

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
MEZŐGAZDASÁGI KAR
NÖVÉNYTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETVÉDELMI INTÉZET

Az őszi árpa mikrospóra-tenyésztés módszerének fejlesztése

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Készítette:

NÉMETH DZSENFER

3. évf. nappali tagozatos hallgató

Belső konzulensek:

Dr. Monostori Tamás

főiskolai tanár

Hódiné Szél Margit

főiskolai docens

Külső konzulens:

Dr. Mihály Róbert

címzetes főiskolai tanár

tudományos munkatárs

Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

HÓDMEZŐVÁSÁRHELY

2014

Tartalomjegyzék

1.Bevezetés.....	2
2.Irodalmi áttekintés.....	3
2.1 Az árpa jelentősége	3
2.2 Az árpa nemesítése.....	4
2.3 A DH növények jelentősége, felhasználása	4
2.3.1 A DH növények szerepe a nemesítésben	4
2.3.2 A DH előállítás módszerei	6
2.4 Az androgenezis indukcióját befolyásoló tényezők.....	7
2.4.1 A genotípus hatása	9
2.4.2 A donor növények felnevelése	9
2.4.3 A stresszek szerepe az androgenezis indukciójában	9
2.4.4 Alapanyag begyűjtés és a mikrospóra izolálás.....	10
2.4.5. A mikrospóra-tenyésztés és az androgenezis indukciója	9
2.5 A haploid technológia történeti áttekintése	11
2.6 A haploid árpa előállítás történeti áttekintése	12
3.Anyag és módszer	13
3.1. Növényanyag.....	13
3.2. A donor növények felnevelése	13
3.3 A donor kalászek begyűjtése és fertőtlenítése	14
3.4. A mikrospóra-izolálás	14
3.5 A mikrospóra-tenyésztés folyamata és körülményei	15
3.6 Növényregenerálás	16
4.Eredmények.....	18
4.1 Az árpa mikrospórák izolálási módszere.....	18
4.2. A genotípus hatása a sikeres tenyésztésre	20
4.2.1. A genotípus hatása az embrióhozamra	20
4.2.2. Az előkezelés során alkalmazott hőmérséklet hatása.....	24
4.2.3A hidegkezelések tartamának hatása a növények számára	26
4.3. Növénykéek előállítása mikrospóra eredetű embriókból.....	27
5.Következtetések, javaslatok	28
6. Összefoglalás.....	30
Köszönetnyilvánítás	37

1.Bevezetés

A növénynemesítésnek egyre nagyobb a szerepe napjainkban. A klímaváltozás, a népességnövekedés, valamint a folyamatosan növekvő nyersanyagárak szükségessé teszik a gyors fejlődést a biotechnológiai kutatások terén is. A nemesítőknek arra kell törekedniük, hogy minél több, jó minőségű fajta közül lehessen válogatni, melyek ellenállnak a biotikus és az abiotikus stresszeknek egyaránt.

Az új fajták előállítása nagyon időigényes, valamint igen magas költségekkel is jár. Nagy előrelépést jelentett, mikor sikerült előállítani az első doubled haploid (DH) növényeket. A DH növények hatalmas előnye, hogy egy generáció alatt jön létre homozigóta állomány. Ez, beépítve a klasszikus nemesítési folyamatba, lerövidíti egy fajta vagy hibrid szülői partnere nemesítésének idejét. Ezzel szemben egy hagyományosan előállított homogén vonal kialakítása több évet is igénybe vehet.

Egyre több növény esetében ismerünk meg új és újabb eljárásokat a DH növények létrehozására. Ezek a módszerek folyamatosan változnak, javulnak azzal a céllal, hogy minél több növényt tudjunk a nemesítők számára nyújtani. A leghatékonyabbnak az androgenezisen alapuló módszerek, a portok- és az izolált mikrospóra tenyésztés bizonyultak.

Tanulmányaim során szerencsém volt bekapcsolódni a szegedi Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Osztályán folyó kutatásba, ahol árpa (*Hordeum vulgare* L.) izolált mikrospórákból állítottunk elő haploid, illetve doubled haploid növényeket.

Célkitűzéseink:

1. Őszi árpa haploid növény-előállítás módszerének kidolgozása nemesítési alapanyagok előállítására.
2. Az izolált mikrospórák fejlettségi állapota- és a mikrospóra-sűrűség regenerált növényszámra gyakorolt hatásának értékelése.
3. Kiültetésre alkalmas őszi árpa haploidok előállítása.

2.Irodalmi áttekintés

2.1 Az árpa jelentősége

Az árpa fontos és értékes gabonafélénk, melyet alkalmazkodóképessége miatt a világ legkülönbözőbb éghajlatú országaiban termesztnek. A búza, rizs és kukorica után a negyedik legnagyobb területen termesztett gabonaféle. A Központi Statisztikai Hivatal 2012-es adatai szerint a világon az árpát 49.525.988 hektáron termesztik, a termésátlag 2,68 t/ha, az össztermése 132.886.519 tonna (KSH.hu). Magyarországon 288 ezer hektár a betakarított területe, ebből 205 ezer hektár az őszi, 83 ezer hektár tavaszi árpa. Erről a területről 1279 ezer tonna termést takarítanak be, melyből 957 ezer tonna őszi és 322 ezer tonna tavaszi árpa. A termésátlag 4450 kg/ha (KSH.hu). A rövidnyarú északi területeken kenyérgabonaként, a déli országokban főleg takarmánygabonaként, míg a mérsékelt meleg nyarú tájakon nagyrészt sörárpának termesztik.

Hazánkban az árpát többféle módon is hasznosítják: fontos nyersanyaga a sör- és malátagyártásnak, értékes abraktakarmány, főleg a sertésenyésztésben, valamint kásaként az árpagyöngy emberi fogyasztásra is alkalmas. Takarmányozási célokra főleg az őszi árpát termesztjük. A tavaszi árpát nagy részben söripari alapanyagként használjuk fel. Az árpamennyiség 60%-át malátagyártásra, a többit közvetlenül sörgyártásra használják fel (mek.oszk.hu). A tavaszi árpa takarmányozási célra is kiváló, a szalmája is alkalmas takarmányozásra, valamint az árpagyöngy is tavaszi árpából készül.

A gabonafélék közül a takarmányárpának nagy szerepe van az egygyomrú állatok takarmányozásában. Nagy nyersrost- és vitamintartalma, ízletessége, valamint a fehérjéi előnyös aminosav-összetétele miatt a sertés- és baromfitenyésztésben nélkülözhetetlen. Az őszi árpa nyersrosttartalma általában 6%, a tavaszi árpáé 4,5%, a csupasz árpáé 1,3%, de ezek az értékek fajtától függően változhatnak (tankonyvtar.hu). A nyersrosttartalom előnyösen befolyásolja a tej zsírtartalmát, a kisebb rosttartalmú árpák etetése a malacnevelés során nagy jelentőségű.

Az őszi és tavaszi árpák biológiai sajátosságai több vonatkozásban eltérnek egymástól. Az őszi árpának dús gyökérzete van és igénytelen, míg a tavaszi árpa sekélyen gyökerező, tápanyagigényes növény (agroinform.hu). Különbség még az is, hogy az őszi árpának hosszabb és durvább szára van, mint a tavaszi árpának. Ezért az őszi árpa szalmája csak almozásra való, a tavaszi árpa szalmája viszont értékes takarmányszalma (agroinform.com).

2.2 Az árpa nemesítése

Az árpanemesítés alapvető célja az árpa agronómiai tulajdonságainak és felhasználói minőségének javítása. Rövidtávú célnak tekinthetjük, például a közvetlen módon történő fajta-előállítás, amely be tud fejeződni egy nemesítési ciklus alatt. A hosszú távú programok lényegesen több időt vesznek igénybe. A cél olyan speciális tulajdonságokkal bíró típusok megteremtése, melyek a további nemesítés számára biztosítanak alapanyagot. Az árpanemesítés a már meglévő genotípusokból új, a korábbiaknál értékesebb fajtákat állít elő. Ehhez a kiindulási anyagot a hazai fajták, a saját tenyész anyagok, a külföldi fajták, a génbankok illetve a mutáns törzsek adhatják.

Az árpa tudományos alapokon nyugvó nemesítését az 1800-as évek végén Angliában kezdték el. Magyarországon elsőként a Karcagi Kutatóintézetben foglalkoztak az őszi árpa nemesítésével. Udvaros Károly itt nemesítette ki az U-259-es, előzetesen elismert fajtát (Lazányi és Puskás 2010).

2.3 A DH növények jelentősége, felhasználása

A DH növények jelentősége abban rejlik, hogy egy generáció alatt homozigóta vonal állítható elő velük. Ez, sikeresen beépítve a klasszikus nemesítési folyamatba, lerövidíti egy fajta vagy hibrid szülői partnerei nemesítésének idejét. Ezzel szemben egy hagyományosan előállított homogén vonal kialakítása több évet is igénybe vehet. Ma már a portok- és mikrospóra-tenyésztési módszerek rutinszerűen alkalmazhatók a DH vonalakkal folytatott árpanemesítésben (Kuhlmann et al. 1991, Jähne et al. 1995).

Hosszas kutatómunka eredményeként jött létre, az első portoktenyészet eredetű európai búzafajta a Florin (De Buyser et al. 1987). Magyarországon elsőként Pauk és munkatársai (1995) állítottak elő államilag elismert DH eredetű búzafajtát (GK Délibáb), de azóta számos más fajtát is létrehoztak már a DH technológia alkalmazásával (Mv Páva, GK Tündér). Sajnos egyes fajoknál a módszer alkalmazását megnehezíti az albinizmus és a genotípus függőség (Lantos 2009).

2.3.1 A DH növények szerepe a nemesítésben

A DH vonalak kiválóan használhatók tesztanyagként számos genetikai vizsgálatban, mivel a DH vonalak és populációik genetikai és nemesítési szempontból megegyeznek a természetes úton kialakuló homozigóta populációkkal (Kasha és Reinbergs 1976). Meghatározó a DH növények szerepe a géntérképezésben, valamint a nemesítésben is azáltal,

hogy az F_1 -heterozigótákból egy lépésben előállított homozigóták segítségével az öntermékenyülők vonal-előállítása és az idegentermékenyülők rekurrens szelekciója egyaránt lerövidíthető. Ez utóbbi módszer a hímsterilitásra alapozott rekurrens szelekció alkalmával az árpanemesítésben is alkalmazható (Kasha és Reinbergs 1976). Látható, hogy a DH nemesítéstől hasonló eredményt várhatunk, mint a hagyományostól, de lényegesen rövidebb idő alatt. A módszer felhasználása, a homozigótaság gyors elérése ellenére, nem váltja ki a homozigóta törzsek több termőhelyen és évjáratban való tesztelésének szükségességét. A homogén növényállomány egy generáció alatt történő előállítása mégis nagy érték, nagy segítség a gyakorlati nemesítői munkában.

A DH technológia egyik fontos alkalmazási területe még a térképező populációk létrehozása. Azok a gének és kromoszóma régiók jól azonosíthatók a DH növények segítségével, melyek a termesztésre hatással vannak (Datta 2005).

A genetikai transzformációk szempontjából is fontosak a DH növények. Egy hatékony haploid sejt- és szövettenyésztési rendszerbe integrálva a genetikai transzformációt, egy lépésben fixálható a bejuttatott transzgén homozigóta formában (Dudits és Heszky 2000).

A DH növények előállítása ma is nagyon fontos eljárás, melyet a növényeszaporításban és a növényélettani kutatásokban is alkalmaznak. Bár a DH-k előállítása jól működik a búzánál, kukoricánál, rozsnál, burgonyánál, káposztánál (Tuvešson 2007) és az árpánál, de a zabnál ez még nehéz feladat. Több kutató is dolgozik az eljárás fejlesztésén, valamint azon, hogy a létrehozott DH növények termékenyek is legyenek. A zabról köztudott, hogy egyike a legnehezebben kezelhető növényfajoknak a haploidok indukcióját tekintve (Sidhu et al. 2006, Kiviharju 1997, Marcinska et al. 2013).

Az androgenezis indukcióján alapuló módszerek fejlesztése közben számos növényi szaporodásbiológiai felfedezés született, illetve a növényi szaporodásbiológiai eredmények sok esetben áttörő hatékonyságbeli fejlődéshez vezettek a DH növény-előállítás terén.

Ahogy az 1. táblázatban is láthatjuk, a Saaten-Union kutatólaborjában is sikeresen alkalmazták a fenti módszereket (Tuvešson et al. 2007).

1. táblázat: Staaten-Union éves DH növény produkciója

Gabona	DH vonalak száma	Módszer
ősz és tavaszi árpa	85000	portokkultúra
ősz és tavaszi repce	25000	mikrospóra kultúra
ősz és tavaszi búza	15000	kukorica beporzás

2.3.2 A DH előállítás módszerei

Haploid növényeket előállíthatunk *in vivo* illetve *in vitro* módszerekkel egyaránt.

Az *in vivo* módszerek között a legegyszerűbbnek a spontán haploidok azonosítását tekinthetjük. Sajnos, ez a módszer csupán néhány növényfajnál működik, leginkább a repce alkalmas erre. Másik módszer a parthenogenezis, mely leginkább burgonyánál alkalmazható sikeresen. Az apomixis általában a fű-, főleg *Poa* fajoknál hatékony módszer. Az első, markergénes, keresztezéssel indukált haploid kukoricáról Chase publikált (1952).

Árpanemesítésben a „Bulbosum technika” az, amely széleskörűen használható. A módszer lényege egy vad fajjal, a *Hordeum bulbosum*-mal történő keresztezés, melyet követően a *H. bulbosum* kromoszómái eliminálódnak. Hátránya, hogy csak a *Hordeum* nemzetségben használható sikeresen. Szintén kromoszóma-elimináción alapuló módszer, a búza kukorica pollennel való megporzása, mellyel jó arányban állíthatunk elő haploidokat.

Búzában az *in vitro* portoktenyésztéssel való haploid-előállítást a világon elsőként két kínai kutató publikálta (Ouyang et al. 1973, Wang et al. 1973). Őket két francia tudós, Picard és De Buyser követte (1973). Ezt a módszert a szegedi Gabonatermesztési Kutató Intézetben 1984-től alkalmazzák széleskörűen, leginkább homozigóta búzatörzsek előállítására. Az első magyar DH búzafajtát is itt sikerült kinemesíteni, amely GK Délibáb néven került minősítésre 1992-ben.

A mikrospóra- és portoktenyésztési eljárások az utóbbi évtizedekben nagy fejlődésen mentek át. A búzán kívül számos növényben alkalmazhatók ezek a módszerek.

A portoktenyésztés lényege, hogy a virágokból, steril körülmények között, éretlen pollent tartalmazó portokokat izolálnak, majd ezeket továbbnevelik táptalajon, *in vitro* körülmények között. Az androgenezissel létrejött haploid embriókból a növényeket regeneráló táptalajon nevelik fel. Széles körben alkalmazzák DH fajták, vonalak előállítására búzában, tritikáléban, árpában, rizsben (Lantos 2009).

A mikrospórák tenyésztése a portokokból izolálva, folyékony tápoldatban történik. A regeneráció a portoktenyésztéshez hasonlóan történik. A módszer előnye, hogy az embriók (és a növények) minden kétséget kizáróan egyetlen haploid sejtből származnak, így különösen alkalmas a genetikai transzformációban történő alkalmazásra. DH fajták előállítására elsősorban a repcenemesítésben használják (Monostori 2004).

A mikrospóra izolálás előnyei a portoktenyésztéssel szemben:

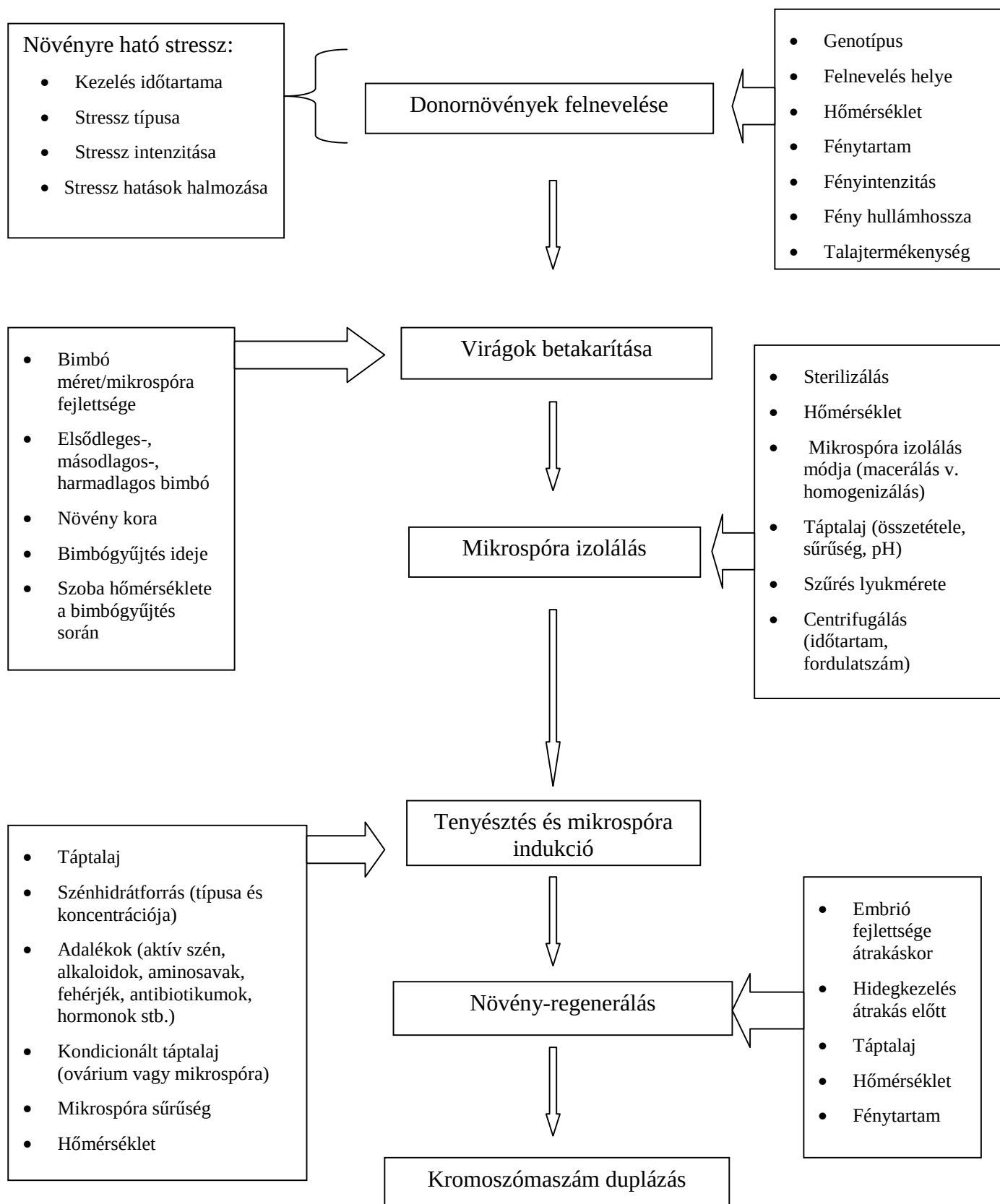
1. Izolált mikrospóra-tenyészetben szomatikus sejtek és szövetek nélkül indukálódnak a mikrospórák, így nem kell más sejtek és szövetek indukciójával számolni (Oleszczuk et al. 2004).
2. A mikrospóra-tenyésztés (mikrospóra embriogenezis) folyamata könnyebben tanulmányozható izolált sejtek tenyésztésében, mint portoktenyésztésben (Indrianto et al. 2001).
3. Az izolált mikrospóra tenyészetben végzett sejtszintű megfigyelések segítik a sejtenyésztési körülmények további fejlesztését (Kim et al. 2008).
4. Lehetőséget ad krioprezervált, és hosszú ideig tárolt pollenből növények regenerálására (Dudits és Heszky 2000).

Lehetővé válhat a mikrospórák szelekciója, tehát a szelekció haploid szinten, mely korai fázisában is biztosítja a működő génekre történő szelekció lehetőségét (Dudits és Heszky 2000).

2.4 Az androgenezis indukcióját befolyásoló tényezők

A mikrospóra tenyésztés sikeres kivitelezése elméletileg nehezebb feladat, mintha portoktenyésztést csinálnánk, mivel a portoktenyésztésnél a portok fala védelmet nyújt a mikrospórák számára. A portokból kiszabadult mikrospórákat a saját sejtfalukon kívül semmi sem védi környezeti hatásokkal szemben, tehát fontos az optimális környezet kialakítása, ha sikeres tenyésztet akarunk létrehozni (Dudits és Heszky 2000).

A kutatók számos hatásról számoltak be, melyek befolyásolják az izolálás és a haploid indukció sikerességét. Ezek a faktorok nagyban függenek a növény fajtól, ami azt jelenti, hogy a DH előállítás menetét optimalizálni kell az egyes fajokra. Ezek a hatások lehetnek fizikai, kémiai és biológiai eredetűek. Fontos tudni, hogy különböző időpontokban más és más hatások befolyásolják a sikeres növény-előállítását. A módszert e szempont alapján 5 részre oszthatjuk: donornövény felnevelése, virágok szedése, mikrospóra izolálás, tenyésztés és androgenezis indukciója, embrió- és növény regeneráció (Ferrie és Caswell 2010) (1. ábra).



1. ábra: A mikrospóra izoláció sikerességét befolyásoló tényezők
(Ferrie és Caswell 2010 nyomán)

2.4.1 A genotípus hatása

A genotípus az egyik legfontosabb befolyásoló tényező, mivel az egyes genotípusok eltérő mértékben alkalmasak a folyamatra. Az egyes genotípusok válaszó képessége legtöbb növényfaj esetén alapvetően meghatározza a DH növény előállítás hatékonyságát. Jó példának szolgál a rizs: a *japonica* típus jobb válaszó, mint az *indica* típus. A válaszó képességért felelős gének átvitelével is javítható a DH módszerre épülő nemesítési program hatékonysága (Lantos 2009). Egy jól kidolgozott haploid indukciós rendszer szélesebb genetikai háttér esetében is képes jelentős DH növény előállítására, így a módszer nemesítési jelentősége növekedhet.

2.4.2 A donor növények felnevelése

A sikeres mikrspóra-tenyésztéshez nélkülözhetetlen az egészséges, kártevőmentes donornövény. Ennek biztosítása érdekében ez a munkaszakasz kívánja a legtöbb figyelmet, mivel ha itt valami probléma lép fel, az kihat az egész kísérletre.

A növényeket szabadföldön, üvegházban és fitotronban nevelhetjük. A fitotronban a hatékonyságot befolyásoló tényezők kontrollálhatók (hőmérséklet, páratartalom, megvilágítás hossza és intenzitása). El tudjuk szigetelni az állományt a külső környezettől, ezáltal csökken a fertőzések esélye.

A hőmérséklet nagyon fontos környezeti tényező a felnevelés során. Az őszi árpát kezdetben 15 °C-on nevelik, majd ezt a hőmérsékletet 12 °C-ra csökkentik. A tavaszi árpát kezdetben 18 °C-on nevelik, majd ezt a hőmérsékletet 15 °C-ra csökkentik (Kasha et al. 2003). Ezzel lassul a növény növekedése és megnyújtja az első és utolsó virág megjelenése közti időszakot, amivel lehetővé válik az optimális fejlettségnél való szedése. E mellett az alacsony hőmérséklet növeli az androgenezis indukciójának sikerességét.

2.4.3 A stresszek szerepe az androgenezis indukciójában

Az androgenezis indukciójához fontos, hogy a donornövényeket különböző stressz-kezeléseknek vessék alá, amivel nem csak az embriogén mikrspórák, hanem a DH növények száma is növelhető. Ezek a stresszek különbözők lehetnek.

Ma a legelterjedtebb módszer a növények hidegkezelése. Tudósok szerint hideg hatására a mikrspórák metabolizmusa lassul. Ezzel azt érzük el, hogy a mikrspórák mitotikus osztódása egyszerre történik *in vitro* körülmények között magasabb (25-32 °C) hőmérsékleten (Zheng 2003). Más kutatók szerint az éheztetés jobb hatásokkal alkalmazható

módszer (Kasha et al. 1990). A kettő kombinációja adta a legjobb eredményeket Hu és Kasha (1999) kísérletei során.

2.4.4 Alapanyag begyűjtés és a mikrospóra izolálás

A kalászok begyűjtésének időpontja meghatározó. Akkor kell elvégezni, mikor a mikrospórák elérték az egy- vagy korai két-sejtmagvas állapotot, mivel ilyenkor található meg a portokokban a legtöbb indukálható mikrospóra. A mikrospórák fejlettségét citológiai analízissel lehet ellenőrizni, mely során acetokarminos festést alkalmaznak. Az izolálás előtt nagyon fontos a kalászok sterilizése a fertőző gombák és baktériumok elpusztítása, ami hypó 50%-os oldatával és/vagy 70%-os etilalkohollal oldható meg (Dudits és Heszky 2000).

A mikrospórák kinyerése négyféle módon történhet: a kiszóródott mikrospórák összegyűjtése, a mágneses keverés, a macerálás és a késes homogenizálás. Csak az utolsó kettő számít valódi izolálásnak (Dudits és Heszky 2000).

A macerálás során műanyag szűrőhálón üvegbot segítségével a kalászkákat vagy a portokokat szétdörzsöljük, és így nyerünk nagy mennyiségű mikrospórát (Tuveesson és Öhlund 1993). A késes homogenizálás során, ugyanakkor, egy steril turmixgép segítségével homogenizáljuk a generatív szerveket és így nyerjük a mikrospórákat (Mejza et al. 1993). Ez a módszer azért előnyösebb, mivel nagy mennyiségű mikrospóra nyerhető, de sajnos sok mikrospóra el is pusztul a gyorsan forgó kések miatt. Ezért kis mennyiségű izolációs alapanyag esetén sokkal hatékonyabb a macerálás, mivel ez a módszer ronthatja az izolálás hatékonyságát.

2.4.5. A mikrospóra-tenyésztés és az androgenezis indukciója

A mikrospórák fejlődésére az indukció időszakában legjelentősebb hatással a táptalaj összetétele bír (Murashige és Skoog 1962). Ezen összetevők a makro és mikroelemek, vitaminok, aminosavak, szénforrás, hormonok és antibiotikumok. Számos fajnál a tápoldatban a maltóz alkalmazása kedvezőbb eredményeket hozott az embriószám tekintetében, mint a szacharóz, így van ez árpánál is. Az általunk használt N24 táptalaj, szacharóz helyett szintén maltózt tartalmaz.

A növényi növekedés szabályozó anyagok – (hormonok) – táptalajban való használatáról a vélemények nem egyöntetűek. Találunk hormontartalmú és hormonmentes táptalajokra is utalást a szakirodalomban. A mi kísérletünk sem hormonmentes táptalajok felhasználásával folyt. A hormontartalmú táptalajok esetében pedig nincs általános megegyezés a hormonok kombinációjára és mennyiségére. A leggyakrabban alkalmazott

hormonok a 2,4-D, a kinetin és a fenil-ecetsav (Tuvešson és Öhlund 1993; Hu és Kasha 1997).

2.5 A haploid technológia történeti áttekintése

Az első haploid növény megjelenése az 1900-as évek elejére nyúlik vissza. Blakeslee és mtsai (1922) *Datura stramonium* L. növényeknél írták le az első természetben előforduló haploid növényt. Az első *in vitro* mikrspóra eredetű növényeket *Datura inoxia* L. portoktenyészetéből állították elő (Guha és Maheswary 1964). 1977-ben Nitschnek különböző *Nicotiana* fajok esetében sikerült haploid növényeket előállítania (Dudits és Heszky 2000). Az általuk kifejlesztett módszer alapján már több mint 150 növényfajnál sikerült haploidokat előállítani a kutatóknak (Maheswary et al. 1980).

Napjainkban már több mint kétszázötven növényfajnál jártak sikerrel a kutatók az *in vitro* körülmények közötti haploid előállítással (Maluszínski et al. 2003). Sajnos nem mindegyik faj esetében lehet sikerrel alkalmazni a haploid technológiát, de szép számmal találunk példát a nemesítési és kutatási célra való felhasználásra (Thomas et al. 2003).

A célzott sejt(ek) alapján lehet a pollenből (portoktenyésztés, úsztatott portoktenyésztés és izolált mikrspóra tenyésztés) és a petesejtből (ovárium tenyésztés, ovulum tenyésztés, petesejtenyésztés és távoli fajkeresztelés) DH növényeket előállítani.

Vannak fajok, melyeknél nem csak az *in vitro*, hanem az *in vivo* módszer alkalmazása is jelentős, ilyen például a kukorica (Röber et al. 2005). A búza kukorica pollennel való megporzása távoli fajkeresztelésnek számít, de a búzanemesítés során ma is alkalmazott technológia (Laurie és Bennett, 1988; Thomas et al., 2003). A távoli fajkeresztelés nagy hátránya, hogy nem csak a megporzandó növény, hanem a pollenadó genotípusa is hatással van a módszer sikerességére (Verma et al. 1999). Az izolált mikrspóra tenyésztés egyes növények esetében hatékonyabb eljárás lett, mint a portoktenyésztés - ilyen például az árpa és a repce is (Lantos 2009).

Természetes körülmények között a mikrsporák gametofita fejlődési útja determinált. Az androgenezis indukciójához ezt a fejlődési utat valahogyan meg kell szakítani, és szükséges feltételeket kell biztosítani (Dudits és Heszky, 2000). A mikrsporák egysejtmagvas-vakuólumos, valamint korai kétsejtmagvas állapota látszik optimálisnak az androgenezis indukciójára (Reynolds, 1997)..

Ezekből a megfigyelésekből kiindulva vizsgálatokat kezdtek és sikeresen felállították a pollendimorfizmus elméletét. A pollendimorfizmus magyarázatot ad a kisszámú indukálható mikrspórára. Ezen elmélet szerint csak azok a mikrsporák indukálhatók, amelyeknek a

fejlődése a portokban "hibás" volt. Ezek a mikrospórák kicsik, kevés és nehezen festődő citoplazmával rendelkeznek, emellett pedig fejlődésük során keményítő nem, vagy alig halmozódik fel bennük. Ez alapján tehát feltételezhetjük, hogy a portokokban csak kevés számú mikrospóra alkalmas az indukcióra, ezeket P vagy S pollenek nevezzük (Dudits és Heszky 2000). Heberle-Bors és Reinert (1980) vizsgálatuk során megfigyelték, hogy míg hosszúnappalos kezelés során csak 1% volt a P pollenek száma, addig a rövidnappalos megvilágítás alkalmazása révén ez már elérte a 10%-ot.

2.6 A haploid árpa előállítás történeti áttekintése

Árpában az első haploid eredményeket Clapham (1973) érte el. Ő elsőként számolt be az árpa portoktenyésztéséről, melyben leírta az ammónium-nitrát koncentráció egytizedre való csökkentésének a portokválaszra gyakorolt pozitív hatását. Később a hatékonyságot jelentősen javító tudományos eredmények születtek meg. Ezek közül a legjelentősebbek a genotípus-elemzés (Foroughi-Wehr és Friedt 1984), a donor növények előnevelési feltételei (Foroughi-Wehr és Friedt 1984), a kalászkok hideg előkezelése (Huang és Sunderland 1982), a leoltott portok - táptalaj helyes arányának meghatározása (Xu és Sunderland 1981), illetve a táptalaj kondicionálás meghatározása (Xu és Sunderland 1982).

Az androgenetikus haploid regeneránsok között nagy számban jöttek létre albínó növények (Day és Ellis 1985). Ez az árpában is problémát jelentett, így az árpa haploidok előállításában a bulbosum-módszer illetve az ikerembrió elemzés, valamint az alloplazmás technika terjedt el (Devaux 1990) korábban.

Kawakami (1967) az árpában 0,032%-ban talált ikerembriót, melyek közül diploid-diploid, diploid-triploid és csak nagyon kis gyakorisággal fordultak elő haploid-diploid ikerembriók, melyek közül haploidokat lehetett szelektálni (Trione és Stockwell 1989).

Számos, a haploidok indukciójában szerepet játszó gént, illetve markert sikerült térképezni. Több androgenetikusan aktív RFL lókuszt azonosítottak a 2H és a 4H kromoszómán, a hajtás-differencilódásért felelős *hd1*-gént a 2H kromoszómán lokalizálták (Komatsuda et al. 1995).

A technikák fejlődésével közel 20 haploid, illetve DH-eredetű árpa fajtát minősítettek (Devaux 1992), közöttük árpa mozaik vírusra rezisztens fajtát is (Foroughi-Wehr és Friedt 1984).

Napjainkig haploid technika felhasználásával spárga, árpa, *Brassica juncea*, padlizsán, repce, rizs, sárgadinnye, paprika, dohány, tritikále, búza fajokban több mint 290 fajtát állítottak már elő (<http://www.scri.ac.uk/assoc/COST851/Default.html>).

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

Kísérletünkhöz leggyakrabban egy német, 2 soros őszi árpa fajtát, az Igrit használtuk, mivel irodalmi adatok alapján (Yao et al. 1997) a mikrospóra-tenyészetekben mutatott válaszdó képességére nézve igen jónak bizonyult.

Az Igrit mellett felhasznált genotípusok a H3673, H3680, H3691, H3692, H5253,, H5255, H5257, H5259 nemesítői jelzésű, F₁ és F₂ generációjú nemesítési törzsek növényei voltak.

3.2. A donor növények felnevelése

A donor növények felnevelése történhet szántóföldi vagy üvegházi körülmények között, a körülmények függvényében. Mivel az üvegházi alapanyag szinte egész évben a kutató rendelkezésére áll, így folyamatosan végezhetők a kísérletek.

A szakirodalmi adatok (Kasha, Simion, Oro, Yao, Hu, Carlson 2001) alapján tudjuk, hogy a donor növények felnevelésének körülményei döntően befolyásolják a tenyésztés hatékonyságát.

A donor növényeket üvegházban neveltük, 60-80%-os relatív páratartalom mellett. Az őszi árpát 15/12 °C-on neveltük 16-17 órás megvilágítással. Fontos, hogy óvatosan öntözzük, kerüljük a stressz hatásokat. Azok a növények, melyeket stressz éri a nevelés során, gyakran nem alkalmasak a mikrospóra tenyésztésre.

A növények egészségi állapotát folyamatosan figyelemmel követtük, mivel a növényvédő szerek használata kedvezőtlenül befolyásolhatja a mikrospórák életképességét. A károsítók és különböző betegségek megtelepedése a növényen szintén ronthatja a donorként használt növényeink mennyiségét és minőségét. Az esetleges levéltetű fertőzés esetén el kell távolítani a fertőzött levelet, vagy súlyosabb esetben az egész növényt a többi növény védelme érdekében. A növények víz-utánpótlását csapvízzel oldottuk meg, a tápanyagok a talajba előzetesen bekeverésre kerültek, így biztosítottuk a növény számára fontos tápanyagokat. Az öntözés gyakoriságát a talaj nedvességtartalmához igazítottuk, így tartani lehetett az előbbieken leírt páratartalmat. Közvetlenül a donor kalászok begyűjtése előtt kerültük a permetezést.

3.3 A donor kalászok begyűjtése és fertőtlenítése

A kalászok begyűjtését a megfelelő fejlődési stádiumban kell elvégezni. Erre a legalkalmasabb idő az, mikor a mikrospórák a korai egy-sejtmagvas állapotban vannak. A korai egy-sejtmagvas állapotban a sejtmag a pórus közelében van, majd a kései egy-sejtmagvas állapothoz közeledve egyre távolodik a sejtmag a pórustól.

A 15-20 cm-es szárral begyűjtött donor kalászokat vízbe állítottuk, majd hidegkamrában 4 °C-on 8-27 napig tároltuk, míg a megfelelő mennyiségű össze nem gyűlt.

A kiválogatott kalászokat felületi sterilizálásban részesítettük. A sterilizést 70%-os etil-alkohollal vagy 50%-os hypó oldattal lehet végezni. Mi a kísérleteinkhez háztartási hypót használtunk és 2 csepp Tween 20 nedvesítőszer isadtunk az oldathoz. A kalászokat kiszedtük a levélhüvelyből, a szálkákat eltávolítottuk a kalászkőről, ezután öntöttük rá a hypó oldatot. A kalászokat az oldatban 20 percig rázóasztalon ráztuk, kb 120-140 rpm fordulatszámon. A sterilizést háromszoros, steril vizes öblítés követte. A sterilizés után steril fülkében folytattuk a munkánkat. A sterilizált kalászokat Petri csészébe raktuk, melybe 15 ml jégen hűtött 0,3 M mannitol került. A 0,3 M mannitolnak a kalászt félig kell ellepnie. A Petri csészét parafilmmel lezártuk, majd hűtőszekrényben tároltuk 3-5 napig 4 °C-on.

A mikrospóra izolálás során felhasznált eszközöket és a tápoldatokat hűtőben (4 °C) tároltuk. A mikrospóra izoláláshoz használt centrifuga hőmérsékletét 4 °C-ra állítottuk be.

3.4. A mikrospóra-izolálás

Az izoláláshoz steril fülke szükséges. Első lépésként minden eszközt sterilizálnunk kell, a fertőzések elkerülése érdekében. Az előkezelt kalászokat csipesszel és ollóval 2-3 centis darabokra vágva helyeztük a blenderba (2.ábra).

A 2 soros árpából kb 10 darabot, a 6 sorosból kb 4 darabot vágunk. Jéghideg mannitollal (0,3 M) töltöttük meg a Waring Microblendor tartályát, míg el nem lepte a kalászokat. A kalászokat alacsony fordulatszámon 6-10 másodpercig turmixoltuk. A kalászzúzalék alkotta pelletet egy 100 µm-es szűrővel ellátott steril pohár felületén dörzsöltük szét lapos végű üvegbottal. A szétdörzsölt anyagot 2-3 alkalommal 0,3 M mannitollal öblítettük át. A szűrőn átjutott szuszpenziót a nagyobb méretű szövetdarabok eltávolítása céljából még egyszer megszűrtük egy 80 µm-es szűrőn. A szuszpenziót átpipettáztuk a centrifuga csövekbe melyekben 5 percig centrifugáltuk 900 rpm-en.



2. ábra: A Waring Blendor

A pelletről pipettával eltávolítottuk a felülúszót. Körülbelül 0,15 ml pellet 500 000 árpa mikropórát tartalmaz. Ezt hideg 0.3 M mannitollal a centrifugacső kb. feléig felöntöttük, majd ugyanennyi 21%-os maltózt adtunk hozzá, amit ismét centrifugálás követett. A centrifugálás végén a mannitol és a maltóz határán helyezkedtek el az életképes mikropórák. Mivel a különböző frakciók csíkokat képezve válnak szét - alul a mannitol, felül a maltóz és középen a mikropórák - ezt sűrűség-grádiens centrifugázási lépést „csíkozásnak” is szokás nevezni. Az életképes mikropórák pipettával történő óvatos leszívását a sejtsűrűség beállítása követte 40.000, illetve 20.000 mikropóra/ml-re. Az így kapott sejtsuszpenziót szétoztottuk Petri-csészékbe. A Petri-csészékbe került még 200 mg/l cefotaxime antibiotikum is, a fertőzések elkerülése érdekében. Az indukciós táptalaj N24BA volt.

3.5 A mikropóra-tenyésztés folyamata és körülményei

Az egyik megoldás, ha 2 darab steril szűrőpapírt teszünk egy szilárd N24BA táptalajt tartalmazó Petri-csészébe, majd 0,3 M mannitollal vagy N24BA tápoldattal benedvesítjük. Ezután 1-2 ml mikropóra szuszpenziót cseppentünk a papírra, majd 2 réteg parafilmmel zárjuk a Petri csészét.

Másik módszer a folyékony táptalajon való tenyésztés. Ilyenkor a folyékony N24BA táptalajt a mikropóra szuszpenzióhoz adjuk, majd az oldatot a Petri-csészébe pipetázzuk.

A tenyésztés 25-28 °C-on zajlik sötétben, maximálisan 6-10 hétig. Ha esetleg a papírból a tápanyag elfogyna, folyékony N24BA tápoldattal pótolhatjuk. Az indukciós táptalaj 2. táblázatban bemutatott N24BA volt (Mordhorst és Lörz 1993).

2. táblázat: Az N24BA indukciós táptalaj komponensei

Komponens	N24BA
Makroelemek	(mgL⁻¹)
NH ₄ Cl	144
KNO ₃	2457
CaCl ₂ x 2H ₂ O	450
MgSO ₄ X 7H ₂ O	350
KH ₂ PO ₄	200
Na ₂ EDTA	37
FeSO ₄ X 7H ₂ O	28
Mikroelemek (mgL⁻¹)	
MnSO ₄ x H ₂ O	25,00
ZnSO ₄ x H ₂ O	7,50
H ₃ BO ₃	5,00
KI	0,75
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSo4 x 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Egyebek	
MyoInozitol	100
Nikotinsav	1
PyridoxinHCl	1
ThiaminHCl	10
BAP	1
Glutamin	222
Maltóz	50000

3.6 Növényregenerálás

A 3. napon már megfigyelhetőek voltak a sejtosztódás fázisai. Hamarosan megjelentek az első mikrokolóniák is. Amikor a megjelent embriók elérték az 1-2 mm-es nagyságot, a legerősebbeket átraktuk 3. táblázatban látható MS regeneráló táptalajra, és vártuk, míg a hajtás és a gyökér megjelenik. A kisebbek még egy ideig maradhattak az indukciós táptalajon, a szűrőpapírt újabb táptalaj cseppekkel frissítettük. A regeneráló táptalajra helyezett embriókat 3-4 napig sötétben tartottuk, majd fényre helyeztük. 8 óra enyhe fény és 22-25 °C a legoptimálisabb ilyenkor.

A folyamatosan fejlődő embriókat átraktuk új Petri-csészékbe. Fontos, hogy ilyenkor az albínókat növénykéket eltávolítsuk, hogy csak a megfelelő, szép zöldek kerüljenek át az új Petri-csészékbe. A kis növénykéket üvegcsövekben lévő szilárd táptalajra (MS) helyeztük. A kétféle regeneráló táptalaj összetételét a 3. táblázat mutatja. Ezután a tenyészsobában neveltük tovább a növénykéket. A megerősödött növényeket üvegházba vagy a tenyészkertbe ültettük ki. Ezt 8 hét vernalizáció követte 3-5 °C-on.

Eredményeink értékelésére az egytényezős varianciaanalízist alkalmaztuk, az SPSS 18.0 programcsomag felhasználásával (Sajtos és Mitev 2007).

3. táblázat: A regeneráló táptalajok összetétele

Komponensek	MS (mg/l)	MMS (mg/l)
Makroelemek		
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
KH ₂ PO ₄	170	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	440
Mikroelemek		
FeNa ₂ · x EDTA	37.3	37.3
MnSO ₄ · 5H ₂ O	22.3	22.3
H ₃ BO ₃	6.3	6.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25
KI	0.83	0.83
Egyebek		
Glutamin	146	750
Inositol	100	100
Tiamin	0.1	0.4
Maltóz	-	60.0 g
Fenil ecetsav	-	10.0 mg
BAP	1.0	1.0
Piridoxin	0.5	-
Nikotinsav	0.5	-
Phytigel	3.0 g	-
Szacharóz	30.0 g	-

4.Eredmények

4.1 Az árpa mikrospórák izolálási módszere

Dolgozatom fontos célkitűzése volt az árpa mikrospóra tenyésztés módszerének fejlesztése. Ezért a módszerünket az anyag és módszer fejezetben vázlatosan, az eredmények bemutatásakor részleteiben mutatjuk be. A kapott eredményeken kívül fontosnak tartjuk a komplett mikrospóra-izolálási eljárás adaptálását is a laborunkba. Változtatásokat hajtottunk végre az egyes szakirodalmakban bemutatott protokollhoz képest, így is segítve azt, hogy a laborunkban rutin módszerré alakuljon az árpa mikrospóra tenyésztése.

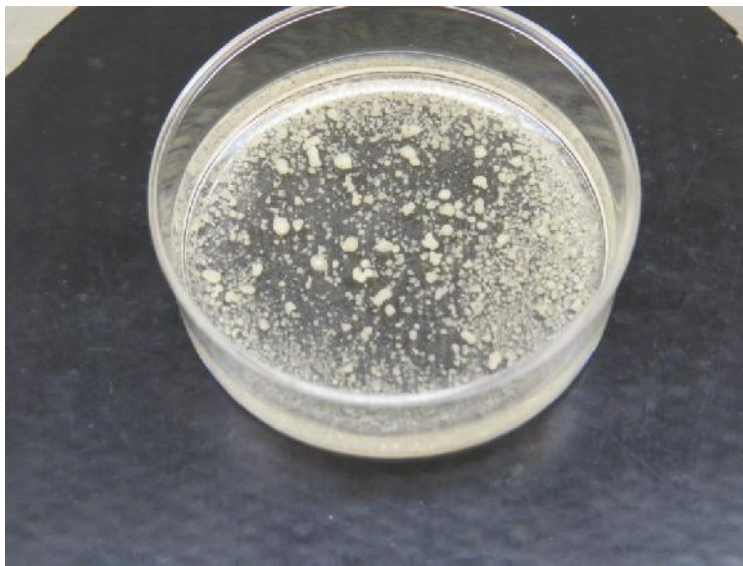
A donornövényeket mesterséges körülmények között neveltük fel. Az őszi árpát kezdetben 15 °C-on neveltük, majd ezt a hőmérsékletet 12 °C-ra csökkentettük. Amint megjelentek az első megfelelő fejlődési stádiumú (korai egy-sejtmagvas) mikrospórákat tartalmazó kalászkok, elkezdtük a begyűjtést. A növényanyagot hideg kamrába helyeztük 8-27 napra. Ezt követően a kalászkokat hypós oldattal sterilizáltuk, utána desztillált vizes öblítés következett. A kalászkokat 0,3 mannitolra helyeztük 3-5 napra. Ez idő alatt vagy a 4 °C-os hűtőben vagy a 26 °C-os termosztátban voltak. A mannitolos kezelés után Blendorral daráltuk le a kalászkokat. Műanyag szűrőkön dörzsöltük át a kapott anyagot, majd a sűrűség-grádiens alapú „csíkozás” segítségével választottuk el a megfelelő mikrospórákat a törmelékektől. Mint ahogy az 3. ábra is mutatja, többnyire szép csíkok születtek. A törmelékek a kéncsővek aljára ülepedtek le.



3. ábra: A sűrűség-grádiens „csíkozás” eredménye

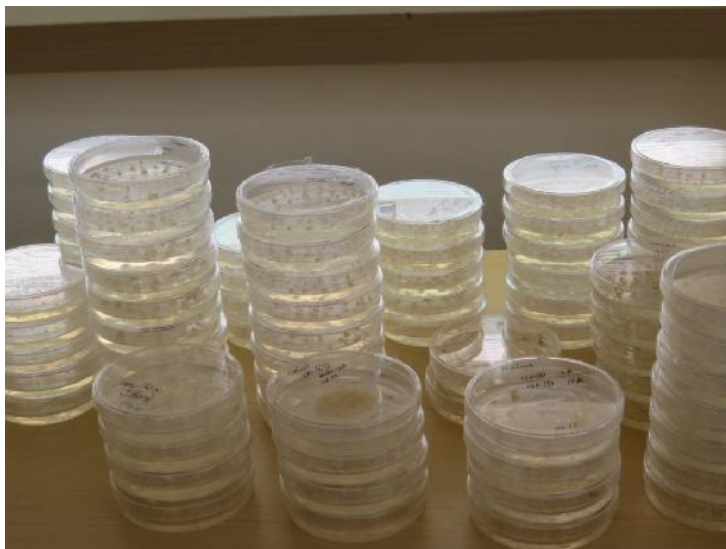
Az izolálás során N24BA indukciós tápoldatot használtunk. A mikrospóra-sűrűséget beállítottuk, majd Petri-csészékbe helyeztük a kultúrákat. A Petri-csészékbe cefotaxime antibiotikumot adagoltunk.

A mikrospórák nevelése sötétben történt, a termosztátban 25-28°C volt beállítva 3-4 hétig. Ha szükséges volt, a táptalajt pótolni kellett ez alatt az idő alatt. Mint ahogy a 4. ábrán is látható a Petri csészékben szép számmal jelentek meg az embriók.



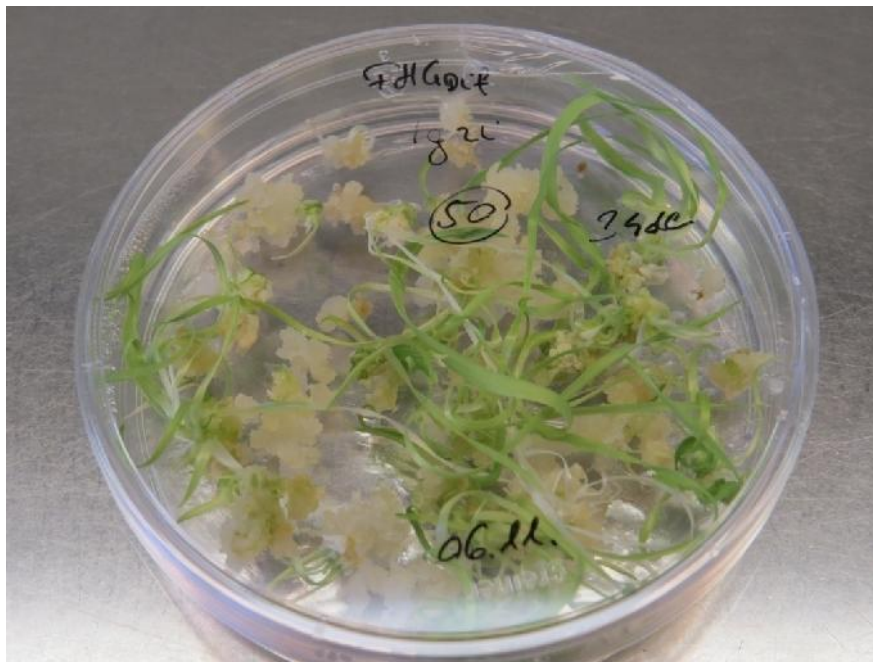
4. ábra: Az első megjelenő embriók

Az embriók, elérve az 1-2 mm-es nagyságot friss MS regeneráló táptalajra kerültek át (5. ábra). A nevelés még 3-4 napig a sötétben folytatódott, majd alacsony fényintenzitásnál 22 °C-on.



5. ábra: A friss táptalajra átpakolt embriók

A 3-4 cm-es növénykéket regeneráló táptalajra helyeztük át (6. ábra).



6. ábra: A 3-4 cm-es zöld növénykék

4.2. A genotípus hatása a sikeres tenyésztésre

Kísérleteink során az egyes genotípusok hatását vizsgáltuk az embrió- és a növényszámra vonatkozóan. Nyolc különböző genotípusú kalászból izoláltunk mikrospórát. A mintákat azonos körülmények között tartottuk és ugyanazoknak a kezeléseknak vetettük alá. Összességében 74 mikrospóra tenyésztést végeztünk el, ebből 37 Petri csészébe került az Igrin, további 37-be a nemesítési anyagok.

4.2.1. A genotípus hatása az embrióhozamra

Az Igrinél összesen mintegy 295 kalászt használtunk fel, melyekből 1577 zöld és 257 albínó növényt kaptunk. Az egyéb nemesítési anyagoknál 128 kalással végeztük a kísérletet. Ebből a 128 kalászból 602 zöld és 324 albínó növényt kaptunk (4. táblázat). A kísérletünkhöz felhasznált 8 genotípust az 5. táblázat is szemlélteti.

4. táblázat: A felhasznált kalászkok és a belőlük létrejövő zöld növények száma

	IGRI	NEMESÍTÉSI ANYAG
KALÁSZOK SZÁMA	295	128
PETRI CSÉSZÉK SZÁMA	37	37
ZÖLD NÖVÉNYEK SZÁMA	1577	602
ALBÍNÓK SZÁMA	257	324

5. táblázat: A nemesítési anyagok közül felhasznált genotípusok

	ZÖLD NÖVÉNYEK SZÁMA	ALBÍNÓK SZÁMA
H5253	32	43
H5255	41	7
H5257	67	16
H5259	196	68
H3673	37	12
H3691	15	18
H3692	214	160
IGRI	1577	257

Mivel genotípusonként nem egyforma kalászmennyiséget dolgoztunk fel, így a pontos eredményekhez fontos, hogy az egy kalászra vetített növény számmal is dolgozzunk. Vizsgálataink során az egytényezős varianciaanalízist használtuk, az SSPS 18.0 programcsomag felhasználásával. A 6. táblázat adatai mutatják az egyes genotípusokból keletkező zöld növények és albínók átlagát, szórását.

6. táblázat: A növénykihozatal genotípusok szerinti megoszlása

		Kalászek		
		száma	Átlag (db)	Szórás (db)
1 kalászra jutó zöld növény	H 3692	9	33,0556	10,69008
	H 5257	3	3,9333	2,40278
	H 5253	6	1,4000	1,30231
	H 5259	6	11,3333	10,33802
	IGRI	6	10,7450	5,55821
	össz.	30	15,0057	14,64945
1 kalászra jutó albínó növény	H 3692	9	24,2778	8,31080
	H 5257	3	,9000	,60828
	H 5253	6	2,2000	,90333
	H 5259	6	3,9000	3,95120
	IGRI	6	,9600	,19910
	össz.	30	8,7853	11,37621

Az egy kalászra jutó zöld- illetve albínó növények genotípusok szerinti csoportosításával elvégeztük az egytényezős variancia analízist, az eredményeket a 7. táblázat tartalmazza. Megállapítható, hogy az egy kalászra jutó zöld és az egy kalászra jutó albínó növények esetében is a különbség szignifikáns az egyes genotípusok között.

7. táblázat: Az egy kalászra jutó zöld, ill. albínó növények ANOVA táblázata

		SS	df	MS	F	Sig.
1 kalászra jutó zöld növények	csoportok között	4600,497	4	1150,124	17,715	0,000
	csoportokon belül	1623,091	25	64,924		
	összesen	6223,588	29			
1 kalászra jutó albínó növények	csoportok között	3117,492	4	779,373	30,653	0,000
	csoportokon belül	635,634	25	25,425		
	összesen	3753,125	29			

További statisztikai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a zöld növények kihozatala tekintetében az H3692-hez viszonyítva az összes genotípus eltérése szignifikáns. A

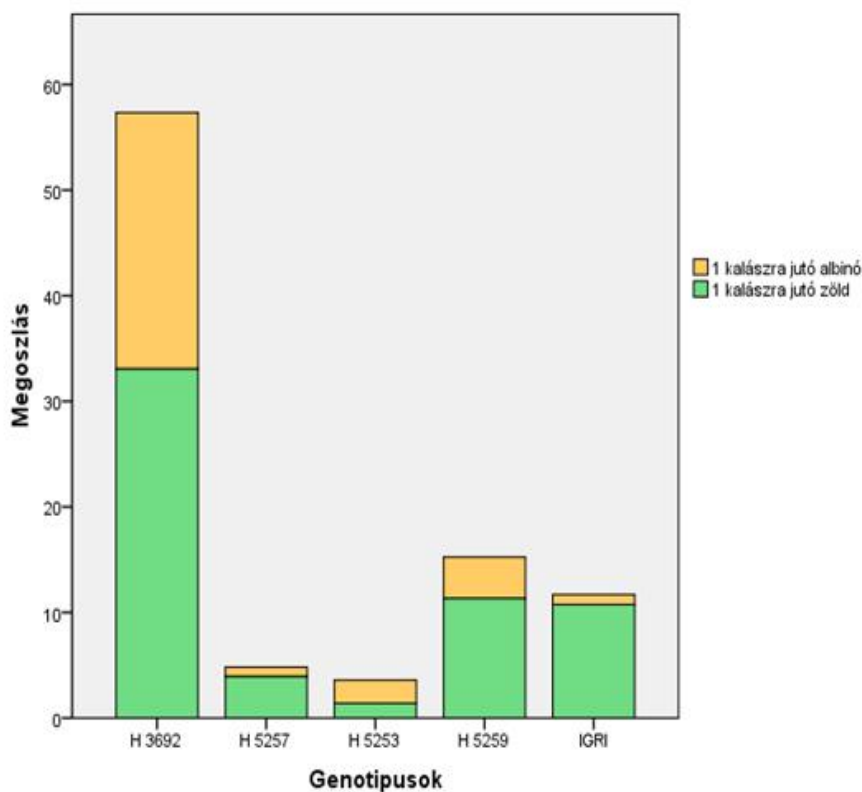
többi genotípus között nem mutatható ki szignifikáns eltérés, mint azt az 8. táblázat is mutatja. Eredményeink alapján az albínókra is ugyanez a megállapítás tehető.

8. táblázat: Genotípusok átlaga közötti különbség és a szignifikancia szint

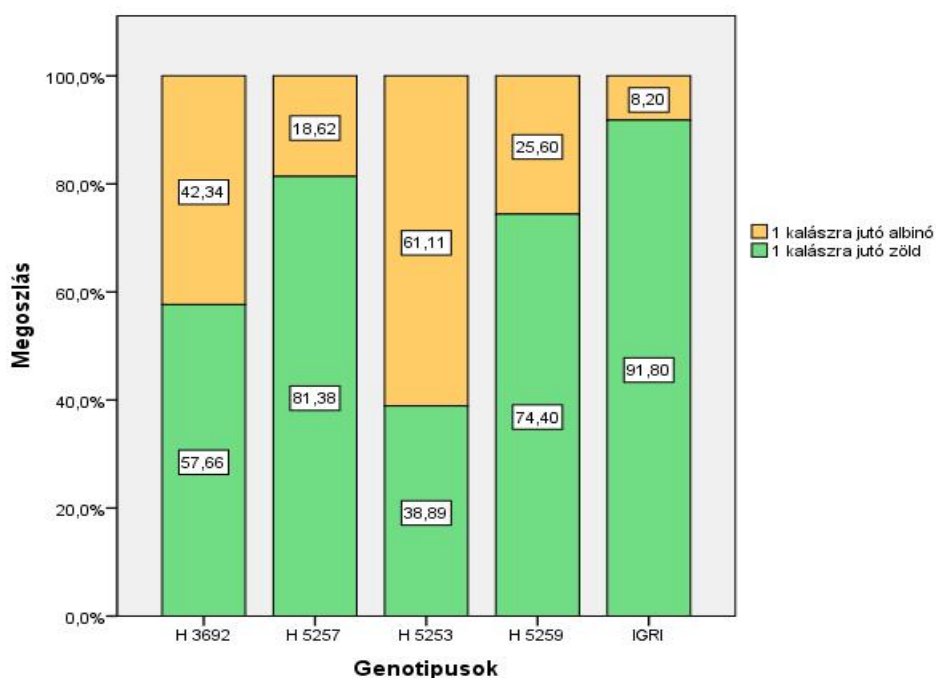
	3692	5257	5253	5259	IGRI
3692	-	0,000*	0,000*	0,023*	0,002*
5257	29,1	-	0,893	0,796	0,318
5253	31,66	2,53	-	1,49	2,33
5259	21,72	-7,40	9,93	-	4,79
IGRI	22,31	-6,81	0,58	-0,58	-

* $p < 0,05$

Az 7. és a 8. ábráról leolvashatjuk, hogy az Igriből keletkezett a legtöbb zöld növény, a legkevesebb pedig a H5253-ból.



7. ábra: Az egy kalászra jutó albínó és zöld növények számának genotípusonkénti alakulása



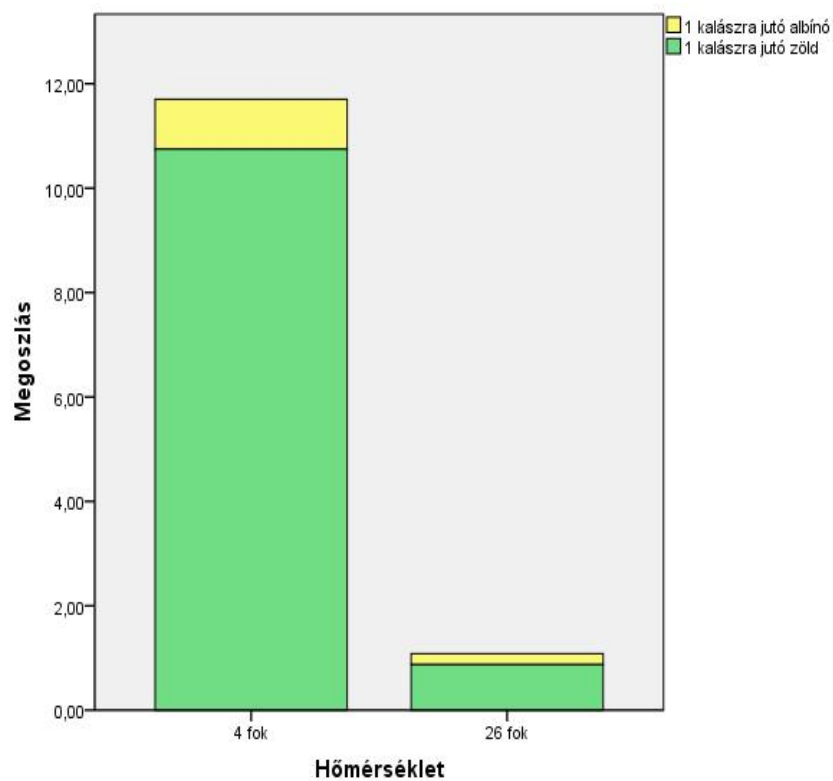
8. ábra: Az egy kalászra jutó növények számának százalékos megoszlása genotípusonként

Megállapíthatjuk, hogy a H5253 genotípusnál volt a legkisebb az egy kalászra jutó zöld növény-kihozatal, több albinó növény fejlődött, mint zöld. Itt is jól látható, hogy az Igrihöz viszonyítva az egy kalászra jutó zöld növény a H5257-nél és a H5259-nél a legmagasabb, míg a legkisebb a H5253-nál (2. ábra).

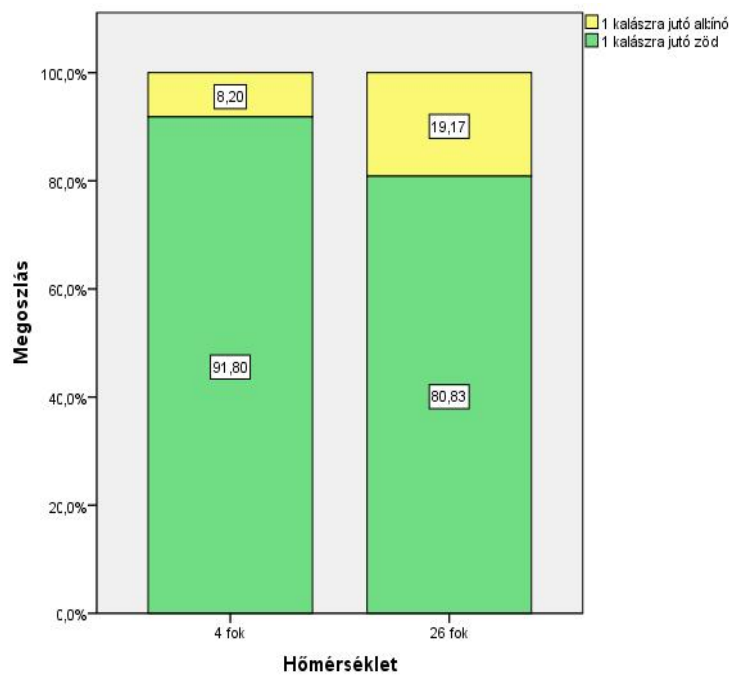
4.2.2. Az előkezelés során alkalmazott hőmérséklet hatása

A mannitolos kezelések 3-6 napig tartottak. Összehasonlítottuk, hogy hogyan alakul a 4 °C –on és a 26 °C-on kezelt kalászokból létrejövő növények száma.

A 3. ábráról megállapítható, hogy a hőmérséklet jelentősen befolyásolja az egy kalászra jutó zöld és az egy kalászra jutó albinó növények számát. Statisztikai módszerekkel elvégezve az összehasonlítást, megállapítható, hogy a különbség mind a két paraméter esetében szignifikáns ($p < 0,05$).



9. ábra: Az egy kalászra jutó albinó- és zöld növények számának hőmérsékletek szerinti alakulása



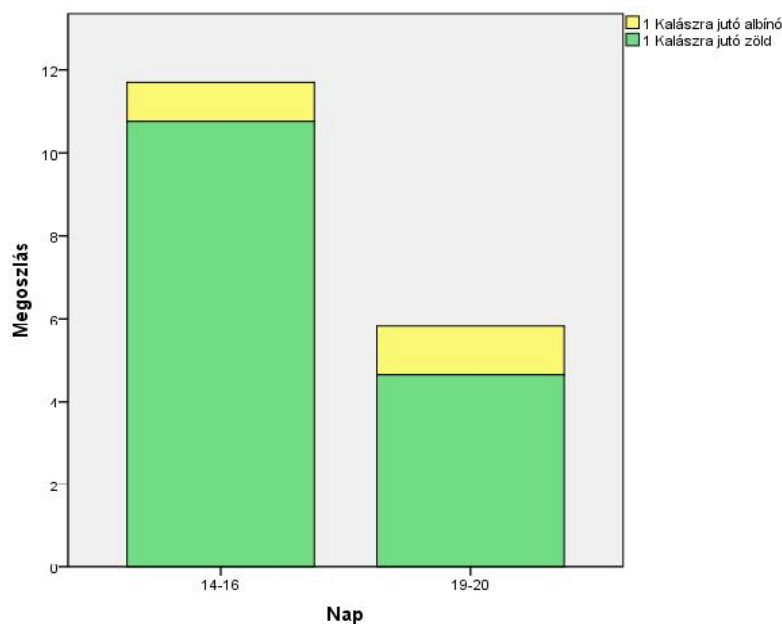
10. ábra Az egy kalászra jutó növények számának százalékos megoszlása a hőmérséklet függvényében

Ha az egy kalászra jutó növények számának százalékos megoszlását vizsgáljuk a hőmérséklet függvényében, akkor megállapítható, hogy az eltérés körülbelül 10%-os (10. ábra).

4.2.3A hidegkezelések tartamának hatása a növények számára

Kísérleteink során vizsgáltuk azt is, hogy a rövidebb, illetve hosszabb hideg-kezelési időtartam vajon befolyásolja-e a növénykihozatalt. A megfigyelést 8 és 27 nap közötti előkezelési időtartamoknál végeztük. Azt tapasztaltuk, hogy a 27 nap túl hosszú, mert ezekből a kalászokból nem fejlődött ki növény. A 8 napos kezelésekből, ugyanakkor kevés adat állt rendelkezésünkre, ezért a dolgozatomba ezek nem kerültek bele.

Dolgozatomban a 14-16 valamint a 19-20 napos kezeléseket hasonlítottuk össze, melynek eredménye az 5. és 6. ábrán is látható. Megállapítható, hogy több növény fejlődött akkor, amikor csak 14-16 napot voltak a hidegkamrában a begyűjtött anyagok.

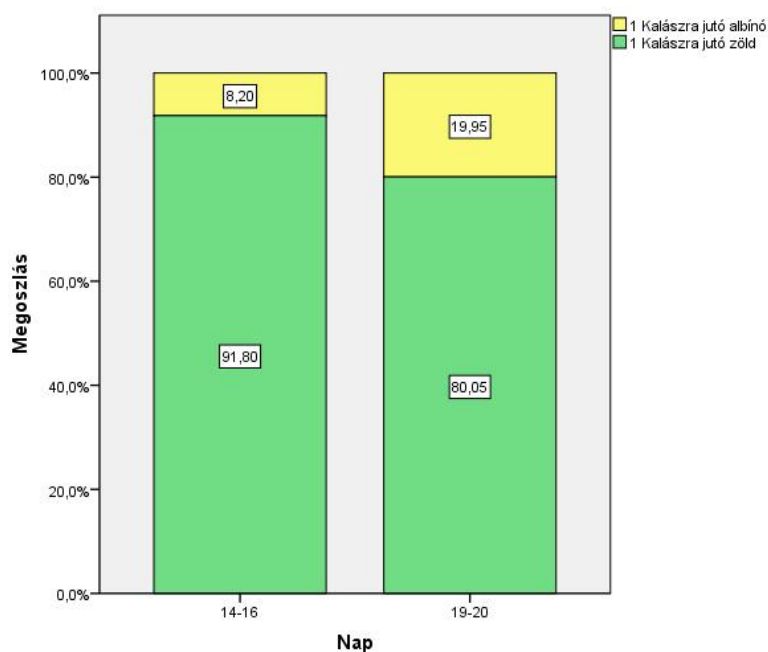


11. ábra: A hidegkezelés hatása a növénykihozatalra

Statisztikai módszerek alkalmazásával összehasonlítottuk az egy kalászra jutó zöld és albínó növények számának alakulását a kezelés függvényében. Megállapíthatjuk a 9. táblázatból, hogy a zöld növények kihozatalát szignifikánsan befolyásolja a hidegkezelés, míg az albínók számának alakulása nem szignifikáns a hőmérséklet függvényében.

9. táblázat: Hidegkezelés hatásának vizsgálata a zöld, ill. albínó növények kihozatalára

		SS	df	MS	F	Sig.
zöld	csoportok között	169,751	1	169,751	5,938	,023
	csoportokon belül	657,551	23	28,589		
	össz.	827,302	24			
albínó	csoportok között	,178	1	,178	,155	,698
	csoportokon belül	26,389	23	1,147		
	össz.	26,567	24			



12. ábra: A hidegkezelés hossza és a növénykihozatal százalékos megoszlása

A hosszabb hidegkezelés hatására növekedett az albínó növények száma.(12. ábra)

4.3. Növénykéek előállítása mikropóra eredetű embriókból

A növénykéket $\frac{1}{2}MS_0$ táptalajra áthelyezve regeneráltuk. A növényregenerálás eredményeként a magról kelt árpához hasonló növényeket kaptunk.

Összesen 280 darab növénykét ültettünk ki, melyek hét genotípusból származtak.

5.Következtetések, javaslatok

Munkánk során sikerrel adaptáltuk illetve kombináltuk a szakirodalomban leírt (Morthorst és Lörz 1993, Jähne-Gärtner és Lörz 1999, Li és Devaux 2001, Kasha et al. 2001 a,b, Ritala et al. 2001) és az előkísérleteink során kipróbált előkezelési, izolálási és mikrospóra tenyésztési módszereket.

Tenyészeteinkben az embriókihozatal magas szintű volt. Tekintettel az embriók rendkívül nagy számára egyedi áthelyezést csak azok egy részénél alkalmaztunk, így az összes embrió számot nem tudtuk pontosan meghatározni. A növények regenerálását az ömlesztve áthelyezett embrióknál is elvégeztük, így mind a zöld és mind az albínó növények pontos számát meg tudtuk határozni.

Kísérleteink többségében az Igri fajtával értük el a legjobb eredményeket a vizsgált genotípusok közül. Ez nem meglepő mivel évtizedek óta ez a genotípus az árpa androgenezisen alapuló haploid tenyésztés modellfajtája. Hoekstra et al. (1993) akár 5000 zöld növényt is elő tudtak állítani 100 portokra vonatkoztatva. A legmagasabb zöld növény kihozatalt, azonban mégsem az Igrinél, hanem a H3692 nemesítési anyagnál tapasztaltuk. E kombináció szülőpartnerei (Ombray//Plaisant/Seco) korábban haploid tenyészetekben nem vizsgált genotípusok. Feltételezhető azonban, hogy a szülőpartnerek jó válaszó képességgel rendelkeznek a haploid tenyészetekben. Balatero et al. (1995) és Monostori (2003) tritikále portok-, illetve mikrospóra tenyésztésében tett megállapítása szerint, ugyanis a szülővonalak jó válaszó képessége egy jól öröklődő tulajdonság, amely a keresztezési kombináció utódnemzedékeiben is megjelenik.

Az általunk alkalmazott alap táptalaj az N24, amelyben Mordhorst és Lörz (1993) a nitrát: ammónium illetve a szerves:szervetlen nitrogén arányát optimalizálták. Szintén az ő nevükhöz fűződik a kalászkok blendorban történő feldolgozása is, melyet más szerzők (pl.: Kasha et al. 2001, Monostori 2003) is nagy hatékonysággal alkalmaztak.

A kalászkok illetve a portokok mikrospóra izolálást megelőző stressz kezelése alapvető jelentőségű az androgenezis indukciója szempontjából (összefoglaló: Heberle-Bors 1998). Touraev et al. (1996a,b) dohány és búza portokok/kalászkok kezelésére az éheztetés és a hő sokk alkalmazását tartották legeredményesebbnek. Ellentétben az általuk javasolttal, a mi kísérleteinkben a magas hőmérsékletű előkezelésekkel szemben az éheztetés és alacsony hőmérsékletű kezelés párosítása bizonyult előnyösebbnek. Ez ellentmond az általuk felállított, fajtól függetlenül érvényes sokk kezelés elmélet érvényességének.

A mikrospórák gametofitikusból sporofitikus fejlődésre történő átállításához elengedhetetlen stresszek közül legáltalánosabban használt a kalászok hidegben (kb. 4 °C) történő előkezelése (Mordhorst és Lörz 1993, Ritala et al. 2001). Az izolált portokok előkezelésénél pedig a mannitolban történő inkubálást alkalmazzák, amely egyrészt „éheztet” a mikrospórát a metabolizálható szénhidrátok hiánya miatt, másrészt ozmotikus stresszt is biztosít (Touraev et al. 1996a,b). A hideg és az éheztetési stressz kombinációja valószínűleg a sejtosztódás genotípustól független indukcióját és fenntartását eredményezi (Kasha et al. 2001a,b).

A kísérleteinkben elért maximális zöld növény szám kalásonként 33 (ez 100 portokra vetítve kb. 50 növénynek felel meg), ami elmarad az irodalmi adatoktól. Ennek oka elsősorban azzal magyarázható, hogy a módszer adaptációja, az elért eredmények ellenére is, jelenleg a kezdeti fázisában tart. Tekintettel arra, hogy a cél alapvetően a nemesítés folyamatába történő tényleges integrálás, előállított zöld növényeink teljes mértékben megfelelőek a kívánalmaknak: erőteljesen fejlettek, megfelelő gyökérszettel rendelkeznek, a kiültetés körülményeihez jól adaptálódtak. Tényleges felhasználásukat, azonban feltétlen meg kell előznie ploidia-fokuk meghatározásának.

A zöld növény-kihozatal javítására, a módszer finomítására lehetőség kínálkozik a mikrospóra sűrűség pontosabb beállításában, és elsősorban, talán a növényregenerálás technikájának javításában, például táptalaj-összetétel (pl. hormontartalma – hormonmentes) és az inkubáció körülményeinek (pl. hőmérséklet, megvilágítás) beállításával.

6. Összefoglalás

A klímaváltozás, a népességnövekedés, valamint az egyre növekvő nyersanyagárak is szükségessé teszik a biotechnológiai kutatások folyamatos fejlődését. A növénynemesítésnek is lépést kell tartania a növénytermesztés által szabott követelményekkel, tehát folyamatosan újabb és újabb fajtákkal kell a termelők rendelkezésére állni. A fajták előállításában lényeges előrelépés a DH növények megjelenése, hiszen ezeknél a növényeknél egy generáció alatt homozigóta állomány hozható létre, így a fajtaelőállítás folyamata több évvel is lerövidíthető.

Kutatásunk célja az árpa mikrospóra-tenyésztés technológiájának minél magasabb szintre való fejlesztése volt. A nagyobb hatékonyság érdekében több módszertani fejlesztést is szerettünk volna kipróbálni. A növényanyag előkezelése, a mikrospóra-izolálás, valamint a tenyésztés során hajtottunk végre változásokat, melyek hatásait vizsgáltuk és értékeltük.

Kísérleteink során az Igri őszi árpa fajtát, valamint a H3673, H3680, H3691, H3692, H5253, H5255, H5257, H5259 nemesítői jelzésű, F₁ és F₂ generációjú nemesítési törzsek donor növényeit használtuk fel haploidok előállításához. Vizsgáltuk a hidegkezelés hosszának hatását, a mannitolos kezelés során beállított hőmérséklet hatását a növénykihozatalra, valamint azt is, hogy a növénykihozatal mennyiben függ a genotípustól. Összehasonlítottuk a regenerált zöld növények és az albínók arányát is egymással. Megfigyeléseink alapján a kalászkok 14-16 napos hidegkezelése bizonyult legjobbnak a növénykihozatal szempontjából. A mannitolos kezelés során az alacsonyabb, 4 °C-os kezelés jobbnak bizonyult a 26°C-on történő kezelésnél. miért? A genotípusok összehasonlításánál tapasztaltuk, hogy az Igri fajtából került ki a legtöbb zöld növény.

Az embrió-kihozatal a legtöbb genotípusnál megfelelő volt, ugyanakkor később, a fejlődő növénykéek gyökérfejlődése nehezen indult be. Néhány esetben az albínó növények száma volt magas a zöld növény kihozatalhoz képest. A kísérletek végén összesen 280 növényt tudtunk kiültetni.

Célkitűzéseinknek megfelelően az őszi árpa haploid növény-előállítás módszerét néhány változtatás bevezetésével kidolgoztuk. Másik fontos célkitűzésünk, a kiültetésre alkalmas őszi árpa haploidok előállítása is sikeresen megvalósult.

7. Irodalomjegyzék

1. Balatero, C.H., Darvey, N.L., Luckett, D.J. 1995: Genetic analysis of anther culture response in 6x triticales. *Theor. Appl. Genet.* 90: 279-284
2. Blakeslee, A., Belling, J., Farnham, M.E., Bergner, A.D. 1922: A haploid mutant in Jimson weed *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647.
3. Blakeslee, A., J., Farnham, M.E., Bergner, A.D. 1922: A haploid mutant in *Datura stramonium*. *Sciences* 55: 646-647
4. Chase S.S. 1952: Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.*, 44, 263-267
5. Clapham, D. 1973: Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. *Z. Pflanzenzüchtg.* 69:142-155
6. Datta, S.K. 2005: Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science* 89 (11): 1870-1878.
7. Day, A., Ellis, T.H.N. 1985: Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* 9: 671-678.
8. 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): 53-56.
9. Dudits, D., Heszky, L. 2000: Növényi biotechnológia és géntechnológia 67-70
10. Ferrie, A.M.R., Caswell, K.L. 2010: Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production in *Plant Cell Tiss Organ Culture* DOI 10.1007/s11240-010-9800-y
11. Foroughi-Wehr, B. and W. Friedt. 1984: Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 65: in press
12. Guha, S., Maheswary, S.C. 1964: *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
13. Heberle-Bors, E. 1998: Experimental control of pollen development. In: Chupeau, Y., Caboche, M., Henry, Y. (Eds.): *Androgenesis and Haploid Plants*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; INRA, Paris. Pp. 38-53.
14. Heberle-Bors, E., Reinert, J. 1980: Isolated pollen cultures and pollen dimorphism. *Naturwissenschaften* 67, 311-312

15. Hoekstra, S., van Zijderveld, M.H., Heidekamp, F., van der Mark, F. 1993: Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. Plant Cell Rep. 12: 661-665.
16. <http://mek.oszk.hu/01200/01216/01216.html> (letöltve: 2014. 10. 25.)
17. www.agroinform.comwww.agroinform.com/aktualis/Szantofold-Az-arpatavaszi-gyomszabalyozasanak-lehetosegei/20110214-15343/ (letöltve: 2014. 10. 25.)
18. <http://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/gyor/kal/kal214.pdf> (letöltve: 2014. 10. 25.)
19. <http://www.scri.ac.uk/assoc/COST851/Default.html> (letöltve: 2014. 10. 25.)
20. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0027_NAI2/ch01s04.htm (letöltve: 2014. 10. 25.)
21. Hu, T., Kasha, K.J. 1997: Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. Plant Cell Rep. 16: 520-525.
22. Hu, T.C., Kasha, K.J. 1999: A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome 42 (3): 432-441.
23. Indrianto, A., Barinova, I., Touraev, A., Heberle-Bors, E. 2001: Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta 212: 163-174.
24. Jähne, A., Lörz, H. 1995: Cereal microspore culture. Plant Sci. 109: 1-12.
25. Jähne-Gärtner, A., Lörz, H. 1999: Protocols for anther and microspore culture of barley. In: Hall, R.D. (Ed.): Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 111. Humana Press Inc. Pp. 269-279.
26. Kasha K.J. Simion E., Miner M. Letarte J. and Hu T. C. 2003: Haploid wheat isolated microspore culture protocol. In: Maluszynski M., Kasha K.J., Foster B.P. és Szarejko I. (eds.) Doubled haploid production in crop plants, a manual. Kluwer Academic, Dordrecht Boston London, pp 77-81
27. Kasha, K.J., Hu, T.C., Oro, R., Simion, E., Shim, Y.S. 2001a: Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. J. Exp. Bot. 52: 1227-1238.
28. Kasha, K.J., Simion, E., Oro, R., Yao, Q.A., Hu, T.C., Carlson, A.R. 2001b): An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica 120: 379-385.
29. Kasha, K.J., Ziauddin, A., Cho, U.H. 1990: Haploids in cereal improvement – anther and microspore culture, 19th stadler genetics symp.: gene manipulation in plant

- improvement 2, mar. 13-15, 1989, Univ. Missouri Columbia, Columbia. Mo gene manipulation in plant improvement II. – 19th stadler genetics symposia series, 213-235.
30. Kasha, K. J., Reinbergs E. 1976: Utilization of haploidy in barley. pp.307-315
 31. Kim M., Jang I. C., Kim J. A., Park E. J., Yoon M. and Lee Y. 2008: Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annum* L.) through isolated microspore culture, *Plant Cell Reports* 27 (3): 425-434.
 32. Kiviharju, E., Puolimatka, M., Pehu, E. 1997: Regeneration of anther-derived plants of *Avena sterilis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48: 147-152.
 33. Komatsuda, T., Taguchi-Shinobara, F., Oka, S., Takiwa, F., Annaka, T., Jacobsen, H-J. 1995: Transfer and mapping of the shoot-differentiation locus *Shd1* in barley chromosome 2. *Genome*, 38: 1009-1014.
 34. Kuhlmann, U., Foroughi-Wehr, B., Graner, A., Wenzel, G. 1991: Improved culture system for microspores of barley to become a target for DNA uptake. *Plant Breed.* 107: 165-168.
 35. Lantos Cs. 2009: Az in vitro androgenezis indukciója búzában (*Triticum aestivum* L.), tritikálében (X *Triticosecale* Wittmack), fűszerpaprikában (*Capsicum annum* L.) és az eredmények felhasználása a nemesítésben pp 9-45
 36. Laurie, D.A., Benett, M.D. 1988: The production of haploid wheat plants × maize crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 393-397.
 37. Lazányi és Puskás 2010: Növénynemesítés és fajta fenntartás az Észak- Alföldi régióban
 38. Li, H., Devaux, P. (2001): Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep.* 20: 475-481.
 39. Maheswary, S.C., Tyagi, A.K., Malhotra, S.K 1980: Sopory: Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms – the current status. *Theor. Appl. Genet.* 58, 193-206
 40. Maluszynski, M., Kasha, K.J., Szarejko, I. 2003: Published doubled haploid protocols in plant species. In Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P. and Szarejko I. (eds.): *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual.* Kluwer Academic Publisher, Dodrecht, the Netherlands, pp 309-335.
 41. Marcińska I., Czyczyło-Mysza I., Skrzypek E., Grzesiak M., Janowiak F., Filek M., et al. (2013). Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic

- or abscisic acid on wheat seedlings. *Int. J. Mol. Sci.* 14 13171–13193
10.3390/ijms140713171
42. Mejza, S.J., Morgant, V., DiBona, D.E., Wong, J.R. 1993: Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports* 12: 149-153.
 43. Monostori T. 2004: Növénytermesztés I. 26-28 pp.
 44. Mordhorst, A.P., Lörz, H. (1993): Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *J. Plant Physiol.* 142: 485-492.
 45. Murashige, T., Skoog, F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15, 473-497
 46. Nitsch, C. 1977: Culture of isolated microspores. In: Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. (Eds.): *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Springer Verlag. Pp. 269-278
 47. Oleszczuk, S., Sowa, S., Zimny, J. 2004: Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale ($\times$ *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Reports* 22: 885-893.
 48. Ouyang J. W., Hu H., Chuang C.C. and Tseng C.C 1973: Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. *Scientia Sinica* 16: 79-95.
 49. Pauk, J., Kertész, Z., Beke, B., Bóna, L., Csősz, M., Matuz, J. 1995: New winter-wheat variety – GK-Délibáb developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Research Communications* 23 (3): 251-256.
 50. Picard E. and De Buyser J. 1973: Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. á partir de cultures d'anthères in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 277:1463-1466-
 51. Reynolds, T.L. 1997: Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 33:1-10
 52. Ritala, A., Mannonen, L., Oksman-Caldentey, K.-M. 2001: Factors affecting the regeneration capacity of isolated barley microspores (*Hordeum vulgare* L). *Plant Cell Rep.* 20: 403-407
 53. Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H. 2005: In vivo haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid line sin hybrid breeding. *Maydica* 50:275-283
 54. Sajtos L., Mitev A., 2007: PSS kutatási és adatelemzési kézikönyv. Alinea Kiadó, Budapest. 408 p.

55. Sidhu, A. S., T. S. Dillon, et al. 2006: Protein Ontology Project: 2006 Updates (Invited Paper). Data Mining and Information Engineering 2006. A. Zanasi, C. A. Brebbia and N. F. F. Ebecken. Prague, Czech Republic, WIT Press.
56. Szarejko, I. 2003: Doubled haploid mutant production, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 351-361.
57. Thomas W.T.B., Forster B.P. Gertsson B. 2003: Doubled haploids in breeding In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko I. (Szerk.), Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual, Kluwer, Dordrecht, pp. 309-337.
58. Thomas, W.T.B., Forster, B.P., Gertsson, B. 2003: Doubled haploids in breeding, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (Eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 337-349.
59. Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., Heberle-Bors, E. 1996a: Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sex. Plant Reprod. 9: 209-215.
60. Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O., Heberle-Bors, E. 1996b: Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. Planta 200: 144-152.
61. Trione EJ, Stockwell VO. 1989: Development of detached wheat spikelets in culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 17:161-170.
62. Tuveson, I.K.D., Öhlund, R.C.V. 1993: Plant regeneration through culture of isolated microspores *Triticum aestivum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 34: 163-167.
63. Tuveson, 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): 305-312.
64. Verma, V., Bains, N.S., Mangat, G.S., Nanda, G.S., Gosal, S.S., Singh, K. 1999: Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat × maize system. Crop Science 39: 1722-1727.
65. Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien, W.I. 1973: The induction of the pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* from anther culture. Scientia Sinica 16: 147-151.

66. Xu, Z.H., Sunderland, N. 1981: Glutamine, inositol and conditioning factor in the production of barley pollen callus *in vitro*. Plant Sci. Lett. 23: 161-168.
67. Zheng, M.Y. 2003: Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) - doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73 (3): 213-230.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az SZTE Mezőgazdasági Karának, hogy lehetővé tették számomra a TDK munkákban való bekapcsolódást, valamint a GK Nonprofit Közhasznú Kft. Biotechnológiai Osztályának, hogy biztosították kísérleteim szakmai és tárgyi feltételeit.

Köszönöm Mihály Róbertnek, hogy a konzulensi szerepkörrel járó nehézségek ellenére elvállalta ezt a feladatot, valamint Monostori Tamásnak, hogy lehetőséget adott a témában való elmélyülésre.

Szeretném megköszönni a sok segítséget Pauk Jánosnak, Markó Ferencnek és Palaticzki Szilviának.

Külön köszönet illeti még Hódiné Szél Margitot az adatok statisztikai értékelésben nyújtott segítségéért.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.