The anther-culture response of tritcale line x tester progenies. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8: 343-351p.
29. **Monostori T., Puolimatka, M., Pauk, J. (1998):** Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) in vitro androgenesis in isolated microspore culture. *Növénytermelés* 47 : 371-382.
30. **Oleszczuk, S., Rabiza-Swider, J., Zimny, J., Lukaszewski, A.J. (2011):** Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid tritcale (X *Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Reports* 30: 575-586p.
31. **Oleszczuk, S., Sowa, S., Zimny, J. (2006):** Androgenic response to preculture stress in microspore cultures in barley. *Protoplasma* 228 (1-3): 95-100p.
32. **Ouyang, J.W., Liang, H., Zhang, C., Zhao, T.H., Jia, S.E. (2004):** The effect of potato extract used as additive in anther culture medium on culture responses in *Triticum aestivum*. *Cereal Research Communications* 32 (4): 501-508p.
33. **Pauk, J., Kertész, Z., Beke, B., Bóna, L., Csósz, M., Matuz, J. (1995):** New winter-wheat variety – GK-Délibáb developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Research Communications* 23 (3): 251-256p.
34. **Pauk, J., Poulimatka, M., Lökös Tóth, K., Monostori, T. (2000):** In vitro androgenesis of tritcale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 61: 221-229.
35. **Pauk J., 2005:** Androgenesis és genetikai transzformáció különböző gabonafajokban. D.Sc dissertation, HAS, Budapest, Hungary, pp.1-138
36. **Ponitka, A., Slusarkiewicz-Jarzina, A., Wedzony, M., Marcinska, I., Wozna, J. (1999):** The influence of various in vitro culture conditions on androgenic embryo induction and plant regeneration from hexaploid tritcale (X *Triticosecale* Wittm.) anther culture. *J Applied Genetics* 40 (3): 165-170p.
37. **Pratap, A., Sing Sethi, G., Chaudhary, H.K. (2006):** Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in tritcale x wheat and tritcale x tritcale hybrids. *Euphytica* 150: 339-345p.
38. **Purnhauser, L., Gyulai, G. (1993):** Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, tritcale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35: 131-139p.

39. **Redha, A., Talaat, A. (2008):** Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92 (2): 141-146p.
40. **Rubio, S., Jouve, N., González, J.M. (2004):** Biolistic transfer of the uidA and its expression in haploid embryo-like structures in triticales. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77: 203-209
41. **Ryöppy, P.H. (1997):** Haploidy in triticales. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants, vol 4. Springer, Berlin Heidelberg: 117-131p.
42. **Salmon, D., Temelli, F., Spence, S. (2002):** Chemical composition of Western Canadian triticales varieties. In E. Arseniuk, ed. *Proc. 5th Int. Triticale Symp., Radzikow, Poland, 30 June-5 July 2002, Vol. II.*: 445-450p., Radzikow, Poland, Plant Breeding and Acclimatization Institute
43. **Sági F. (2004):** Gabonatermesztési Kutató KhT., A nyolcadik évtizedben. *Agroinform Kiadó, Szeged*: 158-160p.
44. **Schumann, G. (1990):** In vitro production of haploids in triticales. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, wheat*, vol 13. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 383-402p.
45. **Sozinov, A.A., Luk' yanyuk, S.F., Ignatova, S.A. (1980):** Induction of haploid plants of triticales by means of anther culture. *Genet, selekts i agrotekhn tritikale*: 7-20 p.
46. **Trop, A.M., Andersen, S.B. (2009):** Albinism in microspore culture, in: A. Touarev, B. P. Forster and S. M. Jain (Eds.), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Springer Science + Business Media B. V.: 155-160p.
47. **Turesson, S., Dayteg, C., Hagberg ,P., Manninen, O., Tanhuanpaa, P., Tenhola-Roininen, T., Kiviharju, E., Weyen, J., Forster, J., Schondelmaier, J., Lafferty, J., Marn, M., Fleck, A. (2007):** Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. *Euphytica* 158 (3): 305-312p.
48. **Turesson, S., Ljungberg, N., Johansson, K.E., Karlsson, L.W., Suijs, Josset, J.P. (2000):** Large-scale production of wheat and triticales doubled haploid through the use of a single-anther culture method. *Plant Breed* 119: 455-459p.
49. **Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chen, N.F. (1973):** The induction of pollen plantlets of Triticales and Capsicum annum from anther culture. *Scientia Sin.* 16: 147-151p.
50. **Warzecha, R., Sowa, S., Salak-Warzecha, K., Oleszczuk, S., Sliwinska, E., Zimny, J. (2005):** Doubled haploids in production of male sterility maintaining triticales (Triticosecale Wittmack) lines. *Acta Physiologiae Plantarum* 27 (2): 245-250p.

51. **Zhuang, J.J., Jia, X. (1983):** Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H., Vega M. R. (eds). Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science, Beijing: 431p.
52. **Zur, I., Dubas, E., Golemić, E., Szechynska-Hebda, M., Janowiak, F., Wedzony, M. (2008):** Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (X *Triticosecale* Wittm.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 94: 319-328p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Karának, hogy lehetőséget nyújtott számomra Tudományos Diákköri dolgozatom elkészítéséhez, valamint a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Osztályának, hogy biztosította dolgozatom kísérleteinek szakmai és tárgyi feltételeit.

Szeretném megköszönni Dr. Lantos Csabának és Dr. Monostori Tamásnak, hogy konzulenseimként hatékonyan segítették dolgozatom elkészítését. Külön szeretném megköszönni a sok szakmai támogatást Dr. Pauk Jánosnak.

Külön köszönet Dr. Bóna Lajosnak a kísérlet során felhasznált növényanyag biztosításáért.

Köszönet illeti még Palaticki Szilviát és Markó Ferencet a sok hasznos szakmai tanácsért és odaadó segítségükért.