

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az *in vitro* androgenezis kutatás eredményei *Triticum* fajok
nemesítésében**

Lantos Csaba



Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged

2024

Bevezetés

Kalászos gabonafajok nemesítésében a hagyományos keresztezésen alapuló nemesítési módszerek a mai napig vezető szerepet töltenek be. A modern biotechnológiai eljárások nem helyettesítik, hanem kiegészítik azokat. A klasszikus nemesítési módszerek és a modern biotechnológiai eszközök szimbiózisa kiváló lehetőségeket biztosít a versenyképes fajták és hibridek előállítására, ahogy ez több nemzetközileg is ismert nemesítőháznál már látható. E módszerek közé soroljuk az *in vitro* androgenezisen alapuló portoktenyésztés (AC) és izolált mikrospóra tenyésztés (IMC) módszerét. Az *in vitro* androgenezis indukciója során a mikrospórák gametofitikus fejlődésmenete stressz előkezelés hatására sporofitikus útra programozható át, majd az indukciót követően embriószerű struktúrák (ELS) állíthatók elő, és zöld növénykékké regenerálhatók a mikrospórákból. Így genetikailag homozigóta kettőzött haploid vagy doubled haploid (DH) növényeket kapunk AC-ben és IMC-ben a haploid kromoszóma készlet spontán vagy indukált módon történő megduplázását követően.

Az *in vitro* androgenezis módszerei számos előnnyel járnak gazdasági növényeink kutatásában és nemesítésében. A legfontosabb előny, hogy homozigóta törzsek hozhatók létre egy generáció alatt, míg hagyományos módon, öntermékenyítéssel akár 6-8 generációra is szükség van. Így a DH vonalak és törzsek előállítása jó lehetőséget kínál a hibrid és a fajtaelőállító nemesítési programok számára.

A DH növényelőállítási módszerek kiválóan felhasználhatóak alkalmazott kutatási programokban. Az *in vitro* AC módszere hatékonyan kombinálható más biotechnológiai eljárásokkal, úgymint marker támogatta szelekció (MAS), mennyiségi tulajdonság lokuszainak (QTL) vizsgálata, genetikai transzformáció stb. Továbbá alkalmas mutációk, recesszív allélek homozigóta formában történő rögzítésére, hogy azok fenotípusos hatása gyorsan vizsgálhatóvá váljon. Ez a széles metodikai eszköztár a nemesítés által kitűzött célok gyorsabb és hatékonyabb elérését szolgálja (Chauhan és Khurana 2011, Wessels és Botes 2014, Ren és mtsai. 2017, Song és mtsai. 2017, Bilichak és mtsai. 2020). Érthető, hogy világszerte számos növénynemesítő cég és akadémiai kutatóintézet évtizedek óta foglalkozik a DH növényelőállítási módszerek kidolgozásával és folyamatos fejlesztésével. A DH növényelőállítási módszerek árpa és repce esetében már széleskörűen alkalmazott rutin eljárások, míg *Triticum* fajok esetében árnyaltabb a módszerek felhasználásának megítélése.

Több kutatócsoport is sikeresen alkalmazta már az *in vitro* AC módszerét kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) fajtaelőállító nemesítés során (Thomas és mtsai. 2003, Tuvešson és mtsai. 2021, Broughton és mtsai. 2020, Weyen 2021), több mint 250 regisztrált kenyérbúza DH fajta ismert a világon (Devaux és Cistue 2016). Mindezen ígéretes eredmények ellenére máig beszámolnak meghatározó kutatócsoportok a közönséges búza *in vitro* androgenezis módszereinek (AC és IMC) szűk keresztmetszeteiről, úgymint genotípusfüggőség, albinizmus vagy alacsony növényregenerációs hatékonyság (Li és mtsai. 2013, Wessels és Botes 2014, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, Orlowska és mtsai. 2020). Tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) és alakor (*Triticum monococcum* L.) fajok esetében pedig alig találni publikált adatot a módszerekről. Így a DH növényelőállítási módszerek (AC és IMC) és a hozzájuk kapcsolódó nemesítési eljárások a mai napig folyamatos fejlesztést igényelnek *Triticum* fajokban a versenyképesség fenntartása érdekében.

1. Kutatási célkitűzések:

1.1. Az *in vitro* portoktenyésztés vizsgálata közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) keresztezési kombinációiban

- A genotípus, tápközeg (P4mf, W14mf) és genotípus×tápközeg kölcsönhatás vizsgálata az *in vitro* androgenezis paramétereire (ELS, zöld és albínó növénykék, kiültetett növénykék száma) tíz közönséges búza F₁ keresztezési kombináció *in vitro* portoktenyésztésében.
- Évjárat, genotípus, évjárat×genotípus hatásának (ELS-k, regenerált növénykék, zöld és albínó növénykék száma) tesztelése *in vitro* portoktenyésztésben nemzetközi kontroll genotípusokkal ('Svilena' – kiváló válaszdó képességű és 'Berengar' – gyenge válaszdó képességű genotípus).
- Az *in vitro* portoktenyésztés hatékonyságának vizsgálata széles nemzetközi genotípus háttérrel (93 német és francia F₁ keresztezési kombináció).

1.2. *In vitro* portoktenyésztés felhasználása közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítésében

- Az *in vitro* portoktenyésztés alkalmazása közönséges búza fajtaelőállító nemesítése során, szelektált DH búzatörzsek vizsgálata országos kísérletben (NÉBIH), fajtaelőállítás.

1.3. *In vitro* androgenezis indukciója tönkölybúzában

- Androgenezis indukciója tönkölybúza *in vitro* AC-ben, a genotípus, előkezelés és genotípus×előkezelés hatásának vizsgálata.
- Androgenezis indukciója tönkölybúza *in vitro* IMC-ben (dajkatenyésztés, exogén hormonkiegészítés és genotípus hatása).

1.4. *In vitro* portoktenyésztés alkalmazása tönkölybúza nemesítésben

- *In vitro* portoktenyésztés vizsgálata tönkölybúza teljes diallél populációval és F₁ keresztezési kombinációkkal.
- Előállított tönkölybúza DH törzsek jellemzése két éves tenyészerti kísérletben.

1.5. Androgenezis indukciója alakor (*Triticum monococcum* L.) fajban

- Androgenezis indukciója *Triticum monococcum* L. *in vitro* portoktenyésztésben.
- Előkezelések hatásának vizsgálata az *in vitro* androgenezis indukciójára *Triticum monococcum* L. genotípusok portoktenyésztésében.
- Genotípushatás vizsgálata *Triticum monococcum* L. *in vitro* portoktenyésztésben.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Donor növények és felnevelési körülmények

2.1.1. Donor növények felnevelése üvegházi körülmények között

A kiválasztott donor genotípusokat üvegházi körülmények között vetettük el, és csírázás után 6-8 hétig vernalizáltuk 2-4°C-on folytonos megvilágítás ($30 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) mellett. A vernalizációs periódust követően a donor növényeket 2 l-es műanyag tenyészedenyekbe palántáztuk ki, melyek homok és tőzeg 1 : 1 arányú keverékét tartalmazták. Kétfelhelyen egy alkalommal tápoldatoztuk Volldünger műtrágya felhasználásával (N : P : K : Mg = 14 : 7 : 21 : 1, és 1% microelemek: B, Cu, Fe, Mn és Zn; Magyar Kwizda Ltd., Budapest, Magyarország). A donor növények számára 20/15°C (nappal/éjjel) hőmérsékletet biztosítottunk, a természetes fényviszonyokon kívül 1-3 órás mesterséges pótvilágítást alkalmaztunk a kora reggeli órákban. A növényápolási munkák során fungicides (Prosaro és Folicure – Bayer Hungária Kft., Budapest, Magyarország) és inszekticides (Lannate – DuPont Magyarország Kft., Budaörs és Actara – Syngenta Seeds Kft., Budapest, Magyarország) kezelést alkalmaztunk szükség szerint. A gyomokat manuálisan távolítottuk el.

Alkalmazott genotípusok:

- Két indukciós tápközeg (W14mf és P4mf) összehasonlítása során 10 közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) F₁ keresztezési kombinációt ('Hyland/Békés', 'Brillant/Bani',

'Tacitus/5003', 'Komárom/Bani', 'Midas/Békés', 'Midas/Csillag', 'Midas/Göncöl', 'Pegassos/Csillag', 'Xiao Yan/Bani' és 'Capo/Körös') használtunk donor genotípusként.

- Tönkölybúza *in vitro* androgenezis (AC és IMC) indukciós kísérletek során a donor genotípusokat szintén üvegházi körülmények között neveltük fel. Négy tönkölybúza fajtát ('GK Fehér', 'Mv Martongold', 'Franckenkorn' és 'Oberkulmer Rotkorn') használtunk. A négy genotípus teljes diallél populációját vizsgáltuk *in vitro* AC-ben. Továbbá tíz nemesítési célú tönkölybúza F₁ keresztezési kombinációt teszteltünk *in vitro* AC-i kísérleteink során ('RCAT056296'/'GK Fehér'/'Franckenkorn', 'RCAT058694'/'GK Fehér', 'Aus'/'RCAT058694', 'Aus'/'Lajta', 'Aus'/'GK Fehér', 'Aus'/'RCAT056296', 'Aus'/'Martongold', 'Aus'/'Bartucz', 'Aus'/'Oberkulmer Rotkorn', 'RCAT060960'/'GK Fehér'/'Franckenkorn'). Az F₁ keresztezési kombinációk szülői között elismert fajták ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Lajta', 'Martongold', 'Oberkulmer Rotkorn'), előrehaladott nemesített törzsek ('Aus', 'Bartucz') és a hazai nemzeti génbankból (Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Tápiószele) származó genotípusok ('RCAT056296', 'RCAT058694', 'RCAT060960') szerepeltek.

2.1.2. Donor növények felnevelése tenyészertői körülmények között

A donor genotípusokat októberben vetettük el tenyészertőnkben (Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged), felnevelésükre a hazánkban hagyományos kalászos termesztéstechnológiát alkalmaztuk. Ősszel NPK alaptrágyázást (nitrogén : foszfor : kálium - 1 : 1 : 1; 12 g/m²), majd április hónap közepén további tápanyag utánpótlást (18 g/m² ammónium-nitrát) végeztünk. A donor növényeket preventíven kétszer vegyszeresen (Talstar és Bulldock) védtük. A gyomokat vetés előtt mechanikai kezeléssel gyérítettük, vegetációs időben vegyszeres (Pointer star) és manuális gyomirtást alkalmaztunk.

Alkalmazott genotípusok:

- Kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC módszerünket több nyugat-európai nemesítési program bevonásával teszteltük (93 F₁ keresztezési kombináció) két egymást követő évben (2010 és 2011). 2010-ben az F₁ keresztezési kombinációkat (harminckettő) a Saaten- Union Biotec GmbH – SU BIO (öt kombináció), a Strube Research GmbH & Co. KG – STR (húsz kombináció), a Saaten-Union Recherche SAS – SUR (négy kombináció) és a W. von Borris-Eckendorf GmbH & Co. KG – BE (három kombináció) biztosította a kísérletekhez. 2011-ben hatvanegy F₁ keresztezési kombináció válaszadó képességét vizsgáltuk a Deutsche Saatveredelung AG – DSV (tizennyolc kombináció), Saaten-Union Recherche SAS – SUR (huszonegy kombináció), Strube Research GmbH & Co. KG – STR (tizenöt kombináció) és a W. von Borris-Eckendorf GmbH & Co. KG – BE (hét kombináció) nemesítési programok bevonásával. Kontrollként a nemzetközileg ismert jó válaszadó képességű 'Svilena' és a gyenge válaszadó képességű 'Berengar' genotípusokat használtuk.
- Két őszi alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípust ('G7026' és 'G7176') alkalmaztunk *in vitro* androgenezis indukciós kísérleteink fejlesztése során. A tesztelt genotípusok saját génbankunkból származtak (Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged).

2.2. Donor alapanyagok begyűjtése és előkezelése

A donor alapanyagok hajtásainak begyűjtését a mikrosporák ideális fejlettségi állapotában végeztük el. *In vitro* AC kísérleteink során a begyűjtött alapanyag korai és középső egysejtmagvas vakuólumos állapotú mikrosporákat tartalmazott, míg IMC esetében a hajtások kalászaiban a mikrosporák kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas vakuólumos állapotúak voltak. A mikrosporák fejlettségi állapotát Olympus CK-2 invert mikroszkóppal (Olympus, Southend-on-Sea, Anglia) ellenőriztük.

A begyűjtött donor hajtásokat 200 ml csapvizet tartalmazó Erlenmeyer lombikba helyeztük, és áttetsző PVC fóliával takartuk le a magas páratartalom megőrzése érdekében, majd hideg előkezelést alkalmaztunk (2-4°C, 10-14 nap). A szálkás genotípusoknál a szálkákat ollóval eltávolítottuk. A négy tönkölybúza genotípus ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Lajta', 'Martongold', 'Oberkulmer Rotkorn') esetében a 12 napos hideg előkezelés hatását *in vitro* AC-ben teszteltük.

Az ideális mikrspórákat tartalmazó előkezelt kalászokat fertőtlenítettük 20 percig rázóasztalon (300 ml 2% -os nátrium hipoklorit oldatban és 2 csepp Tween 80). A donor kalászokat lamináris boksza alatt steril desztillált vízzel (Millipore Elix 5) háromszor öblítettük.

2.2.1. Különböző előkezelések hatásának vizsgálata alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok *in vitro* androgenezisének (AC) indukciója során

Öt különböző előkezelést alkalmaztunk, hogy összehasonlítsuk hatásukat alakor genotípusok *in vitro* AC-ben. Az első előkezelés esetében éheztetést alkalmaztunk (Cistué és mtsai. 2003), a begyűjtött sterilizált kalászaiból portokokat (100 portok/Petri csésze) izoláltunk előkezelő közeget (0.7 M mannit + 40mM CaCl₂×2H₂O + 0,8% alacsony olvadáspontú agaróz) tartalmazó 60 mm-es átmérőjű üveg Petri csészébe (100 portok/Petri csésze), és 4 napig 24 °C-on sötét termosztátban tartottuk. A kettes előkezelés során a steril kalászokat 2 csepp csapvizet tartalmazó üveg Petri csészébe helyeztük, és 4 °C-on 5 napig sötétben tároltuk. A következő 3 kezelés esetében (hármás, négyes és ötös előkezelés), a donor hajtásokat a fenti protokoll szerint 2-4 °C-on hideg előkezeltük. Hármás előkezelés során a donor hajtásokat 9 napig 4 °C-on hideg előkezeltük, majd a hajtások steril kalászait további 4 napig hideg (4 °C) előkezeltük. A négyes előkezelés esetében a donor hajtások csak 14 napos hideg előkezelést kaptak, míg az ötös előkezelés során a négyes előkezelés lépését *in vitro* AC-ben alkalmazott 3 napos hősokk (32 °C) kezeléssel egészítettük ki.

2.2.2. Portokok előkezelése tönkölybúza IMC-hez

Tönkölybúza *in vitro* IMC kísérleteink során a donor hajtások kéthetes hideg előkezelését (2.2. pont szerint) követően éheztetést alkalmaztunk. A steril kalászokból portokokat (100 portok/Petri csésze) izoláltunk 60 mm-es műanyag Petri csészékbe (Sarstedt Ltd., Newton, MA, USA), melyek 54,66 g/l (0,3 M) mannit oldatot tartalmaztak 200 mg/l cefotaxime antibiotikum kiegészítéssel. A tenyészeteket 32°C-on 3 napig inkubáltuk sötét termosztátban.

2.3. Portokok izolálása és *in vitro* AC indítása

Közönséges búza és tönkölybúza donor genotípusok portokjait *in vitro* körülmények között izoláltuk 90 mm átmérőjű üveg Petri csészékbe (200 portok/Petri csésze), melyek 12-15 ml indukciós tápközeget tartalmaztak. Indukciós tápközegként a W14mf tápközeget alkalmaztuk kísérleteink során. A tönkölybúza F₁ kombinációk (diállél kísérlet és 10 F₁ kombináció) esetében 300 portok/Petri csésze denzitással dolgoztunk. Tíz közönséges búza F₁ keresztezési kombinációval a W14mf (Ouyang és mtsai. 1989, Lantos és mtsai. 2013) és P4mf (Ouyang és mtsai 1973, Pauk és mtsai. 2003) indukciós tápközegek hatását vizsgáltuk. Az *in vitro* AC-eket 3 napig 32°C-on, majd 28°C-on tenyésztettük sötét termosztátban 8-10 hétig, amíg ELS-ek fejlődését figyeltük meg a tenyészetekben.

Alakor (*Triticum monococcum* L.) *in vitro* AC kísérleteinkben 5 ml W14mf tápoldatot tartalmazó 60 mm átmérőjű üveg Petri csészékbe izoláltuk a portokokat (100 portok/Petri csésze). A kísérlet során a fent említett különböző előkezeléseket követően a tenyészeteket 8 hétig 28°C-on sötét termosztátban tartottuk.

2.4. Tönkölybúza mikrospórák izolálása és tenyésztése

Tönkölybúza *in vitro* IMC kísérleteinket négy tönkölybúza genotípussal ('GK Fehér', 'Mv Martongold', 'Franckenkorn' és 'Oberkulmer Rotkorn') végeztük el. A mikrospórákat az előkezelt portokokból grádiens centrifugálással izoláltuk (Pauk és mtsai. 2000).

Az izolált mikrospórákat 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészékben tenyésztettük (Sarstedt, Budapest, Magyarország), amely 1,5 ml tenyésztő tápoldatot tartalmazott. A W14mi tenyésztő tápoldat, a W14 alaptápoldat (Ouyang és mtsai. 1989) fejlesztett változata, melyet hormon kiegészítéssel (W14mi) és hormonmentes (W14mi-0) változatban alkalmaztunk (Lantos és mtsai. 2018). A tenyésztő tápoldatokat sterilen szűrtük. Az IMC denzitását $3-3,5 \times 10^4$ mikrospóra/ml sűrűsége állítottuk be Bürker kamra és Olympus CK-2 invert mikroszkóp alkalmazásával. A tenyészetekhez 200 mg/l cefotaxime antibiotikumot adtunk.

Az ováriumos dajkatenyésztés hatását vizsgáltuk tönkölybúza genotípusok *in vitro* IMC-ben. A 'GK Fehér' fajta kalászait 2 nappal virágzás előtt begyűjtöttük. Steril kalászból tíz-tíz ováriumot helyeztünk minden frissen izolált IMC-be. A tenyészeteket 8 hétig 28°C-on sötét termosztátban tartottuk. A mikrospórák osztódását, soksejtes struktúrák és ELS-k fejlődését mikroszkóp segítségével nyomon követtük (Olympus CK-2 invert mikroszkóp).

2.5. Növényregenerálás *in vitro* AC-ben és IMC-ben fejlődött ELS-ekből

Az *in vitro* androgenezis indukcióját követően a negyedik héttől kezdve a tenyészetekben (AC és IMC) fejlődött ELS-k szabad szemmel is megfigyelhetővé váltak. Az 1-2 mm méretű ELS-eket hetente egyszer az *in vitro* AC-kből és IMC-kből áthelyeztük 90 mm átmérőjű műanyag Petri csészékbe (Sarstedt, Newton, MA, USA), melyek 190-2Cu regeneráló táptalajt tartalmaztak (Pauk és mtsai. 2003). Megközelítőleg 30-50 ELS-t helyeztünk egy regeneráló táptalajra, ahol zöld és albinó növénykéket regeneráltunk a struktúrákból két-három héten belül. Az albinó növénykéket megszámláltuk és eldobtuk, míg a 20-30 mm hosszú levelekkel rendelkező zöld növénykéket gyökeresítő táptalajra helyeztük át.

A zöld növénykéek *in vitro* gyökeresítése 190-2Cu táptalajon történt közönséges búza és alakor genotípusok esetében, míg tönkölybúza genotípusoknál a 190-3Cu regeneráló táptalajt alkalmaztuk (Lantos és mtsai. 2018). A regenerált zöld növénykéket egyedenként elkülönítve üvegsövegekben gyökeresítettük. Három hét után a jól fejlett zöld növénykéket kiválogattuk üvegházi kiültetéshez.

2.6. *In vitro* regenerált zöld növénykéek üvegházi akklimatizációja és felnevelése

A jól fejlett gyökérrel és hajtással rendelkező zöld növénykéket 66 férőhelyes növénynevelő tálcába ültettük ki, mely tőzeg és homok 1 : 1 arányú keverékét tartalmazta. Kiültetés után a növénykéket csapvízzel beöntöttük, és letakartuk áttetsző PVC fóliával a magas páratartalom megtartása érdekében. Az akklimatizációs periódus végén (3-5 nap) a takarást eltávolítottuk.

Az akklimatizált növénykéek évszaktól, kísérlettől függően szántóföldi (ősszel) vagy üvegházi (év egyéb szakában) körülmények között kerültek felnevelésre. A 93 nyugat-európai F₁ keresztezési kombinációból származó növénykéek felnevelése a partner intézeteknél történt.

Közönséges búza keresztezési (10 F₁ keresztezési kombináció) programból származó DH₀ növénykéket, a négy tönkölybúza fajta és diallél keresztezéséből származó DH₀ növénykéket, valamint az alakor DH₀ növénykét üvegházi körülmények között neveltük fel a fent említett (2.1.1. szerint) növénynevelési körülmények között. A fertilis növényekről (spontán diploid) a szemtermést betakarítottuk, a spontán kromoszóma duplikáció százalékos értékét a szemtermés alapján állapítottuk meg.

2.7. Akklimatizált növénykéek felnevelése tenyészkeri körülmények között

A tíz tönkölybúza F₁ keresztezési kombinációból származó DH₀ növénykéket tenyészkeri körülmények között neveltük fel (Szeged, Kecskéstelep). Az üvegházban akklimatizált növénykéket október hónap végén palántáztuk ki DH tenyészkerünkbe, egy alkalommal kelesztő öntözést biztosítottunk a gyökeresedés megindulásának elősegítése érdekében. A növénykéek felnevelése során a fent említett (2.1.1 szerint) tenyészkeri növénynevelési körülményeket alkalmaztuk. A spontán diploid növényekről a szemtermést betakarítottuk, a spontán kromoszóma duplikáció százalékos értékét a szemtermés alapján állapítottuk meg a szántóföldi körülményekhez alkalmazkodott növények számához viszonyítva.

2.8. Tönkölybúza DH törzsek tenyészkeri vizsgálata

Előkísérletünkben a 'Tonkoly.pop1' előrehaladott nemesített törzs (advanced line) *in vitro* AC-ből DH törzseket állítottunk elő. A DH₁ generációt követően, 7 DH törzset választottunk ki fenotípusos adataik alapján, melyeket tönkölybúza tenyészkerben hasonlítottunk össze 40 m²-es parcellákon az eredeti kontroll törzssel ('Tonkoly.pop1') két egymást követő évben (2017/2018 és 2018/2019). A kiválasztott DH törzseket és a kontrollt agronómiai bélyegek és termés tulajdonságok alapján értékeltük [kalászolási idő, növénymagasság, termés, hántolási kihozatal (%), kiörlés (%), fehérje (%), nedves siker, szemkeménység, szemek szélessége, szemek hosszúsága, ezerszemtömeg - (TKW)].

A szemkeménység, szemszélesség és TKW paraméterek mérését a PERTEN SKCS 3100 (Pertin Instruments, Stockholm, Svédország) eszköz segítségével végeztük el a nemzetközileg jóváhagyott módszerek szerint (AACC International, 2010). A szemek hosszúságának méréséhez körzőt használtunk. A fehérje és nedves sikértartalom méréséhez NIR készüléket alkalmaztunk (Mininfra SmarT, Infracont, Pomáz, Magyarország). A minták hántolását tönkölybúza hántológéppel végeztük el (Kapacitív Kkt., Budapest, Magyarország), és meghatároztuk a hántolási kihozatalt. A hántolt szemeket 14%-os nedvességtartalomra kondicionáltuk egy éjszakán át, majd Brabender Quadromat Senior malommal (Brabender GmbH & Co., Duisburg, Németország) megőröltük (250 µm szűrő), és a kiörlési százalékot kiszámoltuk.

2.9. Áramlási citometriás vizsgálatok

Az alakor kontroll növények és *in vitro* AC-ből regenerált zöld növényke ploidia fokát áramlási citometriával határoztuk meg CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter International S.A., Nyon, Svájc) készülék segítségével.

Fiatall levélmintákat (100 mg/növény) gyűjtöttünk az üvegházban nevelt növényekről. A mintákat 1 ml Galbraith puffert tartalmazó Eppendorf csőben 2 acél golyóval homogenizáltuk 20 Hz-en egy percig TissueLyser II (Qiagen GmbH., Hilden, Németország) készülék segítségével (Galbraith és mtsai. 1983). A szuszpenziót 20 µm-es szűrőn átszűrtük, és a szűrlethez 10 µl RNáz oldatot (1 mg/ml) adtunk 60 percig, hogy az RNS tartalmat eltávolítsuk. A mintákban lévő DNS tartalmat 40 µl PI oldattal (1 mg/ml) 30 percig festettük szobahőmérsékleten. A levélminták ploidia fokát az áramlási citometriás vizsgálat után a relatív DNS tartalom alapján állapítottuk meg a hisztogramok leolvasásával.

2.10. Statisztikai elemzések

Kísérleteink során minden kezelést legalább három ismétlésben végeztünk el. *In vitro* androgenézis indukciós kísérletek során adatokat gyűjtöttünk a tenyészetekben fejlődött ELS-k számáról, regenerált növénykéek, zöld és albínó növénykéek mennyiségéről. A spontán kromoszóma duplikáció mértékének meghatározásakor a szemtermést hozó növények (fertilis és részlegesen fertilis) és az akklimatizált növények hányadosát szoroztuk százzal.

Kéttényezős varianciaanalízissel elemeztük a genotípus, tápoldat, genotípus×tápoldat kölcsönhatást az *in vitro* AC tulajdonságai tekintetében. A zöld növénykéek regenerálásának százalékát (zöld növénykéek száma / 100ELS * 100) ismétlések nélküli kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk.

A genotípus, évjárat hatását és kölcsönhatásukat kéttényezős varianciaanalízissel elemeztük két nemzetközi kontroll genotípus AC-ében. A 93 nemesítési kombináció esetében az *in vitro* zöld növénykéek számát feljegyeztük, és leíró statisztikával jellemeztük.

A négy tönkölybúza genotípussal ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Mc Martongold', 'Oberkulmer Rotkorn') végzett *in vitro* AC-i és IMC-i kísérletek adatait kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük ki.

Tönkölybúza diallél populáció *in vitro* AC-ben mért adatait felhasználva meghatároztuk az általános kombinálódó képességet (GCA) és a speciális kombinálódó képességet (SCA), valamint tisztáztuk a reciprok hatást és a sejtmagi kromoszómák által meghatározott genetikai hatást. A statisztikai elemzések során Griffing módszerét alkalmaztuk (Griffing és mtsai. 1956). A tíz F₁ keresztezési kombináció esetében az *in vitro* AC adatainak kiértékelését egytényezős varianciaanalízissel végeztük el. A tönkölybúza DH törzsek két éves tenyészkerti kísérletének adatait ismétlések nélküli kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk.

A genotípus, előkezelés és genotípus×előkezelés kölcsönhatását kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk akkor genotípusok AC-ében a mért tulajdonságok alapján.

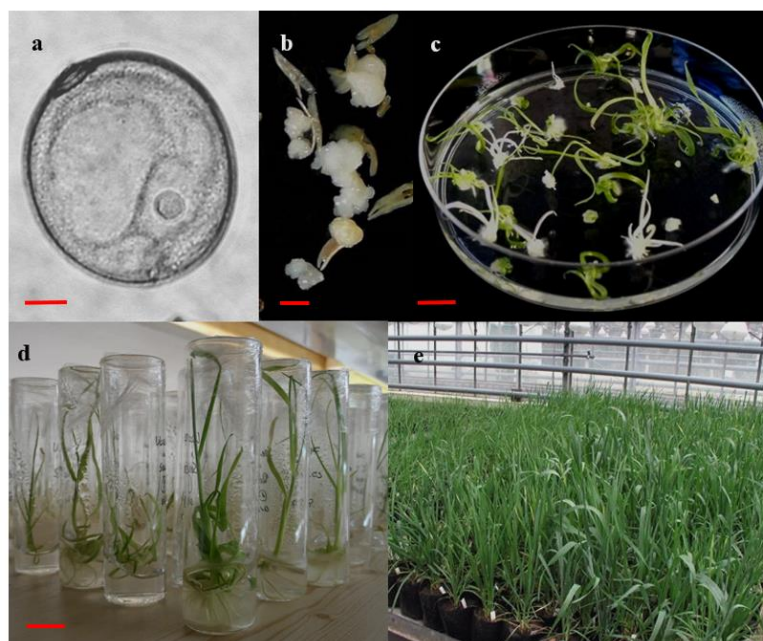
A statisztikai elemzések során a Microsoft Excel 2002, 2013 statisztikai szoftvereket (Microsoft Ltd., Redmond, WA, USA) és az SPSS statisztikai programot (SPSS Hungary, Budapest, Magyarország) használtuk.

3. Eredmények és megvitatásuk

A hatékony DH növényelőállítási módszerek kulcsszerepet tölthetnek be az új fajták és hibridek nemesítésében, valamint a haploid technológiákat gyakorta felhasználják különböző alkalmazott kutatási programokban. Habár az *in vitro* AC módszere közel 50 éve kutatott terület kenyérbúzában, mégis néhány korlátozó tényezőt (genotípus függőség, albinizmus, alacsony hatékonysága az androgenezis indukciónak és növényregenerációnak) úgy említene, mint ami a módszer széleskörű alkalmazhatóságát mérsékli (Li és mtsai. 2013, Wessels és Botes 2014, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, Orłowska és mtsai. 2020). Az eddig elért kutatási és nemesítés eredmények (több mint 250 DH kenyérbúza fajta) arra sarkallják a sejt- és szövettenyésztéssel foglalkozó szakembereket, hogy folytassák az *in vitro* androgenezis módszereinek fejlesztését a nemesítés és alkalmazott kutatás igényeit szem előtt tartva.

3.1. Genotípus, táptalaj és genotípus×táptalaj kölcsönhatás vizsgálata közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) keresztezési kombinációkkal *in vitro* AC-ben

Kísérletünkben 10 őszi búza F₁ keresztezési kombináció válaszó képességét teszteltük *in vitro* AC-ben. Korábbi publikációkkal egyetértésben (Tuvešson és mtsai. 2000, Kondic-Spika és mtsai. 2011), a genotípus szignifikánsan befolyásolta ($p \leq 0,001$) a vizsgált tulajdonságokat (ELS-k, zöld növénykéek, albínó növénykéek és kiültetett növénykéek száma). A genotípus függőség azonban mérsékelt volt a tekintetben, hogy minden F₁ kombináció esetében sikeres volt az androgenezis indukciója, ELS-k fejlődését figyeeltük meg a tenyészetekben, melyekből zöld és albínó növénykéket regeneráltunk (1. ábra). Továbbá fertilis spontán DH növényeket azonosítottunk a regenerált növények között minden F₁ keresztezési kombináció esetében.



1. **ábra.** Kenyérbúza *in vitro* AC főbb lépései: (a) egysejtmagvas mikrospóra a donor hajtások begyűjtése idején (piros vonal = 10 μ m); (b) mikrospóra eredetű ELS-k öthetes *in vitro* AC-ben (piros vonal = 1 mm). (c) Az ELS-kből regenerált zöld- és albínó növénykéek (piros vonal = 10 mm). (d) Jól fejlett zöld növénykéek gyökeresítése üveg fiolákban (piros vonal = 10 mm). (e) A jól gyökeresedett zöld növénykéek akklimatizációja üvegházi körülmények között. [Lantos és Pauk (2016) nyomán.]

A P4mf (Ouyang és mtsai. 1973, Pauk és mtsai. 2003) és W14mf (Ouyang és mtsai. 1989, Lantos és mtsai. 2013) indukciós tápközegeket hasonlítottuk össze, amelyek gyakran alkalmazott tápközegek kenyérbúza *in vitro* AC során. Mindkét indukciós tápközeg alkalmas volt az androgenezis indukciójára és zöld növénykéek előállítására. Korábbi publikációkkal egyetértésben, az indukciós tápközeg összetétele szignifikánsan befolyásolta az *in vitro* AC hatékonyságát (Broughton 2008, Redha és Suleman 2011, Rubtsova és mtsai. 2013, Zur és mtsai. 2015). A két tápközeggel végzett összehasonlító kísérlet statisztikai elemzése bizonyította, hogy a tápközeg szignifikánsan ($p \leq 0,001$) befolyásolta az ELS-k és albínó növénykéek számát, amíg ez a hatás nem volt kimutatható a zöld növénykéek és a kiültetett növénykéek száma tekintetében.

A spontán kromoszóma duplikáció mértéke átlagosan 40% alatti több publikált adat alapján (Barnabás 2003, Weyen 2009). Kísérletünkben a spontán kromoszóma duplikáció 17,65 és 60% között változott genotípustól függően, a 10 F₁ kerezsteszési kombináció átlagában 32,72% volt. A DH növények aránya kutatói, nemesítői igény szerint kolchicin kezeléssel tovább növelhető a regeneránsok között. Az *in vitro* androgenezis indukciójának kezdetén alkalmazott kolchicin tovább emelheti a DH növényelőállítás hatékonyságát, azonban ez az eljárás is genotípus függőséget mutatott (Soriano és mtsai. 2007). Másik lehetőség, hogy az *in vitro* AC eredetű haploid növénykéeket kezeljük kolchicinnel, és így kettőzzük meg a növénykéek kromoszóma készletét. A növényregenerálást követően, az akklimatizált növénykéek száma jól tervezhető, szükség szerint a növénykéek ploidia fokának meghatározása után a haploidok kolchicin kezelésével a DH növények száma tovább növelhető a kívánt kombinációkból.

A kísérleti adatok statisztikai elemzése alapján mindkét tápközeg alkalmas volt DH növények előállítására. A W14mf tápközeg alkalmazása esetén az ELS-k és albínó növénykéek száma alacsonyabb volt, amely megfigyelés arra utal, hogy az indukciós tápközeg tovább fejleszthető az első sejtosztódások és ELS-k számának fokozásával. A P4mf tápközegben

fejlődött ELS-kből regenerált zöld és albínó növénykék aránya kedvezőtlenebb volt, nagyobb mennyiségben figyeltük meg albínó növénykék regenerálását.

Jelenleg a W14mf indukciós tápközeget alkalmazzuk *in vitro* AC eredetű növénykék, fertilis DH törzsek előállítására kenyérbúza nemesítési programok vagy kutatási programok (térképezési populációk) esetében. A zöld növénykék regenerálásának százalékos értéke magasabb volt a W14mf tenyészetben fejlődött ELS-kből (16,9%), mint a P4mf tenyészetben fejlődött ELS-k esetében (9,6%). Így, a W14mf indukciós tápközeg alkalmazásával idő, munkaerő és vegyszer takarítható meg a DH növények előállítása során.

3.2. Az évjárat hatás és széleskörű nyugat-európai genetikai háttér vizsgálata közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC-ben és a módszer nemesítési célú felhasználása

A búza *in vitro* AC módszerének hatékonyságát két egymást követő évben két nemzetközi kontroll genotípussal ('Svilena' és 'Berengar') teszteltük. A módszer növénynemesítés célú gyakorlati alkalmazhatóságát bizonyítottuk 93 nyugat-európai F₁ keresztezési kombinációval, melyek különböző őszi típusú közönséges búza nemesítési programokból származtak.

A kétéves kísérleti adatok statisztikai elemzése alapján kijelenthető volt, hogy az ELS-k, a regenerált növénykék és zöld növénykék száma főként a genotípus által volt meghatározott. Eredményeink azt jelzik, hogy az *in vitro* AC nemesítési célú alkalmazásakor a kombinációk szülői partnereinek a válaszadó képessége hatással van az előállított DH törzsek mennyiségére (Holme és mtsai. 1999, Tuveesson és mtsai. 2000, Kondic-Spika és mtsai. 2011). Az F₁ kombinációk esetében a genetikai háttér szintén befolyásolta az *in vitro* AC hatékonyságát. Jelentős különbségeket találtunk a genotípusok között minden nemesítési program esetében. Néhány korábbi publikációval szemben (Holme és mtsai. 1999, Tuveesson és mtsai. 2000, Broughton 2008), nem találtunk olyan kombinációt, mely esetében teljesen lehetetlen lett volna az *in vitro* androgenezis indukciója, tökéletesen nem válaszadó úgynevezett „unresponsive” genotípust nem azonosítottunk. ELS-k fejlődését és zöld növénykék regenerációját minden keresztezési kombináció esetében megfigyeltük. A kísérletünkben szereplő 93 nemesítési kombináció 5 különböző nemesítési programhoz tartozott. Az előállított zöld növénykék mennyisége alapján a módszer hatékony eljárásnak bizonyult a különböző eredetű és célú nemesítési programok számára egyaránt. Így, a nemesítési programok eredete nem befolyásolta a módszer hatékonyságát szemben Holme és mtsai. (1999) állításával, akik szerint a Kelet-Európai nemesítési programok esetében a módszer hatékonysága magasabb, összehasonlítva a nyugat-európai nemesítési programokkal. Habár a 93 kombináció között jelentős különbséget figyeltünk meg a regenerált zöld növénykék számában, minden kombinációból állítottunk elő zöld növénykét, és így jelentős több ezres nagyságrendű zöld növénykét regeneráltunk mindkét évben a nemesítési programok számára.

A 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ben a regenerált albínó növénykék mennyisége alacsony volt mindkét évben. A kenyérbúza genotípusokkal végzett kísérleteket figyelembe véve, a 'Svilena' genotípus esetében volt a legmagasabb az ELS-kből regenerált zöld növénykék mennyisége, közel 90% mindkét évben. A két kontroll genotípus kísérleti adatai alapján az albínó növénykék számát szignifikánsan befolyásolta a genotípus, az évjárat és a genotípus×évjárat kölcsönhatás, tehát a genotípus mellett a környezeti hatások is.

Az évjárat nem befolyásolta az ELS-k és a zöld növénykék számát a kétéves kísérlet sorozatban, így a módszer ismételt módon évről évre megbízhatóan alkalmazható eljárásnak bizonyult a nemesítés és alkalmazott kutatás számára.

A nemesítési kombinációk esetében az albínó növénykék száma mérsékelt volt, az évről évre változó kombinációk miatt itt mélyebb statisztikai összehasonlítást nem végeztünk. Az albinizmus nem hátráltatta a több ezer zöld növényke előállítását évente. A zöld növénykék regenerálásának átlaga 5,3 zöld növényke/100 portok volt, mely adatok előrelépést jelentettek

a korábban publikált eredményekhez képest: 0,4 zöld növényke/100 portok (Holme és mtsai. 1999) vagy 2,1 zöld növényke/kalász (Tuvešson és mtsai. 2000).

Más kutatók az *in vitro* AC hatékonyságát úgy emelték meg, hogy tervezett módon válaszadó képes genotípusokat vontak be a nemesítési programba (Tuvešson és mtsai. 2000). Azonban ez a stratégia munkaigényes, hiszen a DH növényelőállítás előtt feltételezi a szülői kombinációk válaszadó képességének ismeretét, tesztelését. Jelen kísérleteinkben a szülői partnerek válaszadó képességére vonatkozó előzetes információk nem voltak szükségesek, a módszer így is hatékony eljárásnak bizonyult a nemesítési programok és célok számára.

Nagy mennyiségű búza haploid növénykét lehet előállítani távoli fajkeresztezéssel (a búza kukorica pollennel történő megtermékenyítése során) nemesítési és kutatási programok számára (Tuvešson és mtsai. 2007). Azonban ezt a módszert kevésbé hatékonyan tartjuk, mint az *in vitro* AC-t. A két faj párhuzamos felnevelése miatt költségesebb, több a kézi munkaigény (kasztrálás, porzás, embrióizolálás), és elengedhetetlen a kolchicin kezelés, hiszen ezen módszernél nincs spontán kromoszóma duplikáció.

AC kísérleteink hatékonyságát több tényező befolyásolta, melyek közül a legfontosabbak a donor növények felnevelése, a donor hajtások begyűjtése és előkezelése, indukció, növényregeneráció és a pontosan időzített és kivitelezett munkafolyamatok voltak. Jelenleg két tényező maradt, amely behatárolja a DH növényelőállítás mértékét: a kézi munkaerő és a genotípus függőség.

A nemesítési programok összetettségétől függően keresztezésenként akár több száz DH törzsre is szükség lehet a kívánt szülői tulajdonság kombinációjának eléréséhez. Ezzel a tényezővel kalkulálni kell a DH növényelőállítás tervezésekor. Infrastruktúra fejlesztéssel a kézi munkaerő igény mérsékelhető, de egyelőre nem iktatható ki teljesen az *in vitro* sejt- és szövettenyésztési technikák esetében. Mindezek alapján a genotípus függőség mérséklése továbbra is fontos kutatási terület maradt a búza DH növényelőállítás tekintetében, hogy a módszer a nemesítési igényeket mind széleskörűbben ki tudja szolgálni. Mindezeket összevetve az *in vitro* AC módszere egy hatékonyan alkalmazható eljárás közönséges búza nemesítési és kutatási programokban.

3.3. Androgenezis alkalmazása a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési programjában

Az *in vitro* AC alapuló DH növényelőállítási rendszerünk alkalmazásával évente több tucat kombinációból néhány ezer DH törzset állítottunk elő kenyérbúza nemesítési programunk számára. A kombinációk kijelölése és a hasadó nemzedék (F₁-F₅) kiválasztása nemesítési döntéstől függ. A korábbi és későbbi nemzedékek mellett egyformán szólnak érvek és ellenérvek. A korai generációból (F₁-F₂) indított DH törzsek gyors felszaporítása és szigorú szelekciója a nemesítés folyamatát felgyorsítja, a szelekciót könnyebbé teszi (Pauk 2005). Későbbi generáció (F₃-F₅) esetében nagyobb arányban találunk potenciális fajtajelölteket az előállított törzsek között (Pauk 2005).

Pedigree nemesítési rendszerünk és az *in vitro* AC kombinálásával a Basilica és Izidor fajták kombinációjából előállított DH törzsek közül szelektáltuk ki azt a DH törzset, mely 'GK Déva' néven állami elismerést kapott, és 2020-ban növény-fajtaoltalomban részesült. További ígéretes őszi búza DH törzsek szerepelnek teljesítmény kísérleteinkben és a NÉBIH kísérleteiben fajtajelöltjeink között.

3.4. Az *in vitro* androgenezis indukciója tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) AC-ben és IMC-ben

Kísérleteinkben az *in vitro* androgenezis hatékonyságát hasonlítottuk össze négy köztermesztésben lévő tönkölybúza genotípussal *in vitro* AC-ben és IMC-ben. A szakirodalmi

adatok alapján rendkívül kevés információ állt rendelkezésre tönkölybúza *in vitro* AC-vel kapcsolatban, míg *in vitro* IMC-ről korábbi publikált eredményeket nem találtunk.

A hideg előkezelés nem volt feltétlenül szükséges az androgenezis indukciójához tönkölybúza *in vitro* AC-ben, azonban a stressz előkezelés szignifikánsan megemelte a módszer hatékonyságát. A négy fajtával elvégzett kísérlet adatai alapján a genotípus szignifikánsan befolyásolta az *in vitro* androgenezis (ELS-k, regenerált, zöld és albínó növénykéek száma) hatékonyságát. A zöld növény regenerálás átlaga 41,45 zöld növényke/100 portok volt, ez az érték 20,93 és 83,07 zöld növényke/100 portok között változott genotípustól függően. A négy fajta adatai alapján, az *in vitro* AC módszere egy ígéretes DH növényelőállítási módszernek bizonyult a tönkölybúza nemesítés és alkalmazott kutatási programok számára.

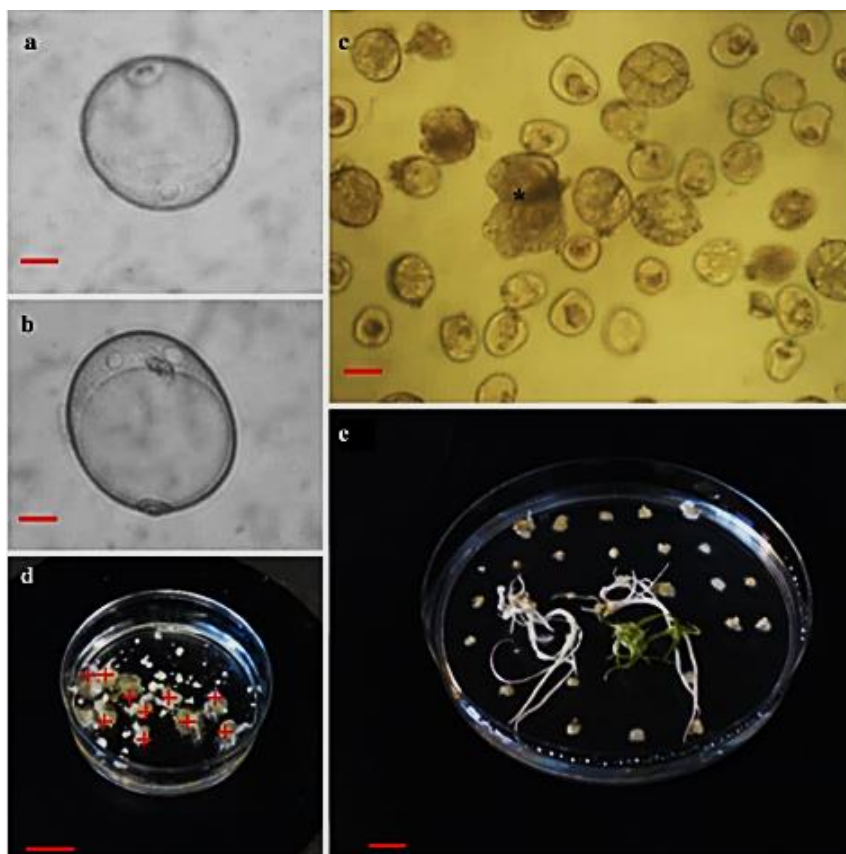
Több releváns publikáció az egyszikűek androgenezis indukciója során az albinizmust a módszer szűk keresztmetszeteként említi (Canonge és mtsai. 2021, Tang és mtsai. 2023). A vizsgált négy fajta *in vitro* AC során az albínók aránya a regenerált növénykéek között mérsékelt volt (átlagosan 3,48 albínó/100 portok), genotípustól függően 0,93 és 7,47 albínó/100 portok között változott. Tönkölybúza *in vitro* AC-ben a négy tesztelt fajta adatai alapján az albinizmus nem bizonyult hátráltató tényezőnek a zöld növénykéek előállítása szempontjából.

A spontán kromoszóma duplikáció aránya kulcsfontosságú a DH növények előállítása során. A fertilis növények százalékos aránya 24,27% volt átlagosan a négy fajta esetében, ami genotípustól függően 11,8 és 44,44% között változott. Ezen adatok közel azonosak a kenyérbúza esetében megfigyelt spontán kromoszóma duplikáció adataival (Barnabás 2003, Weyen 2009), így a módszer a nemesítés számára jelentős mennyiségű DH törzs előállításra nyújt lehetőséget.

Az *in vitro* androgenezis indukcióját elsőként írtuk le tönkölybúza IMC-ben (2. ábra). Az ováriumos dajkatenyésztés módszere közönséges búza IMC-ben egy jól ismert módszertani lépés (Mejza és mtsai. 1993), ami segíti az osztódó többsejtes struktúrákból a mikrospóra eredetű ELS-k fejlődését. Kísérleteink során az ováriumos dajkatenyésztés kulcsszerepet játszott az ELS-k fejlődése során tönkölybúza IMC-ben, ováriumok nélkül ELS-k fejlődését nem figyeltük meg IMC-ben hasonlóan a kenyérbúzában leírt eredményekhez (Mejza és mtsai. 1993).

Az indukció során alkalmazott exogén hormonok szignifikánsan befolyásolják az *in vitro* androgenezis hatékonyságát gazdasági növényeinkben. A hormonmentes tápközeg tritikále IMC-ben hatékony indukciós tápközegnek bizonyult (Pauk és mtsai. 2000), míg exogén hormonok alkalmazása elterjedt a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) genotípusok IMC-e során (Shariatpanahi és mtsai. 2006a, Echávarri és Cistué 2016). Az exogén hormonok (0,5 mg/l 2,4-D és 0,5 mg/l kinetin) jelenléte nem volt szükséges az androgenezis indukciójához a négy vizsgált tönköly fajta IMC-ben, de jelenlétük emelte az ELS-k, zöld és albínó növénykéek számát. Tönkölybúza IMC-ben jelentős mennyiségű ELS fejlődött, azonban a módszer széleskörű gyakorlati alkalmazásának fő korlátozó tényezője az ELS-kből regenerált nagy mennyiségű albínó növényke. Néhány zöld növénykét a 'Franckenkorn' (kettő) és 'GK Fehér' (egy) fajták IMC-ből sikerült regenerálni. Az IMC módszere még jelentős fejlesztéseket igényel a gyakorlati felhasználásig.

Több tényező is ismert (a donor növények felnevelése, genotípus, mikrospórák fejlettsége, stressz előkezelés, indukciós és növényregeneráló tápközeg összetétele), ami jelentősen befolyásolhatja az albínó növénykéek gyakoriságát a regenerált növénykéek között. Az *in vitro* AC és IMC módszerét összehasonlítva a mikrospórák fejlettségi állapota, az előkezelés és az indukciós tápközeg is szerepet játszhatott abban, hogy nagy mértékű különbség volt a két módszer hatékonysága között.



2. **ábra.** Tönkölybúza *in vitro* IMC: (a) kései egysejtmagvas mikrspóra (piros vonal = 10 μ m); (b) korai két sejtmagvas mikrspóra (piros vonal = 10 μ m). (c) Multicelluláris struktúra (*) és osztódó mikrspórák 10 napos *in vitro* IMC-ben (piros vonal = 50 μ m). (d) ELS-k fejlődtek tönkölybúza mikrspórák ováriumos (+) dajkatenyészetben (piros vonal = 10 mm). (e) Zöld és albínó növénykéek regenerálása (piros vonal = 10 mm) IMC eredetű ELS-kből.

3.5. *In vitro* AC felhasználása tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) nemesítési programokban

Az androgenézis kutatás kora szakaszában az *in vitro* AC módszere még nem volt hatékony eljárás tönkölybúzában a gyakorlati célú növény-nemesítés szempontjából. Azonban az utóbbi években, néhány tönkölybúza genotípus alkalmazásával hatékony módszereket publikáltak (Lantos és mtsai. 2018, Castillo és mtsai. 2019).

Az *in vitro* AC módszere hatékonyan működött a négy tesztelt tönkölybúza fajában ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Mv. Martongold' és 'Oberkulmer Rotkorn') a fenti kísérletek alapján. A négy fajta keresztezésével egy teljes diallél populációt készítettünk, mellyel teszteltük *in vitro* AC módszerünk hatékonyságát. Továbbá, 10 F₁ genotípust vontunk be kutatási és nemesítési célú kísérleteinkbe. Minden genotípus esetében sikeres volt az *in vitro* androgenézis indukciója. Bár a genotípus szignifikánsan befolyásolta a módszer hatékonyságát, az indukált ELS-k mennyiségét, a regenerált zöld és albínó növények számát, mégis minden kombinációból állítottunk elő genetikailag tiszta törzseket nemesítési programunk számára.

A genotípus szignifikánsan befolyásolja a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC hatékonyságát (Holme és mtsai. 1999, Tuvešson és mtsai. 2000), és tönkölybúzában is igazolt az *in vitro* AC genotípus függősége (Lantos és mtsai. 2018, Castillo és mtsai. 2019). A sejtmagi gének hatását és a reciprok hatást egyaránt megfigyelték kenyérbúza AC során (Yildirim és mtsai. 2008), azonban a GCA hatása sokkal meghatározóbb volt, mint az SCA hatása (Yildirim

és mtsai. 2008). Meghatározó publikációk szerint az *in vitro* AC válaszadó képességét főleg additív genetikai hatások határozzák meg kenyérbúzában (Lazar és mtsai. 1984, Yildirim és mtsai. 2008).

A teljes diallél populáció esetében nagy mennyiségű *in vitro* zöld növénykét állítottunk elő, míg a regenerált albínó növények száma mérsékelt volt. A legmagasabb zöld növényregenerációs hatékonyságot a 'Franckenkorn' genotípussal (65,00 *in vitro* zöld növényke/100 portok) értük el a szülői genotípusok közül előző eredményeinkhez hasonlóan (Lantos és mtsai. 2018), míg a 'Franckenkorn/Martongold' kombináció *in vitro* AC-ben fejlődött struktúrákból átlagosan 85,00 zöld növénykét regeneráltunk 100 portokonként. A statisztikai elemzések alapján, a genotípusos variancia döntő része a GCA hatásoknak köszönhető, következtetésképpen az additív genetikai hatások elsődlegesen járultak hozzá a megfigyelt adatokhoz. Hasonló eredményeket írtak le korábban kenyérbúza *in vitro* AC-ben (Lazar és mtsai. 1984, Yildirim és mtsai. 2008). Ezen megfigyelések alátámasztják az *in vitro* AC gyakorlati alkalmazását a tönkölybúza nemesítési és alkalmazott kutatási programokban.

Tíz nemesítési célból létrehozott F₁ keresztezési kombinációt teszteltünk *in vitro* AC-ben, melyekből különböző mennyiségű zöld növénykét regeneráltunk genotípustól függően. A kiültetett 1535 AC eredetű növény között 436 spontán diploid, fertilis egyedet azonosítottunk betakarítás után. A spontán kromoszóma duplikáció aránya 28,4% volt, mely 9,76%-54,24% között változott genotípusonként. Előző kísérletünkben ez az érték 24,27% volt, 11,8%-44,44% genotípustól függően (Lantos és mtsai. 2018). A genotípus spontán kromoszóma duplikációt befolyásoló hatását (15-80%) spanyol és közép-európai tönkölybúza genotípusokon is leírták (Castillo és mtsai. 2019). Az *in vitro* AC módszere hatékony eljárásnak bizonyult a nemesítési célú tönkölybúza keresztezési kombinációk esetében is.

A 'Tonkoly.pop1' előrehaladott nemesített törzs (kontroll) és hét AC eredetű testvér DH törzsét hasonlítottuk össze 2 éves tenyészkeri kísérletben. A tönkölybúza DH törzsek egyöntetűek, homogének voltak, kiegyenlített képet mutattak. A DH törzsek a 11 mért paraméter (kalászolási idő, növénymagasság, termés, szemkeménység, szem szélesség és hosszúság, TKW, hántolási kitermelés, kiörlés, fehérjetartalom, nedves siker) tekintetében versenyképesnek bizonyultak a kontrollhoz képest. A két év adatai alapján, a DH törzsek több tulajdonsága tekintetében a genotípus szignifikánsan befolyásolta a mért paramétereket. A genetikailag független DH törzsek közül több elkülönült a kontrollként használt törzstől. Így ezen megfigyelések szerint az *in vitro* AC módszere további szelekciós lehetőséget nyújthat a nemesítők számára.

3.6. *In vitro* androgenézis indukciója alakor (*Triticum monococcum* L.) fajban

Az utóbbi évtizedben több kutatócsoport foglalkozott az *in vitro* szövettenyésztés szempontjából rekalitráns fajként ismert alakor (*Triticum monococcum* L.) szomatikus szövettenyésztési rendszerének fejlesztésével (Miroshnichenko és mtsai. 2017, Orgec és mtsai. 2021). A publikált hatékony szövettenyésztési eljárások új lehetőségeket nyitottak meg az alakor növénybiotechnológiai kutatások területén, úgy mint az alakor faj genetikai transzformációja (Miroshnichenko és mtsai. 2018), a transzgén hatásának vizsgálata diploid *Triticum* fajban. Az *in vitro* androgenézis indukciója azonban kihívás maradt.

A stressz előkezelés kulcsszerepet játszik az *in vitro* androgenézis indukciója során. *Triticum* fajokban több különböző stressz előkezelést teszteltek a kutatók a DH növényelőállítás hatékonyságának fokozása érdekében, beleértve hideg, hősokk, ozmotikus stressz, kolchicin, 2-HNA, DMSO stb. kezeléseket (Shariatpanahi és mtsai. 2006b, Echávarri és Cistué 2016). A donor alapanyagok hideg előkezelése, a hősokk és az éheztetés a leggyakrabban és leghatékonyabban alkalmazott eljárások közé tartoznak közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC területén. Az alakor (*Triticum monococcum* L.) ugyanazon nemzetség tagja, így ezen előkezelések hatását teszteltük alakor *in vitro* AC-ben. A stresszek megfelelő kombinálása

és optimális alkalmazása elengedhetetlen az androgenezis hatékonyságának finomhangolásához. A túlzott mértékű stressz csökkentheti a növényregeneráció hatékonyságát, emelheti az albinók arányát a regenerált növények között (Niazian és Shariatpanahi 2020). Vizsgálataink során a különböző stressz előkezelések hatására szignifikánsan eltérő mennyiségű ELS fejlődött a tenyészetekben, és a regenerált növények mennyiségét is befolyásolta az előkezelés.

Több publikáció is beszámolt arról, hogy az éheztetés önállóan vagy más stresszekkel kombinálva sikeresen alkalmazható stressz előkezelés közönséges búza *in vitro* androgenezisének indukciójában (Soriano és mtsai. 2007, Echávarri és Cistué 2016). Kísérleteink során a két alakor genotípus *in vitro* AC-ben az izolált portokok négy napos éheztetését követően nem tudtuk ELS-k fejlődését megfigyelni a tenyészetekben.

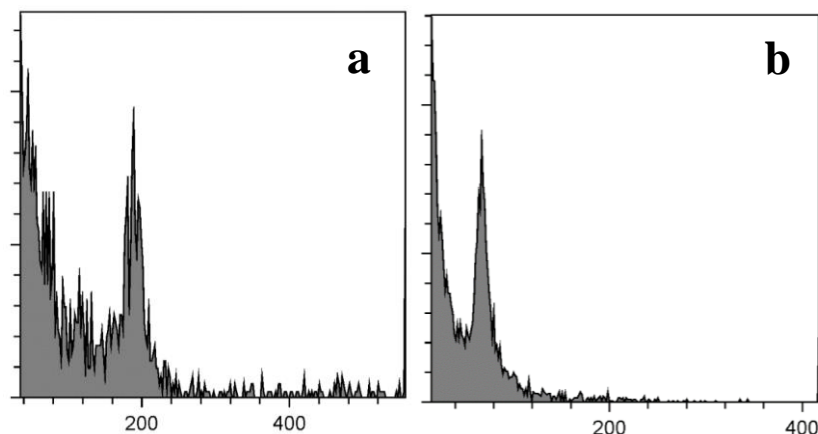
A donor hajtások hideg előkezelése (2-5°C, 10 nap - 4 hét) az egyik leggyakrabban alkalmazott stressz előkezelés gabonafélék mikrospóráinak átprogramozása (androgenezis indukció) során. Kísérleteinkben a legmagasabb ELS számot a donor alapanyagok kéthetes hideg előkezelését követően tudtuk elérni mindkét genotípus esetében.

A hősokk (3 nap, 32 °C) kezelés szintén gyakorta alkalmazott stressz faktor (Pauk és mtsai. 2003, Shariatpanahi és mtsai. 2006b, Lantos és mtsai. 2013), amely fokozza az *in vitro* androgenezisen alapuló módszerek hatékonyságát. Azonban, az alakor genotípusok *in vitro* AC-nek kezdetén a hideg előkezelést követően alkalmazott 3 napos 32 °C-os hősokk nem emelte az *in vitro* AC-ben fejlődött mikroszpóra eredetű ELS-k mennyiségét.

A *Triticum* fajok androgenezis indukciójának genotípus függősége jól ismert a szakirodalomból (Lazar és mtsai. 1984, Tuvesson és mtsai. 2000, Lantos és mtsai. 2018). Alakor *in vitro* AC kísérletekhez két, saját génbankunkból származó genotípust ('G7026' és 'G7176') választottunk ki, hogy teszteljük az előkezelések hatékonyságát, megvizsgáljuk a genotípus hatását és a genotípus×előkezelés kölcsönhatást. A genotípus szignifikánsan befolyásolta az ELS-k és albinó növények számát, és a genotípus×előkezelés kölcsönhatása az albinó növények számában mutatott statisztikailag bizonyítható eltérést. A zöld növények regenerálásának hatékonysága túl alacsony volt ahhoz, hogy statisztikailag megalapozott kijelentéseket tehesünk.

A mikroszpóra eredetű ELS-kből történő növényregeneráció kritikus lépés a DH növényelőállítási módszerek alkalmazása során, amely a korábban említett tényezők által befolyásolt paraméter. A gabonafélék hatékony DH növényelőállításával kapcsolatban gyakorta emlegetik a genotípusfüggőséget, az albinizmust és az alacsony zöld növényregenerációs hatékonyságot szűk keresztmetszetként (Li és mtsai. 2013, Wessels és Botes 2014, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, Orłowska és mtsai. 2020). A növényregenerálás (zöld és albinó) hatékonysága alacsony volt alakor genotípusok *in vitro* AC-ben, néhány albinó és egy zöld növénykét regeneráltunk a mikroszpóra eredetű ELS-kből. Elsőként írtuk le az *in vitro* AC-ből származó zöld növényke regenerálását, azonban jelentős fejlesztések szükségesek még a zöld növény regenerálás hatékonyságának fokozása érdekében.

A DH növények előállítása során, az áramlási citometria az egyik legmegbízhatóbb és leggyakrabban alkalmazott eljárás a regenerált zöld növények ploidia fokának meghatározására. Néhány optimalizálási lépést követően (minták előkészítése, mérési paraméterek), alakor (*Triticum monococcum* L.) növények ploidia fokát megbízhatóan meg tudtuk állapítani. Az áramlási citometriás mérések alapján az alakor *in vitro* AC-ből regenerált zöld növényke haploid volt, ami bizonyította a regenerált növényke mikroszpóra eredetét (3. ábra). Az üvegházba kiültetett és akklimatizált zöld növényke szárbaszökkenés után steril kalászokat hozott.



3. ábra. Alakor (*Triticum monococcum* L.) levélminták ploidia fok vizsgálata áramlási citometriával: a hisztogram mutatja a levélminták relatív DNS tartalmát a (a) kontroll alakor növény és (b) az *in vitro* AC eredetű ELS-ből regenerált zöld növényke esetében.

Az *in vitro* szövettenyésztés genetikai meghatározottsága jól ismert a szomatikus szövettenyésztés és androgenezis kutatás eredményeiből. Több kromoszómát és QTL-t leírtak már kenyérbúzában, melyek befolyásolják az ELS-k mennyiségét, a regenerált zöld és albinó növénykéek számát *in vitro* AC-ben. Vizsgálataik alapján az 1B, 1D, 2A, 2D, 4A, 4B, 5A, 5B és 7A kromoszómák befolyásolják a tenyészetekben fejlődött ELS-k számát, amíg a 2D, 3A, 3B, 3D, 4D, 5B kromoszómák a növényregenerációért felelősek (Zhang és Li 1984, Szakács és mtsai. 1988, Agache és mtsai. 1989, Henry és mtsai. 1994). Az 5A, 5B kromoszómákon az ELS-k mennyiségét befolyásoló QTL-eket azonosították, míg az 1B, 2A, 2B, 5B, 7B kromoszómákon lévő QTL-k a növényregenerálás hatékonyságát befolyásolták (Torp és mtsai. 2001, Nielsen és mtsai. 2015). Lazaridou és mtsai. (2016) bizonyították, hogy a D genom hiányában *in vitro* AC-ben lecsökken az ELS-k száma és a zöld növényregeneráció hatékonysága. Jelenleg, a publikált adatok alapján az *in vitro* AC módszere kevésbé hatékony a tetraploid (AABB) durum búzában (*Triticum durum* L.) mint a hexaploid (AABBDD) kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.). Az említett publikált adatok teoretikus magyarázatot adhatnak az *in vitro* androgenezis alacsony hatékonyságára a diploid (AA) alakor (*Triticum monococcum* L.) fajban.

Az elmúlt években az *in vitro* szomatikus szövettenyésztés korlátját metodikai fejlesztésekkel sikerült áttörni *Triticum monococcum* L. fajban, és egy hatékony szövettenyésztési eljárás alapjait letenni, mely genetikai transzformációra is alkalmassá tette a szövettenyésztési rendszert (Miroshnichenko és mtsai. 2017, 2018). Azonban további fejlesztések szükségesek még, hogy az *in vitro* androgenezis módszere is egy hatékony eszközzé válhasson az alakor fajban (*Triticum monococcum* L.).

4. Új tudományos eredmények

1. Széleskörű hazai és nyugat-európai őszi típusú közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) genetikai háttér felhasználásával igazoltuk, hogy az *in vitro* portoktenyésztés módszere hatékonyan alkalmazható a nemesítésben. Minden tesztelt genotípusból regeneráltunk *in vitro* zöld növénykéket.
2. Az évjárat nem befolyásolta a zöld növénykéek regenerálásának hatékonyságát közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* portoktenyésztésben. Az eredmények alapján a kidolgozott módszer évről évre ismételtető módon, megbízhatóan alkalmazható nemesítési és egyéb alkalmazott kutatási programokban.

3. Az *in vitro* portoktenyésztés módszerét sikeresen alkalmaztuk közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési programban. A módszer felhasználásával előállított DH növények közül több szelektált törzs állami bejelentésre került, és az egyik DH törzs 'GK Déva' néven állami elismerést kapott, és növényfajta-oltalomban részesült.
4. Elsőként írtuk le az *in vitro* izolált mikospóra tenyésztés módszerét tönkölybúzában. Az ováriumos dajkatenyésztés kulcsszerepét igazoltuk a mikospóra eredetű ELS-k fejlődése során. Az exogén hormonok emelték az izolált mikospóra tenyésztés módszerének hatékonyságát, genotípus függőséget figyeltünk meg tönkölybúza izolált mikospóra tenyésztésben.
5. Hatékony *in vitro* portoktenyésztési eljárást írtunk le tönkölybúzában, mellyel a nemesítési és az alkalmazott kutatási programok számára nagy mennyiségű DH törzset állítottunk elő. A hideg stressz előkezelés emelte az ELS-k, regenerált zöld növényekék számát tönkölybúza genotípusok *in vitro* portoktenyésztésében.
6. Teljes diállél populáció felhasználásával vizsgáltuk a genotípus szerepét tönkölybúza *in vitro* portoktenyésztésben. A diállél analízis eredményei alapján a GCA hatása sokkal meghatározóbb *in vitro* portoktenyésztésben, mint az SCA hatása, a válaszadó képesség főként additív genetikai tulajdonságok által volt meghatározott.
7. Elsőként írtuk le az *in vitro* androgenézis indukcióját, zöld és albinó növényekék regenerációját alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok portoktenyésztésében. Kéthetes hideg előkezelés bizonyult a leghatékonyabb stressz előkezelésnek, és a genotípus szignifikáns hatását mutattuk ki alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok *in vitro* portoktenyésztése során.

5. Felhasznált irodalom

- AACC International Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 55-31. Single-Kernel Characterization System for Wheat Kernel Texture AACCI: St. Paul, MN.
- Agache S., Bechelier B., De Buyser J., Henry Y. and Snape J. (1989) Genetic analyses of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theor Appl Genet* 77: 7-11.
- Barnabás B. (2003) Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). in: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejko I (eds), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, 65-70. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Bilichak A., Sastry-Dent L., Sriram S., Simpson M., Samuel P., Webb S., Jiang F. and Eudes F. (2020) Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnol J* 18: 1307-1316.
- Broughton S., Castello M., Liu L., Killen J., Hepworth A. and O'Learly R. (2020) The effect of Caffeine and Triflurain on chromosome doubling in wheat anther culture. *Plants* 9: 105.
- Broughton S. (2008) Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 95, 185-195.
- Canonge J., Roby C., Hamon C., Potin P., Pfannschmidt T. and Philipot M. (2021) Occurrence of albinism during wheat androgenesis is correlated with repression of the key genes required for proper chloroplast biogenesis. *Planta* 254: 123.
- Castillo A. M., Allue S., Costar A., Alvaro F. and Valles M. P. (2019) Doubled Haploid Production from Spanish and Central European Spelt by Anther Culture. *J. Agr. Sci. Tech. Iran* 21: 1313-1324.

- Chauhan H. and Khurana P. (2011) Use of haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics. *Plant Biotechnol J* 9: 408-417.
- Cistué L., Valles M., Echávarri B., Sanz J. and Castillo A. (2003) Barley anther culture. In: Doubled haploid production in crop plants). in: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejko I (eds), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, 29-34. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Devaux P. and Cistue L. (2016) Wheat doubled haploids: production to sequencing. What makes them so appealing? In: Bonjean AP, Angus WJ, van Ginkel M (eds) The world wheat book. A History of Wheat Breeding. Lavoisier Tec & Doc Publishers, Paris, pp 885-938.
- Echávarri B. and Cistué L. (2016) Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium. *Plant Cell Tiss Org* 125: 11-22.
- Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P. and Firoozabady E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Griffing J. B. (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 463-493.
- Henry Y., Vain P. and De Buyser J (1994) Genetic analyses of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica* 79: 45-48.
- Holme I. B., Olesen A., Hansen N. J. P. and Andersen S. B. (1999) Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breed* 118: 111-117.
- Kondic-Spika A., Vukosavljev M., Kobiljski B. and Hristov N. (2011) Relationship among androgenetic components in wheat and their responses to the environment. *J. Biol. Res. (Thessalon)* 16: 217-223.
- Lantos C., Weyen J., Orsini J. M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihály R., Broughton S. and Pauk J. (2013) Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs. *Plant Breed* 132:149-154. doi:10.1111/pbr.12032
- Lantos C., Bóna L., Nagy É., Békés F. and Pauk J. (2018) Induction of *in vitro* androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. *Plant Cell Tiss Org* 133: 385-393.
- Lazar M. D., Baenziger P. S., Schaeffer G. W. (1984) Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theor Appl Genet* 68: 131-134.
- Lazaridou T., Pankou C., Xynias I. and Roupakias D. (2016) Effect of D genome on wheat anther culture response after cold and mannitol pretreatment. *Acta Biol Cracov Bot* 58: 95-102.
- Li H., Singh R. P., Braun H. J., Pfeiffer W. H. and Wang J. (2013) Doubled haploids versus conventional breeding in CIMMYT wheat breeding programs. *Crop Sci* 53: 74-83.
- Mejza S. J., Morgant V., DiBona D. E. and Wong J. R. (1993) Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep* 12: 149-153.
- Miroshnichenko D., Ashin D., Pushin A. and Dolgov S. (2018) Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* spp. *monococcum*), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnol* 18: 68.
- Miroshnichenko D., Chaban I., Chernobrovkina M. and Dolgov S. (2017) Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* spp. *monococcum*), a recalcitrant diploid wheat species. *PLoS One* 12: e0173533.

- Niazian M. and Shariatpanahi M. E. (2020) *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica* 216: 69.
- Nielsen N. H., Andersen S. U., Stougaard J., Jensen A., Backes G. and Jahoor A. (2015) Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores. *Plant Breed* 134: 255-263.
- Orgec M., Verma S. K., Sahin G., Zencirci N. and Gurel E. (2021) *In vitro* culture protocol of ancient einkorn (*Triticum monococcum* spp. *monococum*) wheat via indirect shoot regeneration. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 57: 143-151.
- Orlowska R., Pachota K.A., Machczynska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J. and Bednarek PT (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electron J Biotechnol* 43: 8-15.
- Ouyang J. W., Jia S. E., Zhang C., Chen X. and Fen G. (1989) A new synthetic medium (W14) for wheat anther culture. Annual Report, 91-92. Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing.
- Ouyang J. W., Hu H., Chuang C. C. and Tseng C. C. (1973) Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sinica* 16: 79-95.
- Pauk J., Mihály R. and Puolimatka M. (2003) Protocol of wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture, in: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 59-64.
- Pauk J., Poulimatka M., Lökös Tóth K. and Monostori T. (2000) *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tiss Org* 61: 221-229.
- Pauk J. (2005) *Androgenesis és genetikai transzformáció különböző gabonafajokban*. D.Sc dissertation, 1-138. HAS, Budapest, Hungary.
- Redha A. and Suleman P. (2011) Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105: 345-353.
- Ren J., Wu P., Trampe B., Tian X., Lübberstedt T. and Chen S. (2017) Novel technologies in doubled haploid line development. *Plant Biotechnol J* 15: 1361-1370.
- Rubtsova M., Gnad H., Melzer M., Weyen J. and Gils M. (2013) The auxins centrophenoxine and 2,4-D differ in their effects on non-directly induced chromosome doubling in anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Biotechnol Rep* 7: 247-255.
- Shariatpanahi M. E., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E. and Touraev A. (2006a) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep* 25: 1294-1299.
- Shariatpanahi M. E., Bal U., Heberle-Bors E., Touraev A. (2006b) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. 127 (4): 519-534.
- Song J., Carver B. F., Powers C., Yan L., Klapste J., El-Kassaby Y. A. and Chen C. (2017) Practical application of genomic selection in a doubled-haploid winter wheat breeding program. *Mol Breed* 37: 117.
- Soriano M., Cistué L., Valles M. P. and Castillo A. M. (2007) Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss Org* 91:225-234.
- Szakács É., Kovács G., Pauk J. and Barnabás B (1988) Substitution analyses of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 7: 127-129.
- Tang H. L., Wang K., Zhang S. X., Han Z. Y., Chang Y. A., Qiu Y. L., Yu M., Du L. P. and Ye X. G. (2023) A fast technique for visual screening of wheat haploids generated from TaMTL-edited mutants carrying anthocyanin markers. *Plant Commun* 4: 100569.

- Thomas W. T. B., Forster B. P. and Gertsson B. (2003) Doubled haploids in breeding, In: M. Maluszynski M, K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko (eds), Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual, 337-350. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Torp A. M., Hansen A. L. and Andersen S. B. (2001) Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica* 119: 377-387.
- Turesson S., Ljungberg A., Johansson N., Karlsson K. E., Suijs L. W. and Posset J. P. (2000) Large-scale production of wheat and triticale double haploid through the use of a single-anther culture method. *Plant Breed* 119: 455-459.
- Turesson S. D., Larsson C. T. and Ordon F. (2021) Use of Molecular Markers for Doubled Haploid Technology: From Academia to Plant Breeding Companies. In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2288. Humana, New York, NY. pp. 49-72.
- Turesson S., Dayteg C., Hagberg P., Manninen O., Tanhuanpää P., Tenhola-Roinen T., Kiviharju E., Weyen J., Förster J., Schondelmaier J., Lafferty J., Marn M. and Fleck A. (2007): Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programs. *Euphytica* 158: 305-312.
- Weigt D., Kiel A., Nawracala J., Pluta M. and Lacka A. (2016) Solid-stemmed spring wheat cultivars give better androgenic response than hollow-stemmed cultivars in anther culture. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 52: 619-625.
- Wessels E. and Botes W. C. (2014) Accelerating resistance breeding in wheat by integrating marker-assisted selection and doubled haploid technology. *South Afr J Plant Soil* 31: 35-43.
- Weyen J. (2009) Barley and wheat doubled haploids in breeding., in Advances in Haploid Production in Higher Plants, Touraev A., Forster B.P. and Mohan Jain S., Eds., Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V., 179-187.
- Weyen J. (2021) Application of Doubled Haploids in Plant Breeding and Applied Research. In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2288. Humana, New York, NY. pp.23-39.
- Yildirim M., Bahar B., Genc I., Hatipoglu R. and Altintas S. (2008) Reciprocal effects in anther cultures of wheat hybrids. *Biol Plantarum* 52: 779-782.
- Zhang Y. L. and Li D. S. (1984) Anther culture of monosomics in *Triticum aestivum*. *Hereditas* (Beijing) 6: 7-10.
- Zhao L., Liu L., Wang J., Guo H., Gu J., Zhao S., Li J. and Xie Y. (2015) Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using of gamma-ray irradiation and anther culture. *J Sci Food Agric* 95: 120-125.
- Zhao P., Wang K., Zhang W., Liu H. Y., Du L. P., Hu H. R. and Ye X. G. (2017) Comprehensive analyses of differently expressed genes and proteins in albino and green plantlets from a wheat anther culture. *Biol Plant* 61: 255-265.
- Zur I., Dubas E., Krzewska M. and Janowiak F. (2015) Current insight into hormonal regulation of microspore embryogenesis. *Front Plant Sci* 6: 424.

6. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk listája:

- Lantos C, Weyen J, Orsini JM, Gnad H, Schlieter B, Lein V, Kontowski S, Jacobi A, Mihály R, Broughton S and Pauk J (2013) Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs. *Plant Breed* 132(2): 149-154. IF=1,338

- Lantos C and Pauk J (2016): Anther Culture as an Effective Tool in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding. Russian J Genet 52(8): 794-801. IF= 0,55
- Lantos C, Jenes B, Bóna L, Cserhádi M and Pauk J (2016) High Frequency of Doubled Haploid Plant Production in Spelt Wheat. Acta Biol Cracov Ser Bot 58(2): 107-112. IF= 0,491
- Lantos C, Pauk, J (2020) Factors influencing the efficiency of wheat anther culture. Acta Biol Cracov Ser Bot 62: 7-15 IF=0.938
- Lantos C, Bóna L, Nagy É, Békés F, Pauk J (2018) Induction of *in vitro* androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. Plant Cell Tiss Org Cult 133(3): 385-393. IF= 2,200
- Lantos C, Purgel S, Ács K, Langó B, Bóna L, Boda K, Békés F, Pauk J (2019) Utilization of in Vitro Anther Culture in Spelt Wheat Breeding. Plants 8, 436. IF= 2,762
- Lantos C, Pauk J (2021) *In vitro* anther culture for doubled haploid plant production in spelt wheat. in: Doubled Haploid Technology, 257-266.
- Lantos C, Lehoczki-Krsjak S, Pauk J (2022) Induction of *in vitro* androgenesis in anther culture of recalcitrant einkorn (*Triticum monococcum* L.). Plant Cell Tiss Org Cult 150(2): 417-426. IF=3,0
- Pauk J, Cseuz L, Lantos C, Papp M, Beke B, Óvári J, Pugris T (2020) GK Déva búza, növényi fajtaoltalom. Szabadalmi lajstrom szám: 000306.

7. Az értekezés témájához kapcsolódó referált folyóiratokban megjelent publikációk (*levezető szerzőség):

- Kruppa J, Kanbar OZ, Tóth-Lencsés AK, Kiss E, Bóna L, Lantos C*, Pauk J (2023) Induction of triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) *in vitro* androgenesis in anther cultures of F₁ hybrid combinations and varieties and homogeneity testing of offspring. Life 13(10): 1970 IF₂₀₂₂=3,2
- Lantos C*, Jancsó M, Székely Á, Szalóki T, Venkatanagappa S, Pauk J (2023) Development of *in vitro* anther culture for doubled haploid plant production in indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Plants 12: 1774 IF₂₀₂₂=4,5
- Lantos C*, Jancsó M, Székely Á, Nagy É, Szalóki T, Pauk J (2022) Improvement of anther culture to integrate doubled haploid technology in temperate rice breeding. Plants 11: 3446 IF=4,5
- Chege P, Kiss E, Lantos C, Palágyi A, Pauk J (2021) Doubled Haploid Production using an Improved Anther Culture Protocol for Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Moench]. Phytom J Exp Bot 90: 475-487 IF=1,407
- Chege CP, Lantos C, Pauk J (2020): Retrospect on *in vitro* androgenesis of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Plant Breed 139: 1043-1051. IF=1,832
- Kanbar OZ, Lantos C, Kiss E, Pauk J (2020) Androgenic responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) combinations in *in vitro* anther culture. Genetika-Belgrade 52: 337-350 IF=0,761
- Kanbar OZ, Lantos C, Chege P, Kiss E, Pauk J (2020) Generation of Doubled Haploid Lines from Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding Material via *in Vitro* Anther Culture. Czech J Genet Plant Breed 56: 150-158 IF=0,865
- Lantos C, Bóna L, Boda K, Pauk J (2014) Comparative analysis of *in vitro* anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. Euphytica 197: 27-37. IF= 1,385
- Lantos C, Gémes Juhász A, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Pauk J (2012): Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Biotech Rep 6: 123-132 DOI: 10.1007/s11816-011-0205-0. IF= 1,051
- Pauk J, Lantos C, Somogyi G, Vági P, Ábrahám Táborosi Z, Gémes Juhász A, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Tímár Z (2010) Tradition, Quality and biotechnology in

- Hungarian spice pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding. *Acta Agron Hung* 58: 259-266
- Gémesné Juhász A, Lantos C, Vági P, Kristóf Z, Pauk J (2009) *In vitro* anther and isolated microspore culture as tools in sweet and spice pepper breeding. *Acta Hort* 829: 61-64
- Lantos C, Gémes Juhász A, Somogyi Gy, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J (2009): Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult* 97(3): 285-293. IF= 1,271
- Jancsó M, Lantos C, Simonné Kiss I and Pauk J (2009) Az *in vitro* androgenézis hatékonyságának növelése rizs (*Oryza sativa* L.) DH-vonalak előállítására. *Agrár és Vidékfejlesztési szemle* 4: 115-121
- Lantos C, Gémesné Juhász A, Somogyi G, Mihály R, Somogyi N, Pauk J (2008) *In vitro* androgenézis indukciója fűszerpaprika (*Capsicum annuum* L.) mikrospóra tenyészetben. *Agrár és vidékfejlesztési szemle* 2: 169-174.
- Lantos C, Páricsi S, Zofajova A, Weyen J, Pauk J (2006) Isolated microspore culture of wheat with Hungarian cultivars. *Acta Biol Szeged* 50 (1-2): 31-35
- Lantos C, Jancsó M, Pauk J (2005) Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiol Plant* 27: 523-531 IF= 0,379
- Lantos C, Pauk J (2003) Búza (*Triticum aestivum* L.) haploid növények előállítása mikrospóra-tenyészetből. *Növénytermelés*. 52(3-4): 269-279 IF= 0,206
- Monostori T, Lantos C, Mihály R, Pauk J (2003) Induction of embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. *Cereal Research Communications* 31: 297-300 IF= 0,228

8. További referált folyóiratokban megjelent publikációk listája (*levelező szerzőség):

- Ács K, Varga M, Szekeres A, Salgo A, Lantos C, Békés F, Pauk J, Mesterházy Á (2023) Alteration of Carbohydrate Metabolism in Fusarium infected wheat kernels treated with fungicides and its relation to baking technological parameters and deoxynivalenol contamination. *Agriculture* 13: 868 IF₂₀₂₂=3,6
- Székely Á, Szalóki T, Jancsó M, Pauk J, Lantos C* (2023) Temporal changes of leaf spectral properties and rapid chlorophyll-A fluorescence under natural cold stress in rice seedlings. *Plants* 12: 2415 IF₂₀₂₂=4,5
- Székely Á, Szalóki T, Lantos C, Pauk J, Jancsó M (2023) Data of germination ability of tetraploid rice lines under multiple stress factors. *Data in Brief* 48: 109235. IF₂₀₂₂=1,2
- Nagy É, Szabó-Hevér Á, Lehoczki-Krsjak S, Lantos C, Kiss E, Pauk J (2022) Detection of drought tolerance related QTL in the Plainsman V/Capelle Desprez doubled haploid wheat population. *Cer Res Commun* 50: 689-698 IF=1,6
- Székely Á, Szalóki T, Ibadzade M, Pauk J, Lantos C, Jancsó M (2021) Germination Dynamics of European Rice varieties under salinity stress. *Pak J Agric Sci* 58: 1-5 IF=0,856
- Székely Á, Szalóki T, Pauk J, Lantos C, Ibadzade M, Jancsó M (2022) Salinity tolerance characteristics of marginally located rice varieties in the northernmost rice-growing area in Europe. *Agronomy* 12 (3): 652. IF=3,7
- Székely Á, Szalóki T, Lantos C, Ibadzade M, Pauk J, Venkatanagappa S, Jancsó M (2022) Data of selected set of rice accessions at the germination stage under cold stress. *Data in Brief* 41: 107929. IF=1,2
- Békés F, Ács P, Suter D, Ács K, Lantos C, Cseuz L, Pauk J (2021) Milyen okok állnak a gabonákkal szembeni érzékenység hátterében? II. A gabona-feldolgozás hatásai az egészségre káros komponensekre. *Növénytermelés* 70: 87-107

- Békés F, Ács P, Suter D, Ács K, Lantos C, Cseuz L, Pauk J (2021) Milyen okok állnak a gabonákkal szembeni érzékenység háttérében? I. A nemesítés hatása a búza emberi egészségre káros komponenseire. *Növénytermelés* 70: 57-86.
- Chege P, Palágyi A, Lantos C, Kiss E, Pauk J (2020) Improved culture media for embryogenic callus generation in Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Phyton I J Exp Bot* 89: 111-119 IF=1,039
- Kanbar OZ, Chege P, Lantos C, Kiss E, Pauk J (2020): Characterization of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germplasm for Drought Tolerance. *Plant Genet Resour-C* 18: 369-381 IF=1,080
- Penksza K, Csík A, Filp AF, Saláta D, Pápay G, Kovács L, Varga K, Pauk J, Lantos C, Lisztes-Szabó Z (2020): Possibilities of Speciation in the Central Sandy Steppe Area of the Carpathian Basin through the example of *Festuca*. *Forests* 11: 1325. IF=2,633
- Chege P, Palágyi A, Lantos C, Kiss E, Pauk J (2019): Improved culture media for Embryogenic Callus Generation in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Phyton - I J Exp Bot* 89: 111-119 IF= 0,329
- Nagy É, Lantos C, Pauk J (2017): Selection of drought tolerant and sensitive genotype from wheat DH population. *Acta Physiol Plant* 39(12): 261 IF= 1,438
- Nagy É, Lehoczki-Krsjak S, Lantos C, Pauk J (2018): Phenotyping for testing drought tolerance on wheat varieties of different origins. *S Afr J Bot* 116: 216-221 IF= 1,504
- Békés F, Acs K, Gell Gy, Lantos C, Kovacs AM, Birinyi Z, Pauk J (2017): Towards Breeding less allergenic spelt-wheat with low FODMAP content – a review. *Acta Aliment* 46 (2): 246-258 IF= 0,383
- Szabó-Hevér Á, Lehoczki-Krsjak S, Varga M, Purnhauser L, Pauk J, Lantos C, Mesterházy Á (2014) Differential influence of QTL linked to Fusarium head blight, Fusarium-damaged kernel, deoxynivalenol contents and associated morphological traits in a Frontana-derived wheat population. *Euphytica* 200: 9-26. IF= 1,385
- Fehér-Juhász E, Majer P, Sass L, Lantos C, Csiszár J, Turóczy Z, Mihály R, Mai A, Horváth GV, Vass I, Dudits D, Pauk J (2014): Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. *Acta Physiol Plant* 36: 663-673 IF= 1,584
- Szabó-Hevér Á, Lehoczki-Krsjak S, Tóth B, Pauk J, Lantos C, Purnhauser L, Mesterházy Á (2011): *Fusarium* rezisztencia molekuláris vizsgálata Frontana térképező populációkban. *Agrár és Vidékfejlesztési szemle* 6 (2): 174-185
- Cseuz L, Pauk J, Lantos C and Kovacs I (2009): Wheat breeding for drought tolerance. (Efforts and results). *Cereal Res Commun Suppl.* 37: 245-248.

Kumulatív impakt faktor: 60,891

Idézetek száma: MTMT: 670
 Google Scholar: 844
 Scopus: 379
 Web of Science: 345 (2024. 03. 28.)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom egykori egyetemi tanáromnak, Prof. Dr. Heszky László akadémikus úrnak és munkatársainak, a MATE Molekuláris Genetika és Nemesítés csoport dolgozóinak, a szakma iránti szeretet és elhivatottság elmélyítéséért és a több mint két évtizede töretlen szakmai együttműködésért.

Köszönöm egykori témavezetőmnek, mentoromnak, Prof. Dr. Pauk Jánosnak, MTA doktor, bitechnológus búzanemesítőnek a folyamatos szakmai és emberi támogatást; TDK

dolgozatos korom óta hasznos tanácsokkal látott el, és aktívan segítette a munkafeltételek megteremtését és jobbítását eddigi kutatói pályám során.

Köszönetemet fejezem ki a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. egykori és jelenlegi igazgatóinak (Prof. Dr. Matuz János, Szilágyi László, Dr. Bóna Lajos, Dr. Szarka Béla, Wágner József, Mandák Attila Dávid és Tóth Tibor), hogy lehetővé tették a kutatások kivitelezését, és az eredmények felhasználását a növénynemesítési programjainkban.

Kiemelt köszönet illeti meg közvetlen munkatársaimat lelkiismeretes munkájukért, akikkel közösen dolgoztunk az elmúlt évek során; nélkülük a bemutatott eredmények nem születhettek volna meg. Köszönet a Biotechnológiai Laboratórium dolgozóinak (Markó Ferenc, Beregszászi-Kéri Krisztina, Palaticki Szilvia, Dr. Nagy Éva, Ponta Csaba, Vajasdi-Nagy Sándor, Pataki Márta) szorgos és figyelmes munkájukért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Cseuz Lászlónak és a Búzanemesítési csoport dolgozóinak együttműködésükért a kutatási eredmények nemesítési célú felhasználása során. Köszönettel tartozom Dr. Bóna Lajosnak, Purgel Szendrának, Dr. Mihály-Langó Bernadettnek és Ács Katalinnak a tönkölybúza DH törzsek szántóföldi kísérletének kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. itt fel nem sorolt dolgozóinak sok éves segítőkész munkájukat.

Külön köszönöm a nemzetközi kooperációban megvalósult kísérletek során a partner intézet, Saateen – Union Biotech GmbH (Gatersleben) dolgozóinak (Jens Weyen, Heike Gnad, Birgit Schwier, Natascha Fastenau, Jennifer Donner és Ulrike Jacobi) segítőkész együttműködő munkájukat.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Láng Lászlónak (mai nevén HUN-REN ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár) és a tápiószzelei Nemzeti Biodiverzitás és Génmegőrzési Központnak, hogy biztosították a kért tönkölybúza genotípusokat a kísérletek kivitelezéséhez.

Köszönet illeti mindazokat, akik segítettek az adatok kiértékelésében (Dr. Boda Krisztina) a publikációk és jelen értekezés javításában, nyelvtani helyességének ellenőrzésében (Prof. Dr. Békés Ferenc, Búza Lajosné, Dr. Cserháti Mátyás, Dr. Lehoczki-Krsjak Szabolcs, Hajdúné Búza Kornélia, Kohlmann-né Kelemen Márta, Allan Rattery).

Köszönöm feleségemnek, Lantos Mártának és családomnak el nem múló türelmüket, szeretetüket, bátorításukat, és az Újszegedi Árpád-házi Szent Erzsébet Kolping Család tagjainak baráti támogatásukat!

Kutatásaink az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok, a Nemzeti Kutatás Fejlesztési és Innovációs Hivatal, a Magyar Tudományos Akadémia, a Scientia Amabilis a Magyar Növényélettant és a Szegedért Alapítvány támogatásával valósulhattak meg (GOP-1.1.1-11-2012-0159, TÉT_12_SK-1-2013-0033, HUSRB/1002/214/045, OTKA-K_16-K119835, OTKA-K_21-K138416, GINOP-2.2.1-18-2018-00005, GINOP-2.2.1-15-2016-00026, TUDFO/51757/2019-ITM, TKP2020-NKA-21, Bolyai János kutatási ösztöndíj).

„Én mindent készen kaptam
Áldott elődi kézből,
Éppen csak a szivárvány
Hiányzott még az égről.
Vén vasoszlopokra
Szivárványként feszültem,
Egemet ők tartották
Mohosan és derülten:
Nincs semmi érdemem.”

Reményik Sándor
Elődeim emberségéből (1936)