

Válasz

Prof. Dr. Dobránszki Judit, az MTA doktora

Lantos Csaba: Az *in vitro* androgenezis kutatási eredményei *Triticum* fajok nemesítésében

című MTA doktora cím elnyerésére készített értekezésének bírálatára

Köszönöm Prof. Dr. Dobránszki Juditnak, az MTA doktorának, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm elismerő szavait, az értekezésben szereplő eredmények elismerését, kedvező, támogató értékelését és segítőkész útmutatását.

Köszönöm, és elfogadom a bírálónak a dolgozattal kapcsolatos kritikai megjegyzéseit. Köszönöm, hogy az értekezés téziseit elfogadta és bízom benne, hogy az észrevételekre és feltett kérdésekre (vastag betűvel kiemelve) adott válaszaimat is elfogadja.

„...a tönkölybúzában alkalmazott portok előkezelési módszer mi alapján lett kiválasztva?”

A tönkölybúza és kenyérbúza közeli rokonai egymásnak. Ez alapján választottuk ki és teszteltük a kenyérbúza androgenezis kutatásban sikeresen alkalmazott hideg előkezelést (10-14 nap, 2-4 °C) tönkölybúza genotípusok *in vitro* androgenezisének indukálására.

Más stressz faktorokkal is lehet indukálni a folyamatot tönkölybúza genotípusok esetében kisebb-nagyobb hatékonysággal, ez további kutatásoknak adhat területet a jövőben. Castillo és mtsai. (2019) 5 napos éheztetést követően n-butanol előkezelést alkalmaztak az androgenezis indukációjára tönkölybúza genotípusok *in vitro* portoktenyésztésében. Az általunk alkalmazott előkezeléssel (10-14 nap, 2-4 °C) sikeresen adaptáltuk az *in vitro* portoktenyésztés módszerét tönkölybúza genotípusokra, mely elegendő hatékonyságúnak bizonyult a nemesítési programunk számára.

„...a gyökeresítés után kb. mennyi idő múlva, illetve milyen méretekkel (hajtás, gyökér) kerültek akklimatizálásra?” (a kiültetett növénykéek)

A jól fejlett növényke fogalmát érdemes lett volna pontosabban meghatározni az értekezésben. Az *in vitro* körülmények között regenerált zöld növénykéek megközelítőleg 2-4 hetet töltöttek/töltenek gyökeresítő táptalajon tenyésztőszobában (16 órás mesterséges megvilágítás, 22-24 °C), míg kiültetésre alkalmasak (jól gyökeresedett, megfelelő hajtásokkal) lesznek.

Kiültetésre és akklimatizációra alkalmasnak tartunk egy *in vitro* zöld növénykét, ha már több (5-10) centiméteres levélkével, illetve gyökerekkel rendelkezik. A disszertációban a 2.d ábrán látható néhány ilyen zöld növényke, erre azonban valóban nem hívtam fel részletesen a figyelmet az értekezésben, ezért elnézést kérek.



„alakornál volt-e próbálkozás *in vitro* androgenézis kiváltására IMC-vel?”

Igen, néhány alakor genotípussal végeztünk kísérletet az *in vitro* androgenézis folyamatának indukálására izolált mikrospóra tenyészetben is. Az előkezelést követően sikeresen izoláltunk mikrospórákat, embriószerű struktúrák fejlődését figyeltük meg a tenyészetekben, és albínó növénykéket regeneráltunk. Zöld növénykék regenerálása egyelőre megoldatlan maradt izolált mikrospóra tenyészetből. Így ezek az eredmények nem kerültek publikálásra nemzetközi folyóiratokban, és a dolgozatból is kimaradtak.

Opponensem új tudományos eredményekkel kapcsolatos észrevételeit és javaslatait köszönöm, elfogadom.

Kérdésekre adott válaszok:

1. „Van-e szakirodalmi információ arról, hogy az *in vitro* androgenézis hatékonyságát milyen mértékben befolyásolják epigenetikai tényezők? Azonosítottak-e epiQTL-eket? Áttörhetőek-e, és ha igen, hogyan azok az esetleges epigenetikai módosulások, amik szerepet játszhatnak az alacsony hatékonyságú AC-ben, vagy IMC-ben, illetve a recalcitranciában egyes genotípusoknál, illetve különböző *Triticum* fajokban?”

Az epigenetikai tényezők fontos szerepet játszanak a génszabályozásban, így az *in vitro* androgenézis indukációjában is. Epigenetikai mechanizmusok számos kulcs folyamatot szabályoznak az androgenézis indukciója során beleértve a stressz előkezelésre adott válaszokat. Az utóbbi években hiszton deacetyláz inhibitorok (pl.: trichosztatin A, nátrium-

butirát) és DNS metiltranszferáz inhibitor (5-azacitidine) hatását is vizsgálták különböző fajok *in vitro* androgenezisének indukciója során.

Tritikále izolált mikroszpóra tenyésztésben előkezelés során alkalmazott 5-azacitidine (AzaC) kezeléssel sikeresen emelték az androgenezis indukcióját, azonban a kezelés hatása genotípus függőséget mutatott, a két vizsgált genotípus közül csak az egyikben sikerült emelni az embriószerű struktúrák és regenerált zöld növénykék számát (Nowicka és mtsai. 2019).

A hiszton deacetiláz aktivitásának gátlása trichosztatin A (TSA) kezeléssel pozitív hatással volt az androgenezis indukciójára repce és *Arabidopsis* izolált mikroszpóra tenyésztésben (Li és mtsai. 2014).

Jiang és mtsai. (2017) izolált búza (*Triticum aestivum* L.) mikroszpórák előkezelésével (0,1 μ M TSA, 10 perc) többszörösére emelték a mikroszpóra eredetű embriószerű struktúrák és zöld növénykék számát. Wang és mtsai. (2019) ugyancsak TSA előkezeléssel (0,1 μ M TSA, 10 perc), valamint az indukciós tápoldathoz hozzáadott 0,01 μ M TSA-val fokozták a mikroszpóra eredetű embriószerű struktúrák és zöld növénykék számát búza izolált mikroszpóra tenyésztésben.

Spanyol kutatók két búza fajta *in vitro* portoktenyésztésében az előkezelés (5 nap, 0,7 M mannit) során alkalmazott 0,4 μ M TSA kezeléssel emelték meg az embriószerű struktúrák és zöld növénykék számát (Castillo és mtsai. 2020). Az általuk leírt eljárás ígéretes a két genotípus adatai alapján. Azonban meg kell említeni, hogy rendkívül munkaigényes a leírt módszer (ováriummal kondicionált tápközeg készítése, ováriumos dajkatenyésztés, izolált portokok előkezelése és áthelyezése indukciós tápközegre), és ezért széleskörű nemesítési felhasználására valószínűleg nem kerül sor.

Összefoglalva, több kutatási program szükséges még, hogy pontosabban megértsük az epigenetikai tényezők szerepét az *in vitro* androgenezis indukciója során, és hatékonyan alkalmazzuk azokat a dihaploid (DH) módszerek fejlesztése területén.

2. „Milyen táptalajkülönbségek okozhatták, hogy noha átlagban 1,74-szer több ELS fejlődött a P4mf táptalajon, mint a W14mf-en, később az ezekből fejlődő növénykék között átlagosan 1,71-szer több albinó növény regenerálódott, valamint a W14mf táptalajon szignifikánsan nagyobb százalékban (átlagosan 16,9% szemben a P4mf-en átlagosan mért 9,6%-kal) lehetett zöld növényeket regenerálni az ELS-ekből?”

A két alkalmazott tápközeg közötti azonosságokat és különbségeket az értekezés 3. táblázata foglalja össze. A két indukciós tápközeg esetében a szénforrás (maltóz), hormon kiegészítés (2,4-D és kinetin), hozzáadott ficoll mennyisége és a pH azonos volt, míg számos egyéb különbség volt megfigyelhető az indukciós tápközegek között.

Makroelemek összetétele eltérő a két tápközegben, W14mf tápközegben magasabb a szervetlen N forrás mennyisége. Árpa izolált mikroszpóra tenyésztés esetében ismert, hogy kulcsfontosságú az indukciós tápközegben lévő szerves, szervetlen és összes N forrás mennyisége és aránya (Mordhorst és Lörz 1993). P4mf tápközeg nem tartalmaz mikroelemeket.

W14mf tápközeg vitamin tartalma magasabb, míg a P4mf tápközeg 10% burgonyakivonatot hozzáadásával készül. A burgonyakivonat kémiai vizsgálatát elvégezték már és több mint 200 különböző alkotót detektáltak. További vizsgálatokat igényelne, hogy a burgonya kivonat mely komponense az, ami pozitív vagy esetleg negatív hatású az *in vitro* androgenézis indukciója szempontjából.

3. táblázat. *In vitro* AC-hez alkalmazott indukciós tápközegek.

Összetevők	W14mf indukciós tápközeg (mg/l)	P4mf indukciós tápközeg (mg/l)
KNO ₃	2 000	1 150
K ₂ SO ₄	700	-
KCl	-	35
NH ₄ H ₂ PO ₄	380	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	100
KH ₂ PO ₄	-	200
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	-	100
CaCl ₂ × 2H ₂ O	140	-
MgSO ₄ × 7H ₂ O	200	125
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8	27,8
MnSO ₄ × 4H ₂ O	8	-
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	3	-
H ₃ BO ₃	3	-
KI	0,5	-
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025	-
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025	-
Na ₂ MoO ₄ × 4H ₂ O	0,005	-
Tiamin HCl	2	1
Piridoxin HCl	0,05	-
Nikotinsav	0,05	-
Maltóz	80 000	80 000
2,4-D	2	2
Kinetin	0,5	0,5
pH	5,8	5,8
Burgonya kivonat	-	10%
Ficoll	100 000	100 000

Számos további kísérlet lehetőségét veti fel, hogy a fenti különbségek komplex hatását egyenként megvizsgáljuk, mely munkaigényes folyamat.

3. „A diploid (AA) alakor fajban milyen irányú fejlesztéseket javasol az *in vitro* androgenézis hatékonyságának növelésére a jövőben, tekintettel arra, hogy az eddigi vizsgálatok szerint mely QTL-eknek - köztük számos B és D genomban előfordulónak - van befolyásoló szerepe az ELS-ek, albínók és zöld növények fejlődésében?”

Első lépésben a leírt módszert érdemes lenne tesztelni több alakor genotípus bevonásával, hogy felmérjük létezik-e jobb válaszadóképességgel rendelkező genotípus, mint amit eddig azonosítottunk. A megfelelő genotípus kiválasztását követően lehet folytatni a kísérleteket a különböző előkezelések és kombinációjuk tesztelésével, illetve indukciós tápközegek összehasonlításával és fejlesztésével.

A tenyészetekben fejlődött ELS-k mennyisége a legjobb kezelés esetében 77,25 ELS/100 portok volt. Ez az érték még további fejlesztéseket igényel, más fajokkal (pl.: árpa, búza) összehasonlítva. A fejlesztések során törekedni kell arra, hogy az embriószerű struktúrák fejlődését segítsük elő, és a kalluszok fejlődését elkerüljük. További sarkalatos pont az ELS-k zöld növényregenerációjának fokozása, ami az előkezeléseken túl az indukciós és regeneráló tápközeg fejlesztésével érhető el.

Támpontot nyújthatnak a más kutatók által *Triticum* nemzetségben vagy más nemzetségben elért publikált eredmények. A cél egy genotípustól független jól működő módszer kidolgozása, ahol a QTL-k hatása már csekély mértékű, és jelenlétük vagy hiányuk nem zavarja a DH növények előállítását.

Még egyszer köszönöm Opponensem munkáját és támogató véleményét.

Tisztelettel:



.....

Lantos Csaba
laboratóriumi egységvezető, laborvezető
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.
Termékfejlesztési Igazgatóság
Kalászos Gabona Nemesítési Osztály
Laboratóriumi Egység,
Biotechnológiai Laboratórium

Szeged, 2025. január 10.

Felhasznált irodalom:

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.

Castillo A.M., Valero-Rubira I., Burrell M.Á., Allué, S., Costar M.A., Vallés M.P. (2020): Trichostatin A affects developmental reprogramming of bread wheat microspores towards an embryogenic route. *Plants* 2020, 9, 1442. <https://doi.org/10.3390/plants9111442>

Jiang F., Ryabova D., Diedhiou, Hucl P., Randhawa H., Marillia E.F., Foroud N.A., Eudes F., Kathiria P. (2017): Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Rep* 36:1701–1706 DOI 10.1007/s00299-017-2183-3

Li H., Soriano M., Cordewener J., Muino J.M., Riksen T., Fukuoka H., Angenet G.C., Boutilier K. (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell* 26(1):195–209. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116491>

Mordhorst A.P., Lörz H. (1993) Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by amount and composition of nitrogen sources in culture media. *J Plant Physiol* 142:485–492

Nowicka A., Juzoń K., Krzewska M., Dziurka M., Dubas E., Kopec P., Zieliński K., Żur I. (2019) Chemically-induced DNA de-methylation alters the effectiveness of microspore embryogenesis in triticale. *Plant. Sci.* 287, 110189. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110189>

Wang H.M., Enns J.L., Nelson K.L., Brost J.M., Orr T.D., Ferrie A.M.R. (2019): Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 139:589–599. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01704-5>