

Válasz

Prof. Dr. Hegedűs Attila, az MTA doktora

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

című az MTA doktora cím elnyerésére készített értekezésének bírálatára

Köszönöm, Prof. Dr. Hegedűs Attilának, MTA doktorának, egyetemi tanárnak, hogy doktori értekezésem bírálatát elvállalta, és alapos, minden tartalmi, formai és stilisztikai részletre kiterjedő bírálatot készített. Köszönöm az észrevételeket, javaslatokat és kérdéseket. Sokat tanultam a bírálat olvasása és a válaszok készítése során. Továbbá köszönöm a dolgozattal és a tudományos eredményekkel kapcsolatos pozitív, elismerő megjegyzéseit.

Opponensem felhívtam figyelmemet a szakkifejezések magyar nyelvű helyes használatára, számos formai és helyesírási pontatlanságra. A véglegesítés előtt valóban érdemes lett volna még egyszer alaposan átnézni az értekezést. Észrevételeivel egyetértek, a felmerült kérdésekre (a válaszok előtt vastagbetűvel írva) az alábbiakban válaszolok.

A Sánchez-Díaz és mtsai. (2013) által azonosított *TaTPD1-like*, *TAA1b*, *GSTF2*, *GSTA2*, *TaNf-YA* stb. génekről azt írja, hogy hasznos információval járulhatnak hozzá a közönséges búza mikrospóra embriógenézisének korai szakaszában lejátszódó események mélyebb megértéséhez.... Mik ezek a gének, milyen biológiai funkció társul az általuk kódolt fehérjékhez, milyen molekuláris folyamatokban van tehát különbség a gyenge és jó válaszadó képességű fajták esetében?

Sánchez-Díaz és mtsai. (2013) egy jó ('Pavon') és egy gyenge ('Caramba') válaszadóképes búza genotípussal vizsgálta az *in vitro* androgenézis indukciójában szerepet játszó gének működését. A mintavételezés stressz előkezelés előtt és után történt, valamint a tenyésztés 5., 10. és 15. napján. Összesen tizennégy gént írtak le, amelyek a mikrospóra-eredetű embriószerű struktúrák fejlődésének különböző fázisaiban fejeződnek ki.

A jelátviteli mechanizmusokban részt vevő gének (*TaTPD1-like* és a *TAA1b*), valamint a két glutation-S-transzferáz (*GSTF2* és *GSTA2*) gén akkor indukálódtak, amikor a mikrospórák úgynevezett „csillagszerű” morfológiát mutattak, illetve túljutottak az első sejtosztódáson. A stresszválasz szabályozásával kapcsolatos gének (*TaNf-YA*, *TaAGL14*, *TaFLA26*, *CHI3*, *XIP-R*; *Tad1* és *WALI6*) az exine felszakadása előtt aktiválódtak. Továbbá, a soksejtes struktúrák kiszabadulásakor a *TaEXPB4*, *TaAGP31-like* és *TaME1* gének fejeződtek ki. *Az eltérő válaszadóképes genotípusok génexpressziós vizsgálatainak összehasonlítása azt mutatta, hogy az exine felrepedése előtt aktiválódó gének profilja korábbra tolódott a gyenge válaszadóképes genotípus esetében.*

Az utóbbi években az epigenetikai változások tanulmányozása szintén előtérbe került az *in vitro* androgenézis indukciójával kapcsolatban.

Nem világos, hogy a nagyszámú (összesen 22 hivatkozott mű) felsorolása miért volt nélkülözhetetlen. Minden olyan kutatásról szóló közleményt felsorolt, amelyben kontrollált körülmények között nevelték a növényeket hasonló kísérletekben? A gondolat maga ui. nem túl eredeti: üvegházban bármikor nevelhetünk növényt, ezt a megállapítást még hivatkozás nélkül is el tudnám fogadni.

A donor növények felnevelése kulcsfontosságú az *in vitro* androgenezis indukciója szempontjából. A megállapítások valóban triviálisnak tűnnek első olvasásra, azonban a módszerek széleskörű gyakorlati felhasználása során alapvetően fontosak a donor növények felnevelésének körülményei, és növényfajonként eltérő megállapításra jutottak a kutatók.

Repece esetében az izolált mikrospóra tenyésztés módszere vált rutin módszerré a nemesítésben és kutatásban, ahol kizárólag kontrollált körülmények között felnevelt alapanyagot használnak, mert az indukcióhoz szükséges megfelelő hősokek kezelést így tudják biztosítani (néhány °C eltérés is számít). Paprika esetében is kontrollált körülmények között nevelik fel a donor növényeket, elsősorban az *in vitro* tenyészetek sterilitásának biztosítása érdekében, így tudják csökkenteni a steril tenyészetek fertőzésének kockázatát. Búza esetében még nem eldöntött a kérdés, mindkét példára találunk szép számmal publikált adatot. Saját tapasztalataink alapján az *in vitro* portoktenyésztés módszere háromszor-négyszer hatékonyabb, ha szántóföldi alapanyagból tudunk dolgozni (nagyobb kalászkok több kalászkával; nagyobb portokok, több életképes mikrospórával).

Érdekes megfigyelni, hogy a hosszú hidegkezelés hőmérséklete azonos vagy inkább alacsonyabb a rövid időtartamú hidegkezelés esetén alkalmazott hőmérsékletnél. Arra gondolnék, hogy egy hosszabb, kevésbé hideg kezeléshez hasonló hatást egy rövid, de hidegebb kezelés tud elérni. Mi lehet az oka, hogy nem így van?

Az *in vitro* portoktenyésztés indukciójára a korai- ill. középső egysejtmagvas vakuólumos állapotú mikrospórák alkalmasak. Szántóföldi körülmények között kb. 48 óra az az időtartam, amikor az alapanyag ilyen állapotú és begyűjthető. A begyűjtött hajtások ezután hideg előkezelést kapnak, mely során a mikrospórák fejlődése lelassul, de nem áll meg.

Alacsonyabb hőmérsékletű kezelés esetén több idő áll rendelkezésünkre, hogy az ideális állapotban megőrizzük a mikrospórákat, és a mikrospórák átprogramozása megtörténjen gametofitikus útról sporofitikus útra, azonban néhány fokkal (°C) magasabb hőmérsékletű kezelés esetében ez az időtartam rövidül. A még alacsonyabb hőmérsékletű kezelés már károsítaná a mikrospórák sporofita fejlődésmenetre történő átprogramozását.

Az F1 növények előállításához használt keresztezési kombinációk jelölésekor a szülő genotípusok között perjelet használ, ami nagyon különös. Genetikai munkákban a keresztezés jelölésére nem a perjelet, nem is a kis x-betűt használjuk, hanem a × szimbólumot.

Az értekezésben bemutatott kísérletekben a már előállított F₁ kombinációkat használtuk fel, melyek esetében a szülői genotípusok között perjelet alkalmaztunk. Több évtizedes hagyománya van, hogy a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. búza nemesítési programjában az F₁ kombinációkban perjelet („/”) alkalmazunk a szülő genotípusok között. Kétszeres keresztezés esetén „//” jelet, míg háromszoros keresztezés esetén a „/3” jelölést alkalmazzuk. Ezt a jelölési rendszert a CYMMIT-től (Mexikó) vették át idősebb kollégáim (Barabás Zoltán akadémikus, Kertész Zoltán professzor). Magunk is ezt követjük a nemesítési munkák végzése, publikációk készítése és az értekezés megírása során. Ismereteim szerint az öntermékenyülő gabonaféléknél ezt a rendszert sokan használják a világon.

Kérem ezért, hogy legyen kedves pontosan megadni, milyen képlettel számolta ki a GCA-t, az SCA-t, és milyen számításokkal értékelte a reciprok hatást? Jelölt ugyan hivatkozik a statisztikai analízisnél az eredeti Griffing (1956) cikke, de abban a közleményben több modellen keresztül számos módszert és képletet ismertet a szerző, így megjelölés nélkül lehetetlen azonosítani, pontosan mit használt az eredmények eléréséhez.

Az eredeti tudományos cikk publikálása (Lantos és mtsai. 2019) során nem kérték a képletek részletes ismertetését. Így fordulhatott elő, hogy kevesebb figyelmet fordítottam ezen rész részletesebb kifejtésére az értekezés Anyag és módszer fejezetében. A kísérlet során teljes diallél populációval dolgoztunk, így a kísérletek kiértékeléséhez Griffing 1 módszerét és első modelljét alkalmaztuk. Az ide vonatkozó képletek az eredeti cikkben olvashatóak, a cikk 2. táblázata foglalja össze azokat (Griffing 1956).

TABLE 2
ANALYSIS OF VARIANCE FOR METHOD I GIVING EXPECTATIONS OF MEAN SQUARES FOR THE ASSUMPTIONS OF MODELS I AND II

Source	D.F.	Sum of Squares*	Mean Squares	Expectation of Mean Squares	
				Model I	Model II
General combining ability	$p-1$	S_g	M_g	$\sigma^2 + 2p\left(\frac{1}{p-1}\right)\Sigma y_i^2$	$\sigma^2 + \frac{2(p-1)}{p}\sigma_s^2 + 2p\sigma_g^2$
Specific combining ability	$p(p-1)/2$	S_s	M_s	$\sigma^2 + \frac{2}{p(p-1)}\Sigma\Sigma s_{ij}^2$	$\sigma^2 + \frac{2(p^2-p+1)}{p^2}\sigma_s^2$
Reciprocal effects	$p(p-1)/2$	S_r	M_r	$\sigma^2 + 2\left(\frac{2}{p(p-1)}\right)\Sigma_{i<j}\Sigma r_{ij}^2$	$\sigma^2 + 2\sigma_r^2$
Error	m	S_e	M_e'	σ^2	σ^2

* Where

$$S_g = \frac{1}{2p}\Sigma_i(X_{i.} + X_{.i})^2 - \frac{2}{p^2}X_{..}^2,$$

$$S_s = \frac{1}{2}\Sigma_{i,j}(x_{ij} + x_{ji}) - \frac{1}{2p}\Sigma_i(X_{i.} + X_{.i})^2 + \frac{1}{p^2}X_{..}^2,$$

$$S_k = \frac{1}{2}\Sigma_{i<j}\Sigma(x_{ij} - x_{ji})^2.$$

A diallél kísérlet kiértékeléséhez Dr. Boda Krisztina (SZTE, ÁOK, Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet; SZTE, Matematikai Doktori Iskola oktatója) segítségét kértük, aki a publikált cikkünknek társszerzője is. A bírált értekezésem Köszönetnyilvánítás részében megemlítettem az adatok kiértékelésében nyújtott segítségét. Ezúton is köszönöm Dr. Boda Krisztinának a diallél kísérlet statisztikai kiértékelését.

Opponensem új tudományos eredményekkel kapcsolatos észrevételeit és javaslatait tisztelettel elfogadom a fenti válaszaimat is figyelembe véve.

Válaszok a kérdésekre:

1. Az irodalmi áttekintésben említi, hogy a búza portoktenyésztése során az embriogenezis fokozásának érdekében bizonyították néhány vegyület (pl. n-butanol, antioxidánsok, antibiotikumok) pozitív hatását, ami új lehetőségeket adhat az *in vitro* androgenezisen alapuló módszerek fejlesztésekor. Ezekben a kísérletekben véletlenszerűen kiválasztott vegyületekről igazoltak pozitív hatást. Kérdésem, hogy a rendszerbiológiai alapú (omikai) vizsgálatok segíthetnek-e a fenti célra leghatékonyabban felhasználható vegyületek azonosításában?

Seifert és mtsai. (2016) transzkriptomikai vizsgálatokat végeztek 'Svilena' őszi búza genotípus *in vitro* izolált mikrospóra tenyészetében három fejlettségi állapotot összehasonlítva: hideg előkezelés előtt (1.), után (2.), illetve az első sejtosztódást követően (3.). Több mint húszezer transzkriptumot vizsgáltak a kísérletek során. Feltehetően az átiratok nagy része a mikrospórák embriogenezisének indukciójára specifikus. Nagy mennyiségben azonosítottak stressz állapottal és embriófejlődéssel kapcsolatos transzkriptumokat. Sok átiratról kiderült, hogy kifejezetten mikrospórákban fejeződik ki az első sejtosztódás során, illetve kapcsolatba hozható epigenetikai mechanizmusokkal.

Az utóbbi években számos publikáció tanulmányozta az epigenetikai mechanizmusok szerepét az androgenezis indukciója során. Hiszton deacetiláz inhibitorok (pl.: trichosztatin A – röviden TSA, nátrium-butirát) és DNS metiltranszferáz inhibitor (5-azacitidine) hatását vizsgálták különböző fajokban.

Búza izolált mikrospórák TSA előkezelésével (0,1 μ M TSA, 10 perc), illetve az indukciós tápoldathoz hozzáadott 0,01 μ M TSA-val többszörösére emelték az embriószerű struktúrák és zöld növénykék számát izolált mikrospóra tenyészetben (Jiang és mtsai. 2017, Wang és mtsai 2019). Továbbá két őszi búza genotípus *in vitro* portoktenyészetében az előkezelés (5 nap, 0,7 M mannit) során alkalmazott 0,4 μ M TSA kezeléssel szintén megemelték az embriószerű struktúrák és zöld növénykék számát (Castillo és mtsai. 2020).

Perez-Pinar és mtsai. (2024) átfogó metabolomikai (amino-, szerves- és zsírsavak, cukrok stb.) vizsgálatot végeztek a jó válaszadó képességű 'Svilena' őszi búza genotípussal, mely genotípust számos publikációban pozitív kontrollként használták a kutatócsoportok a búza *in vitro* androgenezisének kutatása során. A vizsgálatokban szintén a stressz (hideg) előkezelés előtti, utáni és az első sejtosztódás utáni állapotokat hasonlították össze. A vizsgálatokból látható, hogy az előkezelés során a keményítő mennyisége lecsökkent, majd az első sejtosztódást követően emelkedett. Az *in vitro* androgenezis indukciójának kezdetén szükséges

energiát a citromsav ciklus biztosította, mely később az aminosavak bioszintéziséhez is hozzájárult. Az aminosav szintézisben szerepet játszó gének transzkripciós profilja eltért a metabolomikai profiloktól. A citromsavciklus köztes termékei is szükségesek az aktív aminosav-anyagcseréhez. Az aminosavak fontos szerepet töltenek be a nitrogén asszimilációban és az oxidatív stressz elkerülésében. A citoszolikus glutamin-szintetáz 1-es izoenzimjét az első sejtosztódás után azonosították nagyobb mennyiségben.

Összességében kimutatták (Perez-Pinar és mtsai. 2024), hogy az előkezelés során megtermelt energia a citromsav cikluson keresztül támogatja az *in vitro* androgenézis indukcióját és az aktív aminosav-anyagcserét. A vizsgálatokat a jó válaszadóképességű ‘Svilena’ genotípussal végezték el. Alacsony válaszadóképességű genotípusok bevonásával tovább lehetne bővíteni az androgenézis indukciójával kapcsolatos ismereteket, melyek segíthetnek a folyamatok megértésében, és további metodikai fejlesztések megtervezésében.

2. A portoktenyésztésből származó embriószerű struktúrákból regenerált zöld növénykék esetében jelentős mértékű genotípusfüggés volt kimutatható (8. táblázat, 3. ábra) különböző indukciós tápközegek (P4mf és W14mf) alkalmazása mellett. Végzett-e vizsgálatokat (pl. korrelációanalízist) arra vonatkozóan, hogy ha a fajtákat sorba állítjuk a regeneráció mértéke szerint, ez a sorrend a kétféle táptalajon milyen mértékben tér el egymástól? Mi lehet az eltérések fiziológiai háttere ebben az esetben?

A kéttényezős varianciaanalízis elvégzése során genotípus×tápközeg interakció hatását vizsgáltuk, ami nem mutatott szignifikáns különbséget (értekezés 6. táblázata) másik négy paramétert vizsgálva (ELS-ek, albinók, zöld és kiültetett növénykék száma).

A zöld növénykék regenerációjának statisztikai elemzése során ismétlések nélküli kéttényezős varianciaanalízist alkalmaztunk, ahol nincs mód az interakció vizsgálatára. A regeneráció mértéke szerint sorrendbe állítva az alábbi táblázatban láthatjuk az eredményeket.

Zöld növénykék regenerálása %-ban			
Genotípus	P4mf	Genotípus	W14mf
‘Midas/Göncöl’	33,7	‘Midas/Göncöl’	42,3
‘Tacitus/5003’	11,4	‘Midas/GK Békés’	26,3
‘Midas/GK Csillag’	9,4	‘Hyland/GK Békés’	22,9
‘Hyland/GK Békés’	9,2	‘Tacitus/5003’	18,5
‘Pegassos/GK Csillag’	8,8	‘Midas/GK Csillag’	15,9
‘Midas/GK Békés’	8,3	‘Pegassos/GK Csillag’	12,2
‘Brillant/GK Bani’	7,9	‘Brillant/GK Bani’	10,9
‘Capo/GK Körös’	4,6	‘Capo/GK Körös’	8,4
‘Xiao Yan/GK Bani’	1,6	‘Komárom/GK Bani’	7,9
‘Komárom/GK Bani’	1,3	‘Xiao Yan/GK Bani’	4,2
átlag	9,6	átlag	16,9

A legmagasabb értéket a ‘Midas/Göncöl’ genotípussal értük el a 10 F₁ kombináció közül mindkét tápközegben, míg a legalacsonyabbakat a ‘Brillant/GK Bani’, ‘Capo/Körös’, ‘Xiao Yan/ GK Bani’ és ‘Komárom/GK Bani’ kombinációkkal. A további öt kombináció a

középmezőnyben helyezkedett el. A sorrendben lehet kisebb változás, de nagy általánosságban igaz, hogy a jó válaszadóképességű genotípusokkal magasabb értékeket értünk el.

A két adatsor közötti korrelációt a Microsoft Excel 2016 statisztika szoftver segítségével vizsgáltuk, és erős korrelációt tapasztaltunk a két adatsor között.

	<i>P4mf</i>	<i>W14mf</i>
<i>P4mf</i>	1	
<i>W14mf</i>	0.900598	1

Természetesen az indukciós tápközeg összetétele meghatározó a tenyészetekben fejlődő ELS-ek növekedése és regenerációs képessége szempontjából, így előfordulhatnak olyan genotípusok, melyek egyik vagy másik tápközeg alkalmazásával mutatnak magasabb értéket.

3. Közönséges búza F1 keresztezési kombinációk tesztelésekor több száz esetben a sterilitást a haploidia jeleként használta a fertilitás alapú szelekció során. Ennek figyelembevételével felmerül a kérdés, hogy az alakor esetében miért volt szükség a flow citométeres megerősítésre a portoktenyésztéssel származó egyetlen növényke esetében? (ami amúgy igazolta a fenotípus alapú feltételezést)

A kalászok teljes mértékű sterilitását alakor esetében is alkalmas markernek tartom a haploid ploid szint megállapításához; különösen akkor, ha majd nagy számú regenerált zöld növényről beszélhetünk. Egy-két zöld növény esetében mindenképp hasznos a flow citométeres vizsgálat a ploid szint meghatározásához.

Tudományos cikk publikálása során egy szigorú bíráló azzal a véleménnyel élhet (tapasztalati példa), hogy a regenerált növény nem mikrospóra eredetű, hanem a portok falából (szomatikus szövet) származik, és a sterilitást nem a haploid ploid szint okozta, hanem a gondatlan üvegházi növénynevelés, például az öntözés hiánya. A ploid szint flow citometriás vizsgálata megelőzi az ilyen jellegű kérdéseket. Figyelembe véve azt, hogy a flow citométeres vizsgálat az elmúlt 10-15 évben általánosan alkalmazott módszerré vált a ploid szint vizsgálatra, ezért is alkalmaztuk ezt a mérési módszert.

4. Érdeklődéssel olvastam a 'GK Déva' fajta előállításának történetét, melynek lényege a pedigree nemesítési rendszer és a portoktenyésztés módszerének kombinálása volt. Feltételezem, nem a Jelölt felelős a fajták elnevezéséért, de nem tudom megállni, hogy ne kérdezzem meg: a magyar-szlovák együttműködés keretében létrehozott fajta nevének kiválasztásakor nem merült fel a GK Pozsony vagy GK Kassa elnevezés lehetősége? Miért ragaszkodtak Dévához?

A szlovák-magyar együttműködés több éven keresztül tartó bilaterális kutató kooperáció volt, melyet több TÉT pályázat támogatott. A kooperáció során elsőként Szlovákiában került köztermesztésbe egy DH törzs 'Januska' néven. Mindeközben hazánkban egy másik DH törzs (GK 506.16) került állami elismerésre. Viszonzásul a 'GK Darina' nevet választottuk volna (szlovák nemesítő kolléganőnk keresztnéve Darina), de ez már sajnos foglalt volt az EU

névlistáján. Így a vezető nemesítő Pauk János javasolta a 'GK Déva' nevet. Elmondása szerint azért, mert az ugyanakkor elismert másik fajtánk neve ('GK Szereda') is erdélyi ihletésű volt. A kettő együtt szép harmóniát mutatott, főleg nekünk nemesítőknek.

Nemesítői szemmel érdekes megfigyelni, hogy két szomszédos ország esetében ugyanabból a DH populációból (több száz törzs) más-más DH törzs került állami elismerésre és köztermesztésbe az egyes országokban. Így az adott országban, régióban történő szelekciónak nagy jelentősége van az értékes búza DH törzsek, fajtajelöltek kiválasztása szempontjából.

5. Tud-e arról, hogy a közönséges búza "A genomját" adó *T. urartu* fajra vonatkozóan vannak-e portoktenyésztéssel kapcsolatos kutatások?

A *Triticum uratu* faj gazdasági jelentősége még az alakornál is szerényebb. Ez lehet az egyik oka annak, hogy *Triticum urartu* DH növények előállításáról szóló publikáció nem áll rendelkezésre.

Segui-Simarro és mtsai. 2021-ben egy könyvfejezetben gyűjtötték össze a haploid és doubled haploid növény előállítási kutatásokkal kapcsolatos publikált adatokat. Közel 400 növényi fajban elért eredményeket foglalták össze, azonban a *Triticum urartu* nem volt megemlítve.

Említésre méltó, hogy Grewal és mtsai. (2021) távoli fajkeresztezés módszerének alkalmazásával állítottak elő DH törzseket búza és *Triticum urartu* introgressziós vonalakból.

Még egyszer, nagyon köszönöm Opponensem részletekre kiterjedő 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 12.

Felhasznált irodalom:

- 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>
- Grewal S., Guwela V., Newell C., Yang C.Y., Ashling S., Scholefield D., Hubbart-Edwards S., Burrige A., Stride A., King I.P. and King J. (2021) Generation of Doubled Haploid Wheat-*Triticum urartu* Introgression Lines and Their Characterisation Using Chromosome-Specific KASP Markers. *Front. Plant Sci.* 12:643636. doi: 10.3389/fpls.2021.643636
- Griffing J. B. (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust J Biol Sci* 9: 463-493. doi:10.1071/BI9560463.
- 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
- Lantos C., Purgel S., Ács K., Langó B., Bóna L., Boda K., Békés F. and Pauk J. (2019) Utilization of *in vitro* anther culture in spelt wheat breeding. *Plants* 8: 436. doi: 10.3390/plants8100436
- Perez-Pinar T., Hartmann A., Bössow S., Gnad H., Mock H. P. (2024) Metabolic changes during wheat microspore embryogenesis induction using the highly responsive cultivar Svilena. *J Plant Physiol* 294: 154193. doi: 10.1016/j.jplph.2024.154193
- Sánchez-Díaz R. A., Castillo A. M. and Valles M. P. (2013) Microspore embryogenesis in wheat: new marker genes for early, middle and late stages of embryo development. *Plant Reprod* 26: 287-296. doi:10.1007/s00497-013-0225-8
- Seguí-Simarro J. M., Moreno J. B., Fernández M. G. and Mir R. (2021) Species with Haploid or Doubled Haploid Protocols. In: Segui-Simarro, J. M. (eds) *Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology*, vol 2288. Humana, New York, NY. pp. 41-103. doi:10.1007/978-1-0716-1315-3_3
- Seifert F., Bössow S., Kumlehn J., Gnad H. and Scholten S. (2016) Analyses of wheat microspore embryogenesis induction by transcriptome and small RNA sequencing using the highly responsive cultivar “Svilena”. *BMC Plant Biol* 16: 97. doi:10.1186/s12870-016-0782-8
- 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>