

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
MEZŐGAZDASÁGI KAR
NÖVÉNYTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETVÉDELMI INTÉZET

Az őszi árpa mikrospóra-tenyésztés módszerének fejlesztése

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Készítette:

NÉMETH DZSENI FER

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	5
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 mikropóra izolálás	10
2.4.5. A mikropóra-tenyésztés és az androgenezis indukciója	10
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 mikropóra-izolálás	14
3.5 A mikropóra-tenyésztés folyamata és körülményei	15
3.6 Növényregenerálás	16
4. Eredmények	18
4.1 Az árpa mikropórák 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
4.2.3 A hidegkezelések tartamának hatása a növények számára	25
4.3. Növény-regenerálás mikropóra eredetű embriókból	27
5. Következtetések, javaslatok	28
6. Összefoglalás	30
Köszönetnyilvánítás	37

1.Bevezetés

A növénynemesítés szerepe napjainkban egyre nagyobb. A régi-új kihívások mint a klímaváltozás, a népességnövekedés, valamint a folyamatosan növekvő nyersanyagárak, ugyanakkor, 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 ezért, 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.

Az első *in vitro* eredetű haploid embriók és növények (*Datura innoxia* portokkultúra; Guha és Maheswari 1964) előállítása óta több száz növényfajnál dolgoztak ki 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 haszonnövények többségénél, így a gabonaféléknél is napjainkra 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. A genotípus, az előkezelések hőmérséklete és hossza 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 termésátlaga 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). Hazánkban fontos őszi árpa nemesítő központ a Károly Róbert Főiskola Fleischmann Rudolf Kutatóintézete. Őszi és tavaszi árpa nemesítése folyik a Gabonakutató Nonprofit Kft-ben.

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 és Lörz. 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 létrehozta már a DH technológia alkalmazásával (GK Szindbád, GK Tündér, Mv Madrigál, Mv Szigma).

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>).

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 alkalmazásával 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 Heszy 2000).

A DH növények előállítása ma is nagyon fontos eljárás, melyet a növény szaporításban és a növényélettani kutatásokban is alkalmaznak. Bár a DH-k előállítása jól működik a búzánál, kukoricánál, rozsnál, burgonyánál, káposztánál (Turesson 2007) és az árpánál. A zabról, ugyanakkor köztudott, hogy egyike a legnehezebben kezelhető növényfajoknak a haploidok indukcióját tekintve (Sidhu et al. 2006, Kiviharju 1997, Marcinska et al. 2013).

1. táblázat: Staaten-Union éves DH növény produkciója

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

Az androgenezis indukcióján alapuló módszerek a növényi szaporodásbiológiai ismeretek bővüléséhez is hozzájárultak. A hatás kölcsönös, ami a hatékonyság javulását is eredményezte a DH növény-előállítás terén. Kiemelendő e téren, például a stressz mint

általános indukciós tényező szerepének felismerése a haploid embriogenezis indukciójában (Touraev et al. 1996b).

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

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 (1952) publikált.

Árpanemesítésben a „bulbosum technika” volt az első haploid-előállítási módszer, amely széleskörűen elterjedt, és csak az utóbbi évtized során szorították háttérbe az androgenezis-alapú eljárások. 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.

Az *in vitro* eljárások közül az androgenezisen alapuló módszerek, a portok- és a mikrospóra tenyésztés terjedtek el a gyakorlatban. Az androgenezis során az éretlen pollen (1 vagy 2 sejtmagvas mikrospóra) fejlődése nem a hímivarsejtek kialakulása, pollentömlő hajtása felé halad tovább, hanem embriogenezis útján haploid embriók, majd növények kialakulásához vezet.

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, többek között 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 sejtől származnak, így különösen alkalmas a genetikai transzformációban történő alkalmazásra. DH fajták előállítására elsősorban a repcenemesítésben használják (Monostori 2004).

Az izolált mikrospórák tenyésztésének számos előnye mutatható ki a portoktenyésztéssel szemben, melyek mindegyike a rendszer „egysejtes” jellegéből adódik:

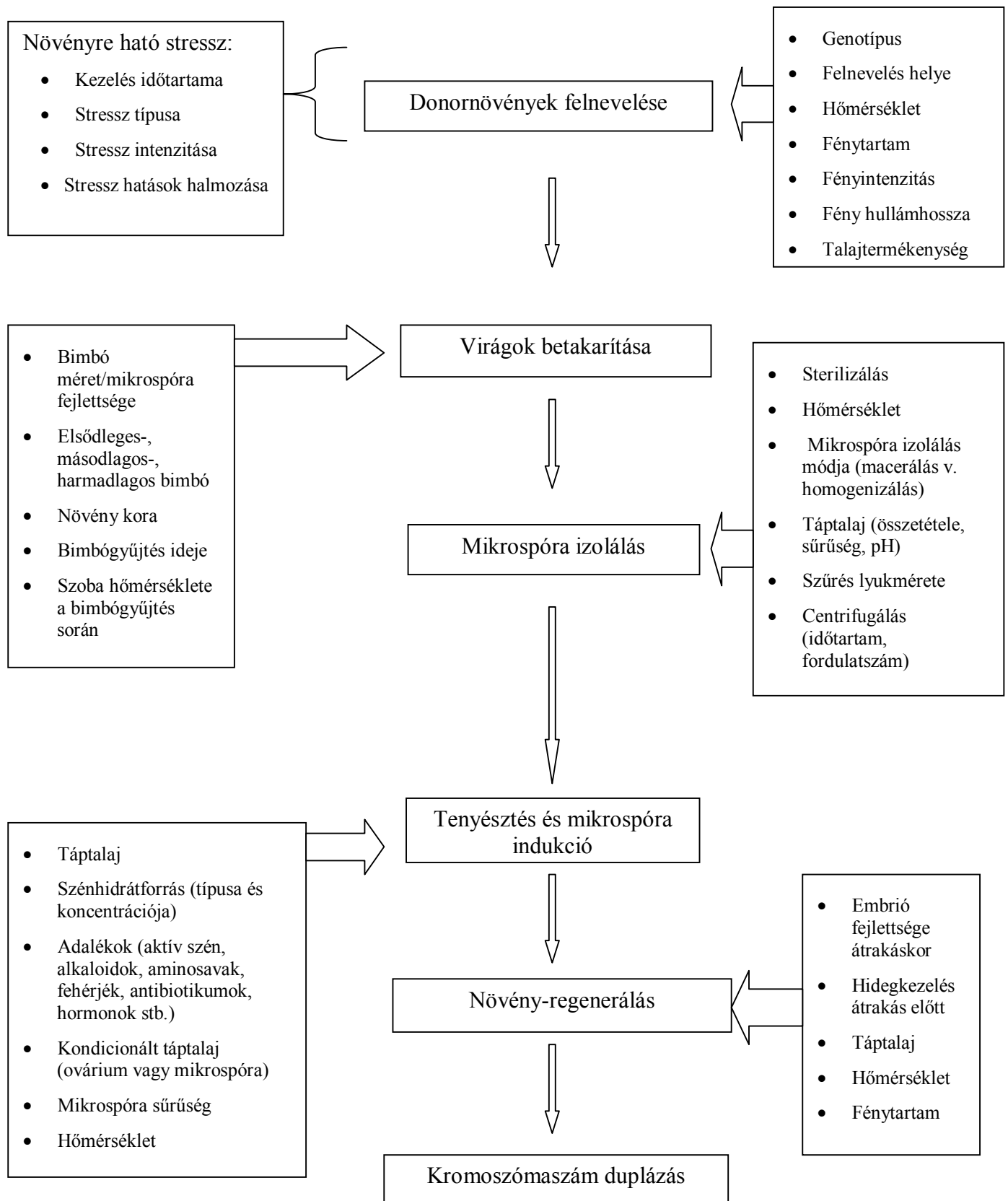
1. Az izolált mikrospóra tenyészetekben nincsenek jelen a mikrospórát körülvevő pollenzsák - szintén indukálható - szomatikus sejtjei és szövetei, így biztosítható az indukált struktúrák (kallusz, embrioid) mikrospóra-eredete.
2. Az izolált egysejtes rendszerben a mikrospóra embriogenezis folyamata könnyebben tanulmányozható, mint portoktenyészetben, a sejt szintű megfigyelések segítik a sejttenyésztési körülmények további fejlesztését (Indrianto et al. 2001, Kim et al. 2008).
3. Lehetőséget ad krioprezervált, és hosszú ideig tárolt pollenből növények regenerálására (Dudits és Heszky 2000).
4. 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).

Árpában Davies és Morton (1998) a mikrospóra tenyészetekben 100-200-szor magasabb regenerációs rátát tapasztaltak, szemben a portoktenyészetekkel (1170-2040 vs. 10.9 zöld növény/100 portok). Hasonló eredményt kapott Li és Devaux (2005) is (3,6-287 vs. 0-29,6 zöld növény/100 portok). Más szerzők mikrospóra tenyészetben 100 portokra számított 5000 zöld növényről is beszámoltak (Hoekstra et al. 1993).

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 sejt falukon kívül semmi sem védi környezeti hatásokkal szemben, tehát fontos az optimális környezet kialakítása, ha sikeres tenyészetet 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-előállítást. 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 mikrospóra-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 mikrospórák, hanem a DH növények száma is növelhető. Ezek a stresszek különbözők lehetnek.

Ma a legelterjedtebb módszer a növények hidegkezelése. Tudósok szerint hideg hatására a mikrospórák metabolizmusa lassul. Ezzel azt érik el, hogy a mikrospórák mitotikus osztódása egyszerre történik *in vitro* körülmények között magasabb (25-32 °C) hőmérsékleten (Zheng 2003). Más kutatók szerint az éheztetés jobb hatásfokkal 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 (Tu vesson 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 árpnál is (Hunter, 1987).

A növényi növekedés szabályozó anyagok (hormonok) táptalajban való használatáról a vélemények nem egyöntetűek (Jähne és Lörz 1995). Az árpa haploid tenyészetek szakirodalmában egyaránt találkozunk hormontartalmú és hormonmentes táptalajok használatával (Cai et al. 1992, Mordhorst és Lörz, 1993, Monostori et al. 2003). A hormontartalmú táptalajok esetében pedig nincs általános megegyezés a hormonok kombinációjára és mennyiségére. Árpa mikrospóra tenyészetekben a leggyakrabban

alkalmazott növekedésserkentők/hormonok a benzil-aminopurin (BAP), illetve a 2,4-D, a kinetin és a fenil-ecetsav (összefoglaló: Monostori 2003).

2.5 A haploid technológia történeti áttekintése

Az első haploid növény felfedezése az 1900-as évek elejére tehető. Az első - természetben előforduló - haploid növényt Blakeslee és mtsai (1922) írták le, *Datura stramonium* L. növényeknél. Így talán nem meglepő, hogy az első *in vitro* mikrspóra eredetű növényeket *Datura innoxia* L. portoktenyészetéből állították elő (Guha és Maheswary 1964). Különböző *Nicotiana* fajok esetében Nitschnek (1977) sikerült haploid növényeket előállítania (Dudits és Heszy 2000).

„A célzott sejt(ek) alapján beszélhetünk petesejtből (ovárium tenyésztés, ovulum tenyésztés, petesejttenyésztés és távoli fajkeresztelés) és pollenből (portoktenyésztés, úsztatott portoktenyésztés és izolált mikrspóra tenyésztés) történő DH növény-előállításról.” (Lantos 2009)

Néhány fajnál 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 mikrspórák gametofita fejlődési útja determinált. Az androgenezis indukciójához ezt a fejlődési utat valahogyan meg kell szakítani, és szükséges feltételeket kell biztosítani (Dudits és Heszy 2000). A mikrspórák 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 mikrspórák indukálhatók, amelyeknek a fejlődése a portokban "hibás" volt. Ezek a mikrspórák 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 mikrspóra alkalmas az indukcióra, ezeket P vagy S pollennek 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

Árpa DH fajták előállítására évtizedekig a „bulbosum technika” volt használatban (Kasha és Kao 1970) – 2002-ig a DH árapajták kétharmadánál ezt alkalmazták (összefoglaló: Forster 2002).

Az *in vitro* eljárások közül a ginogenezisen alapuló ovárium-kultúrák alacsony hatékonyságuk miatt nem terjedtek el a gyakorlatban (Castillo és Cistué 1993). Az első *in vitro* eredetű haploid árpanövényeket Clapham (1973) állította elő portoktenyészetben. Egyúttal beszámolt az ammónium-nitrát koncentráció egytizedre való csökkentésének a portokválaszra gyakorolt pozitív hatásáról is. A portoktenyésztés hatékonyságát a továbbiakban számos kutatási eredmény alapján sikerült jelentős mértékben fokozni. Kiemelendő ezek közül a genotípus-függőség és a donor növények nevelési feltételeinek értékelése (Foroughi-Wehr és Friedt 1984), a kalászok hideg előkezelése módszere (Huang és Sunderland 1982), a portok - táptalaj arány, illetve a tenyészetek kondicionálásának meghatározása (Xu és Sunderland 1981).

Az androgenezisen alapuló módszereknél, így az árpa portoktenyészetekben is problémát jelent, genotípustól függően, az albínó regeneránsok magas aránya (Day és Ellis 1985). Ez a magyarázat arra, hogy az árpa haploid-előállításban miért maradt évtizedekig uralkodó eljárás „bulbosum technika” (Devaux 1992).

Izolált árpa mikrospórák tenyésztéséről először Sunderland és Xu (1982) számolt be a portoktenyészetből induló ún. szóródásos tenyészetekből. Ezt követték néhány év elteltével az első, tényleges mikrospóra izoláláson alapuló tenyészetek (Wei et al. 1986, Hunter 1987).

A haploidok indukciójában szerepet játszó gének, markerek közül többnek a feltérképezésére került sor. A 2H, 3H és 4H kromoszómákon portok-válasz markereket írtak le (Manninen 2000), a 2H kromoszómán a hajtás-differenciálódásért felelős *hdi*-gént 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).

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

Kísérleteink többségében egy német, 2 soros őszi árpa fajtát, az Igrit használtuk, mivel irodalmi adatok alapján a mikrospóra-tenyészetekben mutatott válaszadó képességére nézve igen jónak bizonyult (összefoglaló: Monostori 2003).

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 et al. 2001) alapján ismert, 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 volt az óvatos öntözés, a stressz-hatások kerülése. Saját tapasztalatok és irodalmi utalások alapján azok a növények, melyeket nem megfelelő fejlődési stádiumban ér stressz 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 időpont 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, a vakuólum növekedésével, 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 kalászkokról, ezután öntöttük rá a hypó oldatot. A kalászokat az oldatban 20 percig rázóasztalon ráztattuk, 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 blendorba (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 mikrspórát tartalmaz. Ezt hideg 0,3 M mannitolban hígítva (kb. a centrifugacső felényi mennyiség) 21%-os maltóz felszínére rétegeztük, ügyelve a két fázis azonos térfogatára. E lépést centrifugálás követte, melynek végén a mannitol és a maltóz határán helyezkedtek el az életképes mikrspórák. Mivel a különböző frakciók csíkokat képezve válnak szét - alul a maltóz, felül a mannitol és középen a mikrspórák - ezt sűrűség-grádiens centrifugázási lépést „csíkozásnak” is szokás nevezni. Az életképes mikrspórák pipettával történő óvatos leszívását a sejtsűrűség beállítása követte 100.000 mikrspóra/ml-re. Az így kapott sejtsuszpenziót szétosztottuk 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 mikrspóra-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 mikrspóra 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 mikrospóra 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 (mgL ⁻¹)
Makroelemek	
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	
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
pH 5,8	

3.6 Növényregenerálás

A 3. napon már megfigyelhetőek voltak a sejtosztódás fázisai. Körülbelül 14 nap múlva megjelentek az első mikrokolóniák is. Amikor a kialakult embriószerű struktúrák (embrioidok) elérték az 1-2 mm-es nagyságot, a legfejlettebbeket 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 megvilágítás és 22-25 °C a legoptimálisabb ilyenkor.

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

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

3. táblázat: A regeneráló táptalajok összetétele

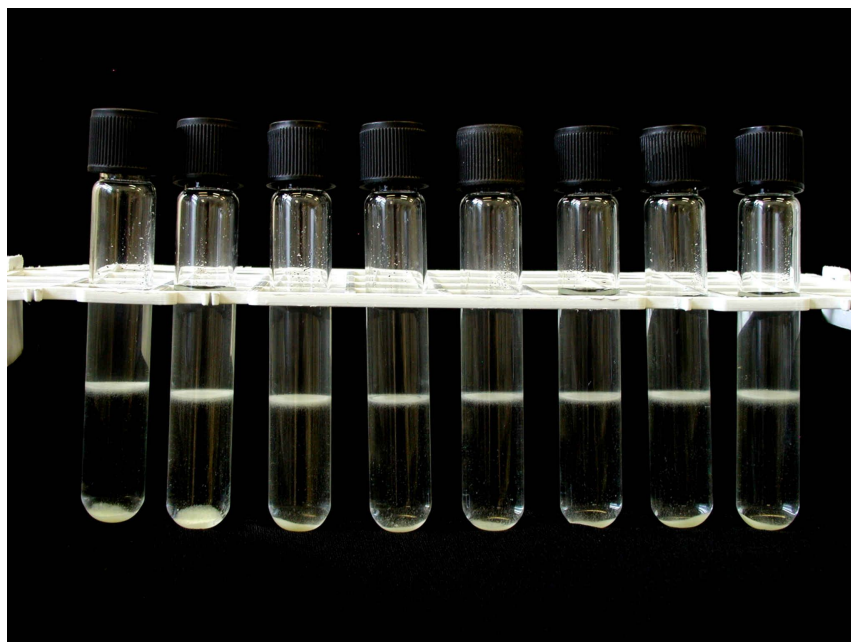
Komponensek	MS (mgL ⁻¹)	MMS (mgL ⁻¹)
Makroelemek		
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
KH ₂ PO ₄	170	170
MgSO ₄ X 7H ₂ O	370	370
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	440
Mikroelemek		
FeNa ₂ x EDTA	37.3	37.3
MnSO ₄ x 5H ₂ O	22.3	22.3
H ₃ BO ₃	6.3	6.3
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6	8.6
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	0.025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.025
NaMoO ₄ x 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 g	-
pH 5,8		

4.Eredmények

4.1 Az árpa mikrospórák izolálási módszere

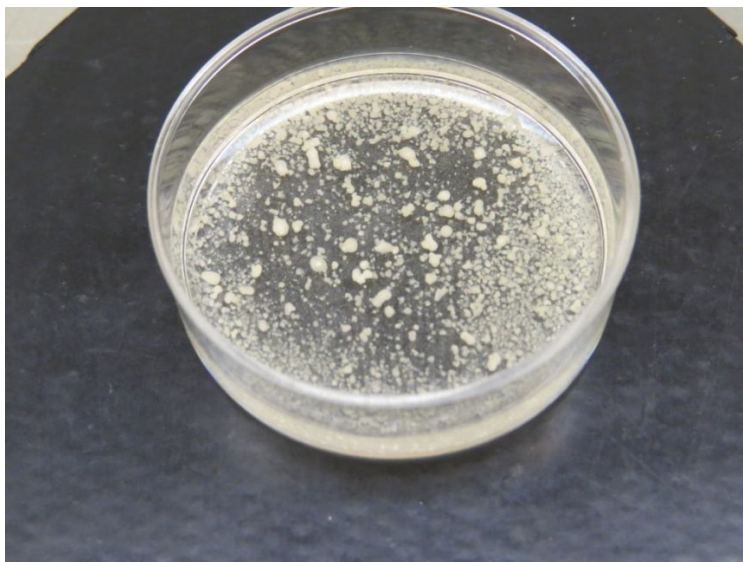
Dolgozatom fontos célkitűzése volt az árpa mikrospóra tenyésztés módszerének technológiai fejlesztése. Ezért a módszerünket az anyag és módszer fejezetben vázlatosan, az eredmények bemutatásakor részleteiben mutatjuk be. A kapott eredmények fontos szerepet játszanak a komplett technológia laborunkba történő adaptálásában. Változtatásokat hajtottunk végre a növényanyag előkezelése, a mikrospóra izolálás és tenyésztés terén az egyes szakirodalmakban bemutatott protokollokhoz képest, így is segítve azt, hogy a laborunkban rutin módszerré alakuljon az izolált árpa mikrospórák tenyésztése.

A donornövényeket mesterséges körülmények között neveltük fel. Az őszi árpát kezdetben 15 °C-on neveltük, majd ezt a hőmérsékletet 12 °C-ra csökkentettük. A kalászokat a korai egy-sejtmagvas fejlődési stádiumú mikrospórák megjelenésekor gyűjtöttük be, és hidegkamrában tároltuk 8-27 napig. Ezt követően a hypo-oldatban fertőtlenített kalászokat 0,3 mannitolon inkubáltuk 3-5 napig, 4 °C-os hűtőben vagy 26 °C-os termosztátban. A mannitolos előkezelés után került sor a mikrospórák izolálására a kalászok Blendorral történő darálásával. A kapott kalász-zúzalékot szűrőkön dörzsöltük át, majd sűrűség-grádiens centrifugálással választottuk el az életképes mikrospórákat a törmelékektől. Mint ahogy az 3. ábra is mutatja, többnyire szép csíkok születtek, melyek a tenyésztésre kerülő mikrospórákat tartalmazták. A törmelék a centrifugacsövek aljára ülepedett le.



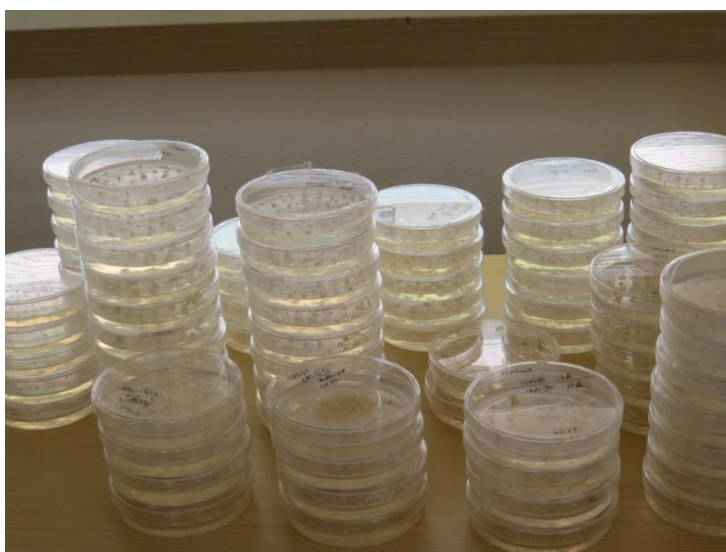
3. ábra: A sűrűség-grádiens „csíkozás” eredménye

A tenyésztésnél az N24BA indukciós tápoldatot használtuk, cefotaxime antibiotikummal kiegészítve. A mikrospóra-sűrűség beállítása után Petri-csészékbe helyeztük a kultúrákat. A mikrospórák tenyésztése termosztátban 25-28 °C-os termosztátban, sötétben történt, 3-4 hétig. Szükség esetén a táptalajt pótoltuk ez alatt az idő alatt. Mint a 4. ábrán is látható, a Petri csészékben nagy számban jelentek meg az embriószerű struktúrák.



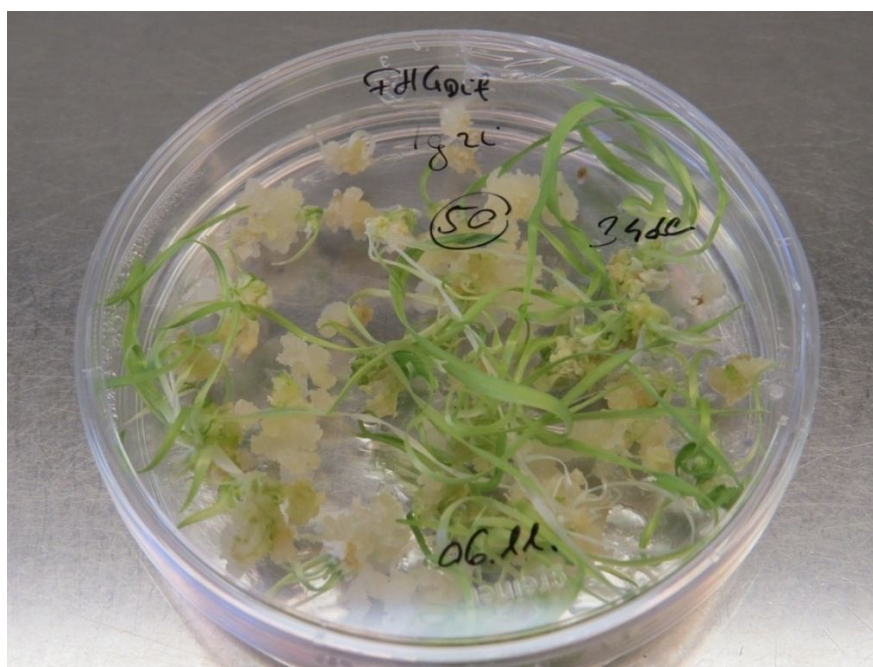
4. ábra: Az első megjelenő embriók

Az embrioidok, 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 áthelyezett 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. Összesen 74 mikrospóra tenyészetet alakítottunk ki, 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. A kísérletünkhöz felhasznált genotípusokat és a növény-kihozatali eredményeket a 4. táblázat szemlélteti.

Mivel genotípusonként nem egyforma kalázmennyiséget dolgoztunk fel, így a pontos eredményekhez fontos, hogy az egy kalászra vetített növény számmal is dolgozzunk. Vizsgálataink során az többletényezős varianciaanalízist használtuk, az SSPS 18.0 programcsomag felhasználásával. Az 5. táblázat adatai mutatják az egyes genotípusokból keletkező zöld növények és albínók átlagát, szórását.

4. táblázat: A nemesítési anyagok között felhasznált genotípusok

	ZÖLD NÖVÉNYEK SZÁMA	ALBÍNÓK SZÁMA
H5125	0	0
H5125/9	0	0
H5253	32	43
H5255	41	7
H5257	67	16
H5259	196	68
H3673	37	12
H3680	0	0
H3691	15	18
H3692	214	160
H3339	0	0
H3340	0	0
H3341	0	0
IGRI	1577	257

5. táblázat: A növénykihozatal genotípusok szerinti megoszlása

		Kalászkok 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	0,9000	0,60828
	H 5253	6	2,2000	0,90333
	H 5259	6	3,9000	3,95120
	IGRI	6	0,9600	0,19910
	össz.	30	8,7853	11,37621

Az egy kalászra jutó zöld- illetve albínó növények genotípusok szerinti csoportosításával elvégeztük a többtényezős variancia analízist, az eredményeket a 6. táblázat

tartalmazza. Megállapítható, hogy az egy kalászra jutó zöld és az egy kalászra jutó albinó növények esetében is a különbség szignifikáns az egyes genotípusok között.

6. táblázat: Az egy kalászra jutó zöld, ill. albinó 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 albinó 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 7. táblázat is mutatja. Eredményeink alapján az albinókra is ugyanez a megállapítás tehető.

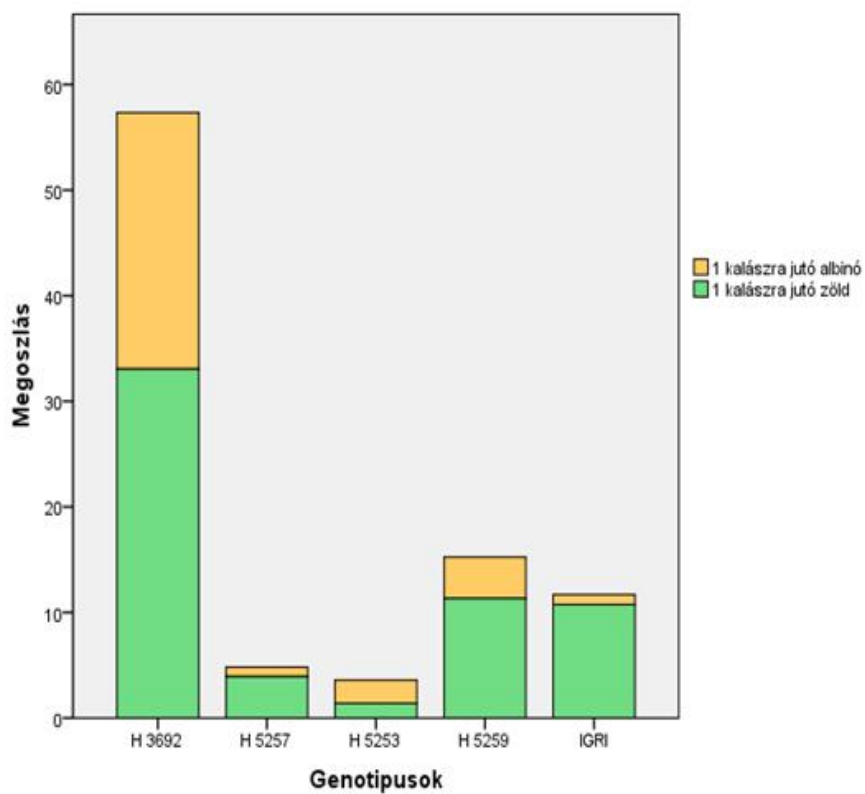
7. táblázat: Genotípusok átlaga közötti különbség és a szignifikancia szint

	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	-

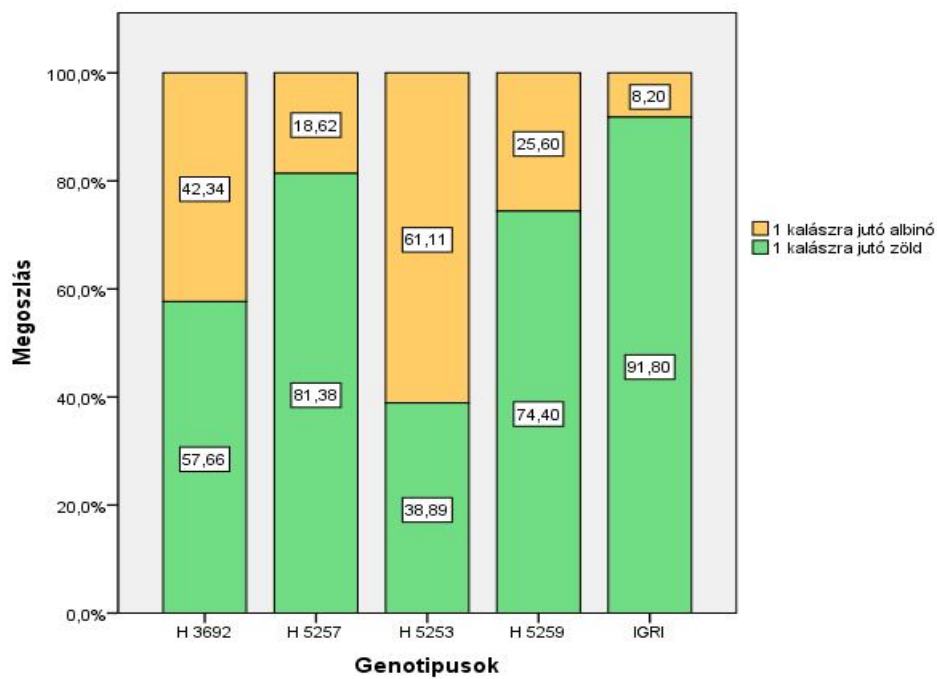
* $p < 0,05$

Az 7. ábráról leolvashatjuk, hogy a H3692-ből keletkezett a legtöbb zöld növény, a legkevesebb pedig a H5253-ból.

A 8. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy az egy kalászra jutó zöld növények aránya az Igrí-nél volt a legmagasabb, a H5253 genotípusnál pedig a legalacsonyabb. Utóbbi esetében több albinó növény fejlődött, mint zöld.



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

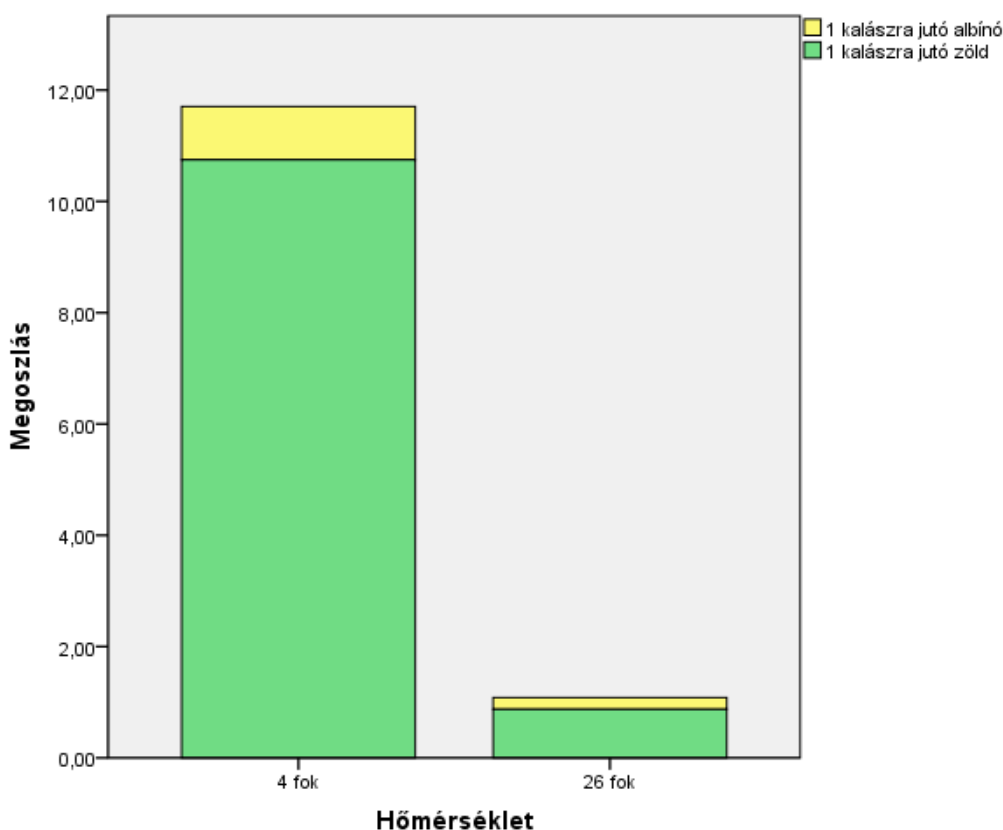


8. ábra: Az egy kalászra jutó növények számának százalékos megoszlása genotípusonként

4.2.2. Az előkezelés során alkalmazott hőmérséklet hatása

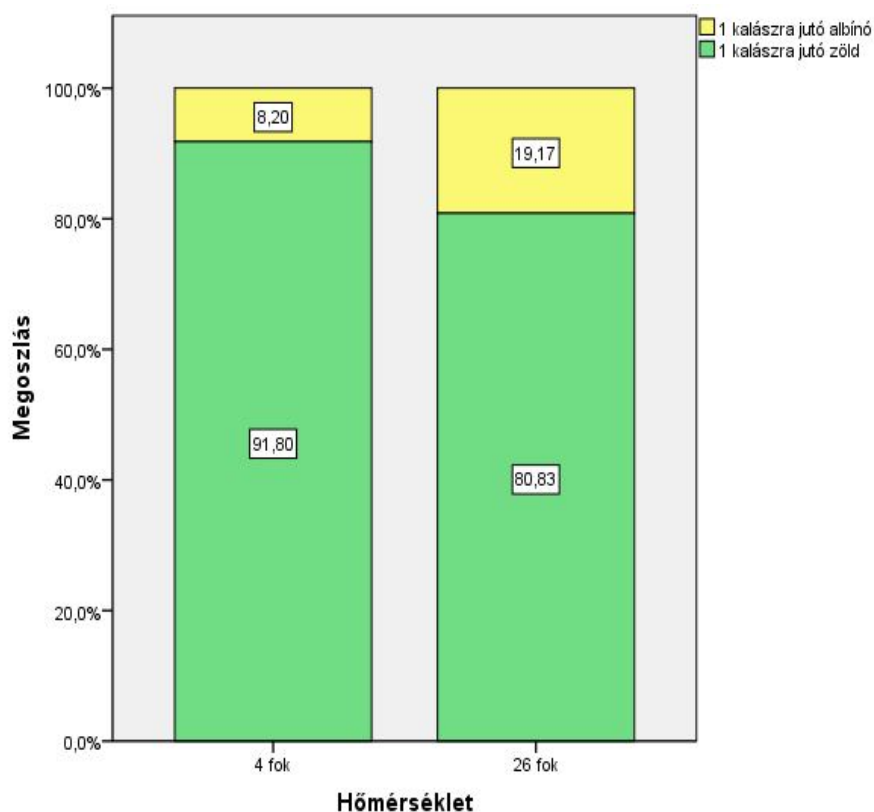
A mannitolos kezelések 3-6 napig tartottak. Összehasonlítottuk, hogy hogyan alakul a 4 °C –on és a 26 °C-on kezelt kalászból létrejövő növények száma.

A 9. ábráról megállapítható, hogy a hőmérséklet jelentősen befolyásolja az egy kalászra jutó zöld és az egy kalászra jutó albínó 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 albínó- és zöld növények számának hőmérsékletek szerinti alakulása

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

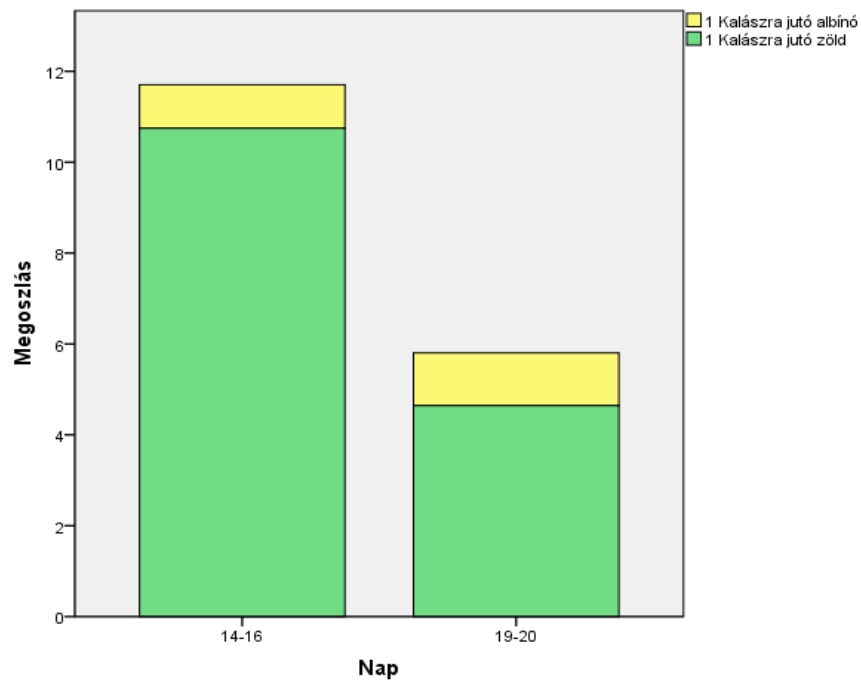


10. ábra Az egy kalászra jutó növények számának százalékos megoszlása a hőmérséklet függvényében

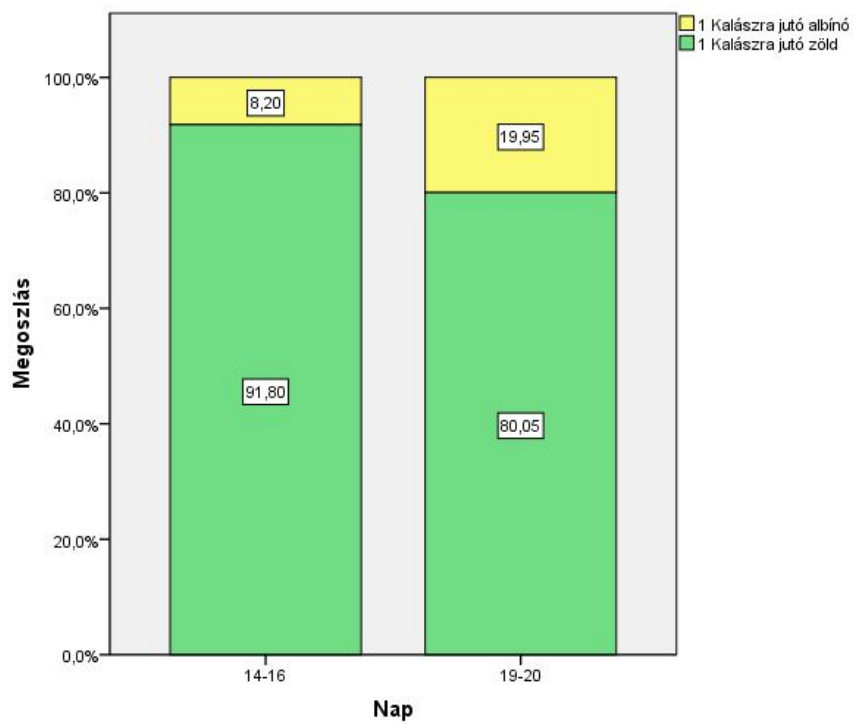
4.2.3A hidegkezelések tartamának hatása a növények számára

Kísérleteink során vizsgáltuk azt is, hogy a rövidebb, illetve hosszabb hideg-kezelési időtartam vajon befolyásolja-e a növénykihozatazt. 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



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

8. 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	0,023
	csoportokon belül	657,551	23	28,589		
	össz.	827,302	24			
albínó	csoportok között	0,178	1	0,178	0,155	0,698
	csoportokon belül	26,389	23	1,147		
	össz.	26,567	24			

Statisztikai módszerek alkalmazásával összehasonlítottuk az egy kalászra jutó zöld és albínó növények számának alakulását a kezelés függvényében. A 8. táblázatból megállapíthatjuk, hogy a zöld növények kihozatalát szignifikánsan befolyásolja a hidegkezelés, míg az albínók számának alakulása nem szignifikáns a kezelés hosszának függvényében.

A hosszabb hidegkezelés hatására, nem szignifikáns mértékben ugyan, de növekedett az albínó növények száma (12. ábra).

4.3. Növény-regenerálás mikrspóra eredetű embriókból

A növénykéket $\frac{1}{2}$ MS₀ táptalajra áthelyezve regeneráltuk. A növényregenerálás eredményeként a magról kelt árpához hasonló növényeket kaptunk.

Összesen 280 darab növénykét ültettünk ki, melyek hét genotípusból származtak. A regeneráló táptalajra helyezett növénykék a 13. ábrán láthatók.



13. ábra: Az üvegcsövekbe áthelyezett növénykék

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.

Tenyésztéseinkben 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 kalászok blendorban történő feldolgozása is, melyet más szerzők (pl.: Kasha et al. 2001b, Monostori 2003) is nagy hatékonysággal alkalmaztak.

A kalászok 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/kalászok 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 „éhezteti” 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 gyökérzettel rendelkeznek, a kiültetés körülményeihez jól adaptálódtak.

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 fajtaelőállításban lényeges előrelépést jelent a doubled haploid (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 és a mannitolos előkezelés 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. A genotípusok összehasonlításánál tapasztaltuk, hogy a H3692-es genotípusból került ki a legtöbb zöld növény.

Az embrió-kihozatal a legtöbb genotípusnál megfelelő volt. Néhány esetben, ugyanakkor, az albínó növények száma volt magas a zöld növény kihozatalhoz képest. A fejlődő növénykéken megfelelő gyökérzet fejlődött. A kísérlet végén összesen 280 növényt tudtunk kiültetni.

Célkitűzéseinknek megfelelően az őszi árpa haploid növény-előállítás módszerét néhány változtatás bevezetésével adaptáltuk laboratóriumunk körülményei közé. 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 *Datura stramonium*. *Sciences* 55: 646-647.
3. Castillo, A.M., Cistué, L. 1993: Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Rep.* 12: 139-143.
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. Devaux, D.P. 1992: Haploidy in barley and wheat improvement. In: Dattee, Y., Dumas, C., Gallais, A. (szerk.): *Reproductive biology and plant breeding*. Springer, Berlin. pp. 139–151.
10. Dudits, D., Heszky, L. 2000: Növényi biotechnológia és géntechnológia 67-70
11. 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
12. Foroughi-Wehr, B., Friedt, W. 1984: Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 67: 377-382.
13. Guha, S., Maheswary, S.C. 1964: *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
14. 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.

15. Heberle-Bors, E., Reinert, J. 1980: Isolated pollen cultures and pollen dimorphism. *Naturwissenschaften* 67: 311-312.
16. 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.
17. <http://mek.oszk.hu/01200/01216/01216.html> (letöltve: 2014. 10. 25.)
18. <http://www.agroinform.com/aktualis/Szantofold-Az-arpas-tavaszi-gyomszabalyozasanak-lehetosegei/20110214-15343/> (letöltve: 2014. 10. 25.)
19. <http://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/gyor/kal/kal214.pdf> (letöltve: 2014. 10. 25.)
20. <http://www.scri.ac.uk/assoc/COST851/Default.html> (letöltve: 2014. 10. 25.)
21. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0027_NAI2/ch01s04.htm (letöltve: 2014. 10. 25.)
22. 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.
23. 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.
24. Huang, B., Sunderland, N. 1982: Temperature-stress pre-treatment in barley anther culture. *Ann Bot* 49: 77-88.
25. Hunter, C.P. 1987: European Patent Application. No. 0245898 A2 Shell International Research Maatschappij B.V.
26. 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.
27. Jähne, A., Lörz, H. 1995: Cereal microspore culture. *Plant Sci.* 109: 1-12.
28. 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.
29. Kasha, K.J., Simion, E., Miner, M., Letarte, J., 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.

30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Kasha, K. J., Reinbergs E. 1976: Utilization of haploidy in barley. Pp. 307-315.
34. 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.
35. Kiviharju, E., Puolimatka, M., Pehu, E. 1997: Regeneration of anther-derived plants of *Avena sterilis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48: 147-152.
36. 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.
37. 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.
38. Lantos Cs. 2009: Az *in vitro* androgenezis indukciója búzában (*Triticum aestivum* L.), tritikáléban (X *Triticosecale* Wittmack), fűszerpaprikában (*Capsicum annum* L.) és az eredmények felhasználása a nemesítésben. PhD értekezés. SZIE Növénytudományis Doktori Iskola. Pp 9-45.
39. Laurie, D.A., Benett, M.D. 1988: The production of haploid wheat plants × maize crosses. Theoretical and Applied Genetics 76: 393-397.
40. Lazányi, J., Puskás, Á. 2010: Őszi árpa (*Hordeum vulgare* L.). In: Lazányi, J. (szerk.): Növénynemesítés és fajta fenntartás az Észak- Alföldi régióban. MTA Debreceni Területi Biz. Mezőgazd. Szakbiz., Debrecen. Pp. 45-50
41. Li, H., Devaux, P. 2001: Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Rep. 20: 475-481.

42. Li, H., Devaux, P. 2005: Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 611-619.
43. 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.
44. 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.
45. Manninen, O.M. 2000: Association between anther-culture response and molecular markers on chromosome 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 57–62.
46. 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
47. 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.
48. Monostori, T. 2003: Microspore culture and genetic transformation studies in barley and triticale. PhD értekezés. SZIE Növénytudományis Doktori Iskola. 110 p.
49. Monostori T. 2004: Növénytermesztés I. Távköztársi jegyzet. SZTE MGK. Pp. 26-28.
50. Monostori, T., Lantos, Cs., Mihály, R., Pauk, J., 2003. Induction of embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. *Cereal Research Communications* 31: 297-300.
51. 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.
52. Murashige, T., Skoog, F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.
53. 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

54. Oleszczuk, S., Sowa, S., Zimny, J. 2004: Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticales ($\times$ *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Reports* 22: 885-893.
55. 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.
56. Picard, E., De Buyser, J. 1973: Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. á partir de cultures d'antheres in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris* 277: 1463-1466.
57. Reynolds, T.L. 1997: Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 33: 1-10.
58. 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.
59. 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.
60. Sajtos L., Mitev A., 2007: PSS kutatási és adatelemzési kézikönyv. Alinea Kiadó, Budapest. 408 p.
61. Sidhu, A.S., Dillon, T.S., Sidhu, B.S., Chang, E. 2006: Protein Ontology Project: 2006 updates (Invited Paper). In: Zanasí, A., Temis, S.A., Brebbia, C.A., Ebecken, N.F.F. (szerk.), Seventh International Conference on Data Mining and Information Engineering, Jul 11 2006, Prague, Czech Republic. WIT Press. pp. 301-306.
62. Sunderland, N., Xu, Z.H. (1982): Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 33: 1086-1095.
63. Thomas W.T.B., Forster B.P. Gertsson B. 2003: Doubled haploids in breeding. In: Maluszinsky, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko I. (Szerk.): Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer, Dordrecht. Pp. 309-349.
64. 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.
65. Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O., Heberle-Bors, E. 1996b: Stress as the major signal controlling the developmentel fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta* 200: 144-152.

66. Tuvešson, 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.
67. Tuvešson, 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.
68. 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.
69. 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.
70. Wei, Z.M., Kyo, M., Harada, H. 1986: Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv. 'Sabarlis'. Theor. Appl. Genet. 72: 252-255.
71. 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.
72. 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, Lantos Csabának, 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.