

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

Eltérő idejű kolhicinkezelés hatása a tritikálé *in vitro*
portoktenyészteteire és a regeneránsok genetikai diverzitásának
vizsgálata

Készítette: Balogh Vera
Évfolyam: Mezőgazdasági biotechnológus MSc, II. évfolyam
nappali tagozat

Belső konzulens: Dr. Kiss Erzsébet
Beosztása: egyetemi tanár (SZIE Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet,
Gödöllő)

Külső konzulens: Dr. Lantos Csaba
Beosztása: tudományos munkatárs (Gabonakutató Nonprofit
Közhasznú Kft., Szeged)

Gödöllő
2014

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A növénynemesítésben alkalmazott DH technológia jelentősége	6
2.2. Tritikálé.....	7
2.3. Haploid növények előállítása.....	9
2.4. <i>In vitro</i> androgenézis	11
2.4.1. Portok vagy mikrospóra	13
2.4.2. Stressz általi indukció és tenyésztési feltételek.....	14
2.4.3. Albinizmus előfordulása	15
2.5. Kromoszóma duplikációs eljárások	15
2.5.1. Kolhicin hatása az osztódó sejtre	16
2.5.2. Kolhicin kezelési módszerek.....	17
2.6. Ploiditás meghatározása.....	18
2.7. Genetikai diverzitás vizsgálata markerek segítségével.....	18
2.7.1. Polimeráz láncreakció	20
2.7.2. Molekuláris marker: mikroszatellit marker.....	20
3. Anyagok és módszerek	23
3.1. Kísérletek növényanyaga, begyűjtése.....	23
3.2. Portokok izolálása, tenyésztése	23
3.3. Embriók tenyésztése, növényregenerálás	24
3.4. Statisztikai elemzés.....	25
3.5. A regeneránsok variabilitásának vizsgálata.....	25
3.4.1. DNS izolálás	26
3.4.2. PCR	28
3.4.3. A PCR termék gélelektroforézissel történő elválasztása	29

4. Eredmények és értékelésük.....	31
4.1. Az androgenetikus folyamatok genotípus függősége	31
4.2. A kolhicinkezelés hatékonysága.....	33
4.3. A regenerások genetikai diverzitása	37
5. Következtetések és javaslatok.....	40
5.1. Az androgenetikus folyamatok genotípus függősége	40
5.2. A kolhicinkezelés hatékonysága.....	41
5.3. A regenerások genetikai diverzitása	42
6. Összefoglalás	44
Köszönetnyilvánítás	45
Irodalomjegyzék	46

Rövidítések jegyzéke:

DH - Doubled Haploid

PCR - Polymerase Chain Reaction

SSR - Single Sequence Repeat

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

ISSR - Inter-Simple Sequence Repeats

SCM - *Secale Cereale* Miscrosatellit

MS - Átlagos négyzetes eltérés

SzD - Legkisebb szignifikáns differencia

SzD_{gen} - Legkisebb szignifikáns differencia a genotípus tekintetében

SzD_{kez} - Legkisebb szignifikáns differencia a kezelés tekintetében

1. Bevezetés

Mióta mindössze néhány hónap alatt sikeresen előállíthatók teljesen homozigóta vonalak, a DH (doubled haploid) technológiák a modern nemesítési programok szerves részévé váltak, drasztikusan lecsökkentve ezzel az új beltenyésztett vonalak előállításához szükséges időt. A DH növények rutinszerűen előállíthatók számos gabonaféle, főként árpa esetében. Relatív magas költsége és alacsony hatékonysága ellenére, mégis indulnak a nemesítésben próbálkozások DH növények előállítására más gabonafélék pl. tritikálé esetében is.

Az androgenezis indukciójával haploid növények *in vitro* előállítása nagy jelentőségű a növénynemesítésben. Az előállított haploidok fenotípusa közvetlenül utal a genotípusukra. A kromoszómaszerelvény megkettőződésével egy lépésben az összes gén homozigóta formába kerül. Az előállított haploidok spontán rediploidizálódnak, vagy kémiai kezeléssel - kolchicinnel- is el lehet érni a haploid kromoszóma szerelvény megduplázódását, ezzel a diploid szint visszaállítását. Így kapjuk a már említett DH növényeket, amelyek megduplázott haploid kromoszómaszámmal rendelkeznek ezért genetikailag homozigótának tekinthetők. A módszer segítségével heterozigóta szülőktől egy nemzedék alatt lehet homozigóta rekombináns genotípusokat előállítani. A leggyakrabban használt és a leghatékonyabb kromoszóma duplikációs ágens, az *in vivo* is előforduló növényi másodlagos anyagcseretermék, a kolhicin. Ez az alkaloid a mitotikus orsók kialakulásának gátlásával megakadályozza a sejtek osztódását ezzel segítve a megkettőzött kromoszómakészletű sejtek létrejöttét.

A nemesítők kezdetben a természetes genetikai variabilitást használták fel új fajták előállítására. Ám már a 18. századtól kezdve megkezdődtek a variabilitás mesterséges, irányított növelését célzó törekvések, melynek kezdeti módszere a keresztezés volt. A variációk azonosításának modern módszere a genetikai markerek használata. A különféle típusú markerek közül a mikroszatellit (=SSR) markerek bizonyulnak a leginformatívabbnak nagyfokú polimorfizmusuknak, kodominanciájuknak és kromoszóma-specifitásuknak köszönhetően.

A tritikálé napjainkra egyre nagyobb jelentőségű a gabonafélék termesztésében. A tritikálé, lévén hogy a búza és a rozs keresztezéséből származó hibrid, értékes agronómiai és beltartalmi tulajdonságokkal rendelkezik, képes a kedvezőtlen talajokon és klimatikus

körülmények között is felülmúlni a szülők termésátlagát. Beltartalmi értékeinek, a nagy fehérjetartalomnak, a magas arányú metionin tartalomnak köszönhetően rendkívül értékes takarmány- és kenyérgabona-növény. A tritikálé szelekciójának célja a heterózis okozta magasabb produktíviású, magas tápértékű fajták nyerése.

Pályamunkám során androgenezis indukciója céljából a tritikálé faj több genotípusának kalászaiból *in vitro* portoktenyészeteket indítottunk. A megjelenő embriókat különféle időtartamú kolhicinkezelésnek kitéve az alkaloid *in vitro* androgenetikus folyamatokra történő hatását vizsgáltuk. A technológia sikerességének elemzéséhez a zöld és az albínó regeneránsok számát határoztuk meg a megjelenő embriószerű struktúrák százalékában illetve a kiültetett egyedek fertilitási hányadát. Célunk a tenyésztésre jellemző nagyszámú albínó növények csökkentése mellett minél több érett, fertilis egyed előállítása. A fent említett értékeket vizsgálva a folyamat genotípus függősége is megállapítható.

További célom a regeneránsok genetikai variabilitásának megállapítására azok heterogenitásának illetve homogenitásának vizsgálata. Ehhez többféle SSR (Simple Sequence Repeats - rövid szekvencia-ismétlődés) markerrel vizsgáltuk a regeneránsok genetikai diverzitását. A genetikai markerek használatával szelektálhatók azok a kimagasló genotípusok, melyek a növénynemesítők számára értékes kiinduló alapanyagul szolgálhatnak az új, versenyképes fajták nemesítéséhez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A növénynemesítésben alkalmazott DH technológia jelentősége

Haploidok azok a növények, melyek az ivarsejtekre jellemző, azaz egyszeres kromoszómakészletet tartalmaznak. A haploidok spontán, természetes körülmények között és számos indukciós folyamat során is képződhetnek (Murovec & Bohanec 2012).

A nemesítési folyamatokban leggyakrabban homozigóta genotípusok előállítása céljából használatosak a haploidok. Ezzel járó előny, hogy viszonylag rövid időn belül nagy számú, recesszív kombinációk is képesek kihasadni (Murovec & Bohanec 2012), mellyel lehetőség van a rejtve maradó, recesszív tulajdonságok fenotípusos megjelenésére (Heszky 2005), ugyanis a DH vonalakban olyan lokuszokban is kialakul a homozigózis, amelyek recesszív alléleket hordoznak.

A dihaploid előállítási rendszerek alkalmazásával egy generáció alatt érhető el a homozigóta állapot (Kuckuck et al. 1988). Ez az időmegtakarítás azoknál a növényfajoknál a leghasznosabb, ahol a generációváltás ideje nem 1 éves mint a legtöbb gabonaféle esetében, hanem 8-10 éves, mint a szőlő, és gyümölcsfák.

Az öninkompatibilis, a kétlaki és a beltenyésztéses leromlás veszélyével rendelkező fajoknál a haploid módszerek jelenthetnek megoldást a beltenyésztett vonalak előállítására. Azoknál a kétlaki növényeknél, ahol a növény neme genetikailag determinált, szuperhímek állíthatók elő. A spárga példáján bemutatva, ahol a domináns M gén határozza meg az egyed nemét, a nőnemű egyedek homozigóta recesszívek (mm), míg a hímneműek heterozigóták (Mm) a génre nézve. Androgenezissel előállított DH vonalak esetében a nemek a következők szerint változnak: (mm) homozigóta recesszív nő, és (MM) homozigóta domináns szuperhím. A szuperhímeket pollenadóvonalként felhasználva minden utód hímnemű hibrid lesz (Murovec & Bohanec 2012). Haploidizálással meg lehet szabadítani a genomot a gének olyan alléljeitől, melyek homozigóta formában szubletális hatásúak. Ez az oka annak is, hogy a haploidokból előállított dihaploidok esetenként donor növényeknél erőteljesebben fejlődnek (Kuckuck et al. 1988).

A növénynemesítés szempontjából az *in vitro* portokkultúra egyfajta genetikai szelektáns is, ugyanis az *in vitro* stressz körülmények között csak a jobb plaszticitású, nagyobb vitalitású genotípusok képesek megmaradni (Kuckuck et al. 1988).

A spontán vagy indukált kromoszóma-duplikáció folyamata nélkülözhetetlen a haploidok előnyeinek hasznosításához a növénynemesítés során. Az így létrejött dihaploidok az összes lókuszra nézve homozigóták, ezzel az öntermékenyülők új variánsai/módosulatai/kombinációi, illetve olyan beltenyésztett vonalak jelennek meg, mellyekkel az idegentermékenyülők különféle hibridjei állíthatók elő (Murovec & Bohanec 2012). A különböző faj- és fajtakersztezésekkel addíciós és szubsztitúciós hibridek állíthatók elő (Heszky 2005).

Néhány évtizede a nemesítési programokban már a DH növények is rutinszerűen használatosak, bár van néhány limitáló faktor, mely megnehezíti az előállításukat. A technológia sikerességét befolyásoló biológiai tulajdonságok többek közt: a donor növény genotípusa, fejlődési szakasza, a virág morfológiája, a gaméták, mikrospórák és az ovulum fejlettségi szintje. A technikai korlátozók közé tartoznak a donor növény fiziológiai tulajdonságai/környezeti feltételei (az életfeltételeihez szükséges tényezők optimális szintje), a donor növények előkezelésének típusa, a táptalajok és tápoldatok összetétele, a szövettenyészetre ható fizikai tényezők (hőmérséklet, megvilágítás) illetve a protokoll hatékonysága és alkalmazhatósága (Murovec & Bohanec 2012).

2.2. Tritikálé

A tritikálét (*X Triticosecale Wittmack*) a búza és a rozs keresztezésével állították elő. Ebben a hibridben megtalálható mindkét szülő tulajdonsága, így a búzára jellemző nagy termésátlag, melyet kedvezőtlen talaj- és klimatikus körülmények között is produkál (Orlovskaya et al. 2012). Ezeknek az alapján az abiotikus rezisztencia vonatkozásában kitűnő a szárazság-, só-, savas és lúgos talajkémhatás és a hideg-meleg klíma-tűrése egyaránt. Rendkívül jó a betegségellenálló-képessége (biotikus rezisztencia), amely mindkét szülőét felülmúlja: a lisztharmat-, a hópenész- és az üszögrezisztenciája kitűnő, a rozsdaraszok egyes biotípusaival szemben ellenálló. Takarmányozási szempontból kiváló szemes- (abak-) takarmány, amelyet önmagában is szívesen fogyasztanak az állatok. Emellett kenyér illetve különféle pékáru is készíthető belőle. Magas metionin + cisztein- és lizintartalommal rendelkezik. A tritikáléfajták többsége túlnyomóan öntermékenyülő, de idegen megporzás

(xenogámia) a fajtától és a virágzáskori időjárástól függően 0–30%-ban előfordulhat (Izsáki & Lázár 2004).

A maga 125 éves korával igen fiatalnak tekinthető gabonafaj. Az első búza-rozs hibrid előállítását A. S. Wilson nevéhez fűződik (1875). Ám az első steril tritikálét Carman (1884) és W. Rimpau (1888) állították elő. Rimpau 1891-ben előállított hibridjét tekinthetjük az első igazi tritikálénak, alapul véve a fajta mai formáját, mely képes volt a növényenkénti 15 szem hozására, melyből átlagosan 12 volt fertilis. Ezek a tritikálé hibridek még mind oktoploidok voltak, ABD (42 kromoszóma) búzagenomot, és az R (14 kromoszóma) rozsgenomot tartalmaztak. Hamarosan elkezdődött a hexaploidok előállítása is. A nagyjából 1940-es évekre tehető időszakban az úgynevezett elsődleges hexaploid tritikálék nemesítési munkálatai folytak (Bóna 2014). A fertilitási problémát Kiss Árpád oldotta meg az oktoploid tritikálé és a primér hexaploid tritikálé keresztezéséből származó F₁ nemzedékek hexaploid tritikáléval történő többszöri visszakeresztezésével (Heszky & Galli 2008). Így elsőként Kiss Árpád közreműködésével létrejöttek a másodlagos hexaploid tritikálé hibridek. – A Rimpau féle tritikálé (oktoploid) és a TcNo1 tritikálé (hexaploid) keresztezéséből kapott F₁ nemzedéket keresztezte vissza a TcNo1-gyel. A másodlagos hexaploidok meiózisa alatt 21 bivalens és 7 univalens figyelhető meg, mivel a D genom kromoszómái páratlanok (Rédei 1987). A másodlagos hexaploid növények között kisebb volt az előforduló aneuploidok aránya, nagyobb fertilitás és stabilitás jellemezte őket, illetve a produkciós képessége is jobb volt, mint az elsődleges hexaploidok esetén. Az első regisztrált tritikálé fajták a T-No. 57 és a T-No.64, melyeket Kiss Árpád állított elő, és Budapesten regisztrálták 1968-ban (Bóna 2014). Léteznek más ploid szintű, mint a dekaploid és a tetraploid tritikálék is, bár ezek a formák ritkák (Kuleung et al. 2004).

A modern fajták már sokban különböznek az „ősüktől”; inkább törpenövésűek, korábban érők és jó szárszilárdságúak. A tavaszi fajták másfélszer nagyobb fehérjetartalmúak mint az árpa, illetve több mint másfélszer több metionin tartalmú esszenciális aminosavval rendelkezik, mint az őszi vetésű rozs (Orlovskaya et al. 2012). A fejlett, kenyérgabonával (búza, rozs) rendelkező országokban elsősorban takarmányként kerül felhasználásra, de már vannak olyan fajták is termesztésben, amelyeknek sütőipari tulajdonságai is jók. Nagy előnye a tritikálénak a többi gabonaféléhez képest, hogy kedvezőtlen ökológiai körülmények között is gazdaságosan és környezetkímélő módon termesztethető (Izsáki & Lázár 2004).

Ez az új gabonaféle megoldást jelent a gabonatermelésben és a gabonaiparban egyaránt, minőségi tulajdonságait tekintve, illetve az élelmezési gondok enyhítésének tekintetében. Számos mediterrán régióban akár 17%-kal is nagyobb a produktuma, mint a

búzának. Egyes fajtái 2013-ban hazánkban is felülmúlták mind a búzát, mind a kukoricát (Bóna 2014).

2.3. Haploid növények előállítása

A haploid növények első megfigyelései 1922-re tehetők. A jelenségről elsőként Blakeslee és munkatársai (1922) számoltak be, melyet a csattanó maszlagnál (*Datura stramonium* L.) tapasztaltak. Számos kísérlet zajlik az *in vitro* haploidok előállítására, melyet igazol az a tény is, hogy ma már több mint 250 növényfaj rendelkezik protokollal. A diploid fajokból előállított, monoploidoknak tekinthető haploidok csak egyetlen kromoszómakészlettel rendelkeznek, így kisebbek és alacsonyabb vigorosságúak a diploidokhoz képest, továbbá sterilek, mivel a meiózissuk során elmarad a kromoszóma-párosodás (Murovec & Bohanec 2012).

Az *in vitro* haploid indukciós módszerek lehetővé teszik a kultúrnövények ploid szintjének redukcióját, a gametoklonális variabilitásnak az intakt növények szintjére hozását, a recesszív tulajdonságok fenotípusos megjelenését, addíciós és szubsztitúciós hibridek előállítását, szuperhím alakok előállítását, hasadó vonalak rögzítését, továbbá genetikailag tiszta vonalként (DH vonal) használhatók molekuláris markerek keresésére, és térképezésére (Heszky 2005).

A haploid növények előállításának technikái közé soroljuk a haploid partenogenezist, a távoli fajok keresztezését, a haploid apomixist (Heszky 2005), az ikercsírás módszert és Chase marker módszerét (Sutka 1980).

- *Haploid parhenogenezis*ről beszélünk, amikor csökkent életképességű pollennel megporzott ováriumból, illetve ovulumból származó petesejt eredetű haploidokat nevelünk fel. Ebben az esetben a besugárzással vagy kémiai úton funkcióképtelenné tett pollen generatív magja nem tud a petesejttel fuzionálni, de a pollentömlő képes behatolni az embriózsákba, ezzel okozva a ginogenezis indukcióját kiváltó stresszt. A haploid partenogenezisen alapuló, a tetraploid burgonya faj haploidjának előállítására kidolgozott módszer aphureja-technika. A *Solanum tuberosum* L.(burgonya) ($2n=4x=48$) fajt keresztezik a *Solanum phureja* Juz. et. Buk. ($2n=2x=24$) fajjal, mely utóbbinak sajátossága, hogy pollenje csak 1 generatív sejttel rendelkezik (ennek oka a II. pollenmitózis elmaradása). A megtermékenyítés után a fejlődő magvak kb. 10-40%-a ginogenetikus eredetű haploid. A pollenstimuluson alapuló partenogenezis

petúnia esetében a leghatékonyabb haploid előállítási módszerre nőtte ki magát (Heszky 2005).

- *Távoli fajok keresztezése* során úgy kaphatunk haploid növényeket, ha a kapott hibrid embriókat mesterségesen felneveljük, ugyanis azok *in vivo* életképtelenek, mivel a megporzást követően a megtermékenyülés megtörténik, de a zigóta első osztódásai során a pollen donor faj genomja 100%-ban eliminálódik. Az embriók felnevelésének módszerét 1971-ben Kasha és Kao a *Hordeum vulgare*L. és a *Hordeum bulbosum*L. fajok keresztezése során dolgozta ki, melyet bulbosum-technikának neveztek el. Mára már búza x kukorica, búza x köles (Heszky 2005) keresztezésekből származó haploidok is sikerrel előállíthatók ezzel a módszerrel.
- *Ikermódszer* alapja, hogy a növények világában is előfordul, hogy egy magból két növény, azaz ikrek fejlődnek. A növények esetében ez gyakran úgy megy végbe, hogy az egyik triploid a másik utód haploid lesz. A haploidok előfordulása ritka, és a kiválogatás munkaigényes (Sutka 1980).
- Chase (1952) kifejlesztette a *marker* gén alapú haploidválogatást. Kiindulási kukoricafajtát egy olyan fajtaival keresztezte, amely marker fajtának felel meg. Ez a marker fajta a fejlődés korai fázisában valamilyen könnyen felismerhető domináns tulajdonsággal rendelkezik (Sutka 1980).
- Abban az esetben, ha nincs megtermékenyítés - tehát nincs zigóta - és embrió mégis fejlődik, *apomixis*ről beszélünk. Attól függően, hogy milyen sejtekből fejlődik az apomiktikus embrió, beszélünk diploid vagy haploid apomixisről. A diploid apomixis során a megtermékenyítés nélkül fejlődő embrió valamilyen diploid sejtéből alakul ki (vagy redukálatlan petesejtéből vagy az embriózsák testi, diploid sejtjeiből). Haploid apomixisről akkor beszélünk, ha az embrió közvetlenül a hímivar-sejtéből (androgenezis), vagy petesejtéből (gynogenezis) fejlődik (Heszky & Galli 2008). Az, hogy az adott faj esetében a partenogenezis vagy az androgenezis az alkalmasabb lehetőség a haploidok előállítására, elsősorban attól függ, hogy a faj melyik módszerre reagál jobban. Persze figyelembe véve azt, hogy a virág porzójában sokkal több a mikrospóra, mint a magházban a petesejt, a kutatások többsége az antérákból (portok) történő haploidok előállítására fókuszál (Kuckuck et al. 1988).

A gynogenezis során az embriózsák redukálatlan sejtjéből közvetlenül haploid növények fejlődnek. A megtermékenyítetlen petesejt a zigótákra jellemző módon osztódik.

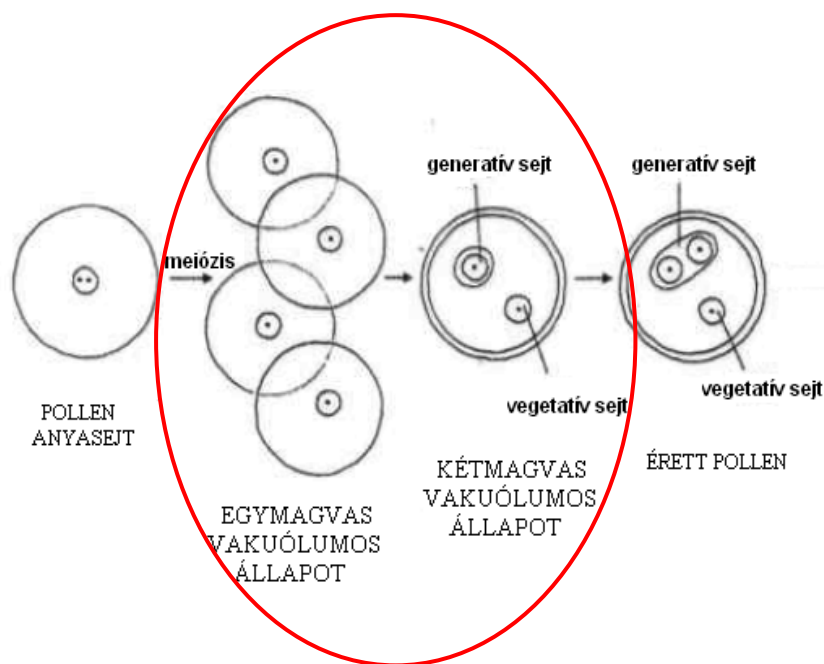
Az *in vitro* ginogenezis termékenyítetlen ovárium vagy ovulum steril kultúráiban indukálható, azok előkezelése, izolálása és *in vitro* mesterséges táptalajon való tenyésztése okozta stressz kiváltásával. (Heszky 2005). A redukáltalan sejtek közvetlenül is haploid növényekké fejlődhetnek, kizárva mindennemű gametoklonális variabilitást, vagy egy köztes, kallusz fázison keresztül. Habár a ginogenetikus regeneránsok nagyobb stabilitást mutatnak és alacsonyabb is az albínó növények aránya az androgenetikus regeneránsokhoz képest, a ginogenezis főként csak azoknál a növényeknél használatos, ahol más technika alkalmazása - mint például az androgenezis vagy a megporzás- megoldatlan. A ginogenezis indukciója megtermékenyítetlen virági részekben számos növényfajon már sikerrel ki van dolgozva, mint például a hagyma, cukorrépa, uborka, tök, gerbera, napraforgó, búza, árpa esetében. Nemesítés szempontjából azonban a hagyma és az cukorrépa esetében hasznosul (Murovec & Bohanec 2012).

Az androgenezis során a redukált pollenszemből (n) közvetlenül fejlődnek haploid növények. Az *in vitro* androgenezis portok és mikrospóra kultúrákban indukálható (Heszky 2005). A kidolgozott technológia kimagaslóan fontos a növénynemeítés és a DH növények kereskedelmi hasznosításában (Murovec & Bohanec 2012). Napjainkra több száz növényfaj haploid alakját állították már elő ezzel a technikával. Nagy hátránya viszont, hogy bizonyos növénycsoportok esetén nagy az albínók aránya (Heszky 2005).

2.4. *In vitro* androgenezis

„A szaporodásnak léteznek alternatív útjai is, mint amikor a pete megtermékenyítés nélkül haploid, illetve egy későbbi spontán kromoszómamegkettőződés következtében akár diploid embrióvá is fejlődhet.” A jelenség *in vitro* körülmények között olyan növény-és állatfajoknál is lejátszódik, melyeknél a természetben spontán nem történik meg (Rédei 1987).

Androgenezis indukciójának alapja az, hogy a portokok izolálása az anyanövényről akkor történjen, amikor benne a mikrospórák egysejtes vakuólumos érettségi állapotban vannak (1. ábra). A pollen továbbfejlődése ebben az állapotában nem determinált, azaz indeterminált fejlődési fázisban van. Az izolált mikrospórák az indukciós közegben megtartják osztódóképességüket, és a megjelenő soksejtes struktúrákból az embriogenezis folyamatával haploid embriók, vagy más esetben haploid kalluszok jönnek létre (Heszky 2005).



1. ábra: Mikrospóra fejlődési fázisai, piros kör jelöli az indeterminált fejlődési fázist. (Balogh Vera készítette <http4> alapján, 2013)

Az indirekt androgenézis, azaz a pollenből kalluszképződésen keresztül történő növényregenerálás nem kívánatos, mert ez rendszerint aneuploidok megjelenésével jár (Rédei 1987). Ha azonban a haploid sejteket a regenerálás előtt kolhicinnel kezeljük, homozigóta diploid embriókat nyerhetünk (Rédei 1987). Fontos továbbá a megfelelő sűrűségű táptalaj megválasztása. A portokok szilárd, félfolyadék, folyékony, vagy két-fázisú rendszerben tenyésztethetők (Murovec & Bohanec 2012). Tritikálé esetében a félfolyadék táptalaj bizonyul a legjobbnak mind az indukció mind a regeneránsok nagy hozama, illetve az albínók alacsony száma tekintetében (Arzany & Darvey 2010). A kontroll és a kolhicines folyékony indukciós táptalaj esetében nagyobb volt a kalluszosodás aránya, mint ez embriók kialakulásának aránya, a szemifolyadékhoz képest (Arzani & Darvey 2001). Az agar alapú kolhicint tartalmazó indukciós táptalaj gátló hatással tud lenni az embrió indukcióra, lévén hogy a toxikus anyag kötött állapotban van jelen (Kohlenbach & Wernicke 1978). Ha viszont csökkentjük az agar koncentrációját, akkor a toxikus anyaggal alkotott kötés minimalizálódik, jobb androgenetikus választ okozva ezzel a tritikálé portokok esetében (Arzani & Darvey 2001).

2.4.1. Portok vagy mikrospóra

Mikrospórákból is nevelhetők kultúrák anélkül hogy a portokoktól elkülönítenénk őket, bár a pollenzsákból eltávolítva elősegíthető fejlődésük. „A portokok általában növekedésgátlókat tartalmaznak” (Rédei 1987).

Embriogenezis mikrospóra kultúra esetében: A mikrospóra tenyésztés során a pollenszemeket izolálva a portokokból, megfelelő tisztítás és a megfelelő denzitás beállítása mellett folyékony tápközegbe helyezzük. A mikrospóra tenyésztés jelentőségét növeli az a tény, hogy az izolált mikrospóra (pollen) szuszpenzió ténylegesen különálló sejteket („single cell”) tartalmazó tenyészet. Viszont a módszer még nincsen rutinszerűen kidolgozva, szemben a portok kultúrával, ami univerzális technikának tekinthető a legfontosabb kultúrfajok vonatkozásában (Heszky 2005).

Embriogenezis portok kultúra esetében: A portok kultúra esetében, a virágból izolált portokokat - melyekben a mikrospórák megfelelő fejlődési fázisban vannak - általában szilárd táptalajon tenyésztjük. A portok kultúra nagy hátránya viszont az, hogy a tenyészetben egyidőben kétféle ploidszintű sejt van jelen: a portok szomatikus sejtjei ($2n$), és a haploid (n) mikrospóra sejtek. Ez megnehezíti a diploid regeneránsok és a kallusz polleneredetének pontos meghatározását (Heszky 2005). Az *in vitro* androgenezis indukálása éretlen antérakon (portok) technikailag egyszerű folyamat, mely felületi sterilizálással kezdődik, előkezelve a virágzatot, majd ebből az antérák steril körülmények között történő kimetszése következik (Murovec & Bohanec 2012). A portok kultúra segítségével hazánkban több, köztermesztésben lévő búzafajta is született, elsőik közt a GK Délibáb és a GK Szindbád (Pauk et al. 1995).

Az *in vitro* androgenezisre alapuló technikával napjainkig több száz növényfaj haploid alakját állították elő. Hátránya, hogy bizonyos növénycsoportokban (pl. *Triticum* fajok) nagy az albínók aránya, melyet csökkenteni a tenyésztési feltételek optimalizálásával lehet (Heszky 2005).

Végeztek kísérletet arra vonatkozóan, hogy a tritikálé egy genotípusán belül a portok vagy a mikrospóra tenyészet reagál-e jobban az androgenetikus folyamatokra. Ennek megállapítására 100 portokra vonatkoztatva meghatározták a megjelenő embriószerű struktúrák száma mellett a zöld regeneránsok és az albínók számát. Az eredmények szerint az androgenezis indukciója az izolált mikrospóra tenyészet esetén hatékonyabb volt a maga 511 embriószámával, szemben a portok kultúrájánál tapasztalt 55,5/100 portok értékével. A regeneránsok hozamában a portok kultúra eredményei szintén alulmúlták a mikrospóra

tenyészet eredményeit, pontosan 3,4-szer alacsonyabb volt (portok: 20,15/100 portok; mikrospóra: 67,6/100 portok). A zöld növény produkció a mikrospóra tenyészetnél 5,8%-os, viszont portok kultúra esetében 16,8 volt, ami 2,9-szer nagyobb érték. Az albinók előfordulását tekintve is kedvezőbb a kihozatal a portok kultúra esetében (Lantos et al.2014).

2.4.2. Stressz általi indukció és tenyésztési feltételek

Az androgenetikus választ befolyásoló egyik legfontosabb tényezők az izolált gaméták fejlettségi állapota és az előforduló lehetséges biotikus és abiotikus stresszek együttes előfordulása jelenti. A stresszválaszt különféle faktorok alkalmazásával segítjük elő, amelyek az éretlen pollenszemeket azok gametofitikus útvonaláról eltérítik a sporofitikus útra, melynek következtében embriószerű struktúrák szabadulnak ki a pollenfalon keresztül (Maraschin et al. 2005).

A leggyakrabban használt kiváltó faktorok a hideg kezelés, hőkezelés, éheztetés, a nitrogénhiány és az ozmotikus stressz. Utóbbiak legegyszerűbben a tenyésztési közegben biztosíthatóak. Általában a kellőképpen beállított tenyésztési feltételek a taxonómialilag különböző fajok körében is jól használhatók (pl.: a dohánynál beállított alkalmazható a búzánál is)(Murovec & Bohanec 2012).Nagy jelentőségű a mikroelemek jelenléte is: az emelkedett rézkoncentráció csökkenti a gabonák körében az albinizmust (Jacquard et al. 2009). A szénhidrátok közül kiemelt jelentőségű a szaharóz szerepe, amit egyes esetekben már maltózzal helyettesítünk.A maltóz jelentőségét először árpa portokkultúrájánál bizonyították. Chu és munkatársai kimutatták, hogy a monoszacharidok közül a a glükóz alkalmazása mellett érhető el a legnagyobb pollen eredetű embrioid,illetve a regeneránsok kihozatala (Chu et al. 1990). Egyes esetben növekedési faktorok is adagolhatók a kultúrákba. A hőkezelés, attól függően, hogy a teljes virágzat vagy csak a kivágott rügyek vagy a kivágott antérákat érinti, történhet alacsony vagy magas hőmérsékleten. Fajtól is függ, miszerint az árpa, a búza, a kukorica, a rizs, a tiritikálé és a rozs az alacsony, míg a repce, a dohány, és egyes búzafajok magas hőfokú kezelést igényelnek. A gaméták újraprogramozására a sugárzás, az auxin, a vízstressz mellett a kolhicint is sokszor használják(Murovec & Bohanec 2012).

A mikro- és makroelemeket különféle koncentrációban és különféle variációkban tartalmazó táptalajok különféle névvel ellátott receptek. A leggyakrabban használt és a legszélesebb körben ismert és elterjedt táptalaj típus az MS táptalaj, melyet Murashige és

Skoog fejlesztettek ki még 1962-ben (Murashige & Skoog 1962). Immonen és Anttila (2000) különféle táptalajtípusok használatával (190-2, W14, OAC-1, N6, AA, MS) végeztek rozs portokkultúrákból növényregenerálást, és eredményeik alapján a 190-2 és a W14 bizonyult a legjobbnak (Immonen & Anttila 2000). A tenyésztési feltételek optimalizálását követően embriószerű struktúrák vagy kallusz sejtek megjelenésére számíthatunk, melyekből növények regenerálhatók (Murovec & Bohanec 2012).

2.4.3. Albinizmus előfordulása

Az albinizmus az interspecifikus keresztezések és a szövettenyésztési kísérletek, így tehát a portoktenyészetek és DH növények előállításának is gyakori problémája. Ennek oka a klorofill pigmentek részleges vagy teljes hiánya, illetve a kloroplasztisz membránjának hiányos differenciálódása, ami pedig a fotoszintézis zavarához vezet. A kloroplasztisz kialakulását a tilakoidokban található klorofill tartalmú fotorendszer hibás fejlődése gátolja. Ezek a növények még az érettségiállapot elérése előtt meghalnak (Kumari et al. 2009).

Az albínó növények előfordulási gyakoriságában szerepet játszik néhány környezeti feltétel, mint például a megvilágítás, a hőmérséklet, a táptalaj összetétele, illetve a tenyésztés körülményei, ám a genetikai faktorok legalább olyan fontosak. A kiváltó mechanizmusok még nincsenek teljesen tisztázva (Kumari et al. 2009).

2.5. Kromoszóma duplikációs eljárások

A gabonafélék mikrospóra eredetű DH növények előállítása során az egyik legkritikusabb lépés a haploidok kromoszóma megkettőzése. A spontán történő kromoszóma-megkettőződés valószínűsége relatíve alacsony tritikálében (Pauk et al. 2000). Mikrospóra eredetű haploidok spontán történő kromoszóma megkettőződés rátája árpa esetében igen magas, 70-90% körüli értéket mutat (Castillo et al. 2009), míg a tritikálénál ez az érték csak 6-38% körül mozog (Arzani & Darvey 2001, Oleszczuk et al. 2004, Eudes & Amundsen 2005).

A nemesítők sikeres DH vonal előállításában, a portoktenyészetből kapott nagyszámú megkettőződött kromoszóma készlettel rendelkező növények módszere adja a sikert (Würschum et al. 2012). Arzani & Darvey 2001-ben publikálta, hogy a tritikálé esetében a portoktenyészetből nyert utódok mindössze kb 10% a spontán megkettőződött kromoszómájú, ezért is van szükség a duplikáció mesterséges indukálására. A növények haploid fázisa az

életciklusuk igen rövid szakasza, mely a miózist követően csupán a megtermékenyítés pillanataig tart. A sejtek osztódása és továbbfejlődésének *in vivo* és *in vitro* irányítására ez a rövid időszak ad lehetőséget (Lantos et al. 2009).

2.5.1. Kolhicin hatása az osztódó sejtre

A leggyakrabban használt és a leghatékonyabb kromoszóma duplikációs ágens a kolhicin (Arzani & Darvey 2001). A kolhicin, az őszi kikerics (*Colchicum autumnale* L.) alkaloidja, több mint 2000 éve használatos a gyógyászatban. Az kolhicin mitózisa gyakorolt hatását tanulmányozó első jelentés Dixon és Malden nevéhez fűződik. Megfigyelték, ahogyan a fehérvérjestegekben a szer megjelenésével a sejtekben beindult a kariokinézis (sejtmegosztódás) folyamata (Eigsti & Dustin 1957). 1820-ban P. S. Pelletier és J. B. Caventou francia kémikusok elsőként vonták ki sikerrel a kikerics aktív alkaloidját. Szívbetegségek, és köszvény betegségek kezelésére még ma is használják.

A káros hatások csak az osztódó sejteket érintik, mivel azok mikrotubulusrendszere érzékenyebb a kolhicin jelenlétére, mint a nyugalmi sejteké. Kolhicin jelenlétében az osztódó sejtek minden gond nélkül túljutnak az interfázis egyes szakaszain, viszont a metafázisban a sejtmegosztódás folyamata leáll. Ennek oka, hogy a mikrotubuláris rendszer instabilitása mintegy húszszor nagyobb az interfázishoz képest. Ez a tulajdonképpeni dinamikus instabilitás azt jelenti, hogy a mikrotubulusokat alkotó tubulin dimerek folytonos polimerizált-depolimerizált állapotban vannak. Ezért van az, hogy a mitózis egész ideje alatt a mikrotubulus-dinamika sokkal érzékenyebb, így a kolhicin hatása csak az osztódó sejtre számottevő. Kis koncentrációban a kolhicin rögzíti a fennálló helyzetet, azaz gátolja a polimerizációt és a depolimerizációt (Szabó 2009). Ezzel inaktiválódik a mikrotubulusokból kialakuló osztódási orsó, így az nem képes a pólus felé húzni a homológ kromoszómapárokat, melynek eredménye egy dupla kromoszóma-készlettel rendelkező sejt (Arzani and Darvey 2001). Az anyag premeiotikus jelenléte az I. metafázisban univalens formációt hoz létre a *Secale* (Bowman & Rajhathy 1977), a *Triticale* (Thomas & Kaltsikes 1977), a *Triticum* (Driscoll et al. 1967), és sok más nemzetség esetében. Egyes fajokban ez a kolhicin-érzékeny periódus átnyúlik a meiotikus szakaszba is (Loidl 1990). A kolhicinnek, a fent leírtakon túl több módosításai is vannak, ezek a premeiotikus kromoszóma-átrendeződések, preszinaptikus felsorakozás, SC (sister chromatid) formáció és a crossing-over (Loidl 1989, Tepperberg et al. 1997).

2.5.2. Kolhicin kezelési módszerek

A kolhicin kezelés alkalmazásával nemcsak stabil homozigóta diploidok állíthatók elő, hanem poliploid növényformák is. A poliploiditás a növénynemesítésben az elsőrendű variációk fejlesztésére, továbbá az interspecifikus és az intergénikus hibridek fertilitásának helyreállításában használatos. A poliploidia tenyészetekben történő indukálása sokkal hatékonyabb más módszerekkel szemben, ugyanis itt sokféle indukciós ágens biztosítható (Huang et al. 2014). A poliploid növények rendszerint nagyobb levéllel, szárral, virággal rendelkeznek, köszönhetően a többszörös kromoszóma készletnek.

A kromoszóma többszörözéséért történő kolhicinkezelés a növény fejlettségi állapota és a kezelt növényi rész szerint lehet magkezelés, csíranövénykezelés, hajtáscsúcskezelés, bimbókezelés, a kolhicin injektálása a növénybe, továbbá a gyökérzet áztatása kolhicin-oldatba. A magkezelés során a kezelt magvak túlélési aránya általában 50-30%-os. A hajtáscsúcs kezelés egyik előnyének tekinthető hogy csakis az osztódó szövetek érintkeznek a kolhicinnel, a növény többi részei érintetlenek maradnak. Itt általában az oldat befecskendezését alkalmazzák, míg a levelek kezelésére általában a bemeztetési módszert. A bimbókezelés és az *in vitro* kezelés elvi alapja megegyezik, miszerint a meiózis fázisában lévő gamétákra hatunk. Itt a mérgező hatás igen erős és nagymértékű terméketlenséget idéz elő. Az optimális koncentráció beállításához előkísérletek végzése szükségeltetik, és ez az optimum rendszerint a növény fejlettségi állapotától, érzékenységtől, illetve a kezelés módjától és időtartamától függ (Hódosné 1986).

Több publikációban leírták, hogy az egész növényen történő kolhicines kezelés nem elegendő, hanem *in vitro* kolhicin kezelésre is szükség van a kromoszóma-duplikáció gyakoriságának növeléséhez (Arzani & Darvey 2001). A csíranövényeken alkalmazott kezelés hátránya, hogy a nagy mennyiségű folyékony kolhicin kinyerése nagy költséggel jár és növeli a toxikus anyagok előfordulását környezetünkben tovább gyakran kapunk mixoploid vagy kimérikus növényeket, melyek alacsony szemtermést adnak (Soriano et al. 2007). Ezért fontos kellő gondossággal megvizsgálni és optimalizálni a kolhicin szükséges koncentrációját és a kezelés időtartamát, mely negatívan is hathat az embriogenezisre illetve a regenerációs rátájára (Würschum et al. 2012). Az androgenézis korábbi fázisaiban történő kolhicin alkalmazás megoldhat néhány problémát és javíthatja az alkalmazhatóságot több gabonaféle esetében (Würschum et al. 2012), ugyanakkor az is bizonyították, hogy az ezzel járó, az

egysejtes állapotot érintő magasabb toxikus hatás, növeli a mikrospóra/embrió mortalitási arányát és az albínók számát (Arzani & Darvey 2001). A búzával kapcsolatosan jelentek meg pozitív (Barnabás et al. 1991, 1999) és negatív (Hansen & Andersen 1998, Redha et al. 1998) értékelések is erre vonatkozóan.

A kromoszóma duplikáció sikeressége függ a fajtától, a növény fejlődési fázisától, a kolhicin kezelés túlélésétől. A kromoszóma kettőződési hajlam örökölhető jelleg, és átadható érzékenyebb genotípusból a kevésbé rezponzívba (Arzani & Darvey 2001). A kolhicines kezelésre történő reakció genotípusfüggőségéről Redha és munkatársai (1998) is beszámoltak búza portokkultúrán (Redha et al. 1998).

2.6. Ploiditás meghatározása

A DH előállítási rendszerben egy fontos lépés a ploiditás meghatározása. Többféle módszer áll rendelkezésre, melyek közül a következőket használják a leggyakrabban:

- kromoszóma számlálás: általában intenzíven osztódó sejtek (például gyökércsúcs) preparálása és kromoszómafestése. (Sutka 1980);
- a flow citométeres mérés: gyors, egyszerű és pontos, viszont drága. Alapja a sejtek DNS-tartalmának meghatározása. (Paprika levélszövet sejtjeinek nukleáris DNS-tartalma a sejt G1 és G2 fázisában a diploid illetve a doubled haploid eredet esetében kétszeres a haploidhoz képest.) (Supena et al. 2006);
- kloroplasztiszszám alapján történő meghatározás: ilyen például a levél sztómák védősejtjeinek a kloroplasztisz számlálása. (A kolhicin kezelés mellett megjelenő doubled haploid paprikanövény esetében kétszeres mennyiség a haploidokhoz képest.) (Supena et al. 2006);
- levelek sztómanagysága alapján (Przywara et al. kiwin bizonyították hogy doubled haploidok esetén nagyobb a sztóma) (Przywara et al. 2011).

2.7. Genetikai diverzitás vizsgálata markerek segítségével

A nemesítők kezdetben a természetes genetikai variabilitást használták fel új fajták előállítására. Ám már a 18. századtól kezdve megkezdődtek a variabilitás mesterséges, irányított növelését célzó törekvések, melynek kezdeti módszere a keresztezés volt. Az öröklődő variációkat, mint például szemszín, endospermiumtípus, rezisztencia, érés,

növénymagasság, a genotípus határozza meg. A növénynemesítők ezeket az öröklődő variációkat keresik, kiemelik és új fajtákat állítanak elő belőlük. A variációk azonosításának modern módszere a genetikai markerek használata (Hajós né 1999).

A klónok között megfigyelt heterogenitás oka többféle lehet. Számos esetben a szomaklonális variabilitáson alapuló mutáció okozza, vagy a redukálatlan gaméták jelenléte. Más esetben, az összetett (multiple) eredetnek köszönhető, ennek oka, hogy a családok közös eredete nem garantálja azok homogenitását. Előfordulhat, hogy az embriószerű struktúra több mint egy haploid mikrospórából fejlődik, mely valószínűleg nem redukálatlan gamétákból származik. Eredetüktől függően a létrejött utódok rendelkezhetnek 2 szülői alléllal adott lokuszokon, de nem származhatnak olyan genetikailag különböző növényekből, melyek homozigóták a lokusz alléljára nézve (Oleszczuk et al. 2014). A genotípus és a ploiditási szint is jelentős hatással van a kromoszóma variabilitásra (Dubrovna & Baval 2011).

A fenti (sejt szintű) folyamatok mellett az tenyésztési körülmények is szerepet játszanak a variabilitás kialakításában. Az *in vitro* körülmények közül számos tényező vesz részt ebben, ilyenek a növekedési faktorok összetétele, az explantátumok természete, morfológiai tényezők, a kultúra életkora, stb. (Dubrovna & Baval 2011).

Köztudott, hogy a genetikailag távoli keresztezésekkel sokkal egyszerűbb heterotikus hibridek létrehozása, mint a közeli rokonok felhasználásával. Számos molekuláris-genetikai analízis módszer, mint a RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), és ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) széles körben használtak a minták genetikai diverzitásának megállapítására. Ez egy új megközelítést ad a heterózis szelekció szempontjából értékes kiinduló anyagok azonosításához, lecsökkentve ezzel az új versenyképes hibridek kifejlesztéséhez szükséges költségeket. A tritikálé szelekciójának célja többek közt a heterózis okozta magasabb produktívású, magas tápértékű hibridek nyérése (Orlovskaya et al. 2012).

„A genetikai markerek tulajdonságokat meghatározó allélek, amelyeknek sajátosságait fenotípusos, fehérje- vagy DNS-szinten vizsgáljuk.” Az azonosítás technikái pedig az izoenzim polimorfizmus, a Southern blot és az RFLP-eljárások mellett a polimeráz láncreakció (PCR) (Hajós né 1999).

2.7.1. Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció (PCR- Polymerase Chain Reaction) megválasztott szekvenciájú, kb 10-15 nukleotid hosszúságú primerek segítségével történő speciális DNS szakaszok felaszaporítására alkalmas módszer. A technikát Kary Mullis fejlesztette ki 1985-ben (Mullis & Faloona 1987).

A reakció fontosabb lépései:

1. Denaturáció: 94-95°C-on a templát DNS denaturálódik, tehát egyszálúvá válik.
2. Primer kapcsolódás: 36-70°C-os hőmérséklettartományban (a primerek hosszúságától és bázisösszetételétől függően) a primerek a szabad 3'OH-végükkel hozzákapszolódnak az egyszálú DNS-hez.
3. Lánchosszabbítás: az indítószekvenciák meghosszabbítása 72°C-on. A DNS polimeráz a templát szekvenciája alapján építi be az új szálba a dNTP-ket.

Ennek megfelelően a reakció komponensei a következők: templát DNS, oligonukleotid primerek, dNTP-k, DNS polimeráz, továbbá magnézium-ion a reakció katalizátoraként (Hajósne 1999).

2.7.2. Molekuláris marker: mikroszatellit marker

A markerek két csoportot alkotnak melyek a genetikai és a molekuláris markerek. A genetikai markerek már a 20. század eleje óta használatosak. Sax már 1923-ban a maghéj színének öröklődése alapján szelektált a bab termésméretre. A genetikai marker olyan tulajdonságot meghatározó gén, melyek a szülők és az utódok fenotípusos megkülönböztetésére alkalmas. A fenotípusos különbség a kódoló szakaszokban létező allélvariációk eredménye. A molekuláris markerek picivel később, az 1950-es években jelentek meg, melyek ezzel szemben DNS szintű variációkat jelentenek. Ez a fajta marker lehet gén, DNS szakasz, illetve olyan lokusz a kromoszómán, mely a különböző genotípusokban eltérő szekvenciákat hordoz. A molekuláris marker származhat kódoló és nem kódoló szakaszból egyaránt (Kiss 2005).

A molekuláris markereken belül a DNS-markert használtuk a variabilitás megállapítására. Az ideális DNS marker nagyfokú polimorfizmust ad, kodominánsan öröklődik, előfordulása a genomban gyakori és egyenletes eloszlású (Hajósne 1999).

A növényi sejtmagi genomra jellemző, hogy akár 90%-ot meghaladó mértékben tartalmaz ismétlődő motívumokat. Ezek a motívumok egyszerű-di-,tri-,tetra-, és pentanukleotidok monoton, tandem elrendeződése. Az ismétlődések határszekvenciái nagyfokú konzervativizmussal rendelkeznek, így az ezek határszekvenciáira tervezett PCR primerekkel ezek a motívumok felszaporíthatók. Ha a motívum eltérő számban ismétlődik két genotípusban, akkor a velük indított PCR reakció termék méretei el fognak térni egymástól, tehát hossz-polimorfizmust fognak mutatni (Kiss 2005).

A DNS-en alapuló molekuláris markerek a géntérképezés, a DNS ujjlenyomat, a populációstruktúra vizsgálatok és a genetikai diverzitás tanulmányának kiváló eszközei (Bowcock et al. 1994). Orlovskaya et al. 20 tavaszi tritikálé fajta DNS mintáin végeztek RAPD és ISSR primerek használatával genetikai diverzitás meghatározást. Egy ISSR marker több mint 80%-os, míg egy RAPD primer 89,9%-os polimorfizmust produkált. Ezekkel az adatokkal a mintákat sikeresen csoportosították, azok genetikai kapcsolatuk alapján, illetve a genetikailag távoli szülőpárok szelektálása is megvalósult. Tehát a genetikailag távoli rokonok keresztezésével előállított hibrid termék kinyerése így könnyűszerrel megoldható, a heterózis hatás segítségével (Orlovskaya et al. 2012).

A különféle típusú markerek közül a mikroszatellit (=SSR; a DNS 2-6 nukleotidból álló rövid tandem ismétlődései) markerek bizonyulnak a leginformatívabbnak nagyfokú polimorfizmusuknak, kodominanciájuknak és kromoszóma-specifitásuknak köszönhetően (Bowcock et al. 1994, Röder et al. 1995, Gupta et al. 1999, Ahmad 2002).

Szekvencia alapú SSR markerek búza és rozs esetében elérhetők, viszont tritikálé esetében még nem. Ezért folynak kutatások ezekenek a markereknek a búzából és rozsából tritikáléba történő átvitelére. A markerek kolinearitásának vizsgálatára olyan összehasonlító térképezést végeznek, mely alapja egy olyan marker, amely egyszerre jelen van több rokon nemzetségben vagy fajban is (Van Deynze et al. 1998, Tikhonov et al. 1999). Kuleung és mtsai (2004) által végzett transzferabilitási vizsgálatában összesen 176 markerből 85 búza marker és 11 rozs marker volt amplifikálható a tritikáléban. A legtöbb búzaspecifikus marker a búza D genomján van lokalizálva. Ezek a markerek (176-85=91) azért nem amplifikálódtak a tritikálé genomjában, mivel az sokszor nem rendelkezik D genommal. Ez az oka annak, hogy az össz búza marker csupán 57%-a volt jelen a tritikáléban is (Kuleung et al. 2004). Hasonló eredményekről számoltak be Leonova és munkatársai (2005). Hexaploid tritikálé vonalak és azok szülői formáik mikroszatellit marker amplifikációs mintázatait összehasonlítva azt tapasztalták, hogy az A és B búza kromoszómák minden vonalban jelen voltak. Míg a D genom specifikus markerek négy tritikálé vonal esetében hiányoztak, azok D

kromoszóma hiánya miatt. (Csak azokban az esetekben volt sikeres a D genom-specifikus búza markerekkel történő amplifikáció, ahol a tritikálé rendelkezett bizonyos D kromoszóma fragmentumokkal, mint pl. a 2D hosszú karja, illetve a 7D kromoszóma.) Az összes kipróbált rozs-specifikus marker sikerrel produkált felszaporított fragmentumokat a tritikálé és rozs szülő vonalakban, míg búza szülő esetében nem amplifikálódott (Leonova et al. 2005). A rendelkezésre álló 750 publikus búza mikroszatellit primerpár eredményes és költség-hatékony eszköz lehet a tritikálé nemesítés és tritikálé genetikában használható molekuláris markerek kifejlesztéséhez (Kuleung et al. 2004).

Oleszczuk és munkatársai (2014) a tritikálé DH vonalakból származó klónok eredetének azonosítása céljából végeztek genetikai vizsgálatot SSR markerekkel. A mintázatok alapján a vizsgált 33 családból 27 genetikailag identikus egyedekkel rendelkezett, míg a maradék 6 családot genetikailag távoli egyedek alkották (Oleszczuk et al. 2014).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérletek növényanyaga, begyűjtése

Az izolált portoktenyésztéses kísérletek növényanyagát a hexaploid tritikálé egy államilag elismert fajtája mellett 4 különböző genotípus donor kalászhajtásai képezték. Ezek a köztermesztésben lévő GK Rege, és a még kísérleti genotípusok: a Tc3384, a Tc5-11-3, a Tc6/2-9 és a Tc5/2-9 voltak.

A portoktenyésztéses kísérlet kalászhajtásait a Gabonakutató Kft. Kecskés telepi tenyészterületén lévő, szántóföldön nevelt donor növényekből gyűjtöttük be. Gondosan kellett ügyelni, arra hogy a portokokban lévő mikrospórák egysejtmagvas vakuólumos állapotban legyenek a begyűjtött kalászhajtásokban. A donor hajtásokkal csapvízzel telt lombikba helyeztük, PVC zacskóval takartuk le, és két hétig hidegkezeltek (4°C).

Az előkezelt hajtások kalászhajtásait 250 ml hipó:víz 1:1 arányú elegyét tartalmazó üvegbe helyeztük, és hozzáadtunk 1 csepp tween 20 oldatot. A kalászhajtásokat 20 percig rázóasztalon sterilizáltuk, majd háromszor steril desztillált vízzel leöblítettük.

3.2. Portokok izolálása, tenyésztése

A már sterilizált kalászhajtások közepes harmadából a pelyvák óvatos leválasztása után izoláltuk a portokokokat (20-50/petri csészébe), W14mf tápoldatba tettük őket a steril körülményeket biztosító lamináris boxban (Lantos et al. 2013). A Petri-csészéket sötét szekrénybe helyezve, 3 napig 32°C -on tenyésztettük, majd állandó 28°C -os hőmérsékleten tartottuk. Körülbelül egy hónap múlva megjelentek az első embriószerű struktúrák. Az újonnan megjelenő embriószerű struktúrákat körülbelül 3-4 héten keresztül 3-4 naponta áthelyeztük regeneráló táptalára.

Az embriószerű struktúrákat *in vitro* kolhicin kezelési kísérletben 3 eltérő kezelést alkalmaztunk. 190-2Cu regeneráló tápoldatot tartalmazó „0 nap” feliratú, kolhicint nem tartalmazó kontroll Petri csészék (Pauk et al. 2003), illetve az „1 nap”, és a „3 nap” feliratú Petri csészék voltak, melyek már kolhicint (400 mg/l) is tartalmaztak. A kolhicines tápoldaton

az embriókat 1 illetve 3 napig tenyésztették, majd mindegyiküket kolhicin-mentes talajra helyezték (190-2Cu), ezzel csökkentve a nagy mértékű toxicitást.

3.3. Embriók tenyésztése, növényregenerálás

Az embriókat tartalmazó Petri csészék állandó 24°C-ot és 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fényerősségű 16 órás megvilágítást kaptak. A kontroll regeneráló táptalaj esetében az embriók mindvégig azon a táptalajon maradtak, amíg nem hoztak hajtást. A kolhicint egyenlő mennyiségben (400 mg/l) tartalmazó táptalajok esetében viszont az embriókat a kromoszóma duplikációs ágens kezelési ideje alapján: 1 illetve 3 nap után kontroll regeneráló táptalajra helyezték. A megjelenő, kb 1-2 cm hosszúságú hajtásokat szintén 190-2Cu táptalajt tartalmazó fiolákba tettük át (2., 3.ábra). A struktúrák regenerálása a fenti paraméterekkel rendelkező fényszobában történt.



2. ábra: Hajtás fiolában
oldalnézetből.
(Balogh Vera 2013)

3. ábra: Hajtás fiolában
alulnézetből.
(Balogh Vera 2013)

A kívánt mennyiségű gyökérzettel rendelkező regeneránsok (3.ábra) üvegházi kiültetésre kerültek, az 5 cm-es átmérőjű, mindkét végén nyitott kis PVC csövekbe. Az üvegházi körülmények a következők: 20-28°C nappali hőmérséklet, 15-19°C éjszakai hőmérséklet, öntözés a növények igénye szerint.

A nagy páratartalom relatíve adott az üvegházakban, de a kiültetést követő 4-5 napon keresztül a cserepekre egyenként felhúzott fóliával biztosítottuk a növények akklimatizációjához szükséges magasabb relatív páratartalmat (90-100%).

3.4. Statisztikai elemzés

Kísérleteinket legalább 10 ismétlésben végeztük el (ismétlésenként 30-40 embrioiddal), mely során az androgenezis négy jellemző paraméterét (regenerált növények száma, albínók száma, kiültetett növények mennyisége és fertilis növények mennyisége) felvételeztük. A kapott adatokat kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük ki a Microsoft Excell program segítségével.

3.5. A regeneránsok variabilitásának vizsgálata

A genetikai variabilitás vizsgálati növényanyagát csak a GK Rege fajta felnőtt növényegyedeiről begyűjtött levelek szolgálták. Egy részük - a kontrollok - a magról kelt növényekről származtak, a többi pedig a portoktenyésztési kísérletekből származó regeneránsoktól. Ezek között fertilis és steril növények is voltak. A termékenységet az alapján határoztuk meg, hogy az érett kalászkák tartalmaztak-e szemtermést vagy sem. A vizsgált 381 regeneráns közül 305 növényen találtunk szemtermést, míg 76 regeneránsnál nem.

A jó minőségű DNS-t adó CTAB féle izolálási módszert alkalmaztuk DNS kivonásra. A CTAB-módszer alapja, hogy a sejtek feltárását végző lízis puffer fő alkotója a hexadecil-trimetil ammónium-bromid, röviden a CTAB. A CTAB-puffer alkotói a következők:

- steril H₂O,
- 1 M-os pH 7,5-ös TRIS,
- 5 M-os NaCl,
- 0,5 M-os pH 8-as EDTA,
- RNáz,
- CTAB.

Az alkotók az izolálás elengedhetetlen feltételét jelentő sejtlízist, denaturációt és RNS bontását is biztosítják.

3.4.1. DNS izolálás

A mintát fagyasztott levelek képezték, melyek mind a Rege fajtának az *in vitro* androgenezis folyamatán átesett, illetve a fajta magról kelt üvegházban felnevelt növényi egyedeiről történtek begyűjtésre.

A minták porítása kétféle módszerrel történt.

- Egy részüket automata DNS izoláló berendezés, az úgynevezett homogenizátor segítségével porítottuk. Ebben az esetben a felhasználandó mintamennyiséget 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük és 1 ml CTAB puffert mértünk rájuk. Továbbá 2-2 acélgolyót is helyeztünk a csövekbe, melyek a homogenizálást végzik. A rázatás és az acélgolyók mozgása idézi elő a sejtek feltárását. A homogenizálás után a csöveket fél órán, 60°C-on melegítettük.
- A többi minta esetében a folyékony nitrogénnel történő porítást alkalmaztuk. Ebben az esetben a mintákat külön, az erre a célra kialakított dörzsmozsarakba mértük és az ezekre mért folyékony nitrogén segítségével sikeresen homogénné dörzsöltük a mintákat. A porítást követően azonnal 1,5 ml-es eppendorf csövekbe helyeztük a mintákat, amelyekbe korábban 1-1 ml CTAB-puffert mértünk. Majd óvatos döntögetés után a csöveket 60°C-os vízfürdőbe tettük.

Ettől a ponttól kezdve az izolálás lépései megegyeznek a két módszer esetében.

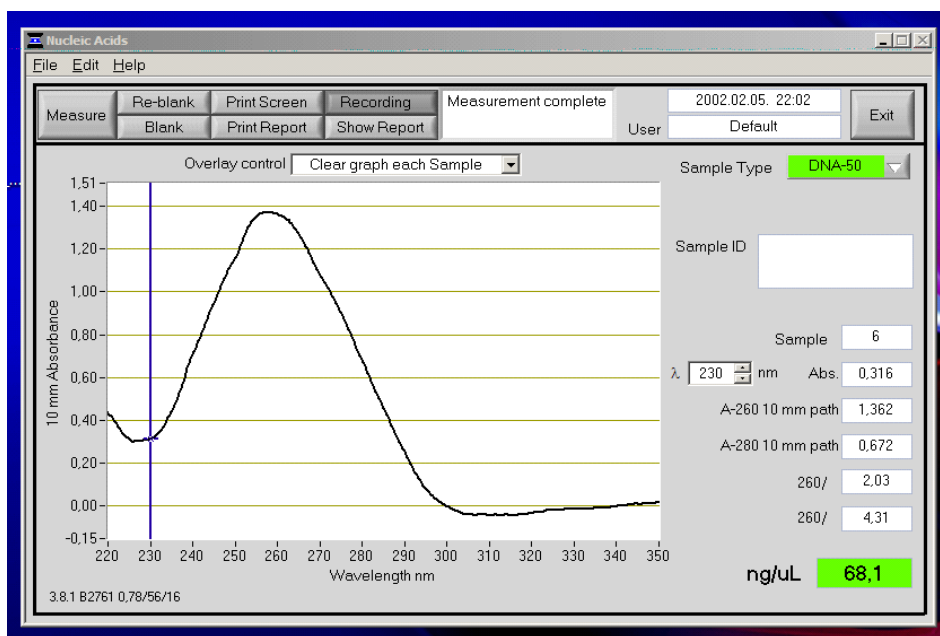
A hőkezelés folyamat mindkét esetben 30 perc hosszúságú volt, 10 precenkénti döntögetéssel. A következő lépés a „kiszabadított”, de még ép DNS elválasztása a fehérjéktől, illetve a többi sejtalkotótól. Így a minták szobahőmérsékletre történő hűtésüket követően kloroformos extrakciót alkalmaztunk. Ehhez a 450 µl kloroform/izoamil-alkohol 24:1 arányú keverékét mértük a csövekbe, melyet már előzőleg összemértünk. A kloroform szerves oldószer, mely további fehérjementesítést lesz tehetővé (http1). Az izoamil-alkohol a kloroformos szerves és a DNS-t tartalmazó vizes fázis tökéletesebb szétválását teszi lehetővé (http1). Egy hosszabb centrifugálást (13 perc, 12000 rpm fordulatszám) követően a DNS-t is tartalmazó felülúszót új, 1,5 ml-es csövekbe pipettáztuk át. A felülúszó tulajdonképpen a DNS vizes oldata, melyhez jéghideg izopropil-alkohol (más néven izopropanol vagy 2-propanol)

oldószeret pipetázva a DNS kicsapódik (http2). Az izopropanol hozzáadása után a mintákat minimum 20 percre fagyasztóba kell tenni, de akár másnap is lehet folytatni az izolálást.

A folytatásban az izopropanolban oldott mintákat a fagyasztóból kivéve egy hosszabb centrifugálásnak tettük ki (10 perc, 6600 rpm). A felülúszó leöntése után a csapadékot képező DNS-t először 700 µl EtOH/NH₄Oac keverékkel mostuk át. Majd egy újabb centrifugálást (5 perc 12000 rpm) követően a felülúszót leöntve a csapadékot 70%-os etil-alkohollal mostuk kétszer is. Újabb centrifugálást (5 perc, 12000 rpm) követően a felülúszó maradéktalan leszívása után a DNS-t steril boxban szárítottuk. Az itt kapott, már száraz DNS-t végül 100 µl TE-pufferben feloldottuk. Nagyon fontos a DNS alapos szárítása a pufferes feloldás előtt, hogy a mosáshoz használt alkohol maradék nélkül elpárologjon belőle.

A feloldott, nagy koncentrációban jelen lévő DNS-t +4°C-on hónapokig, fagyasztóban tárolva, -20°C-on évekig, -70°C-on pedig definiálatlan ideig tárolható degradáció nélkül (http3).

A DNS oldat elnyelési maximuma 260 nm-en, míg a fehérjék elnyelési maximuma 280 nm-en van. „A két hullámhosszon mért abszorbancia értékek hányadosából következtethetünk a DNS oldat tisztaságára (azaz a fehérje szennyezettség mértékére). Ennek a hányadosnak 1,7-1,9 között kell lennie, az ennél alacsonyabb érték fehérje szennyeződésre utal, ami a későbbi eljárásokat zavarhatja.” (http3) A DNS oldatok tisztaságát NanoDrop™ND-1000 Spectrophotometer-rel mértük. Íme egy kép a megfelelő tisztaságú DNS-oldat abszorpciós görbéjéről (4. ábra):



4.ábra: Tritikálé DNS fényelnyelés görbéje. (Balogh Vera 2014)

Ezzel a műszerrel a tisztaságon túl természetesen a DNS-oldat töménysége, azaz a koncentrációja is mérhető. Az izolálás során kapott DNS oldatok koncentrációjukat tekintve tömények, ezért a PCR-hez hígítani kell őket.

3.4.2. PCR

A portok kultúrából kiválogatott haploid embriók kolchicines kezelésével végső soron homozigóta rekombináns genotípus keletkezik. Ezek diverzitásának meghatározására SSR markerekkel indított polimeráz láncreakció termékeit vizsgáltuk, agaróz gélen elektroforézises elválasztásával kapott mintázatok alapján.

A PSA920 UCD1 (genomi DNS specifikus) primerrel végzett touchdown PCR folyamat sikerrel adott nagy mennyiségű terméket. A PCR reakció paramétereit Dvorak és mtsai (2006) publikációjuk szerint módosítottuk, illetve különféle hígításokat alkalmaztunk a reakcióelegyben lévő templát koncentrációját illetően. Ezek 5, 10 és 20 µg/ml értékek voltak.

Rozsspecifikus (SCM) markerpárok is kipróbálásra kerültek, melyek a következők SCM0019, SCM0031, SCM0092, SCM0107, SCM0150, SCM0151.

A PCR elegyet a következők szerint állítottuk össze: 2 µl hígított DNS oldathoz (templát) 8 µl master mix, tehát a végtérfogat 10µl. A hígított templát oldatok végső koncentrációja 20-40 µg/ml között volt. A master mix összemérése a következők szerint történt (/1 db minta) (1.Táblázat):

1. Táblázat: A PCR master mix komponensei.

Alkotók:	Mennyiség (µl)	Megjegyzés:
10xPCR puffer	1	West Team Biotech, Pécs
MgCl ₂ (25mM)	0,5	
WTB- <i>Taq</i> polimeráz (1 U/µl)	0,6	West Team Biotech, Pécs
dNTPmix (2 mM)	0,2	dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP és dTTP)
primer forward (10 µM)	0,75	
primer reverz (10 µM)	0,75	
H ₂ O	4,2	

Az SSR primerpárok felszaporításához touchdown PCR-t használtunk, mely a következő paraméterekkel futott:

1. fázis: 94°C 2 percig
2. fázis: 10 cikluson keresztül: 95°C 30 mp-ig;
65°C 30 mp-ig;
72°C 1 perc 30 mp-ig

Kapcsolódási hőmérséklet ciklusonként 1°C-kal csökken (55°C-ig).

3. fázis: 25 cikluson keresztül: 95°C 30 mp-ig;
56°C 30 mp-ig;
72°C 1 perc 30 mp-ig

4. fázis: 72°C 5 percig, majd 4°C ∞.

A program végén a PCR-csövek +4°C-on tárolhatók a felhasználásig. A fragmentumokat agaróz gélen elválasztva etídium-bromiddal láthatóvá tesszük.

A PSA920 UCD1 primert Dvorak és munkatársai (2006), az SCM 0019, 0031, 0092, 0107, 0150, 0151 primereket pedig Hackauf & Wehling (2003) publikációja alapján alkalmaztuk.

3.4.3. A PCR termék gélelektroforézissel történő elválasztása

A PCR termékeket gélelektroforézissel választottuk el. A fragmentumok elválasztásához 1 illetve 2%-os agarózt és 1x TAE puffert használtunk. A gél 1,5 mg/ml-es etídium-bromid oldattal festettük.

Az elválasztáshoz szükséges agaróz gél készítése a következők szerint történt: 1x-es TAE pufferben oldottunk agarózt gömbömbikban. A gömbömbikot mikrohullámú sütőbe téve, az oldatot forráspontig melegítettük. Melegítés után hideg folyóvízben, folyamatos kevergetés mellett lehűtöttük. Ezt követően etídium-bromidot adtunk a már kézmeleg oldathoz, és az előre elkészített, fésűvel ellátott tálcába öntöttük azt. Az oldat töménységétől függően minimum 20-30 perc alatt megszilárdult, gél formájában.

TAE puffer készítése: az 50x-es törzsoldat alkotói: 242 g TRIS, 57,1 ml jégcet és 100 ml 0,5M-os EDTA (pH=8,0). Ebből történt a hígítás, a szükséges 1x-es oldathoz.

A megszilárdult gél futtatókádba raktuk, mely 1x TAE pufferrel volt feltöltve. A fésűt eltávolítva a zsebekbe mértük a festékkel (DNA Loading Dye) összekevert mintákat. Az utolsó vagy az első zsebekbe 100 bp-onként fragmentumot adó DNS létrát használtunk (Gene

Ruler DNA 100 bp Ladder). A futások 70 V illetve 40 V egyenáram mellett történtek, mellyel a felszaporított specifikus fragmentumok sikerrel elváltak.

4. Eredmények és értékelésük

Kísérleteink során kapott eredményeket (tíz ismétléses) kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük ki (2. Táblázat). A táblázat adataiból jól látható, hogy a genotípus mind a négy vizsgált tulajdonságot szignifikánsan befolyásolta, míg a kezelés a zöld és albínó regeneránsok valamint a kiültetett növények mennyiségét befolyásolta. A Kezelés x Genotípus kölcsönhatást a regenerált albínó növények esetében figyeltük meg.

2. Táblázat: Kolhicin kezelés és genotípus hatás elemzés kéttényezős varianciaanalízissel a portoktenyészet eredetű embriószerű struktúrák regenerációjára.

	df	MS zöld növényké	MS albínó	MS kiültetett növények	MS fertilis növények
Kezelés	2	186,48***	31,81***	141,73***	1,05 n. s.
Genotípus	4	658,18***	47,52 ***	861,09 ***	344,89 ***
Kez x Gen	8	7,05 n.s.	8,27 ***	10,31 n. s.	0,76 n. s.
Hiba	135	13,77	1,37	12,93	3,36

*** szignifikáns $p=0,001$ valószínűségi szint mellett
ns, nem szignifikáns

4.1. Az androgenetikus folyamatok genotípus függősége

A következőkben az androgenetikus folyamatok genotípus függőségét szemléltetem, amihez a kolhicinnel nem kezelt (kontroll) tenyészetek eredményeit veszem alapul (3. Táblázatban a genotípusokhoz tartozó sárgával jelölt '0 nap' sorok). Az embriószerű struktúrák elsőként a GK Rege tenyészeiben jelentek meg, amelyből összesen 322 embriószerű struktúrát kaptunk. A Tc6/2-9 genotípusban összesen 309 embriószerű struktúra fejlődött. A kísérleti fajták közül a Tc3384, a Tc5/2-9 és a Tc5-11-3 genotípusok esetében a regeneráló táptalajra átvihető embriószerű struktúrák száma 331, 314 és 268 volt.

A megjelenő zöld hajtások arányát tekintve szintén a GK Rege fajta rendelkezik a legtöbbel, ahol Petri-csészénként 16,6 zöld hajtást számoltunk. A második legnagyobb érték a 8,5, a Tc6/2-9 esetében figyelhető meg. A harmadik helyen a Tc5/2-9 áll 5,7-tel, a negyedik helyen a Tc3384 áll 5,6-tal, a sort pedig a Tc5-11-3 zárja, 3,8-cal. Ez a zöld növény mennyiség képezi a kiültetésre kerülő növények anyagát.

A legkevebb albínó hajtás a GK Regéből fejlődött (0,01 albínó/Petri csésze). A Tc6/2-9 esetében a Petri-csészékre jutó albínó regeneránsok száma 1,0, a Tc3384 esetében 1,2, a Tc5-11-3-nál pedig 1,9. Ezeket az értékeket messze meghaladja a Tc5/2-9 genotípusnál tapasztalt, 5,3 albínó növényke/Petri-csésze.

A kiültetésre alkalmas, jól gyökeresedett regeneránsok száma/Petri csésze a következők szerint alakult: Tc3384 3,7, Tc5-11-3 3,4, Tc6/2-9 8,0, GK Rege 16,5, Tc5/2-9 3,9. A megjelenő zöld hajtásokra vonatkoztatva a legtöbb kiültethető regeneránssal a GK Rege, a Tc6/2-9 és a Tc5-11-3 rendelkezett.

A már kiültetett, érett és fertilis növényegyedek száma/Petri csésze érték a GK Rege fajta esetében volt a legnagyobb, pontosan 8,6. E tekintetben a Tc6/2-9 2,2, a Tc5-11-3 0,7, a Tc5/2-9 0,5, míg a Tc3384 0,2 értékkel rendelkezett.

Táblázat 3: Az *in vitro* portoktenyésztés sikerességének genotípus függősége, és a kolhicin kezelés hatása. A statisztikai elemzés alapján a genotípusok közötti szignifikáns különbségeket az SzD_{gen} érték mutatja meg. A kezelések hatása közötti különbségek az SzD_{kez} értékekből számolható. A kezelések közötti különbségeket az abc kis betűivel jelöltük minden genotípuson belül.

Genotípus	Kezelés hossza	felhasznált embriók száma	zöld regeneránsok száma/ Petri-csésze	albínó regeneránsok száma/ Petri-csésze	kiültetett növények száma/ Petri-csésze	kiültetett, érett, fertilisek száma/ Petri-csésze	kiültetett, érett, sterilek száma
Tc3384	0 nap	331	5,6 a	1,2 a	3,7 a	0,2 a	25
	1 nap	328	5,0 a	1,1 a	3,5 a	0,5 a	21
	3 nap	331	2,8 b	0,1 a	2,0 b	0,4 a	6
Tc5-11-3	0 nap	268	3,8 a	1,9 a	3,4 a	0,7 a	17
	1 nap	266	2,7 ab	1,0 ab	1,8 b	0,3 a	8
	3 nap	261	1,5 b	0,3 b	1,5 b	0,6 a	4
Tc6/2-9	0 nap	309	8,5 a	1,0 a	8,0 a	2,2 a	45
	1 nap	312	8 a	0,5 a	7,2 a	1,9 a	40
	3 nap	314	3,8 b	0,2 a	3,5 b	1,5 a	12
GK Rege	0 nap	322	16,6 a	0,01 a	16,5 a	8,6 a	73
	1 nap	321	15,6 a	0 a	15,3 a	7,8 b	40
	3 nap	323	11,1 b	0,2 a	10,9 b	8,3 ab	22
Tc5/2-9	0 nap	314	5,7 a	5,3 a	3,9 a	0,5 a	22
	1 nap	308	4,1 a	3,9 b	3,3 a	0,5 a	8
	3 nap	321	2,4 b	0,8 c	1,4 b	0,1 a	7
SzD_{gen}	-	-	2,3	1,7	1,8	0,9	-
SzD_{kez}	-	-	1,6	1,3	1,4	0,7	-

Az elvégzett kéttényezős varianciaanalízis is egybehangzóan igazolja a fent leírtakat. Az SzD értékek a legkisebb szignifikáns differenciaértékeket jelentik, amelyet a vizsgált paraméterekre kiszámoltunk külön a genotípus (SzD_{gen}) és a kezelés (SzD_{kez}) tényezők alapján is. A megjelenő zöld hajtások számához tartozó SzD_{gen} érték 2,3. Ezt a differenciálértéket több esetben is meghaladja a genotípusokhoz tartozó zöld regeneránsok száma/Petri-csésze értékek különbsége (főként a GK Rege és Tc6/2-9 esetében), mely egyértelműen igazolja, hogy a genotípusokhoz tartozó értékek közötti eltéréseket szisztematikus hatás okozza. Ugyancsak a genotípusok közötti varianciát igazolja az albínó regeneránsokhoz tartozó SzD érték, ahol a GK Rege és a Tc5/2-9 genotípusok élesen elhatárolódnak társaiktól. A maradék két tulajdonság SzD_{gen} értékei is megerősítik a kísérlet genotípus függőségét.

4.2. A kolhicinkezelés hatékonysága

A kromoszóma duplikáció céljából történő kezelés a növények fejlődésére gyakorolt gátló hatása már az első héten megfigyelhető volt. Az 5., 6. és 7. ábra mutatja a GK Rege kontroll, az egynapos kezelés és a háromnapos kezelés alá vetett embriószerű struktúrák fejlődését a tenyésztés indításától számított hetedik napon.



5. ábra: „Egyhetes” kontroll, azaz kezelés nélküli GK Rege tenyészet (Balogh Vera 2013)

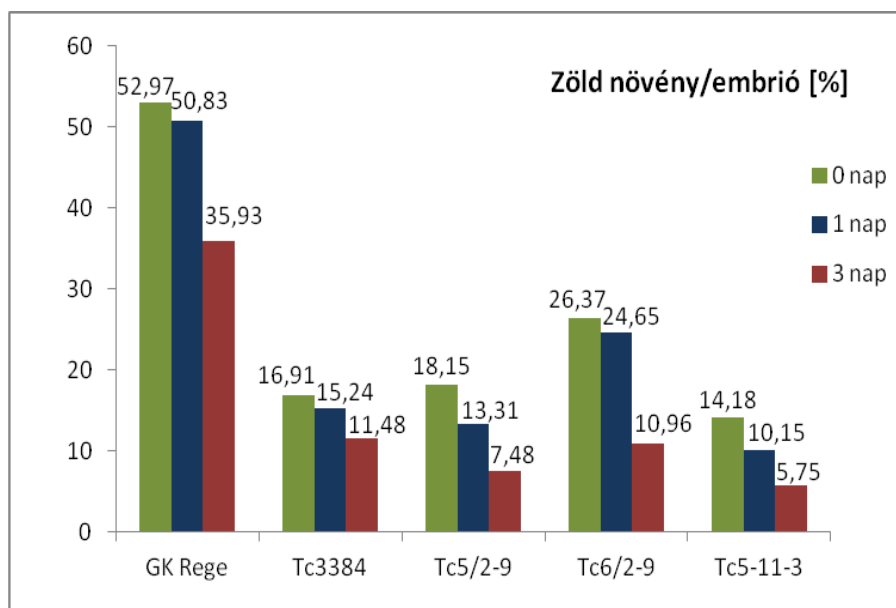
6. ábra: „Egyhetes” egy napig kolhicinnel kezelt GK Rege tenyészet (Balogh Vera 2013)

7. ábra: „Egyhetes” három napig kolhicinnel kezelt GK Rege tenyészet (Balogh Vera 2013)

A kísérlet és a kolhicin kezelés hatékonyságának százalékos elemzéséhez érdemes a következő értékeket vizsgálnunk: zöld növény/felhasznált embriók száma x 100; albínók/felhasznált embriószerű struktúrák száma x 100; fertilis egyedek száma/kiültetett

növények száma x 100. Ezeket az értékeket a következő három grafikon összesíti (8., 9., 10. ábra).

A zöld növény produktum a kolhicin kezelés hatására illetve a kezelés időtartamának növelésével párhuzamosan csökkenő tendenciát mutat (8. ábra). Minden genotípushoz tartozó százalékos értékek grafikonja lépcsőszerű csökkenést mutat a kontrolltól a háromnapos kezelés felé. Az egynapos kezelés negatív hatása a Tc3384 (1,6%) és a Tc6/2-9 (1,8%) mintájánál érezhető a legkevésbé, ahol kevesebb mint 2%-os csökkenést észleltünk a kontrollhoz képest. Ez az érték a Tc 5/2-9 és a Tc5-11-3 fajtáknál a legmagasabb, 4,8% és 4%. Az *in vitro* tenyésztési körülményeket legjobban toleráló GK Rege 2,1%-os visszeseést mutat az egynapos és 17%-os visszaesést mutat a háromnapos kezelés hatására. Egyetlen kísérleti genotípusnál sem tapasztaltunk ilyen mértékű visszaesést a többnapos kolhicines kezelésnél. A háromnapos kihozatalban ismét a Tc3384 a legjobban reagáló, ugyanis 16,9%-ról 11,5%-ra csökkent a zöld regeneránsok aránya, mely csupán 5,4%-os hanyatlás. Őt követi a Tc 5-11-3 14,2%-ról 5,8%-ra fogyatkozó, 8,4%-os csökkenéssel. A Tc 5/2-9 esetében 10,7%-os, a Tc6/2-9 genotípus esetében pedig 15,4%-os visszaesést tapasztaltunk.

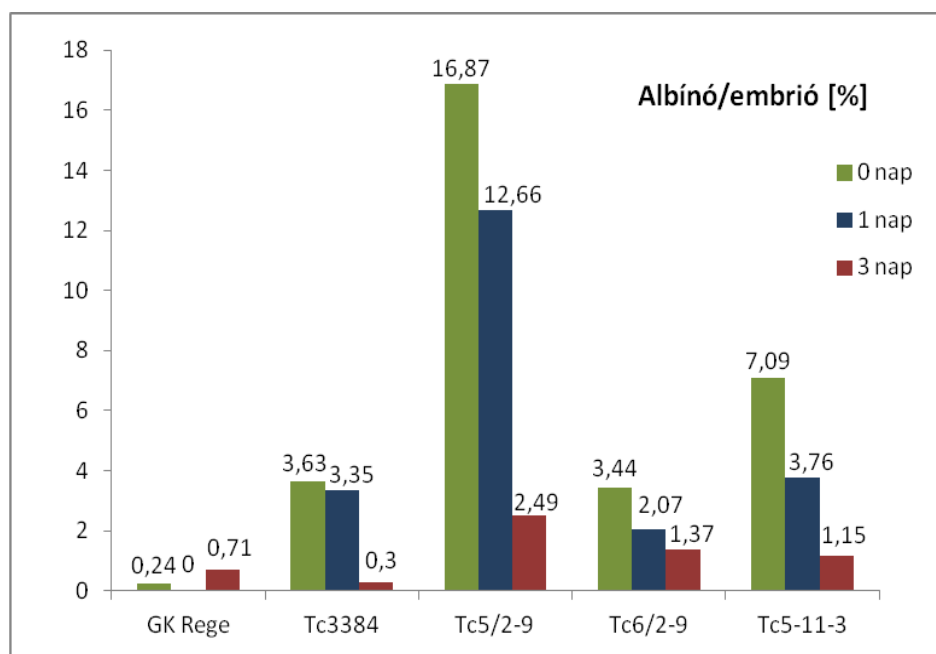


8.ábra: Genotípusonként a kezelés időtartamától függően megjelenő zöld növények előfordulási százaléka az embriószerű struktúrákra vonatkoztatva.

A kolhicinnel történő kezelés az albínó növények regenerálása szempontjából is csökkenő tendenciát mutat, mely tovább fokozódott a kezelés időtartamának növekedésével (9.ábra). Ez alól csakis a GK Rege eredményei képeznek kivételt, ahol a többnapos kezelés

hatására 0,2%-ról 0,7 %-ra növekedett az albinó hajtások százalékos megjelenése a felhasznált embriószerű struktúrákra vonatkoztatva. Ezen fajta esetében az albinizmus jelensége kis mértékű volt. Az egy napig tartó kezelés mellett a Tc 5-11-3 3,3%-os (7,1→3,8), a Tc5/2-9 4,2%-os (16,9→12,7), a Tc6/2-9 1,3%-os (3,4→2,1), a Tc3384 (3,6→3,4) 0,2%-os csökkenése figyelhető meg.

A kísérleti genotípusok mindegyikénél tapasztalható a többnapos kezelés kiemelkedően kedvező hatása az albinó növények számának redukálódására. Ez a Tc5/2-9 példáján a leglátványosabb, (16,9→2,5) 14,4%-os fogyásával a kontroll tenyészetek értékeihez képest. A háromnapos kezelésnél jelentkező albinó növények előfordulási hányadának csökkenése a kontrollhoz képest a Tc5-11-3 példájában 6%, a Tc3384 esetében 3,3% és a Tc6/2-9 esetében 2,1% volt.



9.ábra: Genotípusonként a kezelés időtartamától függően fejlődő albinó növények előfordulási százaléka az embriószerű struktúrákra vonatkoztatva.

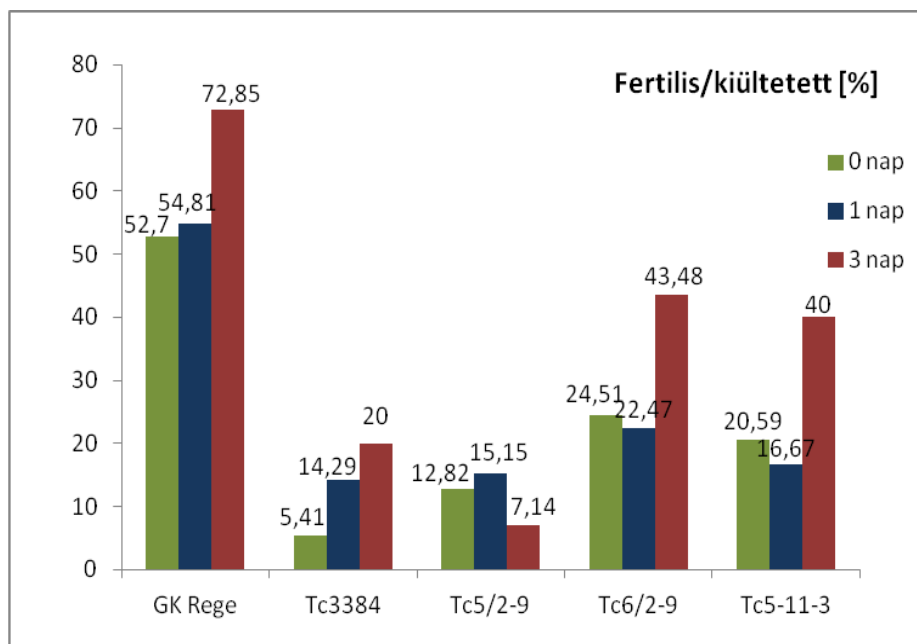
A fertilitást annak alapján határoztuk meg, hogy az érett kalászkák tartalmaztak-e szemtermést vagy sem. A duplikációs ágens hatását a fertilitás tekintetében, a 10. ábra szemlélteti.

Az egy napos kezelés csak kis mértékű százalékos eltérést mutat a kezelés nélküli tenyészetekhez képest. Nagyobb fertilitási arány csak a GK Rege (+2,1%), a Tc3384 (+8,9%)

és a Tc5/2-9 (+2,3%) genotípusoknál fordul elő. Ezzel szemben a Tc6/2-9 2,1%-os visszaesést, a Tc5-11-3 pedig 3,9%-os csökkenést mutat.

A többnapos kezelés azonban csaknem mindegyik genotípusnál (kivéve Tc 5/2-9) még a kontroll értéket is meghaladó fertilitást eredményez százalékos értékben kifejezve. A legtöbb fertilis növényeggyeddel a GK Rege rendelkezik, egészen pontosan 117-tel, ami az üvegházi növények számának 72,9%-a, a kezelt embriószerű struktúráknak pedig 27,8%-a. Őt követik a sorban a Tc6/2-9 és a Tc5-11-3 43,5% és 40%-kal.

A Tc3384 genotípusnál is jól megfigyelhető, hogy az egy napos együtttenyésztés 5,4%-ról 14,3%-ra, azaz csaknem háromszorosára emelte a fertilis növények előfordulási százalékát.



10.ábra: Genotípusonként a kezelés időtartamától függően előforduló fertilis növényeggyedek százalékos aránya az kiültetett regeneránsok számára vonatkoztatva.

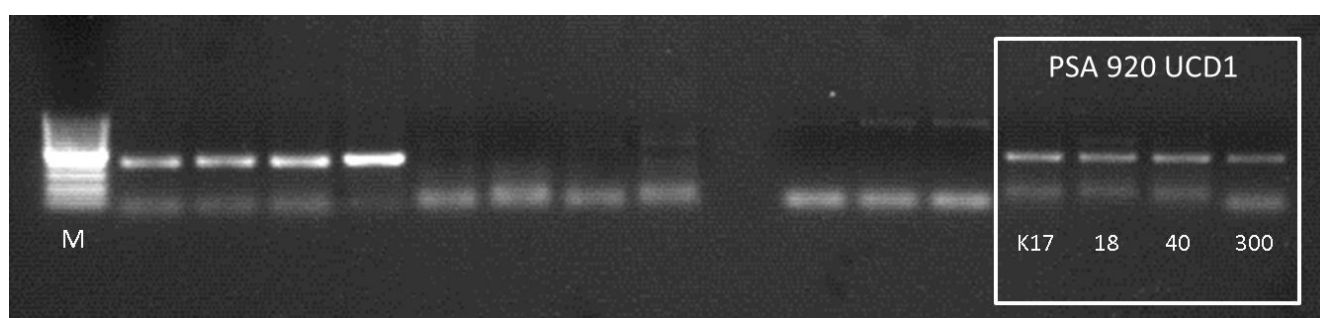
Ezek az eredmények százalékos értékek alapján születtek. A statisztikai adatok alapján (2. és 3.Táblázat) a következők mondhatók el. A kezelés hatására megjelenő zöld hajtások számában az összes vizsgált genotípusnál tapasztalható szignifikáns eltérés, méghozzá a háromnapos kezelés során. Ugyanez a szignifikancia látható a kiültetésre kerülő növények esetén a háromnapos kezelésnek köszönhetően. Az egynapos kezelés csakis a Tc5-11-3 genotípus eredményeit befolyásolta szignifikánsan. A kezelések szignifikáns hatása viszont nem tapasztalható egyértelműen az albínó és a fertilis növény kihozatal szempontjából. A kolhicines kezelés az albínó növények megjelenésének redukálódása csak a Tc5/2-9 és Tc

5/11-3 genotípus tenyésztéseiben tapasztalható, ahol az albinizmus jelensége genotípusukból adódóan eleve nagyobb mértékű volt. Az érett fertilis regeneránsok előfordulási aránya csak százalékos arányban emelkedett, mivel a kezelés a fertilitást szignifikánsan nem befolyásolta.

4.3. A regenerások genetikai diverzitása

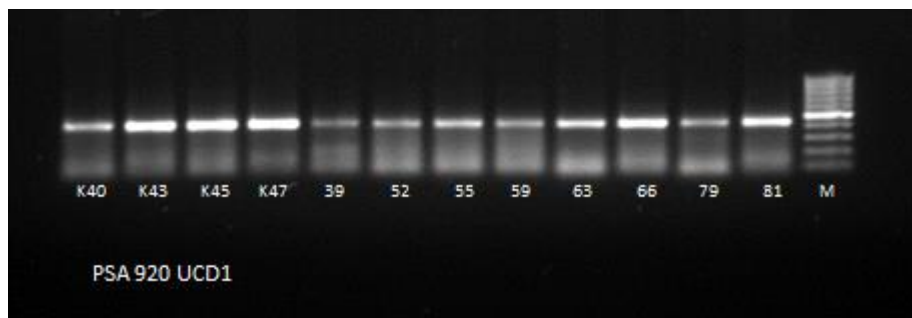
A genetikai variabilitás vizsgálatára a GK Rege fajta magról kelt és *in vitro* portoktenyészetek indításával kapott regenerált növények izolált DNS-eit használtuk fel. A minták között voltak steril és fertilis egyedek (feltételezhetően haploid és spontán diploid egyedek).

A mikroszatellit elemzésekhez használt PSA920 UCD1 primer esetén éles fragmentumokat kaptunk a gélen (11.ábrán fehér keret jelzi).



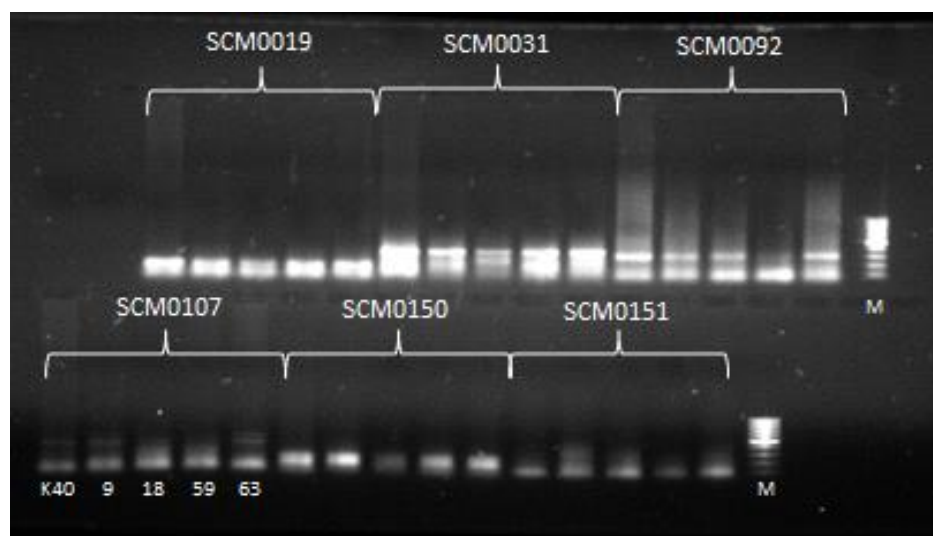
11.ábra: PSA920 UCD1 markerrel végzett PCR eredménye 1%-os agaróz gélen (M: molekulatömeg marker; K17: kontroll minta; 18.: haploid minta; 40., 300.: diploid minták) (A lényeges információ a kereten belül található, Balogh Vera 2014)

Több minta bevonása, és a Dvorak és mtsai 2006-os publikációja szerint történő optimalizált paraméterek nem mutatták a várt, az egyedek közötti nagyfokú polimorfizmusra utaló mintázatot. A vizsgált minták esetében (K40., K43., K45., K47.-kontroll; 39.-haploid, 52., 55., 59., 63., 66., 81.-diploid) mindössze egy fragmentum látható (12. ábra). Bár a mintázat alapján nem állapítható meg egyértelműen, hogy a kapott sávokat egy vagy több fragmentum alkotja. Ehhez DNS fragmentum-analízisre van szükség.



12.ábra: PSA920 UCD1 markerrel végzett PCR eredménye 1%-os agaróz gélen (M: molekulatömeg marker; K40., K43., K45., K47.: kontroll minták; 39.: haploid minta; 52., 55., 59., 63., 66., 79., 81.: diploid minták) (Balogh Vera 2014)

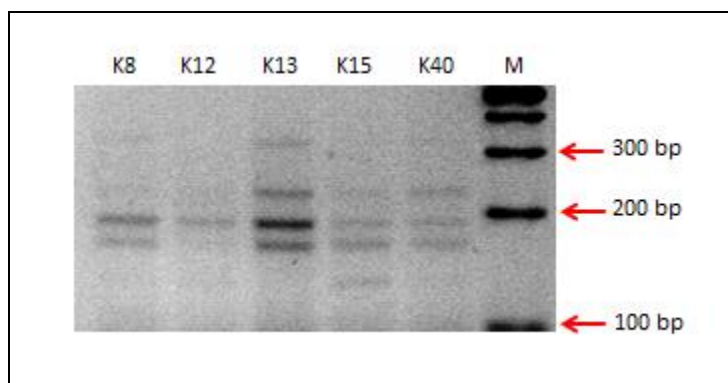
Ezt követően az SCM (*Secale Cereale* Microsatellite), rozsspecifikus primerekkel is végeztünk PCR-t, melyről gélfotó a 13. ábrán látható. Kipróbálásra kerültek az SCM 0019, SCM0031, SCM0092, SCM0107, SCM0150, SCM0151 primerpárok. A reakciókat a következő mintákon végeztük el: egy kontroll (magról kelt) (K40.), két haploid (szemtermést nem adó regeneráns) (9. és 18.), és két diploid (szemtermést hozó regeneráns) (59. és 63.).



13. ábra: SCM0019, SCM0031, SCM0092, SCM0107, SCM0150, SCM0151 markerekkel végzett PCR eredménye 1%-os agaróz gélen. (M: molekulatömeg marker; K40.: kontroll minta; 9. és 18.: haploid minták; 59. és 63.: diploid minták) (Balogh Vera 2014)

A reakció sikeressége az SCM0031, az SCM0092 és az SCM107 primerek használata során a bizonyult a legjobbnak. Az ezekkel a primerekkel felszaporított PCR termékek hosszpolimorfizmusa még agaróz gélen is látható, tehát mindenképpen érdemes velük SSR

allélméret-meghatározást végezni. Ezeket a vizsgálatokat is elkezdtek: első lépésben a magról kelt GK Rege növények közül választottunk ki ötöt és az SCM0107-es primerrel megismételtük a PCR-t. Az amplifikációt követően a termékeket 2%-os agaróz gélen, kisebb mértékű egyenáram alkalmazása mellett elválasztva 2-3-4 fragmentumot is kaptunk (14. ábra).



14. ábra: SCM0107 markerekkel végzett PCR eredménye 2%-os agaróz gélen. (M: molekulatömeg marker; K8., K12., K13., K15., K40.: kontroll minták) (Balogh Vera 2014)

Bár elméletileg a genomösszetétel alapján a lokusz heterozigótasága esetén 6 allél megjelenése is elképzelhető (Kiss 2005, Kiss 2014), további vizsgálatokat tervezünk annak a bizonyítására, hogy a gélen megjelent fragmentumok valóban az SCM0107 primerpár termékei.

5. Következtetések és javaslatok

5.1. Az androgenetikus folyamatok genotípus függősége

Az androgenetikus folyamatok genotípus függőségének bizonyítására a kolhicinnel nem kezelt tenyészetek eredményei szolgálnak. Az, hogy a vizsgáltak közül melyik genotípus reagált a legjobban az androgenetikus folyamatokra, már a regenerálási időszak elején szemmel látható volt. A leghamarabb a GK Rege tenyészeiben jelentek meg az embriószerű struktúrák, a nemesítési alapanyagok közül a Tc6/2-9-nek volt kiemelkedő a válaszóadó képessége.

A regeneráló táptalajon megjelenő a felhasznált embriószerű struktúrákra vonatkoztatott zöld hajtások számát tekintve szintén a GK Rege rendelkezik a legnagyobb értékkel. A megjelenő zöld hajtások mennyisége a felhasznált embriószerű struktúrák 51,6%-a, mely több mint ötször nagyobb az Arzani & Darvey 2001-ben publikált 10%-os eredményénél. Őt követi, a maga 26,9%-os értékével a Tc6/2-9 genotípus.

A megjelenő albínók száma a felhasznált embriókra vonatkoztatva a következő százalékos értékeket adja növekvő sorrendben: GK Rege 0,3%, Tc6/2-9 3,2%, Tc3384 3,6%, Tc5-11-3 7,1%, és Tc5/2-9 16,9%. Láthatjuk, hogy ebből a szempontból is a nemesítési alapanyagok közül a Tc6/2-9 válaszóadó képessége bizonyult a legjobbnak.

A regeneráló táptalaj hatékonyságát illetve a genotípus jó válaszóadó képességét tükrözi a kiültetésre alkalmas zöld regeneránsok száma. A legnagyobb elhullás a Tc3384 esetében volt tapasztalható (33,9%-os), ahol 56 zöld regeneránsból, csupán 37-t tudtunk kiültetni. Míg a legkisebb veszteség szintén - a fentiek alapján is - legjobbnak mondható genotípus a GK Rege rendelkezett (kevesebb, mint 1%). Másodikként a Tc6/2-9 áll 3,6%-os, harmadikként a Tc5-11-3 áll 10,5%-os veszteséggel. A Tc5/2-9 esetében pedig 39 kiültethető regeneránssal 31,6%-os veszteséget tapasztaltunk.

A következő, és egyben rendkívül fontos tulajdonság a tenyésztés sikeressége és a későbbi nemesítési programokban történő felhasználhatósága szempontjából a már kiültetett, érett és fertilis regeneránsok száma. A fertilis növények száma a GK Rege fajta esetében volt a legnagyobb. Őt követi a sorban a Tc6/2-9 genotípus 22 szemtermést adó növényeggyeddel. Mivel a tenyésztési paraméterek azonosak voltak mindegyik minta esetében, a kapott, rendkívül divergens százalékos értékek is azt bizonyítják, hogy az *in vitro* embriogenezis

folyamatának korlátozó tényezői közül a genotípus igen jelentős. Továbbá igazolódott az, hogy a tritikálé faj esetében megoldottnak tekinthető az *in vitro* portoktenyésztés módszere.

A vizsgált öt szempont mindegyike alapján a GK Rege bizonyult a legjobb válaszdónak a portoktenyésztés folyamatában. Négy tulajdonság alapján - melyek a megjelenő embriószerű struktúrák száma, a megjelenő zöld és albínó hajtások aránya és a fertilis regeneránsok aránya -, a második legpozitívabb kihozattal a Tc6/2-9 genotípus rendelkezik.

5.2. A kolhicinkezelés hatékonysága

Az eredmények alapján a kolhicinnel történő kezelés és a kezelés időtartamának növelése mellett a zöld regeneránsok száma kivétel nélkül mindegyik genotípusnál csökkent. Ennek oka, hogy már a mindössze egy napos kezelés is olyan mértékű toxicitást gyakorolt a fejlődő embriószerű struktúrákra, hogy azok csökkent mértékű növekedését okozta. Ez a megállapítás fedi az Arzani és Darvey (2001) kijelentését, miszerint az egysejtes állapotot érintő nagymértékű toxikus hatás, növeli a mikrospórák és az embriószerű struktúrák mortalitási arányát. Ez a visszaesés a kezelés időtartamának csökkentése mellett, esetleg a tápközeghez hozzáadott kolhicin koncentrációjának csökkenésével kerülhető el. A százalékos értékek alapján elmondható, hogy az egynapos kezelést legjobban tolerálók a Tc3384 és a Tc6/2-9, a legkevésbé pedig a Tc 5/2-9 és a Tc5-11-3 genotípusok. A háromnapos kolhicinkezelés tekintetében ismét a Tc3384 a legjobban reagáló. Őt követi a Tc5-11-3 genotípus. Az *in vitro* androgenetikus folyamatokra legjobban reagáló genotípusok - a GK Rege és a Tc6/2-9 – rendelkeznek a legnagyobb mértékű visszaeséssel a háromnapos kezelés hatására, az összes tesztelt genotípus közül. Ezekben az esetekben az embrioidok túl hosszú ideig voltak a kolhicin nekrotikus hatása alatt, mely következtében sok sejt elpusztult. A statisztikai eredmények alapján a kolhicin a zöld regeneránsok mennyiségét a háromnapos kezelés során befolyásolta szignifikánsan az összes vizsgált genotípus esetében.

A nemesítési alapanyagoknál az tapasztalható, hogy a kolhicinnel történő kezelés az albínó növények mennyiségét csökkentette akárcsak a zöldekét, mely hatás tovább fokozódott a kezelés időtartamának növekedésével. Ez megegyezik Redha (1998) és munkatársai által közöltekkel, miszerint a kolhicinnel történő kezelés hatására búza *in vitro* portoktenyésztéseiben csökkent az albínó regeneránsok száma (Redha et al 1998). A

variacionális eredménye szerint viszont a kezelés szignifikánsan nem befolyásolta számottevően az albínó produktumot (csak a Tc5/2-9 genotípus példájában).

Az egynapos kolhicinkezelés a százalékos értékek alapján csak a GK Rege, a Tc3384 és a Tc5/2-9 genotípusoknál növelte a fertilis növények gyakoriságát a kiültetett regeneránsokra vonatkoztatva. A három napos kezelés szinte egybehangzóan, és kiugróan nagyobb értékekkel rendelkezik mind a kontrollhoz, mind az egy napos kezeléshez képest. Az érett regeneránsok tekintetében a fertilis egyedek előfordulási aránya százalékosan fokozódott ugyan a duplikációs ágens jelenléte mellett, azonban a különbség nem volt szignifikáns. Megfigyeléseink indokolják a kísérleti feltételek módosítása mellett a kísérletek folytatását, hogy a kezelés hatására a fertilis növények mennyisége abszolút értékben is emelkedjen.

5.3. A regeneránsok genetikai diverzitása

Dvorak és mtsai (2006) tetra- és hexaploid búzafajtákon PSA920 UCD1 primerrel végzett amplifikációs reakciótermékek mindegyike vagy 426 bp vagy 146 bp nagyságú fragmentumokat eredményezett –haplotípusuktól függően. Az általuk közölt reakcióparaméterek beállításával a reakció hatékonysága a kezdetihez képest javult (Dvorak et al. 2006). Ezzel egyidőben a reakciót három eltérő koncentrációjú templát mellett is elvégeztük. Az eredmények alapján (mintázat szerint) a reakció a nagyobb koncentrációban jelen lévő DNS mennyiséget igényli (20 µg/ml). Több minta bevonásával azonban nem kaptunk heterogenitásra egyértelműen utaló polimorf képet, a próbált minták mindegyike esetében mindössze egy fragmentum látható a gélfoton (~426 bp). További, a sávok tartományában nagyobb felbontást biztosító elválasztást alkalmazva pontosabb eredmények kaphatók az allélméretekre vonatkozóan.

Az SCM (Secale Cereale Microsatellite) markerek kiválóan alkalmasak különféle rozsfajták genetikai diverzitásának megadása alapján azok filogenetikai kapcsolatuk tisztázására. Összesen 184 SCM marker került kifejlesztésre (Shang et al. 2006). A kísérletünk során az SCM0019, SCM0031, SCM0092, SCM0107, SCM0150, SCM0151 primerpárok kerültek kipróbálásra. A PCR termékek elválasztása során kapott mintázatok alapján az SCM0031, SCM0092 és az SCM0107 primerekkel végzett reakciók nagy valószínűséggel alkalmasak tritikálé genomelemzésre. Az előzetes eredmények alapján a DNS fragmentum analízisre javasoljuk a fenti említett három rozsprimert az allélméretek pontos meghatározása céljából. Az agaróz gélen is megfigyelhető allélvariánsok előfordulása

miatt ezeket a lokuszokat az *in vitro* portoktenyészetekből regenerálható növényekre jellemző egyedek közötti genomi szintű diverzitás meghatározására alkamasnak tartjuk.

6. Összefoglalás

Az *in vitro* indított portoktenyészetekben indukált embriogenezis folyamatának genotípus függőségét eredményeink sikerrel bizonyítják. A vizsgált GK Rege fajta messze felülmúlta társait. A vizsgált nemesítési alapanyagok közül több szempontból is a Tc6/2-9 genotípus rendelkezett a legjobb válaszadó képességgel a portoktenyészet indítása tekintetében.

A kolhicinnel történő kezelés a zöld regeneránsok valamint a kiültetett növények mennyiségére vonatkozó hatását a kapott százalékos értékek és a varancianalízis is egyértelműen igazolja. A kezelés fertilitásra gyakorolt pozitív hatásának fokozása illetve a megjelenő albínó növények csökkent mennyiségű előfordulása érdekében viszont a kísérleti feltételek további módosításokat igényelnek. A kísérletből származó fertilis növények a Gabonakutató Kft. nemesítési programjának értékes részét képezik. Különösen fontosak egy olyan gabona faj esetében, mely 10-15%-os idegentermékenyülésre hajlamos. A Kezelés x Genotípus kölcsönhatás szignifikáns hatása a regenerált albínó növények esetében észrevehető.

A molekuláris vizsgálatok során bizonyítottuk, hogy a rozsspecifikus mikroszatellit primerek alkalmasak lehetnek tritikálé fajon történő PCR amplifikációhoz. Az azonos genotípusok utódai közötti genetikai diverzitás is valószínűsíthetően kimutatható, függetlenül azok *in vivo* vagy *in vitro* körülmények között történő létrejöttétől. A továbbiakban, a kapott eredmények alapján, az allélméretek pontosabb meghatározása céljából javasoljuk a fragmentumok méretének pontos analízisét.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Kiss Erzsébet és Dr. Lantos Csaba konzulenseimnek a dolgozat során adott hasznos ötleteit és jó tanácsait. Hálával tartozom a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. dolgozóinak, akik a munkám sikerességéhez tanácsokkal, odafigyeléssel és eszközökkel járultak hozzá. Végül köszönöm a tanszék dolgozóinak, hogy munkám során támogattak, mindvégig a segítségemre voltak és, hogy a felmerülő problémákkal mindig fordulhattam hozzájuk.

Tisztaszívvvel köszönöm a szüleimnek a sok gondoskodást, ami elkísért a tanulmányaim során, hálásan köszönöm a párom és a család kitartó türelmét és támogatását.

Irodalomjegyzék

- Ahmad M.** (2002): Assesment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. *Genome* 45 (6): 646-651.
- Arzani A. & Darvey N. L.** (2001): The effect of colchicine on triticales anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. *Euphitica*, 122 (7): 235-241.
- Barnabás B., Óbert B., Kovács G.,** (1999): Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anther. *Theoretical and Applied Genetics* 18 (4): 858–862.
- Barnabás B., Pfahler P. L., Kovács G.** (1991): Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 81 (4): 675–678.
- Blakeslee A. F., Belling J., Farnham M. E., Bergner, A. D.** (1922): A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*, 55 (2): 646-647.
- Bóna L.** (2014): Szóbeli közlés, előadás anyag. Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Egyéb Kalászosok Nemesítési Osztálya osztályvezető
- Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde A., Minch E., Kidd J. R., Cavalli-Sforza L. L.** (1994): High-resolution human evolutionary trees from polymorphic microsatellites. *Nature* 368(3): 455-457.
- Bowman J. G. & Rajhathy T.** (1977): Fusion of chromocenters on premeiotic interphase of *Secale cereale* and its possible relationships to chromosome pairing. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 19 (9): 313-321.
- Castillo A. M., Cistué L., Vallés M. P., Soriano M.** (2009): Chromosome doubling in monocots. In Touraev A. Forster B.P., Jain S. M. (szerk.): *Advances in Haploid Production in Higher Plants*: Springer; December 2009, 348 p.: 329–338. p.
- Chu C. C., Hill R. D., Brule-Babel A. L.** (1990): High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Science*, 66 (8): 255-262.
- Corredor E. & Noranjo T.** (2007): Effect of colchicine and telocentric chromosome conformation on centromere and telomere dynamics at meiotic prophase I in wheat-rye additions. *Chromosome Research* 15 (15): 231-245.
- Driscoll C. J. & Darvey N. L.** (1970): Chromosome pairing: effect of colchicine on an isochromosoma. *Science* 169 (2): 290-291.
- Driscoll C. J., Darvey N. L., Barber H. N.** (1967): Effect of colchicine on meiosis in wheat. *Nature* 216 (2): 687-688.
- Dubrovna O. V. & Baval A. V.** (2011): Variability of the Wheat Genome during *In Vitro* Culture. *Cytology and Genetics* Vol. 45., No. 5. (8): 333–340.
- Dvorak J., Akhunov E. D., Akhunov A. R., Deal K. R., Luo M.-C.** (2006): Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Molecular Biology and Evolution* 23(7) (11): 1386-1396.
- Eigsti O. J. & Dustin J. P.** (1957): Colchicine- in Agriculture Medicine Biology and Chemistry. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, U.S.A., 470 p.

- Eudes F. & Amundsen E.** (2005): Isolated microspore culture of Canadian 6x triticales cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82 (9):233–241.
- Gupta P. K., Varshney R. K., Sharma P. C., Ramesh B.** (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118 (22): 369-390.
- Hackauf B. & Wehling P.**: Development of microsatellite markers in rye: map construction. *Plant Breeding and Seed Science* Vol. 48., No. 2/2 (9): 143-151.
- Hajósné dr. Novák Márta (szerk.)** (1999): Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Molekuláris diagnosztika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 142 p.
- Hansen N. J. P. & Andersen S. B.** (1998): *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 102 (8): 101–108.
- Heszky L. & Galli Zs.** (2008): A genetika alapja. Szent István Egyetem jegyzet, Gödöllő, 254 p.
- Heszky L.** (2005): Szexuális reprodukció biotechnikái és alkalmazásuk. In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (szerk.): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest, 146-155 p.
- Hódosné Kotvics Gizella (szerk.)**: Mezőgazdasági növények nemesítése. SZIE gyakorlati jegyzet, Gödöllő, 238 p.
- Huang H., Gao S., Wang D., Huang P., Li J.** (2014): Autotetraploidy induced in *Nianmaohuangqin* (*Radix Scutellariae viscidulae*) with colchicine *in vitro*. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(2) (6): 199-205.
- Immonen S. & Anttila H.** (2000): Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Plant Physiology* 156 (7): 204-210.
- Izsáki Z. & Lázár L.** (2004): Szántóföldi növények vetőmagtermesztése és kereskedelme. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 655p.
- Jacquard C., Nolin F., Hecart C., Grauda D., Rashal I., Dhondt-Cordelier S., Sangwan R.S., Devaux P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clement C.** (2009): Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Reports* Vol. 28., No. 9. (11): 1329-1339.
- Kiss E.** (2005): Molekuláris növénynemesítés. In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (szerk.): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest 194-210 p.
- Kiss E.** (2014): Szóbeli közlés. SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő, egyetemi tanár
- Kohlenbach H. W. & Wernicke W.** (1978): Investigations on the Inhibitory Effect of Agar and the Function of Active Carbon in Anther Culture. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 86, 5 (10): 463–472.
- Kuckuck H., Kobabe G., Wenzel G.** (1988): A növénynemesítés alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 216 p.
- Kuleung C., Baenziger P. S., Dweikat I.** (2004): Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticales. *Theoretical and Applied Genetics* 108(4): 1147-1150.
- Kumari M., Clarke H. J., Small I., Siddique B K. H. M.** (2009): Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28 (15): 393-409.

- Lantos C.** (2009): *In vitro* androgenesis indukciója búzában (*Triticum aestivum* L.), tritikálében (*X Triticosecale* Wittmack), fűszerpaprikában (*Capsicum annuum* L.) és az eredmények felhasználása a nemesítésben. Doktori értekezés tézisei, Szent István Egyetem, Gödöllő, 20 p.
- Lantos C., Bóna L., Boda K., Pauk J.** (2014): Comparative analysis of *in vitro* anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (*X Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica* 197(10): 27-37.
- Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihály R., Broughton S., Pauk J.** (2003): Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs. *Plant Breeding* 132 (5): 149-154.
- Leonova I. N., Dobrovolskaya O. B., Kaminskaya L. N., Adonina I. G., Koren L. V., Khotyljova L. V., Salina E. A.** (2005): Molecular Analysis of the Triticale Lines with Different *Vrn* Gene Systems Using Microsatellite Markers and Hybridization In Situ. *Russian Journal of Genetics* Vol. 41., No. 9. (7): 1014-1020
- Loidl J.** (1989): Colchicine action at meiotic prophase revealed by SC-spreading. *Genetica* 78 (9): 195-203.
- Loidl J.** (1990): The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* 33(29): 759-778.
- Maraschin S. F., de Priester W., Spaink H. P., Wang M.** (2005): Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* Vol. 56., No. 417.(16): 1711-1726.
- Mullis K. B. & Faloona F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155 (16): 335-350.
- Murashige T. & Skoog F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (25): 473-49.
- Murovec J. & Bohanec B.** (2012): Haploids and Doubled Haploids. In: Dr. Ibromkhim Abdurakhmonov (szerk.): *Plant Breeding*. InTech, Croatia, 352 p., 87-106. p.
- Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J.** (2004): Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Reports* 22 (9): 885–893.
- Oleszczuk S., Tyrka M., Zimny J.** (2014): The origin of clones among androgenic regenerants of hexaploid triticale. *Euphytica* 198 (12): 325-336.
- Orlovskaya O. A., Koren L. V., Khotyleva L. V.** (2012): Genetic Polymorphism Evaluation of Spring Triticale (*x Triticosecale* Wittmack) Samples with Use of RAPD and ISSR Markers. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* Vol. 2., No.6. (5): 508-512.
- 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 (6): 251-256.
- Pauk J., Mihály R., Monostori T., Puolimatka M.,** (2003): Protocol of triticale (*X Triticosecale* Wittmack) microspore culture. In: Maluszynski M., Kasha KJ., Forster BP., Szarejko I (szerk.): *Doubled haploid production in crop plants: a manual book*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 428p, 129-134 p.
- Pauk J., Puolimatka M., Tóth K. L., Monostori T.** (2000): *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61 (9): 221-229.
- Przywara L., Pandey K. K., Sanders P. M.** (1988): Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. *New Zealand Journal of Botany* 26 (4): 179-182.

Rédei P. György (1987): Genetika. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 830 p.

Redha A., Attia T., Buter B., Saisintong S., Stamp P., Schmid J.E. (1998): Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum*) anther culture. Plant Cell Reports 17 (6): 974–979.

Röder M. S., Plaschke J., König S. U., Börner A., Sorrels M. E., Tanksley S. D., Ganai M. W. (1995): Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Molecular and General Genetics 246 (7): 327-333.

Shang H.-Y., Wei Y.-M., Wang X.-R., Zheng Y.-L. (2006): Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology, Vol. 29., No. 4. (7): 685-691.

Soriano M., Cistué L., Vallés M. P., Castillo A. M. (2007): Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat. Plant Cell Tissue and Organ Culture 91 (10):225–234.

Supena E. D. J., Muswita W., Suharsono S., Custers J. B. M. (2006): Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. Scientia Horticulturae 107 (7): 226–232.

Sutka J. (1980): Citogenetika. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 243 p.

Szabó G. (2009): Sejtbiológia. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 822 p.

Tepperberg J. H., Moses M. J., Nath J. (1997): Colchicine effects on meiosis in the male mouse. 1. Meiotic prophase: synaptic arrest, univalents, loss of damaged spermatocytes and a possible checkpoint at pachytene. Chromosoma 106 (10): 183-192.

Thomas J. B. & **Kaltsikes** P. J. (1977). The effect of colchicine on chromosome pairing. Canadian Journal of Genetics and Cytology 19 (19): 231-249.

Tikhonov A. P., SanMiguel P. J., Nakajima Y., Gorenstein N. M., Bennetzen J. L., Avramova Z. (1999): Colinearity and its exceptions in orthologous *adh* regions of maize and sorghum. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96 (6): 7409-7414.

Van Deynze A. E., Sorrels M. E., Park W. D., Ayres N. M., Fu H., Cartinhour S. W., Paul E., McCouch S. R. (1998): Anchor probes for comparative mapping of grass genera. Theoretical and Applied Genetics 97 (14): 356-369.

Würschum T., Tucker M. R., Reif J. C., Maurer H. P. (2012): Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by *in vitro* chromosome doubling. Würschum et al. BMC Plant Biology 12: 109 p., 1-7 p.

Internetes hivatkozások:

http1 DNS izolálás lépései

http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/novenyeltani_vizsgalo_modszerek/ch10s02.html (2014. szeptember)

http 2 Izopropil-alkohol. <http://hu.wikipedia.org/wiki/Izopropil-alkohol> (2014. szeptember)

http 3 Molekuláris diagnosztika

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_diagnosztika_hu_book/ch12.html
(2014. szeptember)

http 4 A zárva termők spóráképzése és ivarsejtképzése

http://novszerv.elte.hu/oktatas/gyogyszer/porogen_mag.pdf (2014. április)

http 5 Genes, Markers and Linkage Data of Rye <http://www.rye-gene-map.de> (2014. október)