

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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

Lantos Csaba

Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
Bevezetés	8
1. Kutatási célkitűzések	10
2. Irodalmi áttekintés	12
2.1. A haploidkutatás és nemesítés rövid történeti áttekintése a vizsgált <i>Triticum</i> fajokban	12
2.1.1. Alkalmazott DH növényelőállítási módszerek közönséges búzában (<i>Triticum aestivum</i> L.)	13
2.1.2. DH növényelőállítási módszerek tönkölybúzában (<i>Triticum spelta</i> L.)	14
2.1.3. <i>In vitro</i> szomatikus szövettenyésztés és AC tudományos háttere a rekalcitráns alakor (<i>Triticum monococcum</i> L.) fajban	16
2.2. <i>In vitro</i> androgenézis indukciója kenyérbúzában (<i>Triticum aestivum</i> L.)	17
2.3. A közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) <i>in vitro</i> AC hatékonyságát befolyásoló tényezők	19
2.3.1. Genotípus szerepe az <i>in vitro</i> androgenézis indukciójában	19
2.3.2. Donor növények felnevelési körülményei és az alapanyagok begyűjtési ideje	21
2.3.3. Stressz előkezelés szerepe kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i> L.) <i>in vitro</i> androgenézis indukciójában	23
2.3.4. Indukciós tápközegek összetevői közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) AC-ben	24
2.3.5. Növényregenerálás AC eredetű struktúrákból	25
2.3.6. Albinizmus közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) <i>in vitro</i> androgenézise során	26
2.3.7. Zöld növénykéek előállítása kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i> L.) <i>in vitro</i> AC-ben	27
2.3.8. Spontán és indukált kromoszóma duplikáció	27
2.4. Az <i>in vitro</i> androgenézis alkalmazása kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i> L.) nemesítésben és kutatásban	28

2.4.1.	A megkettőzött haploidok szerepe a kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i> L.) nemesítésben	28
2.4.2.	A DH módszerek jelentősége térképezési populációk létrehozásában.....	29
2.4.3.	Genetikai markerek és a DH technológia alkalmazása kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i> L.) nemesítési és kutatási programokban.....	29
2.4.4.	<i>In vitro</i> androgenézis és <i>in vitro</i> szelekció	30
2.4.5.	Haploidia és genetikai transzformáció	30
2.4.6.	Haploidia és genomszerkesztés	31
2.4.7.	Haploidia és mutáció	31
3.	Anyagok és módszerek	33
3.1.	Donor növények és felnevelési körülmények.....	33
3.1.1.	Donor növények felnevelése üvegházi körülmények között	33
3.1.2.	Donor növények felnevelése tenyészkerti körülmények között.....	34
3.2.	Donor alapanyagok begyűjtése és előkezelése.....	35
3.2.1.	Különböző előkezelések hatásának vizsgálata alakor (<i>Triticum monococcum</i> L.) genotípusok <i>in vitro</i> androgenézisének (AC) indukciója során	36
3.2.2.	Portokok előkezelése tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) IMC-hez	38
3.3.	Portokok izolálása és <i>in vitro</i> AC indítása	38
3.4.	Tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) mikrospórák izolálása és tenyésztése	38
3.5.	Növényregenerálás <i>in vitro</i> AC-ben és IMC-ben fejlődött ELS-ekből.....	42
3.6.	<i>In vitro</i> regenerált zöld növényképek üvegházi akklimatizációja és felnevelése.....	42
3.7.	Akklimatizált növényképek felnevelése tenyészkerti körülmények között	44
3.8.	Tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) DH törzsek tenyészkerti vizsgálata	44
3.9.	Áramlási citometriás vizsgálatok	45
3.10.	Statisztikai elemzések	45
3.10.1.	Genotípus és tápoldat hatásának statisztikai vizsgálata tíz közönséges búza F ₁ keresztezési kombináció <i>in vitro</i> AC-ben	45
3.10.2.	Genotípus és évjárat hatásának statisztikai elemzése, 93 közönséges búza F ₁ keresztezési kombináció vizsgálata <i>in vitro</i> AC-ben.....	46
3.10.3.	Tönkölybúza <i>in vitro</i> AC és IMC fejlesztésének statisztikai elemzése.....	46
3.10.4.	Genotípus hatás statisztikai vizsgálata teljes diallél populációval és tíz F ₁ keresztezési kombinációval tönkölybúza <i>in vitro</i> AC-ben	46
3.10.5.	Alakor (<i>Triticum monococcum</i> L.) <i>in vitro</i> AC kísérletek statisztikai kiértékelése	47

4. Eredmények.....	48
4.1. Genotípus és táptalaj hatásának vizsgálata közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) F ₁ keresztezési kombinációkkal <i>in vitro</i> AC-ben	48
4.1.1. Genotípus, tápközeg hatás és genotípus×tápközeg kölcsönhatás vizsgálata <i>in vitro</i> AC-ben.....	48
4.1.2. Közönséges búza F ₁ keresztezési kombinációk <i>in vitro</i> androgenézisének összehasonlítása két indukciós tápközegben	50
4.1.3. Spontán diploid növények százalékos aránya az akklimatizált <i>in vitro</i> AC eredetű növények között.....	53
4.2. Az évjárathatás és a széleskörű nyugat-európai genetikai háttér tesztelése közönséges búza <i>in vitro</i> AC-ben és nemesítési felhasználásuk.....	54
4.2.1. Évjárat, genotípus és évjárat×genotípus kölcsönhatás vizsgálata nemzetközi kontroll genotípusokkal <i>in vitro</i> AC-ben.....	55
4.2.2. Nyugat-európai F ₁ keresztezési kombinációk válaszadó képességének vizsgálata <i>in vitro</i> AC-ben.....	58
4.2.3. Zöld növénykéek előállítása nyugat-európai nemesítési programok számára..	60
4.3. <i>In vitro</i> androgenézis alkalmazása közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) nemesítési programban	61
4.4. <i>In vitro</i> androgenézis módszereinek fejlesztése tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) genotípusokkal	64
4.4.1. <i>In vitro</i> androgenézis indukciója tönkölybúza genotípusok AC-ben.....	64
4.4.2. A genotípus és a hideg előkezelés hatásának vizsgálata tönkölybúza genotípusok <i>in vitro</i> AC-ben.....	64
4.4.3. Androgenézis indukciója tönkölybúza genotípusok <i>in vitro</i> IMC-ben.....	67
4.4.4. <i>In vitro</i> AC és IMC összehasonlítása tönkölybúza genotípusokkal	71
4.5. <i>In vitro</i> androgenézis alkalmazhatóságának vizsgálata tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) nemesítési programokban	72
4.5.1. <i>In vitro</i> androgenézis indukciója tönkölybúza teljes diallél populáció AC-ben	72
4.5.2. <i>In vitro</i> AC vizsgálata tíz nemesítési célú tönkölybúza F ₁ keresztezési kombinációban	76
4.5.3. Tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) DH törzsek tenyészkerti vizsgálata	80
4.6. <i>In vitro</i> androgenézis indukciója alakor (<i>Triticum monococcum</i> L.) fajban	83
4.6.1. Genotípus, előkezelés és kölcsönhatásuk alakor genotípusok <i>in vitro</i> AC-ben	83

4.6.2. AC eredetű alakor zöld növényke ploidszint vizsgálata áramlási citometriával	86
5. Eredmények megvitatása	87
5.1. Genotípus, táptalaj és genotípus×táptalaj kölcsönhatás vizsgálata közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) keresztezési kombinációkkal <i>in vitro</i> AC-ben.....	87
5.2. Az évjárat hatás és széleskörű nyugat-európai genetikai háttér vizsgálata közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) <i>in vitro</i> AC-ben és a módszer nemesítési célú felhasználása.....	89
5.3. Androgenezis alkalmazása a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. kenyérbúza (<i>Triticum aestivum</i> L.) nemesítési programjában	91
5.4. Az <i>in vitro</i> androgenezis indukciója tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) AC-ben és IMC-ben	92
5.5. <i>In vitro</i> AC felhasználása tönkölybúza (<i>Triticum spelta</i> L.) nemesítési programokban	94
5.6. <i>In vitro</i> androgenezis indukciója alakor (<i>Triticum monococcum</i> L.) fajban	95
6. Összefoglalás	99
7. Új tudományos eredmények.....	102
8. Köszönetnyilvánítás	104
9. Felhasznált irodalom.....	106

Rövidítések jegyzéke

2,4-D	(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 2,4-Diklórfenoxi-ecetsav
AC	(Anther Culture) portoktenyésztés
AGP	(Arabinogalactan protein) arabinogalaktán fehérjék
DH	(Doubled Haploid) kettőzött haploid
DMSO	(Dimethyl sulfoxide) Dimetil-szulfoxid
ELS	(Embryo-Like Structure) embriószerű struktúra
GCA	(General Combination Ability) általános kombinálódó képesség
HNA	(2-Hydroxynicotinic acid) 2-Hidroxi-nikotinsav
IMC	(Isolated Microspore Culture) izolált mikrospóra tenyésztés
MAS	(Marker Assisted Selection) marker támogatta szelekció
NAA	(1-Naphthylacetic acid) Naftil-ecetsav
OVCM	(Ovary Conditioned Medium) ováriummal kondicionált tápoldat
PAA	(Phenylacetic acid) Fenil-ecetsav
QTL	(Quantitative Trait Locus) mennyiségi tulajdonság lókusza
SCA	(Special Combination Ability) speciális kombinálódó képesség
TKW	(Thousand Kernel Weight) ezerszemtömeg

A rövidítések az angol nyelvű tudományos dolgozatokból származnak. A könnyebb érthetőség kedvéért szerepel az angol és magyar nyelvű szakkifejezés mellette.

Hivatkozott tápközegek és referenciáik:

190-2	Zhuang és Jia (1983)
190-3	Lantos és mtsai. (2018)
C17	Wang és Chen (1986)

J25-8	Jensen (1977)
LIM	Broughton (2008)
MS	Murashige és Skoog (1962)
MS3M	Hu és Kasha (1997)
P2	Chuang és mtsai. (1978)
P4	Ouyang és mtsai. (1973)
W14	Ouyang és mtsai. (1989)
W14mf	Lantos és mtsai. (2013)

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. Keresik a lehetőségeket a szelekciós előrehaladás javítására, a nemesítési folyamat gyorsítására. 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 mikroszpóra tenyésztés (IMC) módszerét. Az *in vitro* androgenezis indukciója során a mikroszpórák gametofitikus fejlődésmenete stressz előkezelés hatására sporofitikus útra programozható át, majd az indukciót követően embriószerű struktúrák (ELS) állíthatók elő és zöld növénykékké regenerálhatók a mikroszpórákból *in vitro* körülmények között. Így genetikailag homozigóta kettőzött haploid vagy doubled haploid (DH) növények állíthatók elő 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 a genetikailag tiszta állapot eléréséhez. Így a DH vonalak és törzsek előállítása nagyon jó lehetőséget biztosít a hibrid és a fajtaelőállító nemesítési programok számára. A homozigóta anyagok előállításával idő és költség takarítható meg a növénynemesítésben, ami gyakorlati szempontból nem elhanyagolható.

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 fenotípusos hatásuk 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 évtizedek óta világszerte számos növénynemesítő cég és akadémiai kutatóintézet foglalkozik a DH növényelőállítási módszerek kidolgozásával és folyamatos fejlesztésével. A DH növényelőállítási módszerek árpa és repce

esetében már széleskörűen alkalmazott rutin eljárások, amelyek a modern növénynevelési programok szerves részét képezik. *Triticum* fajok esetében azonban árnyaltabb a módszerek felhasználásának megítélése.

Több kutatócsoport is sikeresen alkalmazta már az *in vitro* AC módszerét kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) fajtaelőállítás nemesítés során (Thomas és mtsai. 2003, Tuvešson és mtsai. 2007, 2021, Broughton és mtsai. 2020, Weyen 2021), több mint 250 regisztrált 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, Orłowska 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 válaszó képességű és 'Berengar' – gyenge válaszó 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 kétéves tenyészkerti 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. Irodalmi áttekintés

A haploid kutatás története egészen az 1900-as évek elejéig nyúlik vissza, amikor Blakeslee és mtsai. (1922) csattanó maszlagban (*Datura stramonium* L.) spontán haploid növény előfordulását figyelték meg, és írták le. Azóta több faj esetében is beszámoltak természetben előforduló haploid egyedekről, de ezen események rendkívül ritkák. Amikor La Rue 1952-ben egy nemzetközi botanikai kongresszuson nyitvatermő növények pollenjének szövetszerveződéséről tett említést előadásában, a „képelet vad szárnyalásának” tartották beszámolóját (Heszky 2000). Egy bő évtizeddel később indiai kutatók állították elő az első *in vitro* haploid növényeket indián maszlag (*Datura innoxia* L.) *in vitro* AC-ből (Guha és Maheswary 1964). Azóta közel 400 fajban írták le az *in vitro* androgenezis indukcióját, haploid, illetve DH növények előállítását (Segui-Simarro és mtsai. 2021). A publikált adatok alapján több százra, de inkább több ezerre tehető a DH módszerek által előállított regisztrált növényfajták száma a világon (Weyen 2021). Természetesen nem minden faj esetében vált rutin módszerré az eljárás, de szép számmal találunk példát a DH növények nemesítési és kutatási célú felhasználására.

2.1. A haploidkutatás és nemesítés rövid történeti áttekintése a vizsgált *Triticum* fajokban

A kiegyenlítettség vagy homogenitás alapvető követelmény a fajták, illetve hibridek élettani vizsgálata és nemesítése során. Több megközelítés létezik a növénynemesítők számára, mellyel lecsökkenthetik a nemesítés hosszú, sokéves folyamatát, illetve emelhetik a nemesítési program hatékonyságát. A DH növényelőállítási módszerek kínálják a leggyorsabb lehetőséget a genetikailag tiszta állapot eléréséhez (Dunwell 2010, Germana 2011a, Hensel és mtsai. 2012, Niu és mtsai. 2014, Shchukina és mtsai. 2018, Sharma és mtsai. 2019), hiszen egyetlen generáció alatt eljuthatunk a növények homozigóta állapotához. Továbbá a genetikai tisztaság alapvető elvárás a kutatási programokban, ahol a DH módszerek gyors lehetőséget kínálnak a kívánt vonalak, törzsek, populációk előállítására. Az említett előnyök tartják a DH növényelőállítási módszereket a kutatás és növénynemesítés homlokterében a mai napig.

2.1.1. Alkalmazott DH növényelőállítási módszerek közönséges búzában (*Triticum aestivum* L.)

Közönséges búza esetében három gyakran alkalmazott DH növényelőállítási módszert ismerünk: (i) a kromoszóma eliminációs módszert távoli fajkeresztezéssel, az *in vitro* (ii) AC és (iii) IMC módszerét.

Távoli fajkeresztezés alkalmazásakor a két faj keresztezését követően a pollen donor faj (kukorica, *Imperata cylindrica* L. vagy *Hordeum bulbosum* L.) kromoszómái eliminálódnak az embriófejlődés során. Az így kapott haploid búza embriókat még az abortációjuk előtt izolálni szükséges, és *in vitro* körülmények között felnevelni. A haploid növénykéek indukált kromoszóma duplikációja (pl. kolchicin kezelés) minden esetben elengedhetetlen feltétel a fertilis DH törzsek előállításához, mivel spontán kromoszóma duplikáció nem történik a módszer alkalmazása során. A módszert hatékony eljárásnak írta le néhány kutatócsoport (Tuvevsson és mtsai. 2007, Jauhar és mtsai. 2009), azonban hátrányaként kell megemlíteni, hogy párhuzamosan kell felnevelni két különböző növényfajt mesterséges körülmények között, és az előállított növénykéek haploidok, spontán DH nincs közöttük, így az indukált kromoszóma duplikációjuk (pl. kolchicin kezelés) elengedhetetlen.

A búza *in vitro* androgenézis kutatása az 1970-es évek elejére nyúlik vissza. Az első *in vitro* AC eredetű búza növénykéek előállítását három kutatócsoport párhuzamosan publikálta 1973-ban (Ouyang és mtsai. 1973, Picard és De Buyser 1973, Wang és mtsai. 1973). Több jelentős fejlesztést követően, az első államilag elismert AC eredetű DH búzafajta ('Jinghua No 1') előállítása kínai kutatók nevéhez fűződik (Hu és mtsai. 1986), melyet rövid időn belül több európai követett, úgymint a francia 'Florin' (De Buyser és mtsai. 1987), a szegedi nemesítési programból származó 'GK Délibáb' (Pauk és mtsai. 1995), illetve a martonvásári nemesítésű 'Mv Szigma' fajta (Bedő és mtsai. 1996). Az elmúlt két évtizedben, az *in vitro* AC-n alapuló DH növényelőállítás több jelentős nemesítőház búzanemesítési programjában aktív szerepet töltött be. Számos DH eredetű államilag elismert kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) fajta előállításáról tudományos cikkekben is említést tettek; például 'SV Agaton' (Tuvevsson és mtsai. 2003), 'McKenzi' (Graf és mtsai. 2003), 'AC Andrew' (Sadasiivaiah és mtsai. 2004), 'Huapei 8' (Ming-hui és mtsai. 2011), 'Kharoba' (Elhaddoury és mtsai. 2012) és az intézetünkben nemesített 'GK Déva' fajta (Pauk és mtsai. 2020). Továbbá, a DH növényelőállítási módszerek a hibridbúza nemesítési programokban is kulcsszerepet

játszhatnak, amennyiben a hibridbúzák termesztésének jelentősége tovább emelkedik a jövőben (Longin és mtsai. 2014).

Az első sikeres nemesítési és kutatási alkalmazások ellenére a mai napig lehet olvasni tudományos kritikákat a közönséges búza *in vitro* AC-vel kapcsolatban. Ezen beszámolók elsősorban az erős genotípus függőséget, alacsony növényregenerációt és albinizmust említik, ami korlátozza a módszer széleskörű nemesítési alkalmazását (Jauhar és mtsai. 2009, Islam és Tuteja 2012, Niu és mtsai. 2014, Canonge és mtsai. 2021, Zur és mtsai. 2021, Tang és mtsai. 2023).

A harmadik leggyakrabban alkalmazott módszer kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) DH növények előállítására az IMC módszere, melyet két kutatócsoport írt le 1993-ban (Mejza és mtsai. 1993, Tuvešson és Öhlund 1993). Mejza és mtsai. által publikált ováriumos dajkatenyésztés a mai napig alkalmazott eljárás az izolált haploid sejtek tenyésztése során közönséges búzában. A módszer hatékonyságát jelentősen emeli a dajkatenyésztés, bár több manuális munkával is jár. Számos kutatócsoport megerősítette eredményeiket (Puolimatka és Pauk 1999, Zheng és mtsai. 2002, Letarte és mtsai. 2006), de az ováriumos dajkatenyésztés hatását még nem sikerült teljes mértékben más módszerrel, kezeléssel vagy vegyszerrel kiváltani. A genotípus függőség mellett a módszer legfőbb hátrányának a nagy mértékű albinizmust említi meg több kutatócsoport (Canonge és mtsai. 2021, Zur és mtsai. 2021). A módszer fejlesztése (pl. indukciós tápközeg, trichostatin A kezelés) a mai napig kutatott terület (Islam 2010, Asif és mtsai. 2014, Jiang és mtsai. 2017, Castillo és mtsai. 2020, Valero-Rubira és mtsai. 2023), azonban a széleskörű nemesítési felhasználás egyelőre még további fejlesztéseket igényel.

Számos kutatócsoport foglalkozik a haploid indukáló genetikai források (pl.: CENH3, TaMTL) előállításával közönséges búzában és más, gazdaságilag fontos növényfajban (Ravi és Chen 2010, Kalinowska és mtsai. 2019, Tang és mtsai. 2023). Eredményeik egyelőre még nem váltak a kenyérbúza nemesítési programok meghatározó részévé.

2.1.2. DH növényelőállítási módszerek tönkölybúzában (*Triticum spelta* L.)

Az elmúlt két évtizedben megnövekedett a tönkölybúza termesztés jelentősége a faj számos előnyös tulajdonságának köszönhetően, úgymint kiváló alkalmazkodó képesség, jó bokrosodó és gyomelnyomó képesség, nagy biomassza, stressztűrőképesség, illetve beltartalmi tulajdonságok (Kema 1992, Zielinski és mtsai. 2008, Raman és mtsai. 2009, Gomez-Becerra és

mtsai. 2010, Escarnot és mtsai. 2011, Koutroubas és mtsai. 2012, Guzmán és mtsai. 2014, Vu és mtsai. 2015, Flodrova és mtsai. 2016, Arzani és Ashraf 2017, Andruszczak 2018, Hlisnikovskiy és mtsai. 2019, Wanic és mtsai. 2019). A tönkölybúza genotípusok iránti érdeklődés az alap- és alkalmazott kutatási programokban is egyre fokozottabbá vált. A faj biotikus és abiotikus stressztoleranciája arra bátorítja a kutatókat és nemesítőket, hogy felhasználják ezeket a genotípusokat a kedvező tulajdonságokat kódoló allélek megkeresésére, és alkalmazzák azokat a tönkölybúza és közönséges búza rezisztencianemesítési és kutatási programokban (Raman és mtsai. 2009, Gomez-Becerra és mtsai. 2010, Wang és mtsai. 2010, Mohler és mtsai. 2012, Singh és mtsai. 2013, Peng és mtsai. 2014). A tönkölybúza nemesítési programok sokkal mérsékeltebb kapacitással folytak az elmúlt időszakban, mint kenyérbúza esetében. Számos kihívás (megdőlés, koraiság, termésmennyiség stb.) áll még a tönkölybúza nemesítők előtt, hogy a faj gazdaságosabb termesztését fokozzák, és a piacképes fajták és a belőlük készített termékek szélesebb körben elérhetővé váljanak a fogyasztók számára.

Több gazdaságilag fontos növényfaj esetében (pl.: árpa, repce, rizs, búza, tritikále, kukorica stb.) bőséggel találunk szakirodalmat a DH növényelőállítás módszerek fejlesztéséről és gyakorlati alkalmazásáról, míg kevés publikált adat olvasható a tönkölybúza DH növényelőállítási módszerekkel kapcsolatban (Schmid 1990, Escarnot és mtsai. 2014). Az utóbbi néhány évben vált elérhetővé több adat a tönkölybúza AC-vel kapcsolatban (Lantos és mtsai. 2016, 2018, 2019, Castillo és mtsai. 2019, Lantos és Pauk 2021). Escarnot és mtsai. (2014) voltak az elsők, akik a kromoszóma eliminációs módszert (tönkölybúza genotípusok kukorica pollennel történő megporzása) alkalmazták tönkölybúzában. Módszerüket néhány genotípussal tesztelték, ami alacsony hatékonysággal működött (16,1 embrió/100 megporzott kalászka és 38 növényke/100 embrió). Tönkölybúza genotípusok *in vitro* AC-ről Schmid számolt be először 1990-ben, kísérletében a regenerált növénykéek mennyisége alacsony volt (átlagosan 0,9 növényke/100 portok), az egyik jó válaszadó képességű genotípus esetében 2,4 növényke/100 portok hatékonyságot ért el. Takács és mtsai. (1994) szintén beszámoltak androgenézis indukciójáról *in vitro* AC-ben, az androgenézis indukciójának gyakorisága 6,4% volt, azonban az ELS-k és regenerált növénykéek számát a továbbiakban nem részletezték. Így ezek az eredmények még nem voltak meggyőzően elegendőek a gyakorlati növénynemesítés számára.

Egy hatékonyan működő *in vitro* IMC módszernek számos előnye van az *in vitro* AC-sel szemben. Az IMC-ben különálló haploid sejteket tenyésztünk szomatikus szövetek nélkül, így a regenerált növénykéek mikrospóra eredete nem lehet kétséges, szemben az *in vitro* AC-sel

(Heberle-Bors 1985, Oleszczuk és mtsai. 2004). Az IMC kevésbé idő- és munkaigényes eljárás repce esetében (Germana 2011a, 2011b, Ahmadi és mtsai. 2018). Az IMC kiváló lehetőséget kínál a mikroszpóra embriógenesis sejtszintű vizsgálatára (Indrianto és mtsai. 2001, Soriano és mtsai. 2013). Mindezen előnyök ellenére az IMC módszeréről korábban nem volt publikált adat tönkölybúzában.

2.1.3. *In vitro* szomatikus szövettenyésztés és AC tudományos háttere a rekalcitráns alakor (*Triticum monococcum* L.) fajban

Az alakort elsősorban a mezőgazdasági területek kitettebb peremvidékein termesztik, népszerűsége manapság az ökológiai gazdálkodásban egyre növekszik. Funkcionális élelmiszerként számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, úgymint magas makro-, mikroelem (foszfor, kén, magnézium, cink, mangán stb.) és antioxidáns (konjugált polifenolok, karotinoidok, tokolok, alkil-rezorcinolok, és fitoszterolok) tartalom (Suchowilska és mtsai. 2012, Zaharieva és Monneveux 2014, Arzany és Ashraf 2017, Hlisnikovskiy és mtsai. 2019). Továbbá, egyes alakor genotípusokra biotikus és abiotikus stresszrezisztencia forrásként tekintenek a nemesítők és kutatók, melyek kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési programokban is használhatóak lehetnek (Stein és mtsai. 2000, Zaharieva és Monneveux 2014, Longin és mtsai. 2016, Miroschnichenko és mtsai. 2017). Az alakort modell fajként említik a búza genomikai kutatásokkal kapcsolatban, köszönhetően a kicsi genom méretének ($2n = 14$), nagymértékű polimorfizmusának és könnyű természetűsége miatt (Jing és mtsai. 2007, Miroschnichenko és mtsai. 2017).

Az *in vitro* szomatikus és DH növényelőállítás módszerek széleskörűen alkalmazott eljárások hexaploid gabona fajokban, úgymint búza, tritikále és az utóbbi években tönkölybúza (Purnhauser és Gyulai 1993, Kumlehn és Hensel 2009, Wuerschum és mtsai. 2012, Castillo és mtsai. 2015, Jiang és mtsai. 2017, Lantos és mtsai. 2018, 2019, Testillano 2019, Lantos és Pauk 2020, Niazian és Shariatpanahi 2020, Orłowska és mtsai. 2020). Mindazonáltal a legtöbb publikáció nehezen reagáló, rekalcitráns fajként írja le az alakort *in vitro* sejt- és szövettenyésztési szempontból. Az elmúlt években néhány publikáció hatékony szomatikus szövettenyésztési eljárásokról számolt be alakor fajban (Alikina és mtsai. 2016, Miroschnichenko és mtsai. 2017, 2018, Agil és mtsai. 2021, Orgec és mtsai. 2021). Miroschnichenko és mtsai. (2017) egy jól működő eljárást dolgoztak ki a szövettenyésztési szempontból kritikus tényezők fejlesztésével (explantum típusa, fejlődési stádium, hormonkombinációk), majd ezt a protokollt az alakor (*Triticum monococcum* L.) genetikai

transzformációja során is sikeresen felhasználták (Miroshnichenko és mtsai. 2018), mely eredmények új kutatási lehetőségeket nyitottak meg a diploid *Triticum* faj kutatási területén.

A DH növényelőállítási módszerek jelentősége megkérdőjelezhetetlen a gazdaságilag fontos növények modern nemesítési és kutatási programjaiban. Azonban nem találtunk olyan publikációt, mely alakor genotípusok *in vitro* androgenezisének sikeres indukciójáról számolt volna be korábban. Plamenov és mtsai. (2009) kísérletet tettek az androgenezis indukálására alakorban, azonban kalluszok vagy ELS-k fejlődését nem figyelték meg a tenyészetekben, míg Tan és Halloran (1982) ELS-k fejlődését írták le egy alakor genotípus *in vitro* AC-ben. Így, az *in vitro* androgenezis indukciója továbbra is megoldatlan kutatási terület maradt alakor (*Triticum monococcum* L.) fajban.

2.2. *In vitro* androgenezis indukciója kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.)

A növényi mikrspórák gametofitikus fejlődési útja stressz hatására törölhető, és a sporofitikus út aktiválható. Ez a folyamat az androgenezis indukciója, vagy más néven mikrspóra embriógenezis. A stressz indukálta sejthalál és az átprogramozás alacsony hatékonysága korlátozhatja a folyamatot. Így, az alkalmazott stresszfaktor (típusa, időtartama, koncentrációja stb.) kulcsfontosságú a folyamat kiváltásában, és szignifikáns hatása van a módszer hatékonyságára és gyakorlati alkalmazhatóságára (Shariatpanahi és mtsai. 2006b). A mikrspóra embriógenezis modell növényei elsősorban a repce, dohány és árpa, de kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) esetében is számos tanulmány készült a folyamatról (Touraev és mtsai. 1996, Indrianto és mtsai. 2001).

A stresszkezelt közönséges búza mikrspórákon teljes citológiai változás figyelhető meg abban az esetben, ha az átprogramozás megtörtént, és az androgenezis indukálódott. A stressz előkezelést követően a citoskeleton átrendeződik a mikrspórán belül, a vakuólum fragmentálódik, a sejtmag(ok) középre vándorol(nak), és csillagszerű struktúrát mutatnak azon mikrspórák, melyekben az androgenezis indukálódott (1. ábra). A stresszor(ok) megválasztásakor arra kell törekedni, hogy a kezelés hatására a csillagszerű struktúrát mutató mikrspórák aránya növekedjen a mikrspórák populációján belül (Touraev és mtsai. 1996, Indrianto és mtsai. 2001, Shariatpanahi és mtsai. 2006b).

Modern genomikai és transzkriptomikai kutatásoknak köszönhetően számos gént azonosítottak, melyek fontos szerepet játszanak az *in vitro* androgenezis indukciójában. Seifert

és mtsai. (2016) a jó válaszadó képességű 'Svilena' genotípus IMC-ben végzett széleskörű transzkriptomikai vizsgálataik alapján több ezer eltérően kifejeződő vélt transzkriptumot azonosítottak, melyek kapcsolatosak a stressz indukcióval, embriófejlődéssel, epigenetikai változásokkal. Sánchez-Díaz és mtsai. (2013) 14 gént (TaTPD1-like, TAA1b, GSTF2, GSTA2, TaNF-YA, TaAGL14, TaFLA26, CHI3, XIP-R, Tad1, WALI6, TaEXPB4, TaAGP31-LIKE, és TaME1) írtak le, melyek kapcsolatba hozhatóak kenyérbúza mikrospóra embriógenézisének folyamatával. Az androgenézis korai szakaszában az osztódó mikrospórák exine-jének felrepedése előtt aktiválódó gének vizsgálata esetében eltérő génexpressziós eredményeket kaptak a gyenge és jó válaszadó képességű fajták esetében. Ezek a gének hasznos információval járulhatnak hozzá a közönséges búza mikrospóra embriógenézisének korai szakaszában lejátszódó események mélyebb megértéséhez (Sánchez-Díaz és mtsai. 2013).



1. ábra. Közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) mikrospóra stresszkezelés előtt és után. a, Egysejtmagvas vakuólumos mikrospóra stressz kezelés előtt b, Csillagszerű struktúrát mutató egysejtmagvas mikrospóra stresszkezelés után.

IMC-ben tett megfigyelések szerint azon kenyérbúza mikrospórákban, ahol az androgenézis indukálódott, néhány napon belül a vakuólum helyét a citoplazma foglalja el, keményítő felhalmozódás figyelhető meg, és kezdetét veszi az első sejtosztódás. Később a soksejtes struktúra a keményítő felhalmozódással ellentétes oldalon töri át a mikrospóra falát, és embriók/ELS-ek fejlődése figyelhető meg (Indrianto és mtsai. 2001). Perez-Pinar és mtsai.

széleskörű metabolomikai kutatásokat végeztek 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ben, hideg stressz előkezelés alatt a keményítő tartalom lecsökkent a mikrospórákban, míg az androgenezis indukcióját követően keményítő szintézist figyeltek meg (Perez-Pinar és mtsai. 2024). A trikarbonsav ciklus energiaforrásként szolgált az androgenezis indukciójának korai szakaszában az intenzív metabolomikai változások során, az első sejtosztódást követően emelkedett glutamin koncentrációt és a glutamin-szintetáz 1 izoformájának nagy mértékű expresszióját figyelték meg (Perez-Pinar és mtsai. 2024). Remélhetőleg az újabb kutatási eredmények segítenek megérteni az egyes gének, fehérjék funkcióját és ok-okozati összefüggését a mikrospóra embriogenezis folyamatában.

2.3. A közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC hatékonyságát befolyásoló tényezők

Az alkalmazott *in vitro* AC-i módszer eredményességét több tényező befolyásolja, úgymint a donor növények genotípusa, felnevelési körülményei, az alapanyag (mikrospórák) fejlettségi állapota, az alkalmazott stressz előkezelés, indukciós táptalajok, regeneráló táptalajok összetétele és tenyésztési körülmények. Mindezen tényezők együttesen határozzák meg az *in vitro* AC alkalmazásának sikerességét (Lantos és Pauk 2020).

2.3.1. Genotípus szerepe az *in vitro* androgenezis indukciójában

Az *in vitro* androgenezis kutatás kezdete óta ismert, hogy az AC és IMC során az alkalmazott genotípusnak meghatározó szerepe van a folyamatban. A genotípusoknak ezt a tulajdonságát válaszadó képességnek nevezzük. A válaszadó képesség öröklődése főleg additív genetikai hatások által meghatározott (Lazar és mtsai. 1984, Agache és mtsai. 1989, Szakács és mtsai. 1988, Tuvesson és mtsai. 1989), azonban nem additív genetikai hatásokat és citoplazmatikus hatást is leírtak közönséges búza *in vitro* AC-ben (Lazar és mtsai. 1984, Agache és mtsai. 1989, Ekiz és Konzak 1991a, 1991b, Orlov és mtsai. 1999). Az említett publikációk értékét emeli, hogy a kísérletek során modell genotípusok mellett nemesítési szempontból értékes genotípusokat is bevontak a vizsgálatokba.

A kiemelkedően magas válaszadó képességgel rendelkező genotípusok (például 'Chris', 'Pavon', 'Svilena') az *in vitro* androgenezis kutatás modell genotípusaivá váltak (Lazar és

mtsai. 1984, Lantos és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Nielsen és mtsai. 2015, Seifert és mtsai. 2016), míg néhány genotípust rekalcitráns (nem válaszadó) vagy alacsony válaszadó képességű genotípusként ('Berengar', 'Walter', 'Caramba') írtak le *in vitro* AC-ben (Torp és mtsai. 2001, Lantos és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015). Az eltérő válaszadó képességgel rendelkező genotípusok jól alkalmazhatók módszertani fejlesztési kísérletekben, ahol fő célkitűzés a DH növényelőállítás gyakoriságának fokozása, a genotípus és genotípus×kezelés kölcsönhatás mértékének csökkentése.

Heterózis hatást és additív genetikai hatásokat egyaránt megfigyeltek közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC-ben (Lazar és mtsai. 1984, Deaton és mtsai. 1987, Agache és mtsai. 1989, Tuvešson és mtsai. 2000, 2003, Lantos és mtsai. 2019), mely észrevételek hasznosak lehetnek a módszer széleskörű felhasználása (térképezési populációk készítése, DH törzsek előállítása) során.

A keresztezési kombinációnként előállított DH törzsek mennyisége emelhető, ha válaszadó képes (legalább 1 zöld növényke/kalász) genotípusokat alkalmazunk a keresztezési kombinációk megtervezésekor és elkészítésekor (Tuvešson és mtsai. 2000, 2003). A stratégia előfeltétele, hogy a keresztezés előtt már legyen információnk a szülői genotípusok válaszadó képességéről, ez azonban meghosszabbítja a DH törzsek előállításának folyamatát. Az alacsony válaszadó képességű genotípusok alkalmazása csökkentheti a kombinációnként előállított DH törzsek számát, így késleltetheti a kívánt nemesítési cél elérését. Szegregáló nemesítési populációk esetében jó eséllyel emelkedhet az előállított DH törzsek mennyisége a szülői genotípusokhoz képest egy jól működő *in vitro* AC vagy IMC rendszer alkalmazásával (Lantos és Pauk 2020).

A közönséges búza *in vitro* androgenézisének genetikai térképezése során több kromoszómát (1A, 1B, 1D, 2D, 5B, 7A, 7B, 7D) illetve QTL régiót (1B, 2AL, 2BL, 5BL, 7B) leírtak már, amelyek befolyásolják a tenyészetekben fejlődött ELS-k mennyiségét, a regenerált zöld és albínó növénykéek számát *in vitro* AC-ben és IMC-ben (Szakács és mtsai. 1988, Agache és mtsai. 1989, Kaleikau és mtsai. 1989, Galiba és mtsai. 1986, Ghaemi és mtsai. 1995, Torp és mtsai. 2001, Nielsen és mtsai. 2015). Mindezek ellenére, a leírt QTL régiók gyakorlati célú felhasználása nem vált alkalmazottá a kenyérbúza nemesítési programokban. Ez alól kivételt jelentett Zhao és mtsai. (2015) munkássága, akik ajánlották a jó válaszadó képességért felelős QTL régiók alkalmazását. Kutatási és nemesítési programjukban jó agronómiai bélyegekké rendelkező magas válaszadó képességű genotípusok szelekciójára fókuszáltak (Zhao és mtsai. 2015). Mindazonáltal, ezen QTL régiók integrálása a nemesítési törzsekbe a búzanemesítőknek

nem fő célkitűzése. További rizikót jelent a nemesítés számára, hogy a QTL régiók ismeretlen, nem kívánatos tulajdonságokat is hordozhatnak (Lantos és Pauk 2020).

Az *in vitro* AC módszertani fejlesztései nyújtják a legjobb megközelítést arra, hogy eljussunk egy hatékonyabban működő módszerhez, ami biztosítja a nemesítési folyamat felgyorsítását. A kísérletek során a legfontosabb célkitűzések a DH törzsek, *in vitro* zöld növénykéek előállításának fokozása, az albinizmus mértékének mérséklése és a genotípus függőség csökkentése. Egy genotípustól független, vagy csak mérsékelten genotípus függő DH növényelőállítási módszer válhat igazán alkalmas eszközzé a modern nemesítési programok számára.

2.3.2. Donor növények felnevelési körülményei és az alapanyagok begyűjtési ideje

A donor növények felnevelési körülményei és állapotuk kulcsfontosságú tényező, mely befolyásolja az *in vitro* androgenezis (AC, IMC) hatékonyságát. A kísérletekhez rendelkezésre álló egészséges donor növények, hajtások, illetve kalászok az első kritikus tényezők a nagy mennyiségű DH növényelőállítás folyamatában. A donor növények felnevelésére két gyakran alkalmazott lehetőség létezik: a, növénynevelés kontrollált körülmények között üvegházban vagy fitotronban; b, növénynevelés tenyészkertben szántóföldi körülmények között.

A kontrollált fény- és hőmérsékleti viszonyok (üvegház, fitotron) jó lehetőséget kínálnak egész évben a donor növények felnevelésére (Ghaemi és mtsai. 1995, Torp és mtsai. 2001, Pauk és mtsai. 2003, Tuvešson és mtsai. 2000, 2003, Soriano és mtsai. 2007, 2008, Broughton 2008, 2011, Redha és Suleman 2011, Brew-Appiah és mtsai. 2013, Rubtsova és mtsai. 2013, Sánchez-Díaz és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Nielsen és mtsai. 2015, Seifert és mtsai. 2016, Barakat és mtsai. 2017, Sen 2017, Coelho és mtsai. 2018, Wang és mtsai. 2019, Orlowska és mtsai. 2020, Broughton és mtsai. 2020). Az optimalizált növénynevelési körülmények (hőmérséklet, megvilágítás, páratartalom) egészséges donor növényeket biztosítanak a kísérletekhez. Az őszi típusú genotípusok vernalizációt (6-8 hét, 3-4°C) igényelnek csírázást követően. Az alapanyagok begyűjtéséig a donor növények számára 18-21/12-15°C (nappal/éjjel) hőmérsékletet, 12-18 óra megvilágítást és 70-80% páratartalmat szükséges biztosítani (Soriano és mtsai. 2007, 2008, Sánchez-Díaz és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Coelho és mtsai. 2018, Wang és mtsai. 2019, Broughton és mtsai. 2020). Továbbá, a tápanyagok rendszeres utánpótlásáról és preventív növényvédelméről szintén gondoskodni kell. A kontrollált körülmények esetében figyelembe kell venni a magasabb költségeket

(energia). A donor növények kontrollált körülmények közötti felnevelésének legfőbb előnye, hogy egész évben használható alapanyag áll rendelkezésre metodikai fejlesztésekhez és alkalmazott kutatási programokhoz.

A tenyészkerti körülmények között felnevelt alapanyagot több kutatócsoport előnyben részesítette közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC esetében (Pauk és mtsai. 2003, Chauhan és Khurana 2011, Lantos és mtsai. 2013, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, 2019, Lazaridou és mtsai. 2017). A tenyészkertben felnevelt növények általában több hajtást nevelnek, nagyobb kalással és több portokkal rendelkeznek, melyek több életképes mikrospórát tartalmaznak a portokokon belül (Lantos és Pauk 2020). Érthető, hogy ezek a tények önmagukban is emelik az *in vitro* AC hatékonyságát (zöld növénykék száma/100 portok; zöld növénykék száma/kalász). Tapasztalataink alapján a tenyészkertben felnevelt donor alapanyagok alkalmazásával könnyebben kivitelezhető nagy mennyiségű DH növényelőállítás a nemesítés számára (Lantos és Pauk 2020).

A mikrospórák fejlettségi állapota az egyik legkritikusabb lépés az *in vitro* androgenezis sikeres indukciója szempontjából (He és OuYang 1984). Közönséges búza *in vitro* AC-ben és IMC-ben a mikrospóra embriogenezis folyamata nyomon követhető a mikrospórák első sejtosztódásától az ELS-k, embriók kialakulásáig (Indrianto és mtsai. 2001, Shariatpanahi és mtsai. 2006a, Seldimirova és mtsai. 2017, Niazian és Shariatpanahi 2020).

Közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC-ben az androgenezis folyamata a mikrospórák fejlettségi állapotának egy szűk tartományában (egysejtmagvas vakuólumos állapot) indukálható hatékonyan. Ebből a szempontból apró különbségek figyelhetők meg a publikált módszerekben és protokollokban. Több publikációban olvasható, hogy a donor hajtások begyűjtését a mikrospórák középső és kései egysejtmagvas állapotában hajtották végre (Soriano és mtsai. 2007, 2008, Broughton 2008, 2011, Chauhan és Khurana 2011, Redha és Suleman 2011, Rubtsova és mtsai. 2013, Sánchez-Díaz és mtsai. 2013, Zhao és mtsai. 2015, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué 2016, Weigt és mtsai. 2016, 2019, Lazaridou és mtsai. 2017, Broughton és mtsai. 2020, Orłowska és mtsai. 2020), míg más kutatócsoportok korai és középső egysejtmagvas vakuólumos mikrospórákat tartalmazó alapanyagot használtak az androgenezis indukciója során (Datta és Wenzel 1987, Pauk és mtsai. 1991, 1995, Tuvešson és mtsai. 2000, 2003, Datta 2005, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016). Saját tapasztalataink és kísérleteink a második csoport kutatási eredményeit erősítették meg (Pauk és mtsai. 1991, Pauk és mtsai. 1995, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016, Kanbar és mtsai. 2020, Lantos és Pauk 2020).

2.3.3. Stressz előkezelés szerepe kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* androgenezis indukciójában

A stressz előkezelés kulcsszerepet játszik a mikrospórák fejlődésmenetének átprogramozásában a gametofita útról a sporofita fejlődésmenet felé, ami az *in vitro* mikrospóra embriogenezis indukciójának első lépését jelenti. A kutatók több stressz faktort is leírtak, amely alkalmazható az androgenezis indukciójára kenyérbúzában, például: hideg, hő, éheztetés, kolchicin, ozmotikus sokk, 2-HNA (2-Hidroxi-nikotinsav), DMSO (Dimetil-szulfoxid) stb. (Liu és mtsai. 2001, Barnabás 2003, Shariatpanahi és mtsai. 2006b, Echávarri és Cistué 2016).

A leggyakrabban alkalmazott stressz faktorok a hideg előkezelés, hősokk és éheztetés önállóan, vagy egymással kombinálva. A stresszek mértékének és kombinációjának optimalizálása nélkülözhetetlen az androgenezis hatékony indukciója szempontjából, mivel az enyhe és a túlzott mértékű stressz egyaránt csökkentheti az előállított DH növények mennyiségét. A fokozott mértékű stressz csökkenti a növényregeneráció hatékonyságát, illetve emeli az albínók gyakoriságát a regenerált növények között, míg enyhe stresszkezelés esetén elmarad a mikrospórák fejlődésmenetének sporofitikus átprogramozása (Lantos és Pauk 2020, Niazián és Shariatpanahi 2020). Az alkalmazott stresszek kivitelezhetőek a donor hajtásokon vagy közvetlenül az izolált portokokon.

A donor hajtások hideg előkezelése a legegyszerűbb és leggyakrabban alkalmazott módszer a mikrospórák átprogramozására. A mikrospórák *in vitro* androgenezise indukálható a donor hajtások hosszú hideg előkezelése (2-5°C, 10 nap - 4 hét) által (Pauk és mtsai. 2003, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016, Coelho és mtsai. 2018, Wang és mtsai. 2019), míg más kutatócsoportok a rövid idejű hideg előkezelés (3-8 nap, 4-6°C) alkalmazásával indukálták az *in vitro* androgenezist közönséges búzában (Ghaemi és mtsai. 1995, Broughton 2008, 2011, Rubtsova és mtsai. 2013, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, 2019, Lazaridou és mtsai. 2017, Sen 2017).

Továbbá, a kenyérbúza *in vitro* androgenezise sikeresen indukálható az izolált portokok éheztetésével önállóan vagy kémiai kezelésekkkel kombinálva (Soriano és mtsai. 2007, 2008, Sánchez-Díaz és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué 2016). A mannit oldat és a kolchicin kombinált alkalmazása genotípustól függően emelte a zöld növények és DH növények mennyiségét búza *in vitro* AC-ben (Soriano és mtsai. 2007). Továbbá, mannit oldat és DMSO kombinálásával növelni tudták az ELS-k, zöld növények és DH növények számát az önállóan alkalmazott éheztetéses stressz előkezeléshez képest (Echávarri és Cistué 2016). A

portokok direkt előkezelése időigényes, plusz lépést (portokok átoltása előkezelés után) jelent, ami több kétékezi munkával jár az *in vitro* DH növényelőállítási módszerek alkalmazása során (Lantos és Pauk 2020).

Az izolált portokok hősokk kezelése (3 nap, 32 °C) gyakran alkalmazott stressz tényező *in vitro* AC-ben (Ouyang és mtsai. 1983, Pauk és mtsai. 2003, Shariatpanahi és mtsai. 2006b, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016), amely fokozza az *in vitro* androgenezis indukciójának hatékonyságát.

2.3.4. Indukciós tápközegek összetevői közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) AC-ben

Több indukciós tápközeg (C17, LIM, MS3M, P2, P4 és W14) ismert a publikált protokollokból, amelyeket sikeresen alkalmaztak közönséges búza *in vitro* AC-ben. A legtöbbre igaz, hogy maltóz kiegészítést kapott szénhidrát forrásként (Hunter 1987), és Ficollt, mint ozmotikus ágenszt (Datta és Wenzel 1987). Az indukciós tápközegben alkalmazott növekedés szabályzók tekintetében már szerteágazóbb adatokat találunk a szakirodalomban. Különböző hormonokat [2,4-Diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D), benzyladenin, centrophoxine, dicamba, indole-3-acetic acid, kinetin stb.] illetve azok kombinációját alkalmazták a kutatócsoportok az indukciós tápközegekben (Tuveesson és mtsai. 2000, Pauk és mtsai. 2003, Soriano és mtsai. 2007, Broughton 2008, Ming-hui és mtsai. 2011, Lantos és mtsai. 2013, Rubtsova és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, 2019, Orłowska és mtsai. 2020).

Közönséges búza *in vitro* androgenezisének indukciója során a három leggyakrabban alkalmazott tápközeg a W14 (Ouyang és mtsai. 1989, Lantos és mtsai. 2013, Rubtsova és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016, Lazaridou és mtsai. 2017, Zhao és mtsai. 2017), a P4 (Ouyang és mtsai. 1973, Pauk és mtsai. 2003) és az MS3M (Soriano 2007, Sánchez-Díaz és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué, 2016), amit *in vitro* AC-hez alkalmaztak. A módosított W14 tápközeg, nevezetesen W14mf, hatékonyan alkalmazzuk *Triticum* fajok, főleg kenyérbúza nemesítési és kutatási programjainkban (Lantos és mtsai. 2013, 2016, 2018, 2019, 2022, Lantos és Pauk 2020, Kanbar és mtsai. 2020, Pauk és mtsai. 2020).

Több szerves komponenst (burgonya kivonat, ováriumos dajka tenyésztés) leírtak a szakirodalomban, amelyek fokozzák a közönséges búza genotípusok *in vitro* AC-ének hatékonyságát (Chuang és mtsai. 1978, Datta és Wenzel 1987, Broughton 2008, 2011, Castillo és mtsai. 2015, Sen 2017, Broughton és mtsai. 2020). Az ováriumok hatása nemcsak IMC-ben,

hanem AC-ben is kutatott témává vált pozitív hatásainak köszönhetően. Feltehetően, az ováriumos dajka tenyésztés során aktív szignál molekulák támogatják a mikrospóra eredetű ELS-k fejlődését és közvetetten a növényregenerálást (Zur és mtsai. 2015, Niazian és Shariatpanahi 2020). Az ováriummal kondicionált tápközeget (OVCM) hatékony indukciós tápközegként írták le búza *in vitro* AC-ben (Soriano és mtsai. 2007, 2008, Broughton 2011, Sánchez-Díaz 2013, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué 2016). Az OVCM előkészítése azonban idő- és munkaigényes, mellyel számolni kell a módszer alkalmazása esetén (Lantos és Pauk 2020). Továbbá, ezeknek a lépéseknek az alkalmazása magában rejthet néhány bizonytalansági faktort, úgymint az ováriumok fejlettségi állapota vagy genotípusa, melyek befolyásolhatják a módszer hatékonyságát (Castillo és mtsai. 2015, Lantos és Pauk 2020). Letarte és mtsai. (2006) hatékony lépéseket tettek, hogy tisztázzák az ováriumos dajkatenyésztés hatását, bizonyították az arabinogalaktánok és arabinogalaktán fehérjék (AGPs) pozitív hatását közönséges búza *in vitro* androgenezis indukciójában (Letarte és mtsai. 2006). Az exogén AGP-k pozitívan befolyásolták az első sejtosztódásokat és az ELS-k fejlődését búza *in vitro* AC-ben (Broughton 2008, Testillano 2019), valamint a növényregenerációt árpa *in vitro* AC-ben (Makowska és mtsai. 2017).

Az indukciós tápközegek fejlesztése során fontos azonosítani azon kémiai anyagokat, melyek szerepet játszanak a mikrospórák osztódásában, a soksejtes struktúrák fejlődésében és a stressz indukálta sejthalál csökkentésében (Testillano 2019, Weigt és mtsai. 2019, Lantos és Pauk 2020, Niazian és Shariatpanahi 2020). Búza *in vitro* AC és IMC-ben számos kísérletet hajtottak végre az androgenezis fokozásának érdekében, és bizonyították az n-butanol, antioxidánsok, antibiotikumok vagy a Trichostatin A pozitív hatását (Soriano és mtsai. 2008, Asif és mtsai. 2013a, 2013b, Jiang és mtsai. 2017, Wang és mtsai. 2019, Niazian és Shariatpanahi 2020). Ezek a megközelítések új perspektívákat nyithatnak az *in vitro* androgenezisen alapuló módszerek fejlesztése során (Lantos és Pauk 2020).

2.3.5. Növényregenerálás AC eredetű struktúrákból

A leggyakrabban alkalmazott növényregeneráló tápközegek a 190-2 (Tuveesson és mtsai. 2000, Pauk és mtsai. 2003, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016, Lazaridou és mtsai. 2017, Orłowska és mtsai. 2020), J25-8 (Jensen 1977, Soriano és mtsai. 2007, 2008, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué 2016) és MS (Ming-hui és mtsai. 2011, Rubtsova és mtsai. 2013, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, 2019) táptalajok; az egyes kutatócsoportok

más-más regeneráló tápközeget alkalmaztak vizsgálataik során. Általában szacharóz volt az alkalmazott szénforrás. A növekedésszabályzók szempontjából hormonmentes táptalajt (Soriano és mtsai. 2007, 2008, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué 2016, Castillo és mtsai. 2021) vagy eltérő hormonkombinációkat alkalmaztak a növényregeneráció során a kutatócsoportok, úgymint Naftil-ecetsav (NAA) és kinetin (Pauk és mtsai 2003, Lantos és mtsai. 2013, Zhao és mtsai. 2015, Weigt és mtsai. 2019) vagy kinetin és zeatin (Rubtsova és mtsai. 2013). A mikrospóra eredetű ELS-k számára 22-26°C hőmérsékletet és 16 órás nappali megvilágítást kell biztosítani a növénynevelő kamrában/szobában a zöld növénykék regenerációjához.

2.3.6. Albinizmus közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* androgenezise során

Az albinizmus egy olyan komplex jelenség, melyet az előzőekben említett faktorok szinte mindegyike befolyásol. Gabona fajok *in vitro* androgenezis indukciója során az albínó növénykék regenerálása jól ismert, míg kétszikűek haploid indukciós rendszereiben alig fordul elő albínó a regenerált növénykék között. Több értékes kísérletet végeztek, hogy tisztázzák az albinizmus okait (Torp és mtsai. 2001, Ankele és mtsai. 2005, Kumari és mtsai. 2009, Torp és Andersen 2009, Nielsen és mtsai. 2015, Zhao és mtsai. 2017).

Számos tényezőt azonosítottak, melyek hozzájárulhatnak az albinizmushoz önállóan, vagy akár egymással kombináltan is: genotípus (kromoszómák, QTL régiók), donor növények felnevelési körülményei (időjárás vagy üvegház), alkalmazott stressz előkezelés, *in vitro* tenyésztési körülmények, tápközegek, növényi hormonok (pl.: citokininek, gibberellinek, abszcizinsav, brassinoszteroidok), fémionok (pl.: vas, réz, mangán), plasztid DNS mutációja vagy delécioja, gének vagy fehérjék szabályozásának megváltozása vagy metabolikus blokk, amely a kloroplasztisz bioszintézis folyamatát befolyásolja (Day és Ellis 1984, 1985, Kumari és mtsai. 2009, Nielsen és mtsai. 2015, Zhao és mtsai. 2017, Coelho és mtsai. 2018, Zur és mtsai. 2021).

Az albinizmust több szakirodalmi publikáció a közönséges búza *in vitro* AC gyakorlati alkalmazásának egyik fő akadályaként említi (Wessels és Botes 2014, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2016, Orłowska és mtsai. 2020). Mindezek alapján az *in vitro* AC fejlesztése során az albínó növénykék gyakoriságának csökkentésére kell törekedni, mely a fent említett paraméterek optimalizálásával kivitelezhető. Kivételt képez a nemesítési anyag genotípusa, melyet a nemesítési program határoz meg. Így egy jól működő módszer

alkalmazásával hatékonyan lehet zöld növénykéket regenerálni és DH törzseket előállítani a nemesítés és kutatás számára (Pauk és mtsai. 2003, Lantos és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Echavarrí és Cistué 2016, Weigt és mtsai. 2019, Orłowska és mtsai. 2020).

2.3.7. Zöld növénykéek előállítása kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC-ben

A genotípus függőség a búza *in vitro* androgenézis hatékonyságának egyik fő befolyásoló faktora, a zöld növénykéek regenerálásának mértéke a publikált adatok alapján széles skálán változik 0-325 zöld növényke/kalász értékig (Castillo és mtsai. 2015, Echavarrí és Chistue 2016, Weigt és mtsai. 2019, Wang és mtsai. 2019, Broughton és mtsai. 2020, Orłowska és mtsai. 2020). Mindazonáltal, jelentős előrelépések történtek a genotípus függőség hatásának mérséklésében (Broughton 2008, 2011, Broughton és mtsai. 2020, Soriano és mtsai. 2008, Lantos és mtsai. 2013, Echavarrí és Chistue 2016, Wang és mtsai. 2019, Broughton és mtsai. 2020).

A publikált eredmények alapján a zöld növénykéek előállításának hatékonysága rendkívül nehezen összevethető az eltérő nemesítési kombinációk válaszadó képességének ismerete hiányában, valamint az apróbb módszertani különbözőségek következtében. Néhány tanulmány széles körben tesztelte a nemesítési alapanyagok válaszadó képességét saját módszerek ellenőrzése és igazolása érdekében. A különböző nemesítési programok esetében a zöld növénykéek regenerációjának átlagos értékei 2,00 és 9,76 zöld növényke/100 portok között változtak az alkalmazott módszertől és nemesítési anyagoktól/genotípus körtől függően (Lantos és mtsai. 2013, 2016, Weigt és mtsai. 2019, 2020, Kanbar és mtsai. 2020).

A jelenleg rendelkezésre álló módszereket több nemesítő csoport is alkalmazza közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési programokban (Lantos és mtsai. 2013, Echavarrí és Chistue 2016, Wang és mtsai. 2019, Broughton és mtsai. 2020, Pauk és mtsai. 2020).

2.3.8. Spontán és indukált kromoszóma duplikáció

Az *in vitro* DH növényelőállítási módszerek egyik legfontosabb mérőszáma az előállított DH növények mennyisége. Kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.) az alkalmazott protokollok többsége a spontán kromoszóma duplikáción alapszik, mivel a spontán DH növények gyakorisága jelentős, 17% és 80% között változik genotípustól függően (Soriano és mtsai.

2007, 2008, Broughton 2008, 2011, Lantos és Pauk 2016, Weigt és mtsai. 2019, Broughton 2020).

A közönséges búza AC-ből regenerált növénykéek ploidia fokának meghatározására számos módszer ismert; pl.: gázcserenyílás hosszának mérése, gázcserenyílás kloroplasztiszainak megszámlálása, kromoszómák számolása citológiai preparátumok készítésével, vagy áramlási citometriás meghatározás. Az áramlási citometriás eljárás biztosítja a leggyorsabb és a legpontosabb adatokat a regenerált növénykéek ploidia fokáról (Castillo és mtsai. 2021, Lantos és Pauk 2021).

Szükség esetén az előállított DH növények száma tovább emelhető a haploid növénykéek kolchicin kezelésével, vagy más kromoszóma duplikációs ágens (amiprofosz-metil, koffein vagy triflurain) *in vivo* vagy *in vitro* alkalmazása által (Barnabás és mtsai. 1991, 2003, Hansen és Andersen 1998, Pauk és mtsai. 2003, Soriano és mtsai. 2007, Broughton és mtsai. 2020).

2.4. Az *in vitro* androgenézis alkalmazása kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) nemesítésben és kutatásban

Mind a fajtaelőállító nemesítés, mind a kutatás szempontjából rendkívül fontos tényező az idő. A DH technológiák alkalmazásával egy generáció alatt lehet előállítani genetikailag tiszta homozigóta törzseket, ami a módszer legfőbb előnyét biztosítja. Klasszikus nemesítési eljárással ez több, akár 8-10 generációt is igényel.

A DH módszerek gyakorlati felhasználásának legismertebb módja a DH fajták és hibridek előállítása, azonban az alkalmazott kutatás (QTL analízis, MAS, *in vitro* szelekció, genetikai transzformáció, genom szerkesztés, mutáció) számára is számos lehetőséget kínál az *in vitro* AC módszere (Chauhan és Khurana 2011, Wessels és Botes 2014, Ren és mtsai. 2017, Song és mtsai. 2017, Bilichak és mtsai. 2020, Weyen 2021).

2.4.1. A megkettőzött haploidok szerepe a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) nemesítésben

A világ több nemesítő intézetében a búza DH törzsek előállítása a nemesítés szerves részét képezi (Thomas és mtsai. 2003, Tuvešson és mtsai. 2007, 2021, Weyen 2021). Viszonylag kevés publikált adat áll rendelkezésre a DH törzsek nemesítési célú felhasználásáról, de több

tízezres nagyságrendben állítják elő a DH törzseket ott, ahol a módszer hatékonyan működik (Tuvešson 2007, 2021, Broughton 2018). A közönséges búza DH törzsek felhasználásának elsődleges célterülete a fajta előállító nemesítés, azonban a búza hibridek szélesebb körű elterjedése esetén a szülői genotípusok előállításában is jelentősebb szerep juthat ezen módszereknek (Longin és mtsai. 2014). Publikált adatok alapján 263 regisztrált DH búza fajta került köztermesztésbe a világon 2016-ig (Devaux és Cistue 2016), azóta számuk már tovább növekedett.

2.4.2. A DH módszerek jelentősége térképezési populációk létrehozásában

Térképezési populációk előállítása elősegíti az agronómiai tulajdonságokért felelős gének, kromoszóma régiók azonosítását (Datta 2005), DH törzsek alkalmazásával könnyebb, illetve pontosabb az adott tulajdonságok fenotipizálása és genotipizálása. Az eredmények tudományos értékén túl a kutatásnak gyakorlati haszna is lehet, ha sikerül egy vagy néhány agronómiai szempontból fontos, nagy hatású QTL-t azonosítani.

Közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) esetében az *in vitro* AC módszere megfelelő technikának bizonyult térképezési populációk készítéséhez és kvantitatív tulajdonságok tanulmányozásához. Korábbi kutatási programokban már alkalmaztak *in vitro* AC eredetű térképezési populációkat, hogy kenyérbúzában azonosítsák a termésmennyiséget (Cuthbert és mtsai. 2008), növénymagasságot (Zhang és mtsai. 2008), fuzárium ellenállóságot (Jia és mtsai. 2005, Szabó-Hevér és mtsai. 2014) vagy szárazságtűrést (Nagy és mtsai. 2022) meghatározó QTL-eket.

2.4.3. Genetikai markerek és a DH technológia alkalmazása kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési és kutatási programokban

Már az 1990-es évek kezdete óta alkalmazzák a genetikai markereket (RLP, RAPD, AFLP, ISSR, SSR, SNP) a DH törzsek jellemzésére (Tuvešson és mtsai. 2021). Alkalmazásukkal igazolható a DH törzsek gaméta (mikrospóra, petesejt) eredete, illetve kiszűrhetők az esetlegesen heterozigóta egyedek (Tuvešson és mtsai. 1991, 2007). Fordított esetben maguk a

DH törzsek segítenek az új genetikai markerek fejlesztésében azáltal, hogy fenotípusosan könnyen és megbízhatóan jellemezhetők (Werner és mtsai. 2007, Petrovic és mtsai. 2009, Tuvešson és mtsai. 2021).

Továbbá egy adott DH populáción belül meghatározható a DH törzsek közötti genetikai variabilitás a vizsgálni kívánt tulajdonságok szempontjából. A két módszer kombinált alkalmazásával két vagy több gén gyors piramidálása is lehetséges, így a célgének közös fenotípusos hatása egy homozigóta DH törzsön belül tesztelhető (Werner és mtsai. 2005, 2007, Tuvešson és mtsai. 2021).

Nemesítési programokban a DH technológia segítségével a homozigóta állapot egy lépésben fixálható; ezt követően genetikai markerek alkalmazásával válik lehetővé egy-egy tulajdonság genotípusos azonosítása, amennyiben ismert az adott tulajdonság genetikai markere. Így laboratóriumi szinten csökkenthetővé válhat a nem kívánt tulajdonságot hordozó DH törzsek száma, és a tenyészkerti tesztelésre kerülő DH törzsek mennyisége (Brading és mtsai. 2002, Miranda és mtsai. 2006, Weyen 2021, Tuvešson és mtsai. 2021).

2.4.4. *In vitro* androgenezis és *in vitro* szelekció

Az *in vitro* AC és IMC módszerei kiváló lehetőséget kínálnak a haploid sejtszintű szelekcióra, ennek ellenére szerény a szakirodalma ezen szakterületnek kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.). Közöséges búza *in vitro* AC-ből A1 toleráns törzseket szelektáltak martonvásári kollégák (Darkó és mtsai. 2004, Bakos és mtsai. 2008). Továbbá Fadel és Wenzel (1993) az *in vitro* AC módszerét kombinálta szelekcióval, hogy fuzárium toleráns növényeket állítson elő közöséges búza F₁ keresztezési kombinációiból.

2.4.5. Haploidia és genetikai transzformáció

A cél genotípusba bejutatni kívánt transzgén egy lépésben homozigóta formában fixálható hatékony haploid sejt- és szövettenyésztési rendszer alkalmazásával. A haploid mikrospóra eredetű struktúrák transzformációja jól működő eljárás repce (*Brassica napus* L.) és árpa (*Hordeum vulgare* L.) esetében.

Kezdetben kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC eredetű ELS-eket elektroporációval transzformáltak, azonban a transzformációs hatékonyság alacsony volt (Gustafson és mtsai. 1995). IMC-ben a bioliztikus vagy részecske belövéses transzformációt alkalmazták (Mentewab és mtsai. 1999, Folling és Olesen 2001, Rustgi és mtsai. 2017), és fertilis növények előállításáig jutottak el (Rustgi és mtsai. 2017). *In vitro* AC eredetű búza ELS-k *Agrobacterium* – közvetített transzformációjával szárazságtűrő DH törzseket állítottak elő (Chauhan és Khurana 2011).

Közönséges búza haploid szöveteinek transzformációjára megoldást jelenthet a petesejtek mikroinjektálása; hazánkban is intenzív kutatások folytak ezen a területen (Pónya és mtsai. 1999, Barnabás és mtsai. 2000, 2001). Az *in vitro* androgenezis egy potenciális eszköz lehet transzgenikus búza DH törzsek előállítására.

2.4.6. Haploidia és genomszerkesztés

Az utóbbi években több kutatócsoport is törekedett a genomszerkesztés és az *in vitro* androgenezis módszerének kombinálására kenyérbúzában (Bhowmik és mtsai. 2018, Kelliher és mtsai. 2019, Bilichak és mtsai. 2020, Ferrie és mtsai. 2020). Ferrie és mtsai. 2020-ban számoltak be haploid búza (*Triticum aestivum* L.) mikrospórák genomszerkesztésének (CRISPR/Cas9) hatékony módszeréről és DH növények előállításáról, azonban a módszer genotípus függőségét figyelembe kell venni nemesítési és kutatási célú felhasználás esetén.

2.4.7. Haploidia és mutáció

Klasszikusan a mutagén kezelést követő második generációtól kezdve azonosíthatók fenotípusosan a mutáns recesszív alléleket hordozó egyedek. Azonban a DH technológiák alkalmazása a mutációs nemesítés során megkönnyítheti a recesszív allélek fixálását és azonosítását. A kezelt M₁ növények (kezelést követő generáció) *in vitro* AC-e és IMC-e kiváló lehetőséget nyújt homozigóta mutáns növények előállítására (Sen 2017, Bilgin és mtsai. 2022), hiszen az indukált mutációval keletkezett recesszív tulajdonságok fenotípusosan homozigóta formában jelennek meg a DH módszer alkalmazását követően.

Az *in vitro* androgenezisen alapuló sejt- és szövettenyésztési rendszerek (AC és IMC) lehetőséget kínálnak a közvetlenül haploid sejtek szintjén végzett mutációs kezelésekre is. Kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.) szerény szakirodalma van a haploidia és a mutagenézis együttes alkalmazásának (Ling és mtsai. 1991, Khan és mtsai. 2001). A haploid technikák és a mutagenézis közvetlen kombinálása leginkább repcében, árpában és rizsben volt eddig sikeres (Szarejko 2003).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Donor növények és felnevelési körülmények

3.1.1. Donor növények felnevelése üvegházi körülmények között

A kiválasztott donor genotípusok magjait üvegházi körülmények között vetettük el. Csírázás után 3-5 nappal a donor genotípusokat 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 genotípusok növényeit 2 l-es műanyag tenyészedényekbe palántáztuk ki, melyek homok és tőzeg 1 : 1 arányú keverékét tartalmazták. A donor növényeket kéthetente egy alkalommal tápoldatoztuk Volldünger műtrágya felhasználásával (N : P : K : Mg = 14 : 7 : 21 : 1, és 1% mikroelemek: 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, így 14 óra fotoperiódust biztosítottunk a donor hajtások begyűjtéséig. 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 tíz üvegházi körülmények között felnevelt őszi típusú közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) F₁ keresztezési kombinációt ('Hyland/GK Békés', 'Brillant/GK Bani', 'Tacitus/5003', 'Komárom/GK Bani', 'Midas/GK Békés', 'Midas/GK Csillag', 'Midas/GK Göncöl', 'Pegassos/GK Csillag', 'Xiao Yan/GK Bani' és 'Capo/GK Körös') használtunk donor genotípusként *in vitro* AC-ben.
- Tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) *in vitro* androgenezis (AC és IMC) indukciós kísérletek során a donor genotípusokat szintén üvegházi körülmények között neveltük fel. Négy tönkölybúza genotípust ('GK Fehér', 'Mv Martongold', 'Franckenkorn' és 'Oberkulmer Rotkorn') használtunk az *in vitro* AC és IMC kísérletekben. A 'GK Fehér' genotípus (fajtaelismerés éve 2017) saját nemesítési programunk terméke (Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.), míg a másik három elismert fajta ('Mv Martongold', 'Franckenkorn' és 'Oberkulmer Rotkorn') vetőmagját Dr. Láng László (mai nevén HUN-REN ATK

Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár) biztosította a kísérletekhez. A négy tönkölybúza genotípus teljes diallél populációját szintén megvizsgáltuk *in vitro* AC-ben. Továbbá tíz nemesítési célú tönkölybúza F₁ keresztezési kombinációt teszteltünk AC-i kísérleteink során. Az F₁ keresztezési kombinációk szülői között hazai köztermesztésben lévő fajták ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Lajta', 'Martongold', 'Oberkulmer Rotkorn'), előrehaladott nemesített törzsek ('Aus', 'Bartucz') és a hazai nemzeti génbankból (Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Tápíószele) származó genotípusok ('RCAT056296', 'RCAT058694', 'RCAT060960') szerepeltek (1. táblázat).

1. táblázat. Tönkölybúza *in vitro* AC-ben tesztelt F₁ keresztezési kombinációk.

Kód	Genotípus
Spc24	'RCAT056296'/'GK Fehér'/'Franckenkorn'
Spc28	'RCAT058694'/'GK Fehér'
Spc31	'Aus'/'RCAT058694'
Spc34	'Aus'/'Lajta'
Spc36	'Aus'/'GK Fehér'
Spc39	'Aus'/'RCAT056296'
Spc40	'Aus'/'Martongold'
Spc42	'Aus'/'Bartucz'
Spc43	'Aus'/'Oberkulmer Rotkorn'
Spc50	'RCAT060960'/'GK Fehér'/'Franckenkorn'

3.1.2. Donor növények felnevelése tenyészkerti körülmények között

A donor genotípusok vetőmagját október hónapban vetettük el tenyészkertünkben (Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged). A donor hajtások begyűjtéséig 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 preventív módon kétszer vegyszeresen (Talstar és Bulldock) védtük. A gyomokat vetés előtt mechanikai kezeléssel gyérítettük, vegetációs időben vegyszeres (Pointer star) és manuális gyomirtást alkalmaztunk.

Alkalmazott genotípusok:

- Közöséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC-i rendszerünk hatékonyságát több nyugat-európai nemesítési program genotípusainak bevonásával teszteltük (93 F₁ keresztezési kombináció) két egymást követő évben (2010 és 2011). Az őszi típusú közöséges búza F₁ keresztezési kombinációkat a nemesítői igények szerint választottuk ki, a szülővonalak válaszadó képessége ismeretlen volt. 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. A 93 F₁ keresztezési kombináció különböző nemesítési programokból származott, így széleskörű genetikai háttérrel reprezentált. Kontrollként a nemzetközileg ismert jó válaszadó képességű 'Svilena' és a gyenge válaszadó képességű 'Berengar' genotípusokat használtuk.
- Két őszi típusú alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípust ('G7026' és 'G7176') alkalmaztunk *in vitro* androgenezis indukciós kísérleteink fejlesztése során. A két genotípus vetőmagjai saját génbankunkból származtak (Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft., Szeged).

3.2. Donor alapanyagok begyűjtése és előkezelése

A donor alapanyagok hajtásainak begyűjtését a mikrspórák ideális fejlettségi állapotában végeztük el, üvegházban és tenyészertben felnevelt donor növények esetében egyaránt. *In vitro* AC-i kísérleteink során a begyűjtött donor alapanyagok korai és középső egysejtmagvas vakuólumos állapotú mikrspórákat tartalmaztak, míg IMC esetében a donor hajtások

kalászaiban a mikrospórák kései egysejtmagvas és korai kétsejtmagvas vakuólumos állapotúak voltak. A mikrospórák 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). Az előkezelést követően a mikrospórák fejlettségi állapotát újra ellenőriztük (Olympus CK-2 invert mikroszkóp, Olympus, Southend-on-Sea, Anglia), és az ideális állapotú mikrospórákat tartalmazó kalászokat használtuk fel kísérleteinkhez. 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 állapotú mikrospórákat tartalmazó előkezelt kalászokat 20 percig fertőtlenítettük rázóasztalon 300 ml 2% -os nátrium hipoklorit oldatban 2 csepp Tween 80 oldat hozzáadásával. A donor kalászokat lamináris boksza alatt steril desztillált vízzel (Millipore Elix 5) háromszor leöblítettük.

3.2.1. 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 (2. táblázat). Az első előkezelés esetében éheztetést alkalmaztunk (Cistué és mtsai. 2003). A begyűjtött alapanyagok ideális állapotú mikrospórákat tartalmazó sterilizált kalászaiból portokokat izoláltunk előkezelő közeget (2. táblázat) tartalmazó 60 mm-es átmérőjű üveg Petri csészébe (100 portok/Petri csésze), és négy napig 24°C-on sötét termosztátban tartottuk. A kettes számú előkezelés során az ideális állapotú mikrospórákat tartalmazó kalászokat 2 csepp csapvizet tartalmazó üveg Petri csészébe helyeztük, és 4°C-on öt napig sötétben tároltuk. A következő három előkezelés esetében (hármas, négyes és ötös előkezelés), a donor hajtásokat a fenti protokoll szerint (3.2.) csapvizet tartalmazó lombikba helyeztük, PVC zacskóval letakartuk, és 2-4°C-on hideg előkezeltük. A hármas előkezelés során a donor hajtásokat 9 napig 4°C-on hideg előkezeltük, majd a hajtások kalászait további négy napig 4°C-on tároltuk 2 csepp csapvizet tartalmazó üveg Petri csészében. A négyes előkezelés esetében a donor hajtások 14 nap hideg előkezelést kaptak, míg az ötös előkezelés során a négyes előkezelés lépését 3 napos hősoakk (32 °C) kezeléssel egészítettük ki AC-ben (2. táblázat).

2. táblázat. Donor alapanyagok különböző stressz előkezelései alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok *in vitro* AC-e során. [Lantos és mtsai. (2022) nyomán.]

Növényanyag Előkezelés	Donor hajtások		Donor kalászkok		Izolált portokok előkezelő közegben		Izolált portokok indukciós tápoldatban	
	Hideg előkezelés (4°C)	Hideg előkezelés (4°C)	Hideg előkezelés (4°C)	Hideg előkezelés (4°C)	Előkezelő közeg összetétele	Időtartam és hőmérséklet	Hősokk (32°C) időtartama	
1	-	-	-	-	0.7 M mannit + 40mM CaCl ₂ ×2H ₂ O + 0,8% alacsony olvadáspontú agaróz	4 nap, 24 °C	-	
2	-	-	5 nap	-	-	-	-	
3	9 nap	-	4 nap	-	-	-	-	
4	14 nap	-	-	-	-	-	-	
5	14 nap	-	-	-	-	-	3 nap	

3.2.2. Portokok előkezelése tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) IMC-hez

Tönkölybúza *in vitro* IMC kísérleteink során a donor hajtások kettő hetes hideg előkezelését (3.2. szerint) követően éheztetést alkalmaztunk. A hideg előkezelt sterilizált kalászból 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.

3.3. Portokok izolálása és *in vitro* AC indítása

A 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. A tönkölybúza F₁ keresztezési kombinációk (diállél kísérlet és 10 F₁ keresztezési kombináció) esetében 300 portok/Petri csésze denzitással dolgoztunk. Az *in vitro* androgenézis indukciójára a W14mf tápközeget alkalmaztuk kísérleteink során. Továbbá, tíz őszi típusú kenyérbúza F₁ keresztezési kombinációval állítottunk be egy kísérletet, melyben a W14mf (Ouyang és mtsai. 1989, Lantos és mtsai. 2013, 2014) és a P4mf (Ouyang és mtsai. 1973, Pauk és mtsai. 2003) indukciós tápközegek hatását hasonlítottuk össze (3. táblázat). Az *in vitro* AC-eket 3 napig 32°C-on (hősokk), 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-i 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 (2. táblázat) követően a tenyészeteket nyolc hétig 28°C-on sötét termosztátban tartottuk.

3.4. Tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) mikrospórák izolálása és tenyésztése

Tönkölybúza *in vitro* IMC kísérleteinket négy őszi típusú tönkölybúza genotípussal ('GK Fehér', 'Mv Martongold', 'Franckenkorn' és 'Oberkulmer Rotkorn') végeztük el. A mikrospórákat az előkezelt portokokból (3.2.2. szerint) gradiens centrifugálással izoláltuk *in vitro* körülmények között (Pauk és mtsai. 2000).

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

Mikrospóra izolálás lépései:

1. Az előkezelt portokokat 0,3 M mannit oldatban 150 µm-es szűrőn üvegrúddal eldörzsöltük steril körülmények között, majd a szuszpenziót centrifugacsövekbe helyeztük.
2. A szuszpenziót 600 ford/perc sebességgel centrifugáltuk öt percig.
3. A felülúszót eldobtuk, a mikrospórákhoz 2 ml 0,3 M mannit oldatot adtunk hozzá.
4. Az így kapott szuszpenziót 21%-os maltóz oldatra rétegeztük fel, és 600 ford/perc sebességgel 8-10 percig centrifugáltuk.
5. A centrifugálást követően a két oldat határán lévő élő mikrospórákat összegyűjtöttük transzfer pipetta segítségével, és az élő mikrospórákhoz mannit oldatot adtunk hozzá.
6. A mikrospóra szuszpenziót 600 ford/perc sebességgel centrifugáltuk 5 percig.
7. A felülúszót eldobtuk, és az izolált mikrospórákhoz hozzáadtuk az indukciós tápoldatot.
8. A mikrospórák denzitását Bürker kamra segítségével állítottuk be.

Az izolált mikrospórákat 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészékben tenyésztettük (Sarstedt Ltd., Newton, MA, USA), amelyek 1,5 ml tenyésztő tápoldatot tartalmaztak. A W14mi tenyésztő tápoldat, a W14 alaptápoldat (Ouyang és mtsai. 1989) fejlesztett változata, melyet hormon kiegészítéssel (W14mi) és hormonmentes (W14mi-0) változatban alkalmaztunk (4. táblázat). A tenyésztő tápoldatokat sterilen szűrtük, nem kuktáztuk. Az IMC denzitását $3-3,5 \times 10^4$ mikrospóra/ml sűrűsége állítottuk be Bürker kamra és mikroszkóp alkalmazásával (Olympus CK-2 invert mikroszkóp, Olympus Ltd., Southend-on-Sea, Anglia). A tenyészetekhez 200 mg/l cefotaxime antibiotikumot adtunk.

Az ováriumos dajkatenyésztés hatását vizsgáltuk tönkölybúza genotípusok *in vitro* IMC-ben. A 'GK Fehér' genotípus kalászait kettő nappal virágzás előtt gyűjtöttük be, és használtuk ovárium donorként. Sterilizett kalászközből tíz-tíz ováriumot helyeztünk minden frissen izolált IMC-be, az ováriumokat 5 hetes dajkatenyésztést követően eltávolítottuk. A kontroll tenyészetek azonos körülmények között készültek, ováriumok hozzáadása nélkül. A tenyészeteket nyolc hétig 28°C-on sötét termosztátban tartottuk. A mikrospórák osztódását, soksejtes struktúrák és ELS-k fejlődését Olympus CK-2 invert mikroszkóp (Olympus Ltd., Southend-on-Sea, Anglia) segítségével követtük nyomon.

4. **táblázat.** Tönkölybúza *in vitro* IMC-hez alkalmazott indukciós tápoldatok összetevői.

Összetevők	W14mi indukciós tápoldat (mg/l)	W14mi-0 indukciós tápoldat (mg/l)
KNO ₃	2 000	2 000
K ₂ SO ₄	700	700
NH ₄ H ₂ PO ₄	380	380
CaCl ₂ × 2H ₂ O	140	140
MgSO ₄ × 7H ₂ O	200	200
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8	27,8
MnSO ₄ × 4H ₂ O	8	8
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	3	3
H ₃ BO ₃	3	3
KI	0,5	0,5
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ × 4H ₂ O	0,005	0,005
Tiamin HCl	2	2
Piridoxin HCl	0,05	0,05
Nikotinsav	0,05	0,05
Maltóz	90 000	90 000
Glutamin	1 000	1 000
2,4-D	0,5	-
Kinetin	0,5	-
pH	5,8	5,8

3.5. 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 ELS-k fejlődését hétről hétre ellenőriztük. Az 1-2 mm méretű ELS-eket hetente egyszer az *in vitro* AC-ből és IMC-ből áthelyeztük 90 mm átmérőjű műanyag Petri csészékbe (Sarstedt Ltd., Newton, MA, USA), melyek 190-2Cu regeneráló táptalajt (5. táblázat) tartalmaztak (Pauk és mtsai. 2003). Megközelítőleg 30-50 ELS-t helyeztünk egy regeneráló táptalajra, ahol zöld és albínó növénykéket regeneráltunk a struktúrákból két-három héten belül. Az albínó növénykéket megszámloltuk és eldobtuk, míg a 20-30 mm hosszú levelekkel rendelkező zöld növénykéket gyökeresítő táptalajra helyeztük át.

A zöld növénykék *in vitro* gyökeresítése 190-2Cu táptalajon történt közönséges búza és akkor genotípusok esetében, míg tönkölybúza genotípusoknál a 190-3Cu regeneráló táptalajt alkalmaztuk (5. táblázat). A regenerált zöld növénykéket egyedenként elkülönítve üvegcsövekben gyökeresítettük. Az *in vitro* növényregenerálás és gyökeresítés során 24 ± 1 °C hőmérsékletet és 16 órás megvilágítást ($50 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) biztosítottunk az ELS-k és regenerált növénykék számára. A zöld növénykék fejlődését hétről hétre nyomon követtük, a jól fejlett zöld növénykéket kiválogattuk üvegházi kiültetéshez.

3.6. *In vitro* regenerált zöld növénykék üvegházi akklimatizációja és felnevelése

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

Az akklimatizált növénykék évszaktól, kísérlettől függően tenyészkeri (összel) vagy üvegházi (év egyéb szakában) körülmények között kerültek felnevelésre. A 93 nyugat-európai F₁ keresztezési kombinációból származó zöld növénykék felnevelése - szállítás után - a partner intézeteknél történt.

A közönséges búza keresztezési programból (10 db F₁ kombináció) származó DH₀ növénykéket, a négy tönkölybúza genotípusból és teljes diallél populációból származó DH₀ növénykéket, valamint az alakor DH₀ növénykét üvegházi körülmények között neveltük fel a fent említett (3.1.1. szerint) növénynevelési körülmények között. A fertilis növényekről (spontán diploid) a szemtermést betakarítottuk, a spontán kromoszóma duplikáció százalékos mértékét a szemtermés alapján állapítottuk meg.

5. táblázat. *In vitro* növényregeneráló és gyökeresítő táptalajok összetevői.

Összetevők	190-2Cu regeneráló táptalaj (mg/L)	190-3Cu regeneráló táptalaj (mg/L)
KNO ₃	1000	1000
MgSO ₄ × 7H ₂ O	200	200
KH ₂ PO ₄	300	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	200	200
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	100	100
KCl	40	40
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8	27,8
MnSO ₄ × 4H ₂ O	8	8
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	3	3
H ₃ BO ₃	3	3
KI	0,5	0,5
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,5	0,5
Tiamin HCl	1	1
Piridoxin HCl	0,5	0,5
Nikotinsav	0,5	0,5
Mio-Inozitol	100	100
Glicin	2	2
Szacharóz	30 000	30 000
Kinetin	0,5	-
NAA	0,5	2
pH	5,8	5,8
Gelrite	2,800	2,800

3.7. 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, jól fejlett növénykéket október hónap végén palántáztuk ki DH tenyészkerünkbe. A növénykéek számára egy alkalommal kelesztő öntözést biztosítottunk a gyökeresedés megindulásának elősegítése érdekében.

A növénykéek felnevelése során a fent említett (3.1.2. szerint) tenyészkeri növénynevelési körülményeket alkalmaztuk. A spontán diploid növényekről a szemtermést betakarítottuk, a spontán kromoszóma duplikáció százalékos mértékét a szemtermés alapján állapítottuk meg a tenyészkeri körülményekhez alkalmazkodott növények számához viszonyítva.

3.8. Tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) DH törzsek tenyészkeri vizsgálata

Előkísérletünkben a 'Tonkoly.pop1' előrehaladott nemesített törzs (advanced line) *in vitro* AC-ből DH törzseket állítottunk elő. Ezen DH törzseket tönkölybúza nemesítési programunkba bevontuk, és tenyészkeri körülmények között teszteltük. A DH₁ generációt követően hét DH törzset választottunk ki fenotípusos adataik alapján, melyeket a tönkölybúza tenyészkerben 40 m²-es parcellákon hasonlítottunk össze az eredeti kontroll populációval ('Tonkoly.pop1') két egymást követő évben (2017/2018 és 2018/2019).

A kiválasztott DH törzseket és a 'Tonkoly.pop1' előrehaladott nemesített törzset 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 (Perten Instruments, Stockholm, Svédország) eszköz segítségével végeztük el a nemzetközileg jóváhagyott módszerek szerint (AACCC International, 2010). A szemek hosszúságának méréséhez körzót 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), majd 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), és a kiőrlési százalékot kiszámoltuk.

3.9. Áramlási citometriás vizsgálatok

Az alakor kontroll növények és az *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.

Fiatal 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 sötétben. A levélminták ploidia fokát az áramlási citometriás vizsgálat után a relatív DNS tartalom alapján állapítottuk meg a hisztogramok leolvasásával (Lantos és mtsai. 2022).

3.10. Statisztikai elemzések

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

3.10.1. Genotípus és tápoldat hatásának statisztikai vizsgálata tíz közönséges búza F₁ keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben

Kéttényezős varianciaanalízissel elemeztük a genotípus, tápoldat, genotípus \times tápoldat kölcsönhatást az *in vitro* AC tulajdonságai tekintetében. A zöld növényké regenerálásának

százalékát (zöld növénykék száma/100ELS*100) ismétlések nélküli kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk. A statisztikai elemzések során a Microsoft Excel 2002 statisztikai szoftvert használtuk (Microsoft Ltd., Redmond, WA, USA).

3.10.2. Genotípus és évjárat hatásának statisztikai elemzése, 93 közönséges búza F₁ keresztezési kombináció vizsgálata *in vitro* AC-ben

A genotípus, évjárat hatását és kölcsönhatásukat kéttényezős varianciaanalízissel elemeztük *in vitro* AC-ben két nemzetközi kontroll genotípus (jó válaszadó képességű 'Svilena' és gyenge válaszadó képességű 'Berengar') alkalmazásával. A 93 keresztezési kombináció esetében az *in vitro* fejlődött zöld növénykék számát feljegyeztük, és leíró statisztikával jellemeztük az eredményeket. A statisztikai elemzések során a Microsoft Excel 2002 statisztikai szoftvert használtuk (Microsoft Ltd., Redmond, WA, USA).

3.10.3. Tönkölybúza *in vitro* AC és IMC fejlesztésének statisztikai elemzése

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 a kísérletek során mért tulajdonságok alapján. A statisztikai elemzéseket a Microsoft Excel 2013 statisztikai szoftver segítségével végeztük el (Microsoft Ltd., Redmond, WA, USA).

3.10.4. Genotípus hatás statisztikai vizsgálata teljes diallél populációval és tíz F₁ keresztezési kombinációval tönkölybúza *in vitro* AC-ben

A teljes 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 tönkölybúza *in vitro* AC-ben. 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 kétéves tenyészkerti kísérletének adatait ismétlések nélküli kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk. A statisztikai elemzések során a Microsoft Excel 2013 statisztikai szoftvert (Microsoft Ltd.,

Redmond, WA, USA) és az SPSS statisztikai programot (SPSS Hungary, Budapest, Magyarország) használtuk.

3.10.5. Alakor (*Triticum monococcum* L.) *in vitro* AC kísérletek statisztikai kiértékelése

A genotípus, előkezelés és genotípus×előkezelés kölcsönhatását kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk *in vitro* AC-ben a mért tulajdonságok alapján. A statisztikai elemzések során a Microsoft Excel 2013 statisztikai szoftvert használtuk (Microsoft Ltd., Redmond, WA, USA).

4. Eredmények

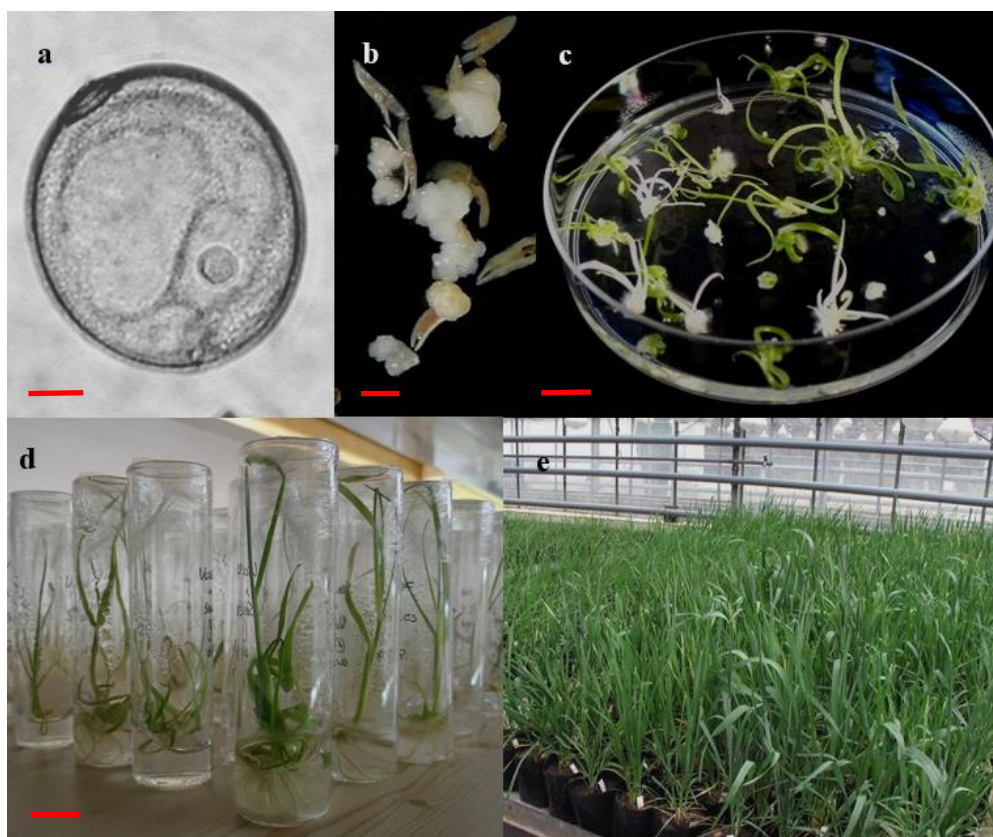
4.1. Genotípus és táptalaj hatásának vizsgálata közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) F₁ keresztezési kombinációkkal *in vitro* AC-ben

Közönséges búza F₁ keresztezési kombinációkat teszteltünk *in vitro* AC-ben, hogy meghatározzuk a genotípus, tápközeg hatását és kölcsönhatásukat az ELS-k, albínó, zöld növénykék és kiültetett növénykék számára. Megállapítottuk a zöld növény regenerálás és a spontán kromoszóma duplikáció százalékos értékét a vizsgált genotípusok *in vitro* AC-ben mért adatai alapján.

4.1.1. Genotípus, tápközeg hatás és genotípus×tápközeg kölcsönhatás vizsgálata *in vitro* AC-ben

Az *in vitro* androgenezis indukciójának hatékonyságát hasonlítottuk össze két indukciós tápközeg (W14mf és P4mf) alkalmazásával tíz őszi búza F₁ keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben. A donor hajtásokat a mikrospórák korai és középső egysejtmagvas vakuólumos állapotában gyűjtöttük be (2.a ábra). Stressz előkezelést követően az *in vitro* androgenezis indukálódott, és a mikrospóra eredetű fehér ELS-k szabad szemmel is jól megfigyelhetőek voltak az 5 hetes tenyészetekben (2.b ábra), melyekből zöld és albínó növénykék regenerálódtak 2-3 héten belül a regeneráló táptalajon (2.c ábra). A kettő-három levéllel rendelkező zöld növénykéket egyedileg elkülönítve gyökeresítettük *in vitro* körülmények között (2.d ábra), a meggyökeresedett növénykék üvegházi kiültetésre kerültek, ahol jól alkalmazkodtak az *in vivo* körülményekhez (2.e ábra).

Kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk a genotípus, tápközeg hatását és genotípus×tápközeg kölcsönhatását tíz őszi búza F₁ keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben (6. táblázat). A statisztikai elemzés alapján a tápközeg szignifikánsan ($p \leq 0,001$) befolyásolta az ELS-k és albínó növénykék számát, míg a genotípus minden vizsgált tulajdonságra szignifikáns ($p \leq 0,001$) hatást gyakorolt (ELS, albínó és zöld növénykék, kiültetett növénykék). A genotípus×tápközeg kölcsönhatás nem volt szignifikáns a vizsgált tulajdonságok tekintetében.



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

6. táblázat. Genotípus és tápközeg közönséges búza AC-re gyakorolt hatásának statisztikai elemzése kéttényezős varianciaanalízissel. [Lantos és Pauk (2016) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - ELS	MS - zöld növénykék	MS - albínók	MS - kiültett növénykék
Tápközeg	1	8160,800***	0,735 ns	364,089***	0,45 ns
Genotípus	9	4619,178***	120,322***	240,216***	114,836***
Gen.×tápk.	9	456,859ns	17,518ns	7,016ns	15,817ns
Hiba	60	442,535	19,822	18,994	18,890

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$); ns, nem szignifikáns

4.1.2. Közöséges búza F₁ keresztezési kombinációk *in vitro* androgenézisének összehasonlítása két indukciós tápközegben

A fentiek alapján a tápközeg és a genotípus befolyásolta az *in vitro* AC hatékonyságát. Szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a vizsgált tulajdonságokban a genotípusok és kezelések között. A legmagasabb ELS mennyiséget (119,67 ELS/100 portok) a 'Capo/Körös' kombináció *in vitro* AC-ben érték el a P4mf tápközeg alkalmazása mellett, míg az ELS-k száma a 'Xiao Yan/GK Bani' keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben volt a legalacsonyabb (12,00 ELS/100 portok) W14mf indukciós tápközeg alkalmazásakor (7. táblázat). A két tápközeg összehasonlítva a P4mf indukciós tápközegben fejlődött ELS-k átlaga (48,84 ELS/100 portok) 1,74-szer magasabb volt, mint a W14mf (28,14 ELS/100 portok) tápközeg alkalmazása esetében.

A zöld növénykék regenerációja sikeres volt minden kezelésben (genotípus és tápközeg) az *in vitro* AC eredetű ELS-ekből. A legmagasabb értéket (17,38 zöld növényke/100 portok) a 'Midas/GK Göncöl' kombináció *in vitro* AC-ben figyeltük meg P4mf indukciós tápközeg alkalmazásával, míg a legalacsonyabb hatékonyságot a 'Komárom/GK Bani' (0,25 zöld növényke/100 portok) kombinációnál tapasztaltuk ugyanazon tápközeg alkalmazása mellett. A tíz F₁ keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben a zöld növénykék regenerációjának átlaga 4,59 és 4,82 zöld növényke/100 portok volt a W14mf illetve P4mf tápközegek tekintetében. Közel hasonló értéket mutatott a két indukciós tápközeg a regenerált zöld növénykék számát összevetve.

Albínó növénykék regenerációját minden kezelés esetében megfigyeltük a tenyészetekben fejlődött ELS-ekből. Szignifikáns különbségeket mutattunk ki a genotípusok és indukciós tápközegek között. A legtöbb albínó növénykét (24,33 albínó/100portok) a 'Capo/GK Körös' kombináció P4mf tápközegében fejlődött ELS-ekből regeneráltuk, míg a 'Midas/GK Göncöl' kombináció *in vitro* AC-ében fejlődött ELS-ekből (W14mf) csak 2,38 albínó növényke regenerálódott 100 portokra vonatkoztatva. Az albínó növénykék átlaga 1,71-szer magasabb volt a P4mf tápközegben kapott ELS-ekből regenerált növénykék (10,12 albínó/100 portok) esetében, mint a W14mf indukciós tápközeg alkalmazása esetén (5,93 albínó/100 portok).

7. táblázat. Tíz őszi búza F₁ keresztezési kombináció válaszdado képessége *in vitro* AC-ben két indukciós tápközeg alkalmazásával. Az abc eltérő kis betűi szignifikánsan különböző értékeket jelölnek azonos genotípuson belül. Az abc eltérő nagy betűi szignifikánsan különböző értékeket jelölnek egy oszlopon belül a genotípusok között. [Lantos és Pauk (2016) nyomán.]

Genotípus	ELS		Zöld növényke		Albínók		Kültetett növénykék	
	/100 portok							
	W14mf	P4mf	W14mf	P4mf	W14mf	P4mf	W14mf	P4mf
'Hyland/GK Békés'	17,50 b C	31,38 a D	4,00 a BC	2,88 a BC	2,63 b C	5,00 a C	3,38 a BC	2,13 a C
'Brillant/GK Bani'	15,33 b C	35,67 a CD	1,67 a C	2,83 a BC	6,83 b B	13,50 a B	1,50 a C	2,67 a BC
'Tacitus/5003'	44,00 a B	47,00 a CD	8,13 a AB	5,38 b BC	6,63 b B	11,00 a BC	8,13 a AB	6,00 b BC
'Komárom/GK Bani'	12,63 a C	20,00 a D	1,00 a C	0,25 a C	3,63 a BC	5,25 a C	1,00 a C	0,25 a C
'Midas/GK Békés'	21,38 a C	26,54 a D	5,63 a BC	2,21 b C	3,38 b BC	6,63 a C	5,63 a B	2,42 b C
'Midas/GK Csillag'	25,88 b BC	49,13 a CD	4,13 a BC	4,63 a BC	4,38 b BC	8,63 a C	3,88 a BC	4,63 a BC
'Midas/Göncöl'	25,13 b C	51,63 a C	10,63 b A	17,38 a A	2,38 b C	7,50 a C	10,38 b A	16,50 a A
'Pegassos/GK Csillag'	31,88 b BC	75,25 a B	3,88 b BC	6,63 a B	5,75 b BC	13,38 a B	3,50 b BC	6,38 a B
'Xiao Yan/GK Bani'	12,00 b C	32,17 a D	0,50 a C	0,50 a C	3,50 b BC	6,00 a C	0,50 a C	0,33 a C
'Capo/GK Körös'	75,67 b A	119,67 a A	6,33 a B	5,5 a BC	20,17 b A	24,33 a A	6,17 a B	5,00 a BC
Átlag	28,14	48,84	4,59	4,82	5,93	10,12	4,40	4,63

A legtöbb zöld növénykét a 'Midas/GK Göncöl' kombináció P4mf tápközeggel készített *in vitro* AC-éből származó növénykéek közül ültettük ki (16,5 kiültetett növényke/100 portok), míg a legalacsonyabb eredményt (0,25 kiültetett növényke/100 portok) a 'Komárom/GK Bani' kombináció adta ugyanazon indukciós tápközeg alkalmazása mellett. Összességében mérsékelt különbséget tapasztaltunk a két tápoldat hatása között a kiültetett növénykéek átlagai tekintetében. A W14mf ill. P4mf indukciós tápközeggel készített *in vitro* AC-ekből átlagosan 4,40 illetve 4,63 zöld növényke/100 portok került üvegházi kiültetésre.

Összegezve, 1,74-szer több ELS fejlődött a P4mf tápoldat alkalmazásával az F₁ keresztezési kombinációk *in vitro* AC-ben, és 1,71-szer több albinó növénykét regeneráltunk e struktúrákból. Ez a hatás mérsékelt volt a regenerált zöld növénykéek (1,05) és kiültetett növénykéek (1,05) tekintetében.

A tíz F₁ keresztezési kombináció esetében összehasonlítottuk a zöld növénykéek regenerálásának százalékat a két indukciós tápközeg alkalmazása esetén. A statisztikai elemzés alapján, a genotípusnak és a tápközegnek egyaránt szignifikáns ($p \leq 0,001$) hatása volt a regenerált zöld növénykéek számára (8. táblázat).

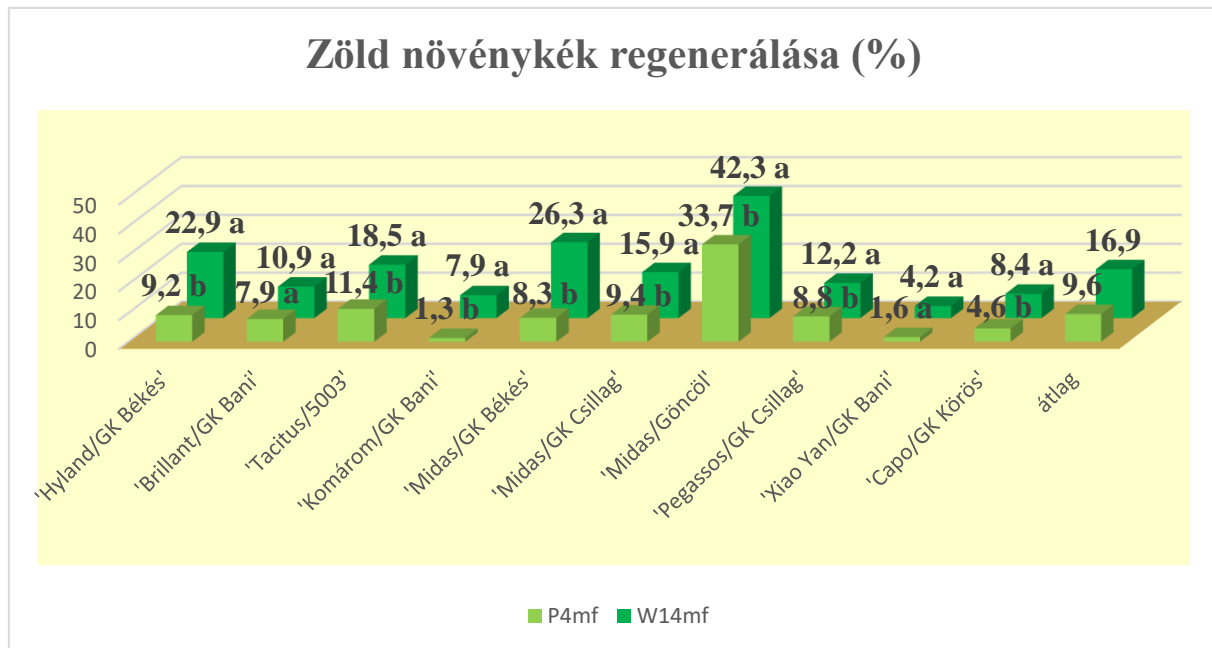
8. táblázat. A genotípus és tápközeg hatásának vizsgálata a zöld növénykéek regenerálásának százalékos értékére ismétlések nélküli kéttényezős varianciaanalízissel. [Lantos és Pauk (2016) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - Zöld növénykéek regenerációs aránya
Genotípus	10	177,9652***
Tápközeg	1	294,8179***
Hiba	10	11,36173

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$)

A zöld növénykéek regenerálásának mértéke 4,2% és 42,3% között változott a W14mf tápközeggel készített *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-k esetében genotípustól függően, míg a P4mf tápközeg alkalmazásakor 1,3% és 33,7% közötti értékeket kaptunk (3. ábra). A W14mf tápközegben fejlődött ELS-ekből nagyobb százalékban tudtunk zöld növénykéket regenerálni minden genotípusnál, és ez a különbség szignifikáns volt nyolc F₁ keresztezési kombináció

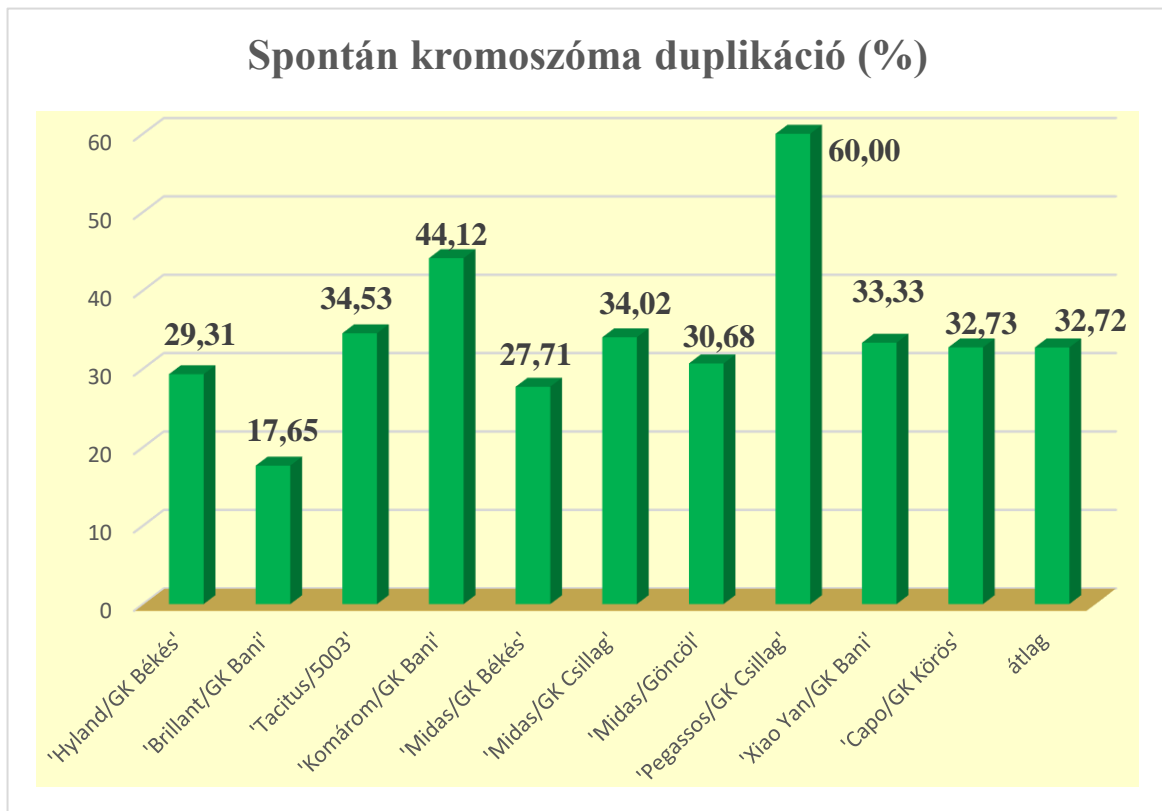
esetében. A mért tulajdonság 1,76-szor volt magasabb a W14mf indukciós tápközeg alkalmazásakor (16,9%) mint a P4mf tápközeg esetében (9,6%).



3. ábra. Zöld növénykéek regenerálása *in vitro* AC eredetű ELS-kből különböző indukciós tápközegek (P4mf és W14mf) alkalmazásával. Az adatokat kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük ismétlések nélkül. Az abc eltérő betűi szignifikánsan különböző ($p \leq 0,05$) értékeket jelölnek az adott genotípuson belül. [Lantos és Pauk (2016) nyomán.]

4.1.3. Spontán diploid növények százalékos aránya az akklimatizált *in vitro* AC eredetű növények között

Az *in vitro* AC eredetű kiültetett és akklimatizált növénykéket üvegházi körülmények között neveltük fel betakarításig. A növényeket három csoportba soroltuk fertilitásuk alapján; fertilis, részlegesen fertilis és steril növények. A fertilis és részlegesen fertilis növényeket (legalább néhány szem) tekintettük spontán diploid növényeknek, ahol a kromoszóma duplikáció spontán módon megtörtént, a sterileket pedig haploidként jegyeztük fel. Összesen 267 fertilis DH törzset állítottunk elő az F₁ keresztezési kombinációk kísérletéből, melyeket később nemesítési programunkba integráltuk. A spontán kromoszóma duplikáció 17,65% és 60,00% között változott genotípustól függően, átlagosan 32,72% értéket kaptunk (4. ábra).



- 4. ábra.** Spontán kromoszóma duplikáció százalékos értéke a különböző keresztezési kombinációkból származó *in vitro* AC eredetű növények között szemtermésük alapján. Az értékek a fertilis növények százalékos arányát mutatják az akklimatizált növényekhez viszonyítva genotípusonként. [Lantos és Pauk (2016) nyomán.]

4.2. Az évjárathatás és a széleskörű nyugat-európai genetikai háttér tesztelése közönséges búza *in vitro* AC-ben és nemesítési felhasználásuk

Kettő nemzetközi kotroll genotípus ('Svilena' és 'Berengar') bevonásával vizsgáltuk az évjárat hatását *in vitro* AC-ben, meghatároztuk a tenyészetekben fejlődött ELS-ek, regenerált növénykéek, zöld és albínó növénykéek számát. A módszer széleskörű nemesítési célú felhasználását teszteltük 93 F₁ keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben, az ELS-ekből regenerált zöld növénykéek számát értékeltük kombinációnként, nemesítési programonként.

4.2.1. Évjárat, genotípus és évjárat×genotípus kölcsönhatás vizsgálata nemzetközi kontroll genotípusokkal *in vitro* AC-ben

A jó válaszadó képességű 'Svilena' és gyenge válaszadó képességű 'Berengar' őszi típusú közönséges búza genotípusok androgenezis reakcióját teszteltük két egymást követő évben (2010 és 2011). Az *in vitro* androgenezist sikeresen indukáltuk mindkét évben és genotípusban.

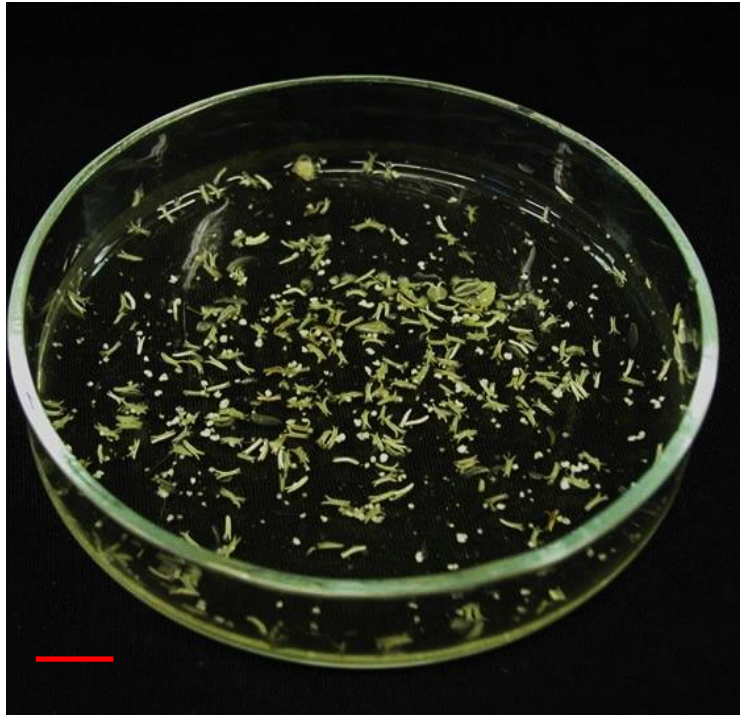
A statisztikai elemzés (kéttényezős varianciaanalízis) megmutatta, hogy a genotípus szignifikánsan befolyásolta a válaszadó képességet, míg az évjárat hatása csak az albínó növénykéek számában mutatkozott jelentősnek (9. táblázat). Az ELS-k, regenerált növénykéek, zöld és albínó növénykéek mennyiségét szignifikánsan ($p \leq 0,001$) befolyásolta a genotípus, ami hangsúlyozza a genotípus szerepét a DH növényelőállításban. Az évjárat, illetve a genotípus×évjárat kölcsönhatás nem befolyásolta az ELS-k, regenerált növénykéek és zöld növénykéek számát. Azonban az albínó növénykéek mennyiségére szignifikáns hatással volt a genotípus ($p \leq 0,001$), az évjárat ($p \leq 0,05$) és a genotípus×évjárat kölcsönhatás ($p \leq 0,05$) egyaránt (9.táblázat).

9. táblázat. Genotípus és évjárat közönséges búza *in vitro* AC-re gyakorolt hatásának statisztikai elemzése kéttényezős varianciaanalízissel. [Lantos és mtsai. (2013) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - ELS	MS - reg. növénykéek	MS - albínók	MS - zöld növénykéek
genotípus	1	153300,05***	142889,51***	437,11***	127520,45***
évjárat	1	396,05ns	3187,81ns	137,81*	4651,25ns
genotípus×évjárat	1	732,05ns	2565,11ns	117,61*	3781,25ns
hiba	16	2691,06	2766,67	19,21	2581,41

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$); *, szignifikáns ($p \leq 0,05$); ns, nem szignifikáns

Szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a két kontroll genotípus között a vizsgált tulajdonságok alapján (10. táblázat). A 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ben jelentős mennyiségű ELS fejlődött 2010-ben (169,4 ELS/100 portok) és 2011-ben (190,4 ELS/100 portok) egyaránt (5. ábra).

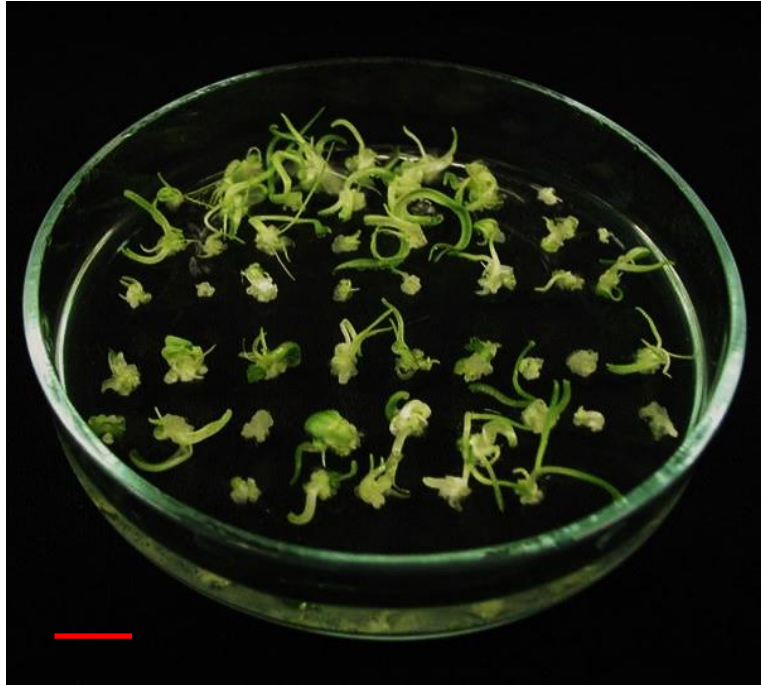


5. ábra. A jó válaszadó képességű 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ben nagy mennyiségű ELS fejlődése figyelhető meg 4 héttel az indukció után (piros vonal = 10 mm).

10. táblázat. *In vitro* AC-i eredmények 'Svilena' és 'Berengar' nemzetközi kontroll genotípusokkal két egymást követő évben, 2010 és 2011. Az abc eltérő betűi szignifikánsan különböző értékeket jelölnek minden oszlopban. Növény regeneráció százaléka = regenerált növénykékek száma/ELS-k száma * 100. [Lantos és mtsai. (2013) nyomán.]

Genotípus	Év	ELS/ 100 portok	Zöld növénykékek/ 100 portok	Albínók/ 100 portok	Reg. növénykékek/ 100 portok	Növ. reg. %-a
'Svilena'	2010	169,40 a	132,40 a	14,60 a	147,00 a	87%
	2011	190,40 a	167,70 a	4,50 b	172,20 a	90%
2 év átlaga		179,9	150,05	9,55	159,6	88,5%
'Berengar'	2010	6,40 b	0,20 b	0,40 b	0,60 b	9%
	2011	3,20 b	0,40 b	0,00 b	0,40 b	13%
2 év átlaga		4,8	0,3	0,2	0,5	11%

A 'Svilena' genotípus AC-ben fejlődött ELS-k dominánsan zöld növénykéket regeneráltak (132,4 zöld növényke/100 portok 2010-ben és 167,7 zöld növényke/100 portok 2011-ben) mindkét évben (6. ábra).



6. ábra. Növényregenerálás 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ből származó ELS-kből (piros vonal = 10 mm).

A gyenge válaszadó képességű 'Berengar' genotípus esetében az ELS-k és a regenerált növénykék mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét évben. Az évjárat nem befolyásolta az ELS-k, regenerált növénykék és zöld növénykék mennyiségét egyik genotípus esetében sem. Az albínó növénykék száma szignifikáns eltérést mutatott a 'Svilena' genotípus esetében a két év között. Az első évben háromszor több albínó növénykét regeneráltunk, mint a második évben. Az évjárat és egyéb környezeti tényezők szignifikáns változást okoztak a 'Svilena' genotípusból regenerált albínó növénykék számában.

A kétéves kísérlet átlagai alapján, a 'Svilena' genotípussal 179,9 ELS/100 portok és 150,05 zöld növényke/100 portok hatékonyságot értünk el, miközben az albínó növénykék mennyisége mérsékelt volt, 9,55 albínó/100 portok. Az ELS-k, regenerált és zöld növénykék mennyisége szignifikánsan alacsonyabb értékeket mutatott a gyenge válaszadó képességű 'Berengar' genotípus esetében. A 'Berengar' genotípus *in vitro* AC-ben átlagosan 4,8 ELS/100 portok fejlődött, melyekből 0,3 zöld növénykét tudtunk regenerálni 100 portokra vonatkoztatva.

Az albínó növénykéek regenerációja szintén alacsony értéket mutatott (0,2 albínó/100 portok). A növényregeneráció (zöld és albínó) hatékonysága szintén a 'Svilena' genotípus esetében mutatott magasabb értékeket mindkét évben (10. táblázat). A növényregenerálás adatait tekintve figyelemre méltó, hogy a 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-knek közel 90%-a regenerált zöld növénykéet mindkét évben (10. táblázat).

4.2.2. Nyugat-európai F₁ keresztezési kombinációk válaszdó képességének vizsgálata *in vitro* AC-ben

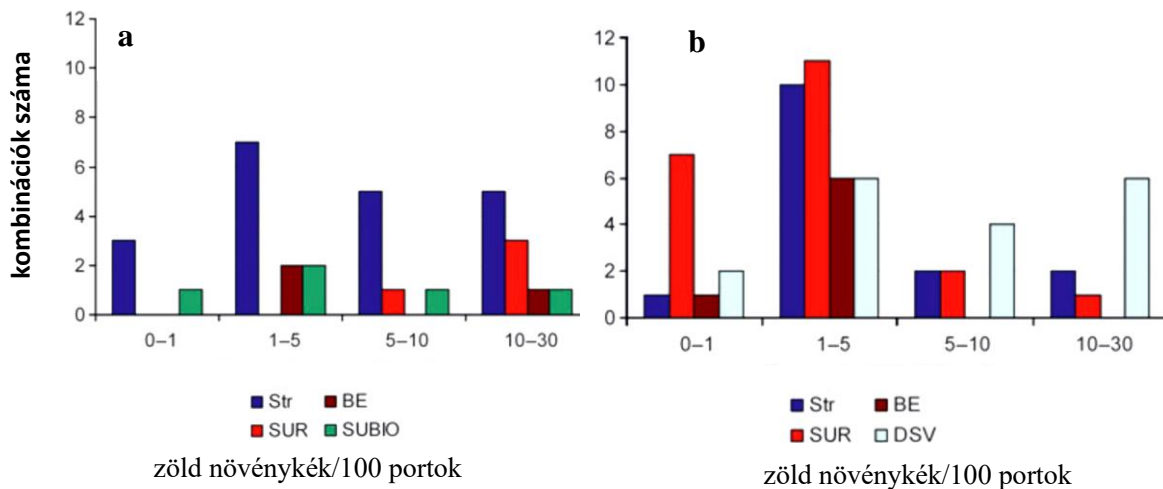
Gyakran hallottuk nemzetközi konferenciákon, illetve olvastuk tudományos publikációkban, hogy a kelet- és nyugat-európai genotípusok *in vitro* AC reakciója között lényeges a különbség. Ennek vizsgálatára állítottuk be a következő kísérleteket. A kétéves kísérlet sorozatban különböző nyugat-európai nemesítési programokból származó 93 F₁ keresztezési kombináció válaszdó képességét teszteltük, hogy megvizsgáljuk az *in vitro* AC hatékonyságát széles genetikai alapanyagon.

Az androgenezist sikeresen indukáltuk minden F₁ keresztezési kombináció esetében, mikrospóra eredetű ELS-eket állítottunk elő, és zöld növénykéket regeneráltunk mind a 93 kombinációból. Nem válaszdó genotípust nem azonosítottunk a tesztelt 93 F₁ keresztezési kombináció között, így a genotípus hatását mérsékeltnek tekintettük.

Habár minden genotípus esetében sikeres volt az *in vitro* androgenezis indukciója, a kombinációk válaszdó képességének mértékében jelentős különbségeket tapasztaltunk minden nemesítő ház nemesítési programján belül (11. táblázat). 2010-ben a regenerált zöld növénykéek számát vizsgálva a legkisebb szórást a SUR nemesítési programban mértük (5,7), ahol a regenerált zöld növénykéek átlaga 9,92 és 21,69 zöld növényke/100 portok között változott genotípustól függően. A legnagyobb szórást a SU BIO nemesítési programjában figyeltük meg (9,1), ahol a regenerált zöld növénykéek átlaga 0,1 és 22,75 között változott 100 portokra vonatkoztatva. 2011-ben a legkisebb szórás értéket a BE (1,2) nemesítési programjában kaptuk, a regenerált zöld növénykéek száma 0,75 és 4,13 zöld növényke/100 portok között változott (7. ábra), míg a DSV nemesítési program kombinációinak szórása 7,3 volt (1-28,67 zöld növényke/100 portok). A két év adatait összegezve a zöld növénykéek regenerációja 0,04 és 28,7 zöld növényke/100 portok között változott genotípustól függően. Az előállított zöld növénykéek mennyiségének szórása nagyobb volt egy-egy nemesítési programon belül, mint a nemesítési programok között az adott évben (kivéve a BE nemesítési program).

11. táblázat. Zöld növénykék előállítására 93 közönséges búza F₁ keresztezési kombinációból 2010-ben és 2011-ben. [Lantos és mtsai. (2013) nyomán.]

Év	Nemesítési program	F ₁ komb. száma	Izolált portokok száma	Jól gyökeresedett zöld növénykék száma/100 portok		In vitro zöld növénykék mennyisége
				Legkisebb érték	Legnagyobb érték	
2010	Str	20	39 000	0,50	20,32	2 577
	SUR	4	9 900	9,92	21,69	1 658
	BE	3	6 400	1,25	13,41	390
	SUBIO	5	11 100	0,10	22,75	821
Összesen		32	66 400	0,1	22,75	5 446
2011	Str	15	27 300	0,67	17,46	1 211
	SUR	21	45 000	0,04	16,00	1 314
	BE	7	12 200	0,75	4,13	269
	DSV	18	36 900	1,00	28,67	3 176
Összesen		61	121 400	0,04	28,67	5 970
2 év összege		93	187 800	0,04	28,67	11 416



7. **ábra.** A zöld növénykék regenerálásának gyakorisága különböző nemesítési programok esetében. A hisztogramok a zöld növénykék regenerálásának hatékonyságát (zöld növényke/100 portok) mutatják különböző nemesítési programok F₁ keresztezési kombinációiból készített *in vitro* AC-ek esetében; a, 2010-ben, b, 2011-ben. Str, Strube Research GmbH & Co. KG; BE, von Borris-Eckendorf GmbH & Co. KG; SUR, Saaten-Union Recherche SAS; SUBIO, Saaten-Union Biotec GmbH; DSV, Deutsche Saatveredelung AG. [Lantos és mtsai. (2013) nyomán.]

Az albinó növénykék mennyisége mérsékelt volt a 93 F₁ keresztezési kombináció kísérletében. Az albinó növénykék százalékos előfordulása 18,29% és 23,98% volt a regenerált növénykék között 2010-ben és 2011-ben (adatok nem mutatják). Az albinizmus nem korlátozta a módszer praktikus növénynemesítési célú felhasználását.

4.2.3. Zöld növénykék előállítása nyugat-európai nemesítési programok számára

Összesen, 11 416 jól gyökeresedett zöld növénykét regeneráltunk a 93 nemesítési célú F₁ keresztezési kombinációból, az átlagos zöld növény előállítási hatékonyság 5,3 zöld növényke/100 portok volt. A zöld növénykék jól alkalmazkodtak az üvegházi körülményekhez, az akklimatizáció során a túlélés aránya 97,21% és 96,34% volt 2010-ben és 2011-ben (személyes közlés Jens Weyen, Saaten-Union Biotec GmbH). Az akklimatizált növénykék télállósága megfelelő volt megközelítőleg 5%-os kipusztulás mellett, a spontán diploid növények százalékos aránya átlagosan 35% volt. Az előállított DH törzsek a Saaten-Union Biotec GmbH, Strube Research GmbH & Co. KG, Saaten-Union Recherche SAS, von Borris-Eckendorf GmbH & Co. KG és Deutsche Saatveredelung AG nemesítési programjában kerültek felhasználásra.

4.3. *In vitro* androgenézis alkalmazása közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési programban

A DH törzsek felszaporítása szigorú szelekcióval kombinálva felgyorsítja a nemesítés folyamatát. Az *in vitro* AC alkalmazásával évente 30-50 kombinációból megközelítőleg 5000-8000 *in vitro* zöld növénykét állítottunk elő közönséges búza nemesítési programunk számára (Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.). Az akklimatizált DH₀ növénykéket tenyészkerti körülmények között kerültek felnevelésre (8. ábra). A felnevelt növénykékek megközelítőleg 30-40%-a fertilis volt (spontán kromoszóma duplikáció). A tenyészkerti körülmények lehetőséget biztosítottak fenotípusos szelekcióra (növénymagasság, bokrosodás, éréscsoport, kalásztípus, rezisztencia) már DH₀ generációban.



8. ábra. *In vitro* AC eredetű DH₀ búza növénykékek felnevelése tenyészkerti körülmények között.

A DH₀ generációban kijelölt 300 DH törzset 6 soros parcellákon szaporítottuk tovább, ahol a DH törzsek homogenitása ellenőrizhető DH₁ generációban (9. ábra). A szegregáló parcellák aránya 5% alatti volt. A többi DH törzs 1 soros rendszerben (kalászutódsor) került

elvetésre. A 6 soros mikroparcellákon végzett megfigyeléseket (kalászolási idő, bokrosodás, növénymagasság, rezisztencia, szárszilárdság, termés stb.) követően 20 DH törzs került kijelölésre, melyeket két termőhelyes négy ismétléses kísérletben vizsgáltunk.



9. ábra. DH törzsek felszaporítása és szelekciója DH₁ generációban 6 soros mikroparcellákon.

Kísérleti rendszerünkben hároméves teljesítmény kísérlet után kerülhetnek a legjobban teljesítő DH törzsek állami bejelentésre. 2019 decemberében, 'GK Déva' fajtanévvel, szálkás, középérésű, DH módszer segítségével létrehozott kenyérbúza fajtát ismert el a Fajtaminősítő Tanács (10. ábra), mely 2020-ban növényfajta-oltalomban részesült (lajstromszám 000306). A fajta nemesítését egy szlovák-magyar bilaterális kutatási kooperáció keretén belül kezdtük el. A Basilica és Izidor szülőfajták F₁ generációjából tíz kalász (~1000 portok) felhasználásával indítottunk AC-ket, melyekből 30 DH törzset állítottunk elő. Tenyészkerti szelekciót követően kettő DH törzset választottunk ki fajtajelöltnek. A hároméves NÉBIH vizsgálatok alatt az 506.16 számú fajtajelölt 1,3 %-kal múlta felül termésben a középérésű standard fajtákat, és állami elismerést kapott. A 'GK Déva' malmi hasznosítási célú (jellemzően A1 farinográfos értékű), az egész országban biztonságosan termesztendő őszi típusú kenyérbúza fajta, a 11. ábra mutatja a lisztjéből készült cipót. A hároméves NÉBIH növénykórtani vizsgálatok alapján mindegyik gombabetegséggel szemben a követelményeknek jól megfelelt. Saját vizsgálataink alapján, sárga- és szárrozsdá, valamint fuzárium rezisztenciával kapcsolatos tulajdonságai emelkednek ki.



10. ábra. 'GK Déva' államilag elismert őszi típusú kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) fajta.



11. ábra. 'GK Déva' lisztjéből készített cipó.

4.4. *In vitro* androgenezis módszereinek fejlesztése tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) genotípusokkal

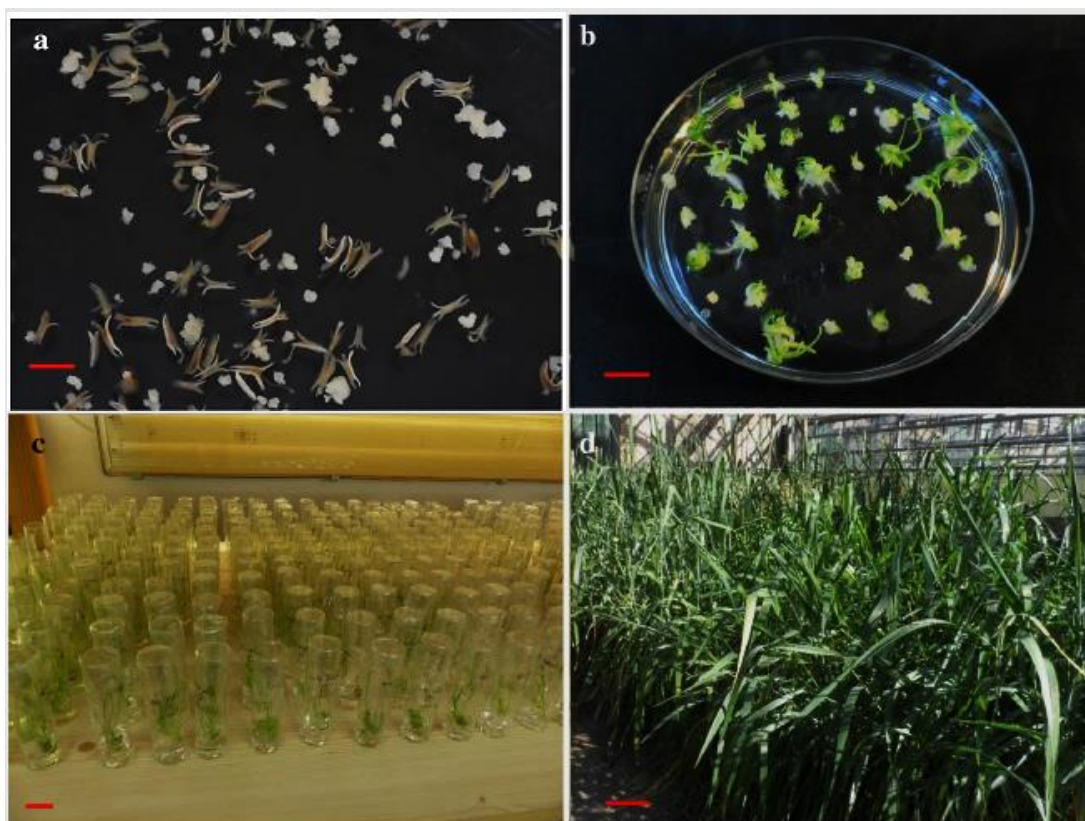
Az *in vitro* androgenezis indukcióját teszteltük tönkölybúza genotípusok AC-ben és IMC-ben. A genotípusok hatása mellett a hideg előkezelést vizsgáltuk *in vitro* AC-ben, valamint az ováriumos dajkatenyésztés és exogén hormonok hatását IMC-ben. A tenyészetekben fejlődött ELS-k, regenerált növénykéek, zöld és albínó növénykéek száma alapján a két módszert összehasonlítottuk.

4.4.1. *In vitro* androgenezis indukciója tönkölybúza genotípusok AC-ben

Négy tönkölybúza genotípussal dolgoztunk *in vitro* AC kísérletünk során. Az androgenezis folyamata indukálható volt mind a négy tesztelt genotípus esetében. Az *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-k szabad szemmel is megfigyelhetővé váltak négy héttel az AC indítását követően. Az 1-2 mm méretű megnagyobbodott ELS-eket (12.a ábra) regeneráló táptalajra helyeztük, ahol dominánsan zöld növénykéket regeneráltak két héten belül néhány albínó növényke mellett (12.b ábra). A jól fejlett, 2-3 cm-es levelekkel rendelkező növénykéket egyedileg elkülönített üvegcsövekben *in vitro* körülmények között gyökeresítettük (12.c ábra), majd üvegházi körülmények között akklimatizáltuk (12.d ábra).

4.4.2. A genotípus és a hideg előkezelés hatásának vizsgálata tönkölybúza genotípusok *in vitro* AC-ben

A genotípus és a hideg előkezelés (0 nap és 12 nap hideg előkezelés) hatását vizsgáltuk négy őszi típusú tönkölybúza genotípus *in vitro* AC-ben. Statisztikai elemzés (kéttényezős varianciaanalízis) alapján a genotípus szignifikánsan ($p \leq 0,01$) befolyásolta a vizsgált tulajdonságokat (12. táblázat); az előkezelés hatása szintén szignifikáns volt az ELS-k ($p \leq 0,001$), regenerált növénykéek ($p \leq 0,001$), zöld ($p \leq 0,001$) és albínó ($p \leq 0,01$) növénykéek számára. A genotípus \times előkezelés kölcsönhatása szignifikánsan befolyásolta az ELS-k ($p \leq 0,01$), regenerált növénykéek ($p \leq 0,05$) és zöld növénykéek ($p \leq 0,05$) mennyiségét, míg az albínó növénykéek számában nem volt kimutatható különbség.



12. ábra. Tönkölybúza *in vitro* AC lépései. (a) Mikrospóra eredetű ELS-k az *in vitro* AC 4. hetében (piros vonal = 5 mm). (b) Az ELS-k döntő többségében zöld növénykéket regeneráltak (piros vonal = 10 mm). (c) A jól fejlett növénykéket üvegsövegekben gyökeresítettük (piros vonal = 10 mm). (d) A meggyökeresedett növénykéket akklimatizálódta az üvegházi körülményekhez (piros vonal = 50 mm). [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

12. táblázat. A genotípus és a hideg előkezelés (0 és 12 nap) hatásának statisztikai elemzése (kéttényezős varianciaanalízis) négy őszi típusú tönkölybúza fajta *in vitro* AC-ben. [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - ELS	MS - regenerált növényké	MS - zöld növényké	MS - albínók
Előkezelés	1	31238,78***	17458,47***	15203,50***	77,93403**
Genotípus	3	6957,412**	3021,544**	2348,98**	43,7581**
Előkezelés×Gen.	3	5585,936**	2028,395*	1818,73*	10,01181ns
Hiba	32	1232,608	566,925	506,1938	6,902083

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$); **, szignifikáns ($p \leq 0,01$); *, szignifikáns ($p \leq 0,05$); ns, nem szignifikáns

Mindkét kezelés (0 nap és 12 nap hideg előkezelés) esetében megfigyeltük mikospóra eredetű ELS-k fejlődését *in vitro* AC-ben, azonban a hideg előkezelés hatására szignifikánsan emelkedett az AC hatékonysága (13. táblázat). Az albínók száma mérsékelt volt a regenerált növénykék között (átlagosan 3,48 albínó növényke/100 portok), hideg előkezelést követően az albínó növénykék száma 0,5 és 7,47 albínó/100 portok között változott genotípustól függően.

13. táblázat. A genotípus és a hideg előkezelés hatása (0 nap és 12 nap) tönkölybúza *in vitro* AC-ben. Az eltérő nagy betűvel (A, B, C) jelölt értékek szignifikánsan ($P < 0,05$) különböző értékeket jelölnek egy oszlopon belül. Az abc eltérő kis betűvel (a, b) jelölt értékek szignifikánsan ($P < 0,05$) különböző értékeket jelölnek a két kezelés között. [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

Genotípus	ELS/ 100 portok		Regenerált növénykék/100 portok		Zöld növénykék/ 100 portok		Albínók/ 100 portok	
	0 nap	12 nap	0 nap	12 nap	0 nap	12 nap	0 nap	12 nap
'Franckenkom'	9,17 b	134,80 a A	8,67 b	90,53 a A	5,50 b	83,07 a A	3,17 b	7,47 a A
'GK Fehér'	2,33 a	46,33 a B	1,33 b	43,33 a AB	1,00 b	38,33 a AB	0,33 b	5,00 a B
'Mv Martongold'	4,33 a	34,80 a B	3,00 a	21,87 a B	2,67 a	20,93 a B	0,33 a	0,93 a C
'Oberkulmer R.'	3,60 a	27,07 a B	1,07 a	25,47 a B	0,67 a	23,47 a B	0,40 a	0,50 a C
Átlag	4,86	60,75	3,52	45,3	2,46	41,45	1,06	3,48

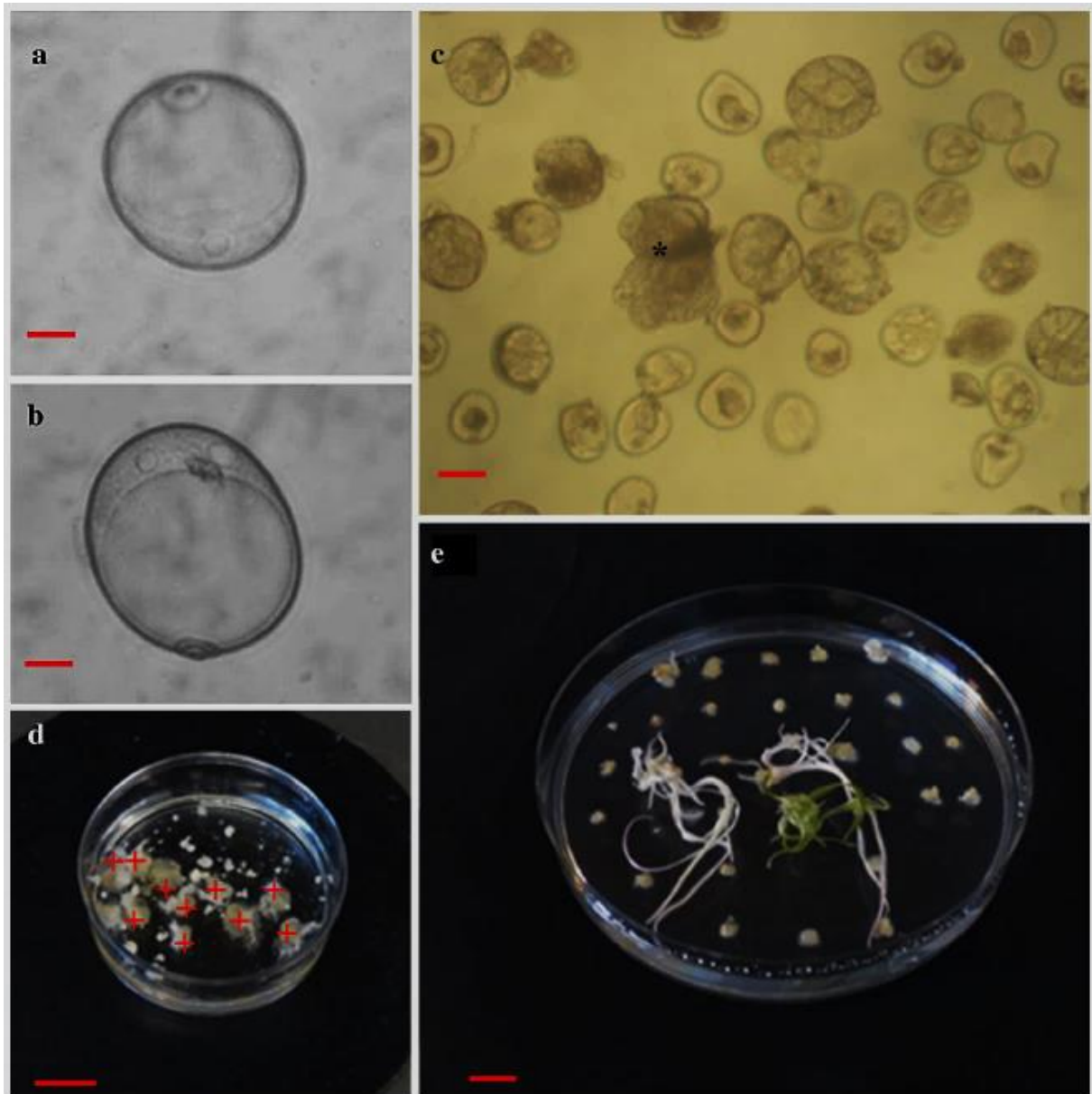
A hideg előkezelést követően a regenerált zöld növénykéek mennyisége magas volt, átlagosan 41,45 zöld növénykét regeneráltunk 100 portokból. A négy genotípus adatai alapján, a regenerált zöld növénykéek száma átlagosan 20,93 és 83,07 zöld növényke/100 portok között változott genotípustól függően. A legmagasabb értéket (83,07 zöld növényke/100 portok) a 'Franckenkorn' fajta *in vitro* AC-ben érték el. Összesen, 1720 AC eredetű zöld növénykét regeneráltunk a négy fajta *in vitro* AC-ből.

A spontán DH növények százalékát a növények fertilitása alapján határoztuk meg genotípusonként. Ez az érték 11,8%, 19,35%, 44,44% és 21,47% volt a 'Franckenkorn', 'Oberkulmer Rotkorn', 'GK Fehér' és 'Mv Martongold' genotípusokban. A spontán kromoszóma duplikáció mértéke 24,27% volt átlagosan.

4.4.3. Androgenézis indukciója tönkölybúza genotípusok *in vitro* IMC-ben

A hideg előkezelést és éheztetést követően a portokokból izolált mikrospórák populációja egyszéjtmagvas (13.a ábra) és kétszéjtmagvas (13.b ábra) vakuólumos állapotú mikrospórákat tartalmazott. A mikrospórák tenyésztése során az ováriumos dajkatenyésztés hatását vizsgáltuk. Az ováriumok jelenléte nélkülözhetetlen volt tönkölybúza genotípusok *in vitro* IMC-ben. Ováriumok hiányában soksejtes struktúrák és ELS-k fejlődését nem figyeltük meg a tenyészetekben. Az ováriumok segítették a mikrospóra eredetű struktúrák osztódását és ELS-k fejlődését (13.c és 13.d ábra). A tenyészetekben fejlődött 1-2 mm méretű ELS-eket regeneráló táptalajra helyeztük át, ahol zöld és albínó növénykéket regeneráltunk a struktúrákból (13.e ábra).

Az *in vitro* androgenézis folyamata indukálható volt mind a négy tesztelt tönkölybúza genotípus IMC-ben. A statisztikai elemzés alapján a genotípus szignifikánsan befolyásolta az ELS-k, regenerált növénykéek és albínó növénykéek számát ($p \leq 0,001$), míg a hormonok hatása szignifikáns volt az ELS-k ($p \leq 0,001$), regenerált növénykéek ($p \leq 0,01$), zöld ($p \leq 0,05$) és albínó ($p \leq 0,01$) növénykéek tekintetében (14. táblázat). A genotípus \times hormon kölcsönhatás az ELS-k ($p \leq 0,01$), regenerált növénykéek ($p \leq 0,01$) és albínó ($p \leq 0,01$) növénykéek számát szignifikánsan befolyásolta (14. táblázat).



13. ábra. Tönkölybúza *in vitro* IMC: (a) kései egysejtmagvas mikrospóra (piros vonal = 10 μm); (b) korai kétsejtmagvas mikrospóra (piros vonal = 10 μm). (c) Soksejtes struktúra (*) és osztódó mikrospórák 10 napos *in vitro* IMC-ben (piros vonal = 50 μm). (d) ELS-k fejlődtek tönkölybúza mikrospórák ováriumos (+) dajkatenyészetben (piros vonal = 10 mm). (e) Zöld és albínó növénykéek regenerálása (piros vonal = 10 mm) IMC eredetű ELS-ekből. [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

14. táblázat. Genotípus és hormonok hatásának statisztikai elemzése kéttényezős varianciaanalízissel tönkölybúza *in vitro* IMC-ben. [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - ELS	MS - reg. növ.	MS - zöld növ.	MS - albínók
Hormon	1	42336***	6016,667**	0,375*	5922,042**
Genotípus	3	227602,8***	4041,444***	0,152778ns	4024,708***
Hor.×Gen.	3	17928,33**	2988,778**	0,152778ns	2974,708**
Hiba	16	242,5	437	0,083333	428,7917

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$)

** , szignifikáns ($p \leq 0,01$)

* , szignifikáns ($p \leq 0,05$)

ns, nem szignifikáns

A négy tönkölybúza genotípus közül a ‘Franckenkorn’ IMC-ben volt a legmagasabb az ELS-k (562,33 ELS/100 portok) és regenerált növénykéek száma (105,33 regenerált növényke/100 portok), míg az ‘Oberkulmer Rotkorn’ fajta tenyészetében figyeltük meg a legalacsonyabb értékeket (1,00 ELS/100 portok, 0,00 regenerált növényke/100 portok). Az exogén hormonok nem voltak szükségesek az *in vitro* androgenézis indukciójához, de alkalmazásuk emelte a tenyészetekben fejlődött ELS-k, regenerált zöld és albínó növénykéek mennyiségét (15. táblázat).

A tenyészetekben előállított ELS-k száma magas volt a négy tönkölybúza genotípus átlagában (210,17 ELS/100 portok). Az ELS-k mennyiségét a genotípus jelentősen befolyásolta, a genotípusok között 14-szeres különbséget figyeltünk meg (15. táblázat). Az ELS-k száma 39,33 ELS/100 portok és 562,33 ELS/100 portok között változott genotípustól függően a W14mi tápoldatban.

A regenerált növénykéek száma átlagosan 34,00 növényke/100 portok volt a W14mi tápoldatban, melyet a genotípus jelentős mértékben befolyásolt (2,33-105,33 növényke/100 portok). Az ELS-ekből regenerált növénykéek döntő többsége albínó volt (15. táblázat), az albínó növénykéek száma genotípustól függően 2,33 és 105,00 albínó növényke/100 portok között változott a W14mi tápoldattal készült IMC-ekben. Összesen 3 zöld növénykét regeneráltunk a tönkölybúza genotípusok *in vitro* IMC-ben fejlődött ELS-ekből, kettőt a ‘Franckenkorn’ és egyet a ‘GK Fehér’ genotípusból.

15. táblázat. A genotípus és exogén hormonok (W14mi: 0,5mg/l 2,4-D és 0,5 mg/l kintin; W14mi-0: hormonmentes) hatása tönkölybúza *in vitro* IMC-ben. A különböző nagy betűvel (A, B, C) jelölt értékek szignifikánsan ($P<0,05$) eltérő értékeket jelölnek egy oszlopon belül. Az abc eltérő kis betűvel (a, b) jelölt értékek szignifikánsan ($P<0,05$) különböző értékeket jelölnek a két kezelés között. [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

Genotípus	ELS/ 100 portok		Regenerált növénykék/100 portok		Zöld növénykék/ 100 portok		Albínók/ 100 portok	
	W14mi	W14mi-0	W14mi	W14mi-0	W14mi	W14mi-0	W14mi	W14mi-0
'Franckenkorn'	562,33 aA	347,00 bA	105,33 aA	7,67 bA	0,33 aB	0,00 bA	105,00 aA	7,67 bA
'GK Fehér'	90,00 aB	129,00 aB	21,67 aB	1,67 aA	0,67 aA	0,00 bA	21,00 aB	1,67 aA
'Mv Martongold'	149,00 aB	27,67 aB	6,67 aB	0,00 aA	0,00 aC	0,00 aA	6,67 aB	0,00 aA
'Oberkulmer R.'	39,33 aB	1,00 aB	2,33 aB	0,00 aA	0,00 aC	0,00 aA	2,33 aB	0,00 aA
Átlag	210,17	126,17	34,00	2,33	0,25	0,00	33,75	2,33

4.4.4. *In vitro* AC és IMC összehasonlítása tönkölybúza genotípusokkal

A két *in vitro* DH növényelőállítási módszert (AC és IMC) kéttényezős varianciaanalízissel hasonlítottuk össze négy tönkölybúza genotípus esetében (16. táblázat). A statisztikai elemzés alapján a genotípus szignifikánsan befolyásolta a vizsgált paramétereket: az ELS ($p \leq 0,001$), regenerált növénykéek ($p \leq 0,001$), zöld ($p \leq 0,05$) és albínó ($p \leq 0,001$) növénykéek számát. A módszer, illetve a genotípus \times módszer kölcsönhatás a regenerált növénykéek kivételével minden vizsgált tulajdonságot (ELS, zöld és albínó növénykéek száma) szignifikánsan befolyásolt.

16. táblázat. A genotípus és *in vitro* DH növényelőállítási módszer hatásának statisztikai elemzése kéttényezős varianciaanalízissel tönkölybúza genotípusok esetében. [Lantos és mtsai. (2018) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - ELS	MS - reg. növénykéek	MS – zöld növ.	MS - albínók
Módszer	1	223253,4***	1276,9ns	16974,4***	8940,1***
Genotípus	3	207658,1***	15851,48***	2091,574*	6455,207***
Mód. \times Gen.	3	90485,23***	786,596ns	2052,26*	5188,078***
Hiba	32	1820,067	772,4847	502,3222	213,5833

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$); **, szignifikáns ($p \leq 0,01$); *, szignifikáns ($p \leq 0,05$);

ns, nem szignifikáns

A négy tönkölybúza genotípus *in vitro* androgenezis indukciója során összehasonlítottuk a két módszer hatékonyságát (13. és 15. táblázat), átlagosan több ELS-t állítottunk elő IMC-ben (210.17 ELS/100 portok), mint AC-ben (60.75 ELS/100 portok). Az ELS-kből regenerált növénykéek száma között a különbség mérsékeltebb volt, átlagosan 45,3 növénykét regeneráltunk az *in vitro* AC eredetű ELS-kből 100 portokra vonatkoztatva, míg *in vitro* IMC-ben fejlődött ELS-k esetében 34,00 volt ez az érték a négy genotípus átlagában. IMC-ben a regenerált növénykéek többsége albínó volt (33,75 albínó/100 portok), a regenerált zöld növénykéek száma pedig alacsony. Azonban, *in vitro* AC-ben a regenerált zöld növénykéek száma átlagosan 41,45 zöld növényke/100 portok volt alacsony albínó növényke gyakoriság mellett (3,85 albínó növényke/100 portok).

4.5. *In vitro* androgenezis alkalmazhatóságának vizsgálata tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) nemesítési programokban

4.5.1. *In vitro* androgenezis indukciója tönkölybúza teljes diallél populáció AC-ben

Az *in vitro* androgenezis indukálható volt a négy tesztelt genotíusból ('Oberkulmer Rotkorn', 'Martongold', 'Franckenkorn' és 'GK Fehér') készített teljes diallél populáció AC-ben, a genotípus szignifikánsan befolyásolta a módszer hatékonyságát. Az ELS-k száma 32,75-173,33 ELS/100 portok között változott genotípustól függően (17. táblázat).

17. táblázat. Tönkölybúza teljes diallél populáció *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-k száma. Az abc eltérő betűi szignifikánsan különböző értékeket jelölnek ($p \leq 0,05$). [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	apai szülőpartner			
	'Oberkulmer Rotkorn'	'Martongold'	'Franckenkorn'	'GK Fehér'
'Oberkulmer Rotkorn'	51,00 b	50,50 b	163,75 ab	120,33 ab
anyai szülőpartner	'Martongold'	34,25 b	76,00 b	82,25 ab
'Franckenkorn'	97,00 ab	155,00 ab	149,50 ab	82,75 ab
'GK Fehér'	74,25 b	32,75 b	173,33 a	88,33 ab

Az *in vitro* AC eredetű ELS-kből zöld növénykéket regeneráltunk minden tesztelt F₁ keresztezési kombináció és szülői genotípus esetében. A regenerált zöld növénykéek száma 13,75 zöld növényke/100 portok és 85,00 zöld növényke/100 portok között változott genotípustól függően (18. táblázat). A legmagasabb értéket a ‘Franckenkorn’/‘Martongold’ keresztezési kombináció AC-ben kaptuk. További két hibrid kombináció (‘Franckenkorn’/‘Martongold’, ‘Oberkulmer Rotkorn’/‘Franckenkorn’) esetében a regenerált zöld növénykéek mennyisége szignifikánsan magasabb volt összehasonlítva a saját alacsonyabb válaszó képességű szülőjével.

18. táblázat. Tönkölybúza teljes diallél populáció F₁ kombinációinak *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-kből regenerált zöld növénykéek száma. Az abc eltérő betűi szignifikánsan különböző értékeket jelölnek ($p \leq 0,05$). [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	apai szülőpartner			
	‘Oberkulmer Rotkorn’	‘Martongold’	‘Franckenkorn’	‘GK Fehér’
‘Oberkulmer Rotkorn’	20,75 c	24,00 c	56,25 ab	44,67 bc
anyai szülőpartner	19,50 c	19,00 c	35,00 bc	38,50 bc
‘Franckenkorn’	40,50 bc	85,00 a	65,00 ab	36,25 bc
‘GK Fehér’	29,25 bc	13,75 c	54,67 b	33,00 bc

Az *in vitro* AC eredetű ELS-kből regenerált albínó növénykék száma mérsékelt volt tönkölybúza teljes diallél populáció *in vitro* AC-ben (19. táblázat), így nem hátráltatta a zöld növénykék nagy mennyiségű regenerációját. A regenerált albínó növénykék száma 0,0 és 15,0 albínó/100 portok között változott genotípustól függően. A legalacsonyabb értéket (0,0 albínó növényke/100 portok) a 'Mv Martongold' fajta *in vitro* AC-ben figyeltük meg, míg a legtöbb albínó növénykét (15 albínó növényke/100 portok) a 'Franckenkorn' fajta *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-kből regeneráltuk.

19. táblázat. Tönkölybúza teljes diallél populáció *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-kből regenerált albínó növénykék száma. Az abc eltérő betűi szignifikánsan különböző értékeket jelölnek ($p \leq 0,05$). [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	apai szülőpartner		
	'Oberkulmer Rotkorn'	'Martongold' 'Franckenkorn'	'GK Fehér'
'Oberkulmer			
Rotkom'	1,25 b	1,50 b	10,75 ab
anyai			
szülő-			
partner			
'Martongold'	2,75 b	0,00 b	6,00 b
'Franckenkorn'	9,25 ab	5,00 b	15,00 a
'GK Fehér'	4,50 b	1,50 b	4,00 b
			8,00 ab
			4,25 b
			5,25 b
			9,00 ab

A statisztikai elemzések megerősítették, hogy a genotípus szignifikánsan ($p \leq 0,001$) befolyásolta az ELS-k, zöld és albínó növénykék számát (20. táblázat).

20. táblázat. Tönkölybúza *in vitro* AC-ben fejlődött ELS-k, regenerált zöld és albínó növénykék számának statisztikai elemzése egytényezős varianciaanalízissel. [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

	DF	MS értékek		
		ELS	Zöld növénykék	Albínók
Ismétlések	3	2 656,625	99,79	11,875
Genotípus	15	9 088,233***	1 465,384***	64,967***
Hiba	45	2 117,103	236,415	18,353
Összesen	63			

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$)

A GCA hatása szignifikáns ($p \leq 0,01$) volt minden tulajdonság (ELS, zöld és albínó növénykék) tekintetében. Szignifikáns reciprok hatást ($p \leq 0,05$) mutattunk ki a regenerált zöld növénykék számában (21. táblázat).

21. táblázat. A genotípusos variancia részletes elemzése az ELS-k, zöld és albínó növénykék tekintetében tönkölybúza *in vitro* AC-ben. [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

	DF	MS értékek		
		ELS	Zöld növénykék	Albínók
GCA	3	6699,7**	963,34**	51,786**
SCA	6	356,5	104,53	12,529
Reciprok hatás	6	1973,8	330,28*	2,182
Hiba	45	529,2	59,10	4,588

** , szignifikáns ($p \leq 0,01$)

* , szignifikáns ($p \leq 0,05$)

A GCA hatása szignifikáns volt a ‘Martongold’, ‘Franckenkorn’ fajták esetében mindhárom vizsgált tulajdonság tekintetében (ELS-k, zöld és albínó növénykék), míg ‘Oberkulmer Rotkorn’ fajta esetében a zöld növénykék számában ($p \leq 0,01$) volt statisztikailag igazolható szignifikáns hatás (22. táblázat).

22. táblázat. GCA hatása ELS-k, zöld és albínó növénykék számára tönkölybúza teljes diallél populáció *in vitro* AC-ben. [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Fajták	ELS	Zöld növénykék	Albínók
‘Oberkulmer Rotkorn’	-11,25	-6,4844**	-0,5937
‘Martongold’	-29,0937**	-6,7344**	-2,8750***
‘Franckenkorn’	39,2188***	16,2656***	3,2813***
‘GK Fehér’	1,125	-3,0469	0,1875

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$)

** , szignifikáns ($p \leq 0,01$)

SCA hatása szignifikánsan különbözött 0-tól a ‘Martongold’/‘Franckenkorn’ kombinációból regenerált zöld ($p \leq 0,01$) és a ‘Franckenkorn’/‘GK Fehér’ kombinációból regenerált albínó növénykék ($p \leq 0,01$) száma esetében (23. táblázat).

A jól gyökeresedett *in vitro* növénykék akklimatizációs periódus után üvegházi körülmények között lettek felnevelve. A spontán DH növények szemtermését betakarítottuk, és a DH törzseket a tönkölybúza nemesítési programunkba integráltuk.

4.5.2. *In vitro* AC vizsgálata tíz nemesítési célú tönkölybúza F₁ keresztezési kombinációban

Az *in vitro* AC hatékonyságát 10 nemesítési célú alacsony FODMAP tartalmú (fermentálható oligoszacharidok, diszacharidok, monoszacharidok és poliolo) F₁ keresztezési kombinációban teszteltük. Az androgenezis indukciója minden kombináció AC-ben sikeres volt, ELS-k fejlődését figyeltük meg a tenyészetekben, melyekből albínó és zöld növénykéket regeneráltunk.

23. táblázat. SCA hatása az a, ELS-k, b, zöld és c, albínó növénykék számára tönkölybúza *in vitro* AC-ben. [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

a, Genotípus	‘Martongold’	‘Franckenkorn’	‘GK Fehér’
‘Oberkulmer Rotkorn’	-8,40625	10,78125	15,75
‘Martongold’		13,75	-6,15625
‘Franckenkorn’			-3,96875

b, Genotípus	‘Martongold’	‘Franckenkorn’	‘GK Fehér’
‘Oberkulmer Rotkorn’	-3,48438	0,150875	8,057625
‘Martongold’		12,01563**	-2,53663
‘Franckenkorn’			-6,19238

c, Genotípus	‘Martongold’	‘Franckenkorn’	‘GK Fehér’
‘Oberkulmer Rotkorn’	0,09375	1,8125	1,15625
‘Martongold’		-0,40625	0,0625
‘Franckenkorn’			-4,34375**

** , szignifikáns ($p \leq 0,01$)

A genotípus szignifikánsan befolyásolta az ELS-k, regenerált zöld és albínó növénykék számát (24. táblázat), az ELS-k száma átlagosan 19,5 és 183,47 ELS/100 portok között változott genotípustól függően. Az ELS-k dominánsan zöld növénykéket regeneráltak a növényregenerálás első két hetében. A zöld növénykék száma genotípustól függően 6,3-51,0 zöld növényke/100 portok között változott, átlagosan 28,28 zöld növénykét állítottunk elő 100 portokra vonatkoztatva.

Albínó növénykék regenerálását is megfigyeltük a növényregeneráció során. Az albínók száma alacsony volt, 4,2 és 24,3 albínó növényke/100 portok között változott genotípustól függően. A 10 F₁ keresztezési kombináció átlagában 11,43 albínó/100 portok volt (24. táblázat).

24. táblázat. *In vitro* androgenezis hatékonysága tíz nemesítési célú F₁ tönkölybúza keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben. Az abc eltérő betűivel jelölt értékek szingifikánsan ($p \leq 0,05$) különböző értékeket jelölnek egy oszlopon belül. [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	ELS/	Albínók/	Zöld növénykék/
	100 portok	100 portok	100 portok
Spc24	110,60 ab	4,60 b	39,80 ab
Spc28	163,60 ab	4,20 b	51,00 a
Spc31	183,47 a	17,60 ab	37,20 ab
Spc34	98,80 b	8,10 b	35,40 b
Spc36	66,20 bc	11,70 b	14,30 c
Spc39	109,20 b	24,30 a	17,30 c
Spc40	55,30 bc	9,10 b	6,30 c
Spc42	169,20 ab	22,27 a	25,73 bc
Spc43	19,50 c	4,20 b	8,40 c
Spc50	126,10 ab	8,20 b	47,40 ab
Átlag	110,20	11,43	28,28
LSD5%=	73,29	8,17	14,51

Az *in vitro* AC eredetű zöld növénykék jól akklimatizálódtak az *in vivo* üvegházi körülményekhez. Az akklimatizált növénykéket (összesen 1535) október hónap végén tenyészertbe palántáztuk ki (14. ábra), és szántóföldi körülmények között neveltük fel betakarításig (25. táblázat). A növények között 436 spontán DH, fertilis egyedet azonosítottunk. A spontán kromoszóma duplikáció százalékos értéke 9,76% és 54,24% között változott genotípustól függően, a genotípusok átlaga 28,4% volt.



14. ábra. *In vitro* AC eredetű tönkölybúza növénykéek tenyészkerti felnevelése DH₀ generációkban.

25. táblázat. Spontán kromoszóma duplikáció százalékos mértéke tíz tönkölybúza F₁ keresztezési kombináció AC eredetű növénykéi között. [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	Akklimatizált növénykéek száma	Fertilis növények száma (DH)	Spontán kromoszóma duplikáció (%)
Spc24	216	42	19,44 %
Spc28	306	68	22,22 %
Spc31	144	33	22,91 %
Spc34	168	67	39,88 %
Spc36	41	4	9,76 %
Spc39	153	83	54,24 %
Spc40	17	5	29,41 %
Spc42	126	52	41,27 %
Spc43	52	23	44,23 %
Spc50	312	59	18,91 %
Átlag	1535	436	28,40 %

4.5.3. Tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) DH törzsek tenyészkerti vizsgálata

‘Tonkoly.pop1’ tönkölybúza előrehaladott nemesített törzset (kontroll) és hét AC eredetű testvér DH törzsét hasonlítottunk össze tenyészkerti körülmények között két egymást követő évben. A DH törzsek kiegyenlített megjelenését figyeltük meg a tenyészkertben (adatok nem mutatják). A DH törzsek a kontrollhoz képest hasonló adatokat mutattak a kalászolási idő, növénymagasság és termés tekintetében (26. táblázat). Az évjárat nagyobb különbséget okozott a három mért tulajdonság (kalászolási idő, növénymagasság, termés) között, mint a genotípus.

26. táblázat. A ‘Tonkoly.pop1’ előrehaladott nemesített törzs (kontroll) és testvér DH törzseinek kalászolási idő, növénymagasság és termés adatai két egymást követő év adatai alapján. Az eltérő betűvel jelölt adatok szignifikánsan különböző értékeket jelölnek egy tulajdonságon belül ($p \leq 0,05$). [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	Kalászolási idő (nap)		Növénymagasság (cm)		Termés (t/ha)	
	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19
DH1	141 ab	147 c	115 ab	120 ab	5,06 ab	5,95 b
DH2	141 ab	147 c	115 ab	120 ab	4,74 ab	5,86 b
DH3	142 ab	147 c	115 ab	125 b	4,85 ab	5,85 b
DH4	143 b	147 c	110 a	125 b	4,19 a	5,38 ab
DH5	142 ab	147 c	115 ab	125 b	4,43 a	6,09 b
DH6	143 b	147 c	110 a	115 ab	4,34 a	6,18 b
DH7	141 ab	147 c	110 a	125 b	4,24 a	6,79 b
Kontroll	140 a	147 c	115 ab	130 b	4,37 a	6,13 b
LSD5%	2,5		10,94		1,31	

A learatott termésekből meghatároztuk az egyes genotípusok hántolási kihozatalát, kiörlési százalékát, fehérje- és nedves sikértartalmát (27. táblázat). Az évjáratnak szignifikáns hatása volt a kiörlési százalékra, fehérje- és nedves sikértartalomra több genotípus esetében. A genotípus szignifikánsan befolyásolta a hántolási kihozatal, fehérjetartalom és nedves siker

adatokat mindkét évben. A kiőrlési százalék adatainak értékelése során csak az első évben tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a genotípusok között.

27. táblázat. A 'Tonkoly.pop1' előrehaladott nemesített törzs (kontroll) és testvér DH törzseinek hántolási kitermelés, kiőrlési százalék, fehérje- és nedves sikértartalom adatai két egymást követő év alapján. Az abc eltérő betűvel jelölt adatok szignifikánsan különböző értékeket jelölnek egy tulajdonságon belül ($p \leq 0,05$). [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	Hántolási kihozatal (%)			Kiőrlés (%)			Fehérje (%)			Nedves siker (%)		
	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19
DH1	67,6 d	66,9 cd	56,53 ab	60,94 bc	13,6 ab	16,0 bc	33,1 ab	35,1 bc				
DH2	66,0 bc	66,0 bc	54,00 a	61,45 bc	13,8 ab	16,1 bc	32,8 ab	35,2 bc				
DH3	67,6 d	67,2 cd	55,23 ab	60,96 bc	13,8 ab	16,1 bc	32,2 ab	35,1 bc				
DH4	66,3 c	66,2 bc	54,59 a	62,18 c	14,0 ab	15,3 bc	32,3 ab	32,9 ab				
DH5	67,9 d	67,2 cd	58,28 b	61,69 c	13,6 ab	15,1 b	31,4 a	31,8 ab				
DH6	65,7 bc	66,0 bc	57,05 ab	62,68 c	13,0 a	15,1 b	30,5 a	31,7 ab				
DH7	63,4 a	64,1 ab	54,84 a	59,71 bc	13,3 a	15,8 bc	30,3 a	34,4 b				
Kontroll	65,6 bc	65,0 b	56,5 ab	62,68 c	16,2 bc	16,8 c	35,1 bc	37,4 c				
LSD5%	1,2		3,4		1,59		2,91					

A tesztelt genotípusok szemfizikai tulajdonságait vizsgáltuk (28. táblázat). A DH törzsek szemkeménység adatai a második évben mutattak szignifikáns különbséget, a vizsgált genotípusok puhaszeműek a mért adatok alapján. A szemszélesség (2,27-2,55 mm) és a szemek hosszúsága (7,01-7,44 mm) egy szűk tartományon belül változott, míg a TKW nagyobb (28,8-34,7), de nem szignifikáns különbségeket mutatott a genotípusok között (28. táblázat).

28. táblázat. A 'Tonkoly.pop1' nemesített vonal (kontroll) és a testvér DH törzsek szem fizikai tulajdonságainak (szemkeménység, szélesség, hosszúság, ESZT) adatai két egymást követő év alapján. Az eltérő betűvel jelölt adatok szignifikánsan különböző értékeket jelölnek egy tulajdonságon belül ($p \leq 0,05$). [Lantos és mtsai. (2019) nyomán.]

Genotípus	Szemkeménység (-)		Szemszélesség (mm)		Szemhosszúság (mm)		TKW (g)	
	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19	2017/18	2018/19
DH1	16,0 ab	16,0 ab	2,350 a	2,48 a	7,14 b	7,42 d	31,3 a	32,8 a
DH2	13,0 ab	9,0 a	2,390 a	2,49 a	7,19 b	7,38 cd	31,0 a	33,9 a
DH3	16,0 ab	11,0 ab	2,420 a	2,48 a	7,2 b	7,44 d	32,3 a	33,2 a
DH4	19,0 b	14,0 ab	2,270 a	2,47 a	7,15 b	7,4 cd	29,8 a	33,4 a
DH5	17,0 b	13,0 ab	2,370 a	2,55 a	7,2 b	7,35 c	31,0 a	34,6 a
DH6	18,0 b	14,0 ab	2,290 a	2,48 a	7,11 ab	7,39 cd	28,8 a	33,4 a
DH7	14,0 ab	18,0 b	2,340 a	2,53 a	7,1 ab	7,31 c	30,2 a	34,7 a
Kontroll	18,00 b	17,0 b	2,495 a	2,34 a	7,01 a	7,21 bc	32,4 a	29,5 a
LSD5%	7,47		0,28		0,104		5,9	

4.6. *In vitro* androgenezis indukciója alakor (*Triticum monococcum* L.) fajban

Az *in vitro* androgenezis indukciója előtt a kísérletekhez felhasznált két genotípus donor kalászaiban lévő mikrspórák fejlettségi állapotát Olympus CK-2 inverted mikroszkóppal ellenőriztük. Az *in vitro* AC-ek készítése során a dominánsan egysejtmagvas vakuólumos mikrspórákat tartalmazó sárgászöld kalászok kerültek felhasználásra (15.a és b ábra). Az androgenezis mindkét genotípus *in vitro* AC-ben indukálható volt a megfelelő stressz előkezelést követően. Az első mikrspóra eredetű ELS-ek fejlődését négy hetes *in vitro* AC-ben figyeltük meg (15.c ábra). Az 1-2 mm méretű struktúrákat regeneráló táptalajra helyeztük, ahol albínó és zöld növénykéket regeneráltunk (15.d és 15.e ábra). Albínó növénykéket mindkét genotípusból regeneráltunk, míg egy zöld növénykét sikerült előállítani a 'G7176' genotípus ELS-iből. A zöld növényke jól alkalmazkodott az *in vivo* üvegházi körülményekhez (15.f ábra).

4.6.1. Genotípus, előkezelés és kölcsönhatásuk alakor genotípusok *in vitro* AC-ben

Öt különböző előkezelést hasonlítottunk össze két alakor genotípus *in vitro* AC-ben, hogy megvizsgáljuk az előkezelések hatását az *in vitro* androgenezis indukciójára (ELS, zöld és albínó növénykék száma). Statisztikai elemzések alapján az előkezelés és a genotípus szignifikánsan befolyásolta az ELS-k ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$) és albínó növénykék ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$) mennyiségét (29. táblázat). A genotípus \times előkezelés kölcsönhatás szignifikáns volt az albínó növénykék száma tekintetében ($p \leq 0,001$). A regenerált zöld növénykék adatait elemezve nem tudtunk szignifikáns hatást kimutatni.

29. táblázat. Genotípus, előkezelés és genotípus \times előkezelés kölcsönhatás statisztikai elemzése kéttényezős varianciaanalízissel alakor genotípusok *in vitro* AC-ben. [Lantos és mtsai. (2022) nyomán.]

	<i>df</i>	MS - ELS	MS - albínók	MS - zöld növénykék
Előkezelés	1	9517,225**	0,4**	0,025ns
Genotípus	4	3443,838**	0,5875***	0,025ns
Genotípus \times Előkezelés	4	888,1625ns	0,7125***	0,025ns
Hiba	30	725,825	0,05	0,025ns

***, szignifikáns ($p \leq 0,001$), **, szignifikáns ($p \leq 0,01$), ns, nem szignifikáns



15. ábra. Alakor (*Triticum monococcum* L.) *in vitro* AC lépései: **a**, AC-hez begyűjtött donor hajtások kalászai (piros vonal = 10 mm), melyek **b**, egysejtmagvas vakuólumos mikrospórákat tartalmaztak (piros vonal = 10 μ m). **c**, Mikrospóra eredetű ELS-k négy hetes *in vitro* AC-ben (piros vonal = 1 mm), melyek **d**, albínó (piros vonal = 10 mm) vagy **e**, zöld növénykéket regeneráltak (piros vonal = 10 mm). **f**, Üvegházi *in vivo* körülményekhez alkalmazkodott zöld növényke (piros vonal = 50 mm). Jelölések: mp, csírapapu; nc, sejtmag; va, vakuólum. [Lantos és mtsai. (2022) nyomán.]

Az androgenezis folyamata indukálható volt mindkét alakor genotípus *in vitro* AC-ben a megfelelő előkezelések alkalmazása után, kivételt az első előkezelés képezett. Az első előkezelés (négy napos éheztetés) alkalmazását követően ELS-k nem voltak megfigyelhetők a genotípusok *in vitro* AC-iben, míg a többi előkezelés után ELS-k fejlődését tudtuk nyomon követni a tenyészetekben. Az előállított ELS-k száma jelentős eltérést mutatott a különböző előkezelések esetében (30. táblázat). Szignifikánsan több ELS-t kaptunk a hármas és négyes előkezelést követően, mint a kettes vagy ötös előkezelés alkalmazása után. A legmagasabb átlagos ELS értéket (77,25 ELS/100 portok) a ‘G7026’ genotípus AC-iben érték el a hármas előkezelés alkalmazásával, míg a ‘G7176’ genotípus esetében a négyes előkezelés után tudtuk a legtöbb ELS (28,25 ELS/100 portok) fejlődését regisztrálni *in vitro* AC-ben.

30. táblázat. Genotípus és előkezelés hatása alakor genotípusok *in vitro* AC-ben. Az abc eltérő nagy betűi (A, B) szignifikánsan különböző értékeket jelölnek a genotípusok között ($p \leq 0,05$) azonos kezelés esetében. Az abc eltérő kis betűi (a, b és c) szignifikánsan különböző értékeket jelölnek a kezelések között ($p \leq 0,05$) egy genotípuson belül. [Lantos és mtsai. (2022) nyomán.]

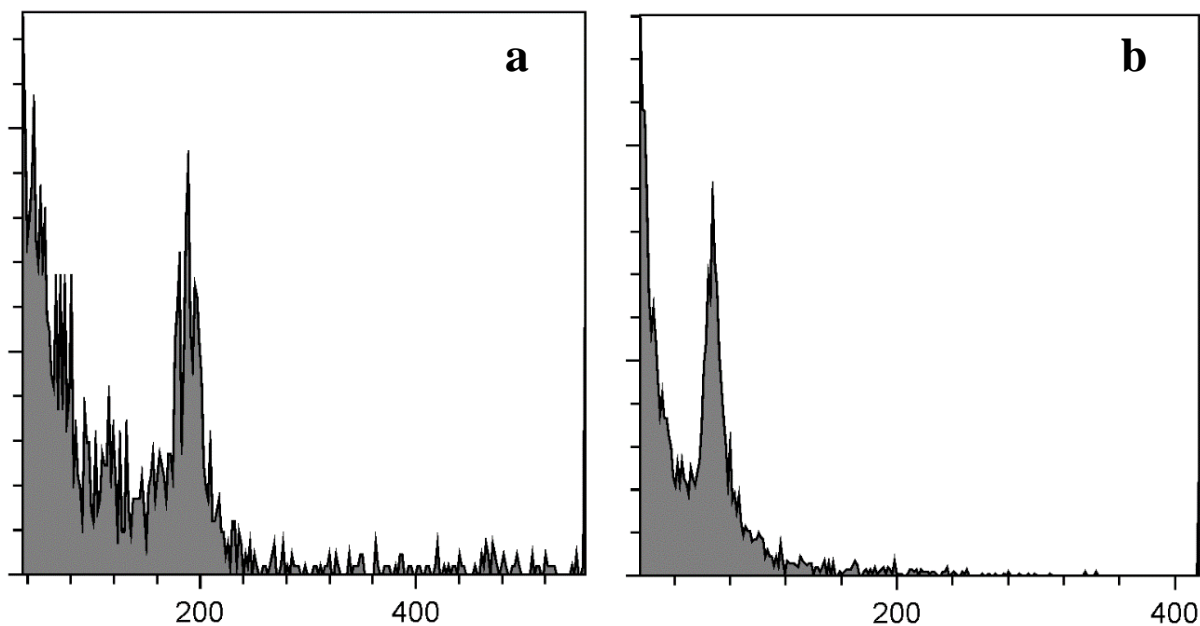
Genotípus	Előkezelés	ELS/ 100 portok	Albínók/ 100 portok	Zöld növénykék/ 100 portok
‘G7026’	1	0,00 A c	0,00 A b	0,00 ns
	2	41,00 A b	0,00 A b	0,00 ns
	3	77,25 A a	1,25 A a	0,00 ns
	4	71,75 A a	0,00 A b	0,00 ns
	5	38,50 A b	0,00 A b	0,00 ns
‘G7176’	1	0,00 A b	0,00 A a	0,00 ns
	2	8,25 B ab	0,00 A a	0,00 ns
	3	22,00 B ab	0,00 B a	0,00 ns
	4	28,25 B a	0,25 A a	0,25 ns
	5	15,75 B ab	0,00 A a	0,00 ns

A növényregenerálás hatékonysága mérsékelt volt az alakor genotípusok *in vitro* AC-iben fejlődött ELS-ekből. Néhány albínó növényke regenerálását figyeltük meg a hármas illetve négyes előkezelést követően (30. táblázat). Összesen öt albínó növénykét regeneráltunk a ‘G7026’ genotípus ELS-ből a hármas előkezelés alkalmazása után (donor hajtások hideg

előkezelése kilenc napig és donor kalászkok hideg előkezelése öt napig). A 'G7176' genotípus esetében a négyes előkezelés (donor hajtások 14 napos hideg előkezelése) után egy albínó növénykét és egyetlen zöld növénykét sikerült regenerálnunk (30. táblázat). Az akklimatizált zöld növénykét üvegházi körülmények között neveltük érésig. A DH₀ növényen fejlődött kalászkokban egyetlen szemet sem figyeltünk meg betakarítás után, a kalászkok sterilek maradtak, ami a növény haploid volta utal.

4.6.2. AC eredetű alakor zöld növényke ploidszint vizsgálata áramlási citometriával

Az *in vitro* AC eredetű struktúrákból regenerált egyetlen zöld növényke ploid szintjét áramlási citometriás vizsgálattal határoztuk meg, ahol kontrollként magról kelt alakor növényt használtunk. A mérések alapján látható a különbség a minták között (16. ábra). A kontroll növény relatív DNS tartalma kétszer magasabb volt, mint az *in vitro* AC eredetű ELS-ből regenerált növényke relatív DNS tartalma, ami igazolja a regenerált növény haploid (n) ploid szintjét és mikrospóra eredetét.



16. 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 haploid zöld növényke esetében. [Lantos és mtsai. (2022) nyomán.]

5. Eredmények megvitatása

A hatékony DH növényelőállítási módszerek kulcsszerepet töltenek be az új fajták és hibridek nemesítésében (Islam és Tuteja 2012, Longin és mtsai. 2014, Rather és mtsai. 2014). Továbbá a DH technológiákat gyakorta felhasználják különböző alkalmazott kutatási programokban (Dunwell 2010, Ganeva és mtsai. 2014, Oleszczuk és Lukaszewsky 2014).

Habár az *in vitro* AC módszere közel 50 éve kutatott terület közönséges búzában (*Triticum aestivum* L.), mégis néhány tényezőt (genotípus függőség, albinizmus, az androgenézis indukciónak és növényregenerációnak alacsony hatékonysága) úgy említenek a szakirodalomban, mint ami a módszer széleskörű alkalmazhatóságát mérsékli (Broughton 2008, 2011, Redha és Talaat 2008, Jauhar és mtsai. 2009, Kumari és mtsai. 2009, Redha és Suleman 2011, Islam és Tuteja 2012, Niu és mtsai. 2014). Az eddig elért kutatási és nemesítési eredmények (több mint 250 DH búzafajta) arra sarkallják a sejt- és szövettenyésztéssel foglalkozó szakembereket, hogy folyamatosan törekedjenek az *in vitro* androgenézis módszereinek fejlesztésére a nemesítés és alkalmazott kutatás igényeit szem előtt tartva.

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

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

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 közönséges búza *in vitro* AC során. Mindkét tápközeg alkalmas volt az androgenezis indukciójára és zöld növénykéek előállítására. Korábbi publikációkkal megegyezően, az indukciós tápközeg összetétele szignifikánsan befolyásolta az *in vitro* AC hatékonyságát (Broughton 2008, Redha és Talaat 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 számában.

A spontán kromoszóma duplikáció mértéke átlagosan 40% alatti közönséges búzában (*Triticum aestivum* L.) több tudományos publikáció alapján (Ouyang és mtsai. 1994, Barnabás 2003, Soriano és mtsai. 2007, Weyen 2009). Kísérletünkben a spontán kromoszóma duplikáció 17,65 és 60% között változott genotípustól függően, a tíz F₁ keresztezési kombináció átlagában 32,72% volt. Összesen 267 DH törzset állítottunk elő őszi típusú kenyérbúza nemesítési programunk számára e kísérletben.

Az előállított DH növények száma kutatói, nemesítői igény szerint indukált kromoszóma duplikációval (pl.: kolchicin kezeléssel) tovább növelhető a regeneránsok között. Az *in vitro* androgenezis indukciójának kezdetén alkalmazott kolchicin kezelés tovább emelheti az előállított DH növények számát (Barnabás és mtsai. 1991, Soriano és mtsai. 2007), azonban ez az eljárás is genotípus függőséget mutatott (Soriano és mtsai. 2007). Másik lehetőség, hogy az *in vitro* AC eredetű haploid növénykéket kezeljük, és így kettőzzük meg a növénykéek kromoszómaszámát. A növényregenerálás után, az üvegházba kiültetett növénykéek száma jól tervezhető. Szükség szerint a regenerált növénykéek ploidia fokának meghatározását követően a haploid növénykéek indukált kromoszóma duplikációjával 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 sejtsztódások és ELS-k számának fokozásával. A P4mf tápközegben fejlődött ELS-kból regenerált zöld és albínó növénykéek aránya kedvezőtlenebb volt, nagyobb mennyiségben figyeltük meg albínó növénykéek regenerálását.

Jelenleg a W14mf indukciós tápközéget alkalmazzuk *in vitro* AC eredetű növénykéek, fertilis DH törzsek előállítására kenyérbúza nemesítési programok vagy kutatási programok (téreképzési populációk készítése) esetében. A zöld növénykéek regenerálásának százalékos

aránya 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.

5.2. 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

Közönséges búza *in vitro* AC módszerének hatékonyságát két egymást követő évben két nemzetközi kontroll fajtavával ('Svilena' és 'Berengar') vizsgáltuk. Továbbá, a módszer növénynemesítési célú gyakorlati alkalmazhatóságát bizonyítottuk 93 nyugat-európai F₁ keresztezési kombinációval, melyek különböző közönséges búza nemesítési programokból származtak szolgáltatási szerződés alapján.

A kétéves kísérleti adatok statisztikai elemzése alapján kijelenthető, hogy az ELS-k, a regenerált növénykékek és zöld növénykékek száma főként a genotípus által volt meghatározott, az évjárat által kevésbé. 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, Tuvešson és mtsai. 2000, 2003, Kondic-Spika és mtsai. 2011). Az F₁ keresztezési 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, Tuvešson és mtsai. 2000, Broughton 2008), nem találtunk olyan kombinációt, mely esetében teljesen lehetetlen lett volna az *in vitro* androgenézis indukciója, tökéletesen nem válaszadó úgynevezett „unresponsive” genotípust nem azonosítottunk. ELS-k fejlődését és zöld növénykékek regenerációját minden keresztezési kombináció esetében megfigyeltük. A kísérletünkben szereplő 93 keresztezési kombináció öt különböző nemesítési programhoz tartozott. Az előállított zöld növénykékek mennyisége alapján a módszer hatékony eljárásnak bizonyult a különböző eredetű és célú nemesítési programok számára. Így, a nemesítési programok eredete nem befolyásolta a módszer eredményességét 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 keresztezési kombináció között jelentős különbséget figyeltünk meg

a zöld növénykéek számában, minden kombinációból regeneráltunk zöld növénykét, és így több ezres nagyságrendű zöld növénykét állítottunk elő mindkét évben a nemesítési programok számára.

A 'Svilena' genotípus *in vitro* AC-ben a regenerált albínó növénykéek mennyisége alacsony volt mindkét évben. Az őszi típusú kenyérbúza genotípusokkal végzett kísérleteket figyelembe véve, a 'Svilena' genotípus esetében volt a legmagasabb az ELS-kből regenerált zöld növénykéek mennyisége, közel 90% mindkét évben. A két kontroll genotípus kísérleti adatai alapján az albínó növénykéek 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 növénykéek számát a kétéves kísérlet sorozatban, így a módszer ismételhető módon évről évre megbízhatóan alkalmazható eljárásnak bizonyult a nemesítés és alkalmazott kutatás számára. Természetesen a jelentős mértékű biotikus (pl.: járvány) és abiotikus stresszek (pl.: aszály) befolyásolhatják a donor növények fejlettségi állapotát, és a módszer eredményességét.

A nemesítési kombinációk esetében az albínó növénykéek száma mérsékelt volt, az évről évre változó kombinációk miatt itt mélyebb statisztikai összehasonlítást nem végeztünk. Néhány kritikai véleménnyel szemben (Jauhar és mtsai. 2009, Wedzony és mtsai. 2009), az albinizmus nem hátráltatta a több ezer zöld növényke előállítását évente. A zöld növénykéek 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, 2003). Azonban ez a stratégia munkaigényes, hiszen a DH növényelőállítás előtt feltételezi a szülői kombinációk válaszadó képességének ismeretét, tesztelését. Bemutatott kísérleteinkben a szülői partnerek válaszadó képességére vonatkozó előzetes információk nem álltak rendelkezésünkre, 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 hatékonynak tartjuk, mint az *in vitro* AC-t. A két faj párhuzamos felnevelése miatt költségesebb, több a kézi munkaigénye

(kasztrálás, porzás, embrióizolálás), és elengedhetetlen a kolchicin kezelés, hiszen e módszer alkalmazásakor nem történik spontán kromoszóma duplikáció.

AC kísérleteink hatékonyságát több tényező befolyásolta, melyek közül a legfontosabbak a donor növények felnevelése, a donor hajtások begyűjtése és előkezelése, androgenézis indukciója, növényregeneráció és minden lépésnél 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 közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC során, hogy a módszer a nemesítői igényeket mind széleskörűbben tudja kielégíteni. Mindezeket összevetve az *in vitro* AC módszere hatékonyan alkalmazható eljárás közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítési és kutatási programokban.

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

Az *in vitro* AC-n alapuló DH növényelőállítási rendszerünk alkalmazásával évente több tucat kombinációból néhány ezer DH törzset állítottunk elő közönséges búza nemesítési programunk számára. A kombinációk kijelölése és a hasadó nemzedék (F₁-F₅) kiválasztása nemesítői döntéstől függ, a kombinációk kijelölésének meghatározó szerepe van abban, hogy a belőlük előállított DH törzsekkel sikerül-e a kitűzött nemesítési célokat elérni. 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 segíti (Pauk 2005). Későbbi generáció (F₃-F₅) esetében nagyobb arányban találunk potenciális fajtajelölteket az előállított DH törzsek között (Pauk 2005).

Pedigree nemesítési rendszerünket és az *in vitro* AC módszert kombináltuk egy szlovák-magyar együttműködés keretén belül, ahol a Basilica és Izidor fajták kombinációjából állítottunk elő harminc DH törzset. A tenyészkerti kísérletek eredményei alapján közülük szelektáltuk ki azt a fajtajelöltet (506.16), mely 'GK Déva' néven állami elismerést kapott, és

2020-ban növényfajta-oltalomban részesült. További ígéretes őszi típusú kenyérbúza DH törzsek szerepelnek teljesítmény kísérleteinkben és a NÉBIH kísérleteiben is fajtajelöltjeink között.

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

Kísérleteinkben az *in vitro* androgenézis hatékonyságát hasonlítottuk össze négy tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) 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 androgenézis indukciójához tönkölybúza *in vitro* AC-ben. Azonban a stressz előkezelés szignifikánsan megemelte a módszer hatékonyságát, hasonlóan a közönséges búzában (*Triticum aestivum* L.) publikált eredményekhez (Sunderland és mtsai. 1984, Redha és mtsai. 1998, Lazaridou és mtsai. 2016). A négy genotípussal elvégzett kísérlet adatai alapján a genotípus szignifikánsan befolyásolta az *in vitro* androgenézis (ELS-k, regenerált, zöld és albínó növénykéek száma) hatékonyságát. A zöld növénykéek regenerálásának átlaga 41,45 zöld növényke/100 portok volt, ez az érték 20,93 és 83,07 zöld növényke/100 portok között változott genotípustól függően.

Több releváns publikáció az egyszikűek androgenézis indukciója során az albinizmust a módszer szűk keresztmetszeteként említi (Jauhar és mtsai. 2009, Kumari és mtsai. 2009, Dunwell 2010, Broughton 2011, Niu és mtsai. 2014, Makowska és Oleszczuk 2014, Krzewska és mtsai. 2015, Canonge és mtsai. 2021, Tang és mtsai. 2023). A vizsgált négy tönkölybúza genotípus *in vitro* AC-e során az albínó növénykéek 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 genotípus adatai alapján az albinizmus nem bizonyult hátráltató tényezőnek a zöld növénykéek *in vitro* regenerációja szempontjából.

A spontán kromoszóma duplikáció aránya kulcsfontosságú a DH növények előállításánál. A fertilis spontán DH növények százalékos aránya 24,27% volt átlagosan a négy genotípus esetében, ami 11,8 és 44,44% között változott. Ezek az adatok közel azonosak a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) esetében megfigyelt spontán kromoszóma duplikáció

adataival (Ouyang és mtsai. 1994, Barnabás 2003, Soriano és mtsai. 2007, 2008, Broughton 2008, 2011, 2020, Weyen 2009, Lantos és Pauk 2016, Weigt és mtsai. 2019), így a négy genotípus adatai alapján az *in vitro* AC egy ígéretes DH növényelőállítási módszernek bizonyult a tönkölybúza nemesítési és alkalmazott kutatási programok számára.

Az *in vitro* androgenezis indukcióját elsőként írtuk le tönkölybúza IMC-ben (Lantos és mtsai. 2018). Az ováriumos dajkatenyésztés módszere kenyérbúza és tritikále IMC-ben jól ismert módszertani lépés (Mejza és mtsai. 1993, Eudes és Amundsen 2005), ami elősegíti az osztódó többsejtes struktúrákból a mikrospóra eredetű ELS-k fejlődését. Kísérleteink során az ováriumos dajkatenyésztés kulcsszerepet játszott tönkölybúza IMC-ben. Ováriumok hiányában ELS-k fejlődését nem figyeltük meg IMC-ben hasonlóan a kenyérbúzában (*Triticum aestivum* L.) és tritikáléban (*X Triticosecale* Wittm.) leírt eredményekhez (Mejza és mtsai. 1993, Eudes és Amundsen 2005).

Az indukció során alkalmazott exogén hormonok szignifikánsan befolyásolják az *in vitro* androgenezis hatékonyságát. A hormonmentes tápközeg tritikále IMC-ben hatékony indukciós tápközegnek bizonyult (Pauk és mtsai. 2000, Oleszczuk és mtsai. 2004), míg az exogén hormonok alkalmazása széleskörűen elterjedt kenyér búza (*Triticum aestivum* L.) genotípusok IMC-e során (Tuvešson és Öhlund 1993, Puolimatka és mtsai. 1996, Kunz és mtsai. 2000, Shariatpanahi és mtsai. 2006a, Echávarri és Cistué 2016). Hormonok (0,5 mg/l 2,4-D és 0,5 mg/l kinetin) jelenléte nem volt szükséges az *in vitro* androgenezis indukciójához a négy vizsgált tönkölybúza genotípus IMC-e során, de jelenlétük emelte az ELS-k, regenerált zöld és albínó növénykéék 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' és 'GK Fehér' 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 növénykéék gyakoriságát a regenerált növénykéék között. Az *in vitro* AC és IMC módszerét összehasonlítva a mikrospórák fejlettségi állapota, az előkezelés és az indukciós tápközeg is szerepet játszhatott abban, hogy nagymértékű különbség volt a két módszer hatékonysága között.

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

Az *in vitro* androgenezis kutatás korábbi szakaszában az *in vitro* AC módszere a tönkölybúza nemesítés szempontjából még nem volt hatékony eljárás (Schmid 1990, Takács és mtsai. 1994). Azonban az utóbbi években, néhány tönkölybúza genotípus alkalmazásával hatékony módszereket publikáltak (Lantos és mtsai. 2018, Castillo és mtsai. 2019), melyek lehetőséget nyitottak a módszer nemesítési célú felhasználása felé.

Az *in vitro* AC módszere jól működött a négy tesztelt tönkölybúza genotípusban ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Mv. Martongold' és 'Oberkulmer Rotkorn') a fenti kísérletek alapján. A négy genotípus keresztezésével egy teljes diallél populációt készítettünk, mellyel teszteltük *in vitro* AC módszerünk hatékonyságát. Továbbá, tíz F₁ genotípust vontunk be kutatási és nemesítési célú kísérleteinkbe. Összesen huszonkettő F₁ keresztezési kombináció válaszadó képességét vizsgáltuk *in vitro* AC-ben. Minden genotípus esetében sikeres volt az *in vitro* androgenezis indukciója. Bár a genotípus szignifikánsan befolyásolta az indukált ELS-k mennyiségét, a regenerált zöld és albínó növénykéek számát, mégis minden kombinációból állítottunk elő genetikailag tiszta törzset (DH) nemesítési programunk számára.

A genotípus szignifikánsan befolyásolja a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC hatékonyságát (Holme és mtsai. 1999, Tuveesson és mtsai. 2000, Yildirim és mtsai. 2008), és tönkölybúzában is igazolt az *in vitro* AC genotípus függősége (Schmid és mtsai. 1990, 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). 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 tönkölybúza diallél populáció esetében nagy mennyiségű *in vitro* zöld növénykét állítottunk elő AC alkalmazásával, míg a regenerált albínó növénykéek száma mérsékelt volt. A legmagasabb zöld növény regenerációs hatékonyságot a 'Franckenkorn' genotípussal (65,00 *in vitro* zöld növényke/100 portok) érték 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, következtetesképpen 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). Ezek a megfigyelések támogatják és alátámasztják az *in vitro* AC módszerének gyakorlati alkalmazását tönkölybúza nemesítési és alkalmazott kutatási programokban.

Tíz nemesítési célból létrehozott F₁ keresztezési kombinációt teszteltünk *in vitro* AC-ben, melyekből különböző számú 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 (Lantos és Pauk 2021).

A 'Tonkoly.pop1' előrehaladott nemesített törzset (kontroll) és hét AC eredetű testvér DH törzset hasonlítottuk össze kétéves tenyészkerti kísérletben. A tönkölybúza DH törzsek egyöntetűek, homogének voltak, kiegyenlített képet mutattak. A DH törzsek a 11 mért tulajdonság (kalászolási idő, növénymagasság, termés, szemkeménység, szem szélesség és hosszúság, TKW, hántolási kihozatal, 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 lehetőségeket nyújthat a nemesítők számára.

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

Az utóbbi évtizedben több kutatócsoport is foglalkozott az *in vitro* szövettenyésztés szempontjából rekalitráns fajként ismert alakor (*Triticum monococcum* L.) szomatikus szövettenyésztési rendszerének kidolgozásával, és jelentős előrelépéseket tettek (Alikina és mtsai. 2016, Miroshnichenko és mtsai. 2017, Agil és mtsai. 2021, Orgec és mtsai. 2021). A publikált hatékony szövettenyésztési eljárások új lehetőségeket nyitottak meg az alakor

növénybiotechnológiai kutatások területén, úgymint az alakor faj genetikai transzformációja (Miroshnichenko és mtsai. 2018), a transzgén hatásának vizsgálata diploid *Triticum* fajban. Az *in vitro* androgenezis indukciója azonban kihívás maradt.

A stressz előkezelés kulcsszerepet játszik az *in vitro* androgenezis 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 (Liu és mtsai. 2001, Barnabás 2003, Shariatpanahi és mtsai. 2006b, Echávarri és Cistué 2016, Lantos és Pauk 2020). A donor alapanyagok hideg előkezelése, a hősokk és az éheztetés a leggyakrabban és leghatékonyabban alkalmazott eljárások közé tartoznak a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC területén. Az alakor (*Triticum monococcum* L.) ugyanazon nemzetség tagja, így ezen előkezelések hatását vizsgáltuk alakor *in vitro* AC-ben. A megfelelő stresszkezelések kiválasztása, 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 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 árpa és búza *in vitro* androgenezisének indukciójában (Cistué és mtsai. 2003, Soriano és mtsai. 2007, 2008, Sánchez-Díaz és mtsai. 2013, Castillo és mtsai. 2015, Echávarri és Cistué 2016). Kísérleteink során az izolált portokok négy napos éheztetését követően nem tudtuk ELS-k fejlődését megfigyelni a két alakor genotípus *in vitro* AC-ben.

A donor hajtások hideg előkezelése (2-5°C, 10 nap - 4 hét) az egyik leggyakrabban alkalmazott stressz előkezelés gabona fajok mikrospóráinak átprogramozása (androgenezis indukció) során (Pauk és mtsai. 2003, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016, Coelho és mtsai. 2018, Wang és mtsai. 2019). Kísérleteinkben a legmagasabb ELS számot a donor alapanyagok kéthetes hideg előkezelését követően tudtuk elérni mindkét alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípus esetében.

A hősokk kezelés (3 nap, 32 °C) szintén gyakorta alkalmazott stressz faktor kenyérbúzában (Ouyang és mtsai. 1983, Pauk és mtsai. 2003, Shariatpanahi és mtsai. 2006b, Lantos és mtsai. 2013, Lantos és Pauk 2016), 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 hősokek nem emelte az *in vitro* AC-ben fejlődött mikospóra eredetű ELS-k mennyiségét.

A *Triticum* fajok *in vitro* androgenezis indukciójának genotípus függősége jól ismert a szakirodalomból (Lazar és mtsai. 1984, Deaton és mtsai. 1987, Agache és mtsai. 1989, Tuveesson és mtsai. 2000, Lantos és mtsai. 2019). Alakor *in vitro* AC kísérletekhez két, saját génbankunkból származó genotípust ('G7026' és 'G7176') választottunk ki, hogy megvizsgáljuk az előkezelések hatékonyságát, ellenőrizzük a genotípus hatását és a genotípus×előkezelés kölcsönhatást. A genotípus szignifikánsan befolyásolta az ELS-k és albínó növénykékek számát, míg a genotípus×előkezelés kölcsönhatása az albínó növénykékek számában mutatott statisztikailag bizonyítható eltérést. A zöld növénykékek regenerálása túl alacsony volt ahhoz, hogy statisztikailag megalapozott kijelentéseket tehesünk.

A mikospóra eredetű ELS-kből történő növényregenerálás kritikus lépés az *in vitro* DH növényelőállítási módszerek alkalmazása során, amely a korábban említett tényezők által befolyásolt paraméter. A gabona fajok *in vitro* AC és IMC-vel kapcsolatban gyakorta emlegetik szűk keresztmetszetként a genotípusfüggőséget, az albinizmust és a zöld növénykékek regenerációjának alacsony hatékonyságát (Li és mtsai. 2013, Wessels és Botes 2014, Zhao és mtsai. 2015, 2017, Weigt és mtsai. 2020, Orłowska és mtsai. 2020). Elsőként írtuk le az *in vitro* AC-ből származó mikospóra eredetű zöld növényke regenerálását, azonban jelentős fejlesztések szükségesek még a módszer hatékonyságának fokozása érdekében. A növényregenerálás (zöld és albínó) hatékonysága alacsony volt alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok *in vitro* AC-ben, néhány albínó és egy zöld növénykét regeneráltunk a mikospóra eredetű ELS-kből.

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

Az *in vitro* szövettenyésztés genetikai meghatározottsága jól ismert a szomatikus szövettenyésztés és androgenezis kutatás eredményeiből. Ismert számos kromoszóma (7B, 7D, 1D, 1B), mely a növényregenerálás hatékonyságát befolyásolja közönséges búza (*Triticum*

aestivum L.) szomatikus szövettenyésztésében (Henry és De Buyser 1985, Galiba és mtsai. 1986, Henry és mtsai. 1994). Több kromoszómát és QTL-t leírtak már kenyérbúzában, melyek befolyásolják az ELS-k mennyiségét, a regenerált zöld és albínó 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 azonosítottak, 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 növénykéek regenerációjának 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* androgenézis 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 jól működő szövettenyésztési eljárás alapjait letenni, mely genetikai transzformációra is alkalmassá tette a szövettenyésztési rendszert (Miroshnichenko és mtsai. 2017, 2018). Mindezek alapján további fejlesztések szükségesek még, hogy az *in vitro* androgenézis módszere is hatékony eszközzé válhasson alakor fajban (*Triticum monococcum* L.).

6. Összefoglalás

Az elmúlt ötven évben az első kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* AC-ről szóló eredmények megjelenése óta számos kísérletet publikáltak különböző kutatócsoportok, hogy fejlesszék a kenyérbúza *in vitro* AC kritikus lépéseit (genotípus, donor növények felnevelési körülményei, mikrospórák fejlettségi állapota, stressz előkezelés stb.) és mérsékeljék a korlátozó tényezők hatásait (genotípus függőség, albinizmus, alacsony zöld növény regenerálás). A fejlesztéseknek köszönhetően a közönséges búza *in vitro* AC módszere használható eszközzé vált a nemesítés és alkalmazott kutatás számára. A publikált adatok alapján több mint 250 államilag elismert DH búzafajta ismert a világon. Jelenleg a metodikai fejlesztések a költséghatékonyság fokozására és a genotípusfüggőség mérséklésére irányulnak.

Tíz őszi típusú F₁ kenyérbúza keresztezési kombináció *in vitro* AC-ben két széleskörűen alkalmazott alaptápközeget (W14 és P4) hasonlítottunk össze. Az androgenezist indukáltuk minden genotípusban és kezelésben, valamint zöld növénykéek regenerációját figyeltük meg. A statisztikai elemzések alapján a genotípus befolyásolta az ELS-k, albínó, zöld és kiültetett növénykéek számát, a tápközegnek szintén szignifikáns hatása volt az ELS és albínó növénykéek mennyiségére. Mindkét tápközeget használható volt búza DH törzsek előállítására. Az ELS-k és mérsékelten a zöld növénykéek száma magasabb volt a P4mf tápoldatban (48,84 ELS/100 portok, 4,82 zöld növényke/100 portok) mint a W14mf tápoldatban (28,14 ELS/100 portok, 4,59 zöld növényke/100 portok). Azonban a zöld növény regenerálás hatékonysága magasabb volt a W14mf tápoldatban fejlődött ELSk-nél (16,9%), mint a P4mf tápoldatból származó ELS-k esetében (9,6%). Így a W14mf tápoldat alkalmazásával idő és munkaerő takarítható meg közönséges búza DH törzsek széleskörű előállítása során. Kísérletünkben 267 fertilis őszi búza DH törzset állítottunk elő, a spontán kromoszóma duplikáció mértéke 32,72% volt.

Közönséges búza *in vitro* AC módszerének alkalmazhatóságát vizsgáltuk két nemzetközi kontroll genotípussal (jó válaszadó képességű 'Svilena' és gyenge válaszadó képességű 'Berengar' genotípus) és 93 nyugat-európai keresztezési kombinációval két egymást követő évben. A genotípus befolyásolta az ELS-k, regenerált növénykéek és zöld növénykéek számát, míg az albínó növénykéek mennyiségét a genotípus, az évjárat (környezet) és kölcsönhatásuk határozta meg. A tenyészkerti körülmények között felnevelt donor növények kiválóan alkalmazhatóak *in vitro* AC-k készítésére és búza DH törzsek előállítására. Az évjárat nem befolyásolta a zöld növénykéek regenerálásának hatékonyságát, azonban egyes évjáratokban a túlzottmértékű biotikus (pl.: járvány) és abiotikus stresszek (pl.: aszály)

mérsékelhetik a módszer hatékonyságát. A genotípus hatása a nyugat-európai származású keresztezési kombinációk esetében is megfigyelhető volt, azonban minden kombinációból állítottunk elő zöld növénykét, melynek mértéke genotípustól függően 0,04 és 28,67 zöld növényke/100 portok között változott, átlagosan 5,3 zöld növényke/100 portok hatékonyságot értünk el. Összesen 11 426 jól gyökeresedett zöld növénykét állítottunk elő a nemesítési programok számára, akklimatizációjuk 97,21% volt 2010-ben és 96,34% 2011-ben. Az albínó növénykéek aránya mérsékelt volt, nem hátráltatta a több ezer *in vitro* zöld növényke regenerációját. A megfigyelt adatok alapján az *in vitro* AC hatékony módszernek bizonyult a közönséges búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítés számára, mérsékelt genotípus függőséget tapasztaltunk és publikáltunk számos szakirodalmi adattal szemben.

Az *in vitro* AC módszerével évente több ezer DH törzset állítunk elő őszi típusú kenyérbúza nemesítési programunk számára. A klasszikus Pedigree nemesítési módszert az *in vitro* AC eljárásával kombinálva hoztuk létre azt a DH törzset, mely 'GK Déva' néven állami elismerést kapott és növényfajta-oltalomban részesült 2020-ban.

Négy köztermesztésben lévő tönkölybúza fajtával ('Franckenkorn', 'GK Fehér', 'Mv Martongold', 'Oberkulmer Rotkorn') hasonlítottuk össze az *in vitro* AC-t és IMC-t. Elsőként írtuk le tönkölybúzában az IMC módszerét. Az ováriumos dajkatenyésztés segítette az ELS-k fejlődését IMC-ben. Az exogén hormonok (0,5 mg/l 2,4-D és 0,5 mg/l kinetin) nem voltak szükségesek az *in vitro* androgenezis indukciójához, azonban jelenlétük emelte a tenyészetekben fejlődött ELS-k és a belőlük regenerált növénykéek mennyiségét. Az ELS-k száma alapján ígéretesnek tűnik a módszer, azonban az alacsony növényregeneráció és az albinizmus jelenleg még hátráltatja a módszer szélesebb körű felhasználását. Az *in vitro* AC egy hatékony eljárásnak bizonyult tönkölybúza DH törzsek előállítására. *In vitro* AC-ben a genotípus hatása szignifikáns volt, a donor kalászkok hideg előkezelése (12 nap 2 °C) pozitívan befolyásolta a módszer hatékonyságát. Az *in vitro* zöld növénykéek regenerálásának átlaga 41,45/100 portok volt *in vitro* AC-ben (20,93-83,07 genotípustól függően), míg albínó növénykéket mérsékelt számban figyeltünk meg (3,48 albínó/100 portok). Összesen 1720 AC eredetű zöld növénykét állítottunk elő a négy tönkölybúza genotípusból.

In vitro AC hatékonyságát a négy tönkölybúza genotípus teljes diallél populációjával és tíz F₁ keresztezési kombináció felhasználásával teszteltük. A genotípus szignifikánsan befolyásolta az *in vitro* AC paramétereit (ELS-k, zöld és albínó növénykéek száma). A zöld növénykéek regenerálása genotípustól függően változott a diallél populáció (13,75-85,00 zöld növényke/100 portok) és az F₁ keresztezési kombinációk (6,30 – 51,00 zöld növényke/100

portok) *in vitro* AC-e során. A spontán kromoszóma duplikáció átlagosan 28,4% volt, mely 9,76% és 54,24% értékek között változott genotípusonként. A diallél analízis eredményei alapján a GCA hatása sokkal jelentősebb volt *in vitro* AC-ben mint az SCA hatása, a válaszadó képesség főként additív genetikai tulajdonságok által volt meghatározott. Kétéves szántóföldi kísérletben hét AC eredetű tönkölybúza DH törzset teszteltünk, a DH törzsek versenyképesek voltak a kontroll genotípussal összevetve a vizsgált tizenegy tulajdonság (kalászolás, növénymagasság, termés, szemkeménység, szemszélesség, szemhosszúság, TKW, hántolási %, kiórlési %, fehérje, nedves siker) alapján. Az *in vitro* AC egy használható eszköznek bizonyult a tönkölybúza nemesítés és alkalmazott kutatás számára.

Az *in vitro* androgenezis sikeres indukcióját, mikrspóra eredetű ELS-kból regenerált zöld és albínó növénykéek előállítását elsőként írtuk le akkor faj *in vitro* AC-ében. A vizsgált előkezelések közül a donor hajtások hideg előkezelése (2 hét, 4°C) pozitívan befolyásolta az ELS-k fejlődését. A genotípus hatását igazoltuk a kísérletek során. Zöld és albínó növénykéket regeneráltunk a mikrspóra eredetű ELS-kból. A regenerált zöld növényke haploid ploidia fokát áramlási citometriával határoztuk meg.

Az *in vitro* AC hatékony eljárássá válhat az akkor kutatás és nemesítés számára a jövőben, azonban a zöld növénykéek regenerálásának gyakoriságát még jelentősen fokozni kell.

7. 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 mikrospóra tenyésztés módszerét tönkölybúzában. Az ováriumos dajkatenyésztés kulcsszerepét igazoltuk a mikrospóra eredetű ELS-k fejlődése során. Az exogén hormonok emelték az izolált mikrospóra tenyésztés módszerének hatékonyságát, genotípus függőséget figyeltünk meg tönkölybúza izolált mikrospóra 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 növénykéek számát tönkölybúza genotípusok *in vitro* portoktenyésztésében.

6. Teljes diallél populáció felhasználásával vizsgáltuk a genotípus szerepét tönkölybúza *in vitro* portoktenyészetben. A diallél analízis eredményei alapján a GCA hatása sokkal meghatározóbb *in vitro* portoktenyészetben, 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 albínó növénykék regenerációját alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok portoktenyészetében. Kéthetes hideg előkezelés bizonyult a leghatékonyabb stressz előkezelésnek, és a genotípus szignifikáns hatását mutattuk ki alakor (*Triticum monococcum* L.) genotípusok *in vitro* portoktenyésztése során.

8. 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 támogatták az eredmények felhasználását a növénynemesítési programjaink során.

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 Biotec 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 Növényélettanért 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)

9. 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. doi:10.1007/BF00292308

Agil F., Orgec M., Karakas F. P., Verma S. K. and Zencirci N. (2021) *In vitro* mature embryo culture protocol of einkorn (*Triticum monococcum ssp. monococcum*) and bread (*Triticum aestivum* L.) wheat under boron stress. *Plant Cell Tiss Org* 148: 293-304. doi:10.1007/s11240-021-02186-0

Ahmadi B., Ahmadi M., da Silva J. E. T. (2018) Microspore embryogenesis in Brassica: calcium signalling, epigenetic modification, and programmed cell death. *Planta* 248: 1339-1350. doi:10.1007/s00425-018-2996-5

Alikina O., Chernobrovkina M., Dolgov S. and Miroshnichenko D. (2016) Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas. *Crop Breed Appl Biotechnol* 16: 307-314. doi:10.1590/1984-70332016v16n4a46

Andruszczak, S. (2018) Spelt wheat grain yield and nutritional value response to sowing rate and nitrogen fertilization. *J Anim Plant Sci* 28: 1476-1484.

Ankele E., Heberle-Bors E., Pfosser M. F. and Hofinger B. J. (2005) Searching for mechanism leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiol Plant* 27: 651-664. doi:10.1007/s11738-005-0069-4

Arzany A. and Ashraf M. (2017) Cultivated Ancient Wheats (*Triticum* spp.): A potential source of health-beneficial food products. *Compr Rev Food Sci F* 16: 477-488. doi:10.1111/1541-4337.12262

Asif M., Eudes F., Randhawa H., Amundsen E., Yanke J. and Spaner D. (2013b) Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *Plant Cell Rep* 32: 1637-1646. doi:10.1007/s00299-013-1476-4

- Asif M., Eudes F., Goyal A., Amundsen E., Randhawa H. and Spaner D. (2013a)** Organelle antioxidants improve microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cell Dev Biol - Pl* 49: 489-497. doi:10.1007/s11627-013-9514-z
- Asif M., Eudes F., Randhawa H., Amundsen E. and Spaner D. (2014)** Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cell Dev - Pl*, 50: 121-126. doi:10.1007/s11627-013-9545-5
- Bakos F., Darkó É., Ascough G., Gáspár L., Ambrus H. and Barnabás B. (2008)** A cytological study on aluminium-treated wheat anther cultures resulting in plants with increased Al tolerance. *Plant Breed* 127: 235-240. doi:10.1111/j.1439-0523.2007.01473.x
- Barakat M. N., Al-Doss A. A., Ghazy A. I., Moustafa K. A., Elshafei A. A. and Ahmed E. I. (2017)** Doubled haploid wheat lines with high molecular weight glutenin alleles derived from microspore culture. *N Z J Crop Hort Sci* 46: 198-211. doi:10.1080/01140671.2017.1368674
- 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
- Barnabás B., Pfahler P. L. and Kovács G. (1991)** Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 81: 675-678. doi:10.1007/BF00226736
- Barnabás B., Pónya Z., Finy P., Solymoss M., Tímár I., Fehér A. and Dudits D. (2000)** Micromanipulation of gametic cells of cereals. Use of Agriculturally important genes in Biotechnology. NATO advanced science institutes series, series A, life sciences. 319: 76-79.
- Barnabás B., Pónya Z., Szakács É., Tímár I., Obert B. and Pretova A. (2001)** Biotechnology and micromanipulation of sexual processes in flowering plants. *Biologia* 56 (1): 7-12

- Bedó Z., Karsai I., Láng L., Vida G. (1996)** Current Plant Science and biotechnology in agriculture. In: Mohan Jain S., Sopory S. K., Veilleux R. E. (szerk.) *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 2, 93-109. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/ Boston/ London.
- Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Song H., Gao C., Voytas D. F. and Kagale S. (2018)** Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 8: 6502. doi:10.1038/s41598-018-24690-8
- Bilgin O., Sarier S. Y., Baser I., Balkan A (2022)** Enhancement of androgenesis and plant regeneration from wheat anther culture by seed pre-sowing gamma irradiation. *JOTAF* 19: 354-365. doi: 10.33462/jotaf.993270
- 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. doi:10.1111/pbi.13296
- Blakeslee A., Belling J., Farnham ME, Bergner AD (1922)** A haploid mutant in Jimson weed, „*Datura stramonium*”. *Science* 55: 646-647. doi:10.1126/science.55.1433.646
- Brading P. A., Verstappen E. C. P., Kema G. H. J., Brown J. K. M. (2002)** A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92:439-445. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.439
- Brew-Appiah R. A. T., Ankrah N., Liu W., Konzak C. F., von Wettstein D., and Rustgi S. (2013)** Generation of doubled haploid transgenic wheat lines by microspore transformation. *PLOS ONE* 8: e80155. doi:10.1371/journal.pone.0080155
- 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 Org* 95, 185-195. doi:10.1007/s11240-008-9432-7
- Broughton S. (2011)** The application of n-butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Crop Past Sci* 62: 813-822. doi:10.1071/CP11204

- 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. doi:10.3390/plants9010105
- 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. doi:10.1007/s00425-021-03773-3
- 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., Sánchez-Díaz R. A. and Valles M. P. (2015)** Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. *Front Plant Sci* 6:402. doi:10.3389/fpls.2015.00402
- Castillo A. M., Valero-Rubira I., Allué S., Costar M. A. and Vallés M. P. (2021)** Bread Wheat Doubled Haploid Production by Anther Culture. In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2287. Humana, New York, NY. pp. 257-266. doi:10.1007/978-1-0716-1315-3_11
- Castillo A. M., Valero-Rubira I., Burrell M. A., Allue S., Costar M. A., Valles M. P. (2020)** Trichostatin A Affects Developmental Reprogramming of bread wheat microspores towards an embryogenic Route. *Plants* 9:11. doi: 10.3390/plants9111442
- 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. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00561.x
- Chuang C. C., Ouyang T. W., Chia H., Chou S. M., and Ching C. K. (1978)** A set of potato media for wheat anther culture. in: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Beijing, China. p. 51-56.
- 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

Coelho M. B., Scagliusi S. M. M., Lima M. I. P. M., Consoli L., Grando M. F. (2018)

Androgenic response of wheat genotypes resistant to fusariosis. *Pesqui Agropecuaria Bras* 53: 575-582. doi:10.1590/S0100-204X2018000500006

Cuthbert J.L., Somers D.J., Brule-Babel. A. L., Brown P. D. and Crow G. H. (2008)

Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 117: 595–608. doi:10.1007/s00122-008-0804-5

Darkó É., Ambrus H., Stafanovits-Bányai E, Fodor J., Bakos F. and Barnabás B. (2004)

Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Sci* 166: 583-591. doi:10.1016/j.plantsci.2003.10.023

Datta S. K. (2005) Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr Sci* 89: 1870-1878.

Datta S. K. and Wenzel G. (1987) Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci* 48: 49-54. doi:10.1016/0168-9452(87)90069-0

Day A. and Ellis T. H. N. (1984) Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen. Possible basis for maternal inheritance of chloroplast. *Cell* 39: 359-368. doi:10.1016/0092-8674(84)90014-X

Day A. and Ellis T. H. N. (1985) Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr Genet* 9: 671-678. doi:10.1007/BF00449820

De Buyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R. and Hespel A. (1987) Florin – a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breed* 98: 53-56. doi:10.1111/j.1439-0523.1987.tb01089.x

- Deaton W. R., Metz S. G., Armstrong T. A. and Mascia P. N. (1987)** Genetic-analyses of the anther culture response of 3 spring wheat crosses. *Theor Appl Genet* 74:334-338. doi:10.1007/BF00274715
- 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.
- Dunwell J. M. (2010)** Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J* 8: 377-424. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
- 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. doi:10.1007/s11240-015-0923-z
- Ekiz H. and Konzak C. F. (1991a)** Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat: I. analyses of alloplasmic lines. *Crop Sci* 31: 1421-1427. doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100060005x
- Ekiz H. and Konzak C. F. (1991b)** Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat: III. Common wheat crosses. *Crop Sci* 31: 1432-1436. doi:cropsci1991.0011183X003100060007x
- Elhaddoury J., Lhaloui S., Udupa S. M., Moatissim B., Taiq R., Rabeh M., Kamlaoui M. and Hammadi M. (2012)** Registration of 'Kharoba': A bred wheat cultivar developed through doubled haploid breeding. *J Plant Regist* 6: 169-173. doi:10.3198/jpr2011.07.0385crc
- Escarnot E., Aguedo M., Agneessens R., Wathelet B. and Paquot M. (2011)** Extraction and characterization of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans from spelt bran: Study of the hydrolysis conditions for monosaccharides analyses. *J Cer Sci* 53: 45-52. doi:10.1016/j.jcs.2010.09.002

- Escarnot E., Thibaut C. and Forgeois P. (2014)** Study of the impact of growth substance treatment and maize (*Zea mays* L.) variety in spelt (*Triticum spelta* L.) haplodiploidization. *Biotechnol Agron Soc* 18: 32-36
- Eudes F. and Amundsen E. (2005)** Isolated microspore culture of Canadian 6x triticales cultivars. *Plant Cell Tiss Org* 82: 233-241. doi:10.1007/s11240-005-0867-9
- Fadel F. and Wenzel G. (1993)** *In vitro* selection for tolerance to Fusarium in F1 microspores population of wheat. *Plant Breed* 110: 89-95. doi:10.1111/j.1439-0523.1993.tb01218.x
- Ferrie A. M. R., Bhowmik P., Rajagopalan N. and Kagale S (2020)** CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis in Wheat Doubled Haploids. In: Vaschetto, L. (eds) *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2072. Humana, New York, NY. 183-198.
- Flodrova D., Bobalova J. and Lastovickova M. (2016)** Cereal n-glycoproteins enrichment by lectin affinity monolithic chromatography. *Cereal Res Commun* 44: 286-297. doi:10.1556/0806.44.2016.019
- Folling L. and Olesen A. (2001)** Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 20 (7): 629-636. doi:10.1007/s002990100371
- 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. doi:10.1126/science.220.4601.1049
- Galiba G., Kovács G. and Sutka J. (1986)** Substitution analyses of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breed* 263: 263-266. doi:10.1111/j.1439-0523.1986.tb01062.x
- Ganeva G., Landjeva S., Belchev I. and Koleva, L. (2014)** Characterization of two wheat doubled haploid populations for resistance to common bunt and its association with agronomic traits. *Cereal Res Commun* 42: 484–494. doi: 10.1556/CRC.42.2014.3.11
- Germana M. A. (2011a)** Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep* 30: 839-857 doi:10.1007/s00299-011-1061-7

- Germana M. A. (2011b)** Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Org* 104: 283-300. doi:10.1007/s11240-010-9852-z
- Ghaemi M., Sarrafi A. and Morris R. (1995)** Reciprocal substitutions analyses of embryo induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 38: 158-165. doi:10.1139/g95-020
- Gomez-Becerra H. F., Erdem H., Yazici A., Tutus Y., Torun B., Ozturk L., Cakmak I. (2010)** Grain concentration of protein and mineral nutrients in a large collection of spelt wheat grown under different environments. *J Cereal Sci* 52: 342-349. doi:10.1016/j.jcs.2010.05.003
- Graf R. J., Hucl P., Orshinsky B. R. and Kartha K. K. (2003)** “McKenzi” hard red spring wheat. *Can J Plant Sci* 83: 565-569. doi:10.4141/P02-115
- 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.
- Guha S. and Maheswary S. C. (1964)** *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
- Gustafson V. D., Baenziger P. S., Mitra A., Kaeppler H. F., Papa C. M. and Kaeppler S. M. (1995)** Electroporation of wheat anther culture-derived embryoids. *Cereal Res Commun* 23 (3): 207-213.
- Guzmán C., Medina-Larqué A. S., Velu G., González-Santoyo H., Singh R. P., Huerta-Espino J., Ortiz-Monasterio I. and Pena R. J. (2014)** Use of wheat genetic resources to develop biofortified wheat with enhanced grain zinc and iron concentration and desirable processing quality. *J Cereal Sci* 60: 617-622. doi:10.1016/j.jcs.2014.07.006
- Hansen N. J. P. and Andersen S. B. (1998)** Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breed* 117: 401-405. doi:10.1111/j.1439-0523.1998.tb01963.x
- He D. G. and Ouyang J. W. (1984)** Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers different developmental stages. *Plant Sci Lett* 33: 71-79. doi:10.1016/0304-4211(84)90070-1

- Heberle-Bors E. (1985)** *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theor Appl Genet* 71: 361-374. doi:10.1007/BF00251175
- Henry Y. and De Buyser J. (1985)** Effect of 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 4: 307-310. doi:10.1007/BF00269885
- 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. doi:10.1007/BF00023575
- Hensel G., Oleszczuk S., Daghma D. E. S., Zimny J., Melzer M. and Kumlehn J. (2012)** Analysis of T-DNA integration and generative segregation in transgenic winter triticale (*X Triticosecale* Wittmack). *BMC Plant Biol* 12: 171. doi:10.1186/1471-2229-12-171
- Heszky L (2000)** Portoktenyésztés (In vitro androgenesis). in: Dudits D. and Heszky L. (2000) Növényi Biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest. pp 67-77.
- Hlisnikovsky L., Hejzman M., Kunzova E. and Mensik L. (2019)** The effect of soil-climate conditions on yielding parameters, chemical compositions and baking quality of ancient wheat species *Triticum monococcum* L., *Triticum dicoccum* Schrank and *Triticum spelt* L. in comparison with modern *Triticum aestivum* L. *Arch. Agron Soil Sci* 65: 152-163. doi:10.1080/03650340.2018.1491033
- 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. doi:10.1046/j.1439-0523.1999.118002111.x
- Hu D. F., Yuan Z. D., Tang Y. L. and Liu J. P. (1986)** Jinghua No. 1-A winter wheat variety derived from pollen sporophyte. *Sci Sin B Chem Biol Agr Med Earth Sci* 29: 733-745.
- Hu T. and Kasha K. J. (1997)** Improvement of isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Rep* 16: 520-525. doi: 10.1007/BF01142316
- Hunter C. P. (1987)** Plant regeneration method. European patent, 1987. Application No. 872007737.

- Indrianto A., Barinova I., Touraev A. and Heberle-Bors E. (2001)** Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212: 163-174 doi:10.1007/s004250000375
- Islam S. M. S. (2010)** Effect of embryoids age, size, and shape for improvement of regeneration efficiency from microspore – derived embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Omics* 3: 149-153.
- Islam S. M. S. and Tuteja N. (2012)** Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci* 182: 134-144. doi:10.1016/j.plantsci.2011.10.001
- Jauhar P. P., Xu S. S. and Baezinger P. S. (2009)** Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci* 49: 737-755. doi:10.2135/cropsci2008.08.0462
- Jensen C. J. (1977)** Monoploid production by chromosome elimination. In: Reinert J. and Bajaj YPS (eds) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin, pp 299-330.
- Jia G., Chen P. D., Qin G. J. Bai G., Wang X., Wang S., Zhou B., Zhang S and Liu D. (2005)** QTLs for *Fusarium* head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's'. *Euphytica* 146, 183-191. doi:10.1007/s10681-005-9001-7
- Jiang F.Y., Ryabova D., Diedhiou J., Hucl P., Randhawa H., Marillia E. F., Foroud N. A., Eudes F. and Kathiria P. (2017)** Trichostatin A increases the embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Rep* 36: 1701-1706. doi:10.1007/s00299-017-2183-3
- Jing H. C., Korniyukhin D., Kanyuka K., Orford S., Zlatska A., Mitrofanova O. P., Koebner R. and Hammon-Kosack K. (2007)** Identification of variation in adaptively important traits and genome wide analyses of trait-marker associations in *Triticum monococcum*. *J Exp Bot* 58: 3749-3764. doi:10.1093/jxb/erm225
- Kaleikau E. K., Sears R. G. and Gill B. S. (1989)** Monosomic analyses of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 78: 625-632. doi:10.1007/BF00262556

- Kalinowska K., Chamas S., Unkel K., Demidov D., Lermontova I., Dresselhaus T., Kumlehn J., Dunemann F. and Houben A. (2019)** State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theor Appl Genet* 132: 593-605. doi:10.1007/s00122-018-3261-9
- Kanbar O. Z., Lantos C., Kiss E. and Pauk J. (2020)** Androgenic responses of winter wheat combinations in *in vitro* anther culture. *Genetika-Belgrade* 52: 337-350. doi:10.2298/GENSR2001335K
- Kelliher T., Starr D., Su X., Tang G., Chen Z., Carter J., Wittich P. E., Dong S., Green J., Burch E., McCuiston J., Gu W., Sun Y., Strebe T., Roberts J., Bate N. J., Que Q. (2019)** One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat Biotechnol* 37: 287-292. doi:10.1038/s41587-019-0038-x
- Kema G. H. J. (1992)** Resistance in spelt wheat to yellow rust I. Formal analysis and variation for gliadin patterns. *Euphytica* 63: 207-217. doi:10.1007/BF00024548
- Khan A. J., Hassan S., Tariq M., and Khan T. (2001)** Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica* 120: 409-414. doi:10.1023/A:1017598202368
- Kondic-Spika A., Vukosavljev M., Kobiljski B. and Hhristov N. (2011)** Relationship among androgenetic components in wheat and their responses to the environment. *J Biol Res (Thessalon)* 16: 217-223.
- Koutroubas S. D., Fotiadis S., Damalas C. A. (2012)** Biomass and nitrogen accumulation and translocation in spelt (*Triticum spelta*) grown in Mediterranean area. *Field Crop Res* 127: 1-8. doi:10.1016/j.fcr.2011.10.011
- Krzewska M., Czyczylo-Mysza I., Dubas E., Golebiowska-Pikana G. and Zur I. (2015)** Identification of QTLs associated with albino plant formation and some new facts concerning green and albino ratio determinants in triticale (*X Triticosecale* Wittm.) anther culture. *Euphytica* 206:263-278 doi:10.1007/s10681-015-1509-x
- Kumari M., Clarke H. J., Small I. and Siddique K. H. M. (2009)** Albinism in Plants: A major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Crit Rev Plant Sci* 28: 393-409. doi:10.1080/07352680903133252

- Kumlehn J. and Hensel G. (2009)** Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breed Sci* 59: 553-560. doi:10.1270/jsbbs.59.553
- Kunz C., Islam M. S., Berberat J., Peter O., Büter B., Stamp P. and Schmid J. E. (2000)** Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *J Plant Physiol* 156: 190-196 doi: 10.1016/S0176-1617(00)80305-3
- Lantos C. and Pauk J. (2016)** Anther Culture as an Effective Tool in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding. *Russ J Genet* 52: 794-801. doi:10.1134/S102279541608007X
- Lantos C. and Pauk J. (2020)** Factors influencing the efficiency of wheat anther culture. *Acta Biol Cracov Bot* 62: 7-15. doi:10.24425/abcsc.2020.131671
- Lantos C. and Pauk J. (2021)** In Vitro Anther Culture for Doubled Haploid Plant Production in Spelt Wheat. In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2287. Humana, New York, NY. pp. 257-266. doi:10.1007/978-1-0716-1315-3_13
- Lantos C., Bóna L., Boda K. and 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. doi:10.1007/s10681-013-1031-y
- 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. doi:10.1007/s11240-018-1391-z
- 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 Bot* 58: 107-112. doi:10.1515/abcsb-2016-0014
- Lantos C., Lehoczki-Krsjak S., Pauk J (2022)** Induction of in vitro androgenesis in anther culture of recalcitrant einkorn. *Plant Cell Tiss Org* 150: 417-426. doi: 10.1007/s11240-022-02293-6
- 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

- 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
- 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. doi:10.1007/BF00252328
- Lazaridou T. B., Pankou C. I., Xynias I. N. and Roupakias D. G. (2017)** Effects of 1BL.1RS wheat-rye translocation on the androgenic response in spring bread wheat. *Cytol Genet* 51: 485-490. doi:10.3103/S009545271706007X
- 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. doi:10.1515/abcsb-2016-0006
- Letarte J., Simion E., Miner M. and Kasha K. J. (2006)** Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep* 24: 691-698. doi: 10.1007/s00299-005-0013-5
- 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. doi:10.2135/cropsci2012.02.0116
- Ling D. X., Luckett D. J., and Darvey N. L. (1991)** Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Aust J Bot* 39: 467-474.
- Liu W., Zheng M. Y. and Konzak C. F. (2001)** Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 20: 821-824. doi:10.1007/s00299-001-0408-x
- Longin C. F. H., Friedrich H. and Würschum T. (2016)** Back to the future – tapping into ancient grains for food diversity. *Trends Plant Sci* 21: 731-737. doi:10.1016/j.tplants.2016.05.005

- Longin C. F. H., Mi X., Melchinger A. E., Reif J. C. and Würschum T. (2014)** Optimum allocation of test resources and comparison of breeding strategies for hybrid wheat. *Theor Appl Genet* 127: 2117-2126. doi:10.1007/s00122-014-2365-0
- Makowska K. and Oleszczuk S. (2014)** Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Rep* 33:385-392. doi:10.1007/s00299-013-1543-x
- Makowska K., Kaluzniak M., Oleszczuk S., Zimny J., Czaplicki A. and Konieczny R. (2017)** Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tiss Org* 131: 247-257. doi: 10.1007/s11240-017-1280-x
- 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. doi:10.1007/BF00239096
- Mentewab A., Letellier V., Marque C. and Sarrafi A. (1999)** Use of anthocyanin biosynthesis stimulatory genes as markers for the genetic transformation of haploid embryos and isolated microspores in wheat. *Cereal Res Commun* 27 (1-2): 17-24. doi: 10.1007/BF03543914
- Ming-hui K., Yan H., Bing-yan H., Yong-ying Z., Shi-jie W., Li-juan M. and Xin-you Z. (2011)** Breeding of newly licensed wheat variety Huapei 8 and improved breeding strategy by anther culture. *Afr J Biotechnol* 10: 19701-19706. doi:10.5897/AJB11.2832
- Miranda L. M., Murphy J. P., Marshall D., Cowger C., Leath S. (2007)** *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 113: 1497-1504. doi: 10.1007/s00122-006-0397-9
- Miroshnichenko D, Ashin D, Pushin, A, Dolgov S (2018)** Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* spp. *monococcum*), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnol* 18: 68. doi:10.1186/s12896-018-0477-3
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0173533
- Mohler V., Singh D., Singrün C. and Park R. F. (2012)** Characterization and mapping of Lr65 in spelt wheat ‘Altgold Rotkorn’. *Plant Breed* 131: 252-257. doi:10.1111/j.1439-0523.2011.01934.x
- Nagy É., Szabó-Hevér Á., Lehoczki-Krsjak S., Lantos C., Kiss E. and Pauk J. (2022)** Detection of drought tolerance-related QTL in Plainsman V./Cappelle Desprez doubled haploid wheat population. *Cereal Res Commun* 50: 689-698. doi: 10.1007/s42976-021-00229-y
- Niazian M. and Shariatpanahi M. E. (2020)** *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica* 216: 69. doi:10.1007/s10681-020-02609-7
- 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. doi:10.1111/pbr.12257
- Niu Z., Jiang A., Abu Hammad W., Oladzadabbasabadi A., Xu S. S., Mergoum M. and Elias E. M. (2014)** Review of doubled haploid production in durum and common wheat through wheat × maize hybridization. *Plant Breed* 133: 313-320. doi:10.1111/pbr.12162
- Oleszczuk S. and Lukaszewsky A. J. (2014)** The origin of unusual chromosome constitutions among newly formed allopolyploids. *Am J Bot* 101: 318–326. doi: 10.3732/ajb.1300286
- Oleszczuk S., Sowa S. and Zimny J. (2004)** Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep* 22: 885-893. doi:10.1007/s00299-004-0796-9
- 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. doi: 10.1007/s11627-020-10122-8

- Orlov P. A., Becker D., Shewe G. and Lorz H. (1999)** Cytoplasmic effects on pollen embryogenesis induction in wheat microspore culture. *Cereal Res Commun* 27: 357-363. doi:10.1007/BF03543549
- 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. doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001
- 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.
- 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., Liang H., Jia S., Zhang C., Zhao T. H., He L. Z. and Jia X. (1994)** Studies on the chromosome doubling of wheat pollen plants. *Plant Sci* 98: 209-214. doi:g/10.1016/0168-9452(94)90011-6
- Ouyang J. W., Zhou S. M. and Jia S. E. (1983)** The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 66: 101-109. doi:10.1007/BF00265182
- Pauk J. (2005)** Androgenezis és genetikai transzformáció különböző gabonafajokban. D.Sc dissertation, 1-138. HAS, Budapest, Hungary.
- Pauk J., Kertész Z., Beke B., Bóna L., Csósz M. and Matuz J. (1995)** New winter wheat variety-'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. *Cereal Res Commun* 23: 251–256.
- Pauk J., Lantos C., Cseuz L., Papp M., Óvári J., Beke B. and Pugris T. (2020)** 'GK Déva' dihaploid módszer segítségével előállított új őszi búzafajta ('GK Déva', new released winter wheat variety using dihaploid method). XXVI. Növénynevelési Tudományos Napok, Szeged, Hungary, 04-05. 03. 2020. p. 102.

- Pauk J., Manninen O., Mattila I., Salo Y. and Pulli S. (1991)** Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breed* 107: 18-27. doi: 10.1111/j.1439-0523.1991.tb00524.x
- 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. doi:10.1023/A:1006416116366
- Peng F. X., Song N., Shen H. X., Wu H. B., Dong H. T., Zhang J., Li Y. H., Peng H. R., Ni Z. F., Liu Z. Y., Yang T. M., Li B. Y., Xie C. J. and Sun Q. X. (2014)** Molecular mapping of a recessive powdery mildew gene in spelt wheat cultivar Hubel. *Mol Breed* 34: 491-500. doi: 10.1007/s11032-014-0052-0
- 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
- Petrovic D., Förster J., Devaux P., Hariri D., Guilleroux M., Kanyuka K., Lyons R., Weyen J., Feuerhelm D., Kastirr U., Sourdille P., Röder M., Order F (2009)** Mapping and diagnostic marker development for soil-borne cereal mosaic virus resistance in bread wheat. *Mol Breed* 23: 641-653. doi: 10.1007/s11032-009-9262-2
- Picard E. and De Buyser J. (1973)** Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d'antheres *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 277: 1463-1466.
- Plamenov D., Belchev I. and Spetsov P. (2009)** Anther culture response of *Triticum durum* × *T. monococcum* spp. *aegilopoides* amphiploid. *Cereal Res Commun* 37: 255-259. doi:10.1556/CRC.37.2009.2.13
- Pónya Z., Finy P., Fehér A., Mitykó J., Dudits D. and Baranbás B. (1999)** Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of 102 wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection. *Protoplasma* 208 (1-4) 163-172. doi: 10.1007/BF01279087

- Puolimatka M. and Pauk J. (1999)** Impact of explant type, duration and initiation time on the co-culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Physiol* 154 (3): 367-373.
- Puolimatka M., Laine S. and Pauk J (1996)** Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. *Cereal Res Commun* 24: 393-400.
- Purnhauser L. and Gyulai G. (1993)** Effect of cooper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue-cultures. *Plant Cell Tiss Org* 35: 131-139. doi:10.1007/BF00032962
- Raman H., Rahman R., Luckett D., Raman R., Békés F., Láng L. and Bedó Z. (2009)** Characterisation of genetic variation for aluminium resistance and polyphenol oxidase activity in genebank accessions of spelt wheat. *Breed Sci* 59: 373-381. doi:10.1270/jsbbs.59.373
- Rather S. A., Chaudhary H. K. and Kaila V. (2014)** Proportional contribution and potential of maternal and paternal genotypes for polyhaploid induction in wheat x *Imperata* cylindrical chromosome elimination approach. *Cereal Res Commun* 42: 19-26. doi:10.1556/CRC.2013.0038
- Ravi M. and Chen S. W. L. (2010)** Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464: 615-618. doi:10.1038/nature08842
- Redha A. and Suleman P. (2011)** Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. *Plant Cell Tiss Org* 105: 345-353. doi:10.1007/s11240-010-9873-7
- Redha A. and Talaat A. (2008)** Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant Cell Tiss Org* 92: 141-146. doi:10.1007/s11240-007-9315-3
- Redha A., Attia T., Büter B., Stamp P. and Schmid J. E. (1998)** Single and combined effects of colchicine, L-proline and post inoculation low temperature on anther culture of wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Breed* 117: 335-340. doi:10.1111/j.1439-0523.1998.tb01950.x

- 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. doi:10.1111/pbi.12805
- 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. doi:10.1007/s11816-012-0256-x
- Rustgi S., Ankrah N. O., Brew-Appiah R. A. T., Sun Y., Liu W. G. and von Wettstein D (2017)** Doubled Haploid TRansgenic Lines by microspore transformation. In: Bhalla P., Singh M. (eds) Wheat Biotechnology. Methods in Molecular Biology, vol 1679. pp 213-234. Humana Press, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8_13
- Sadasivaiah R. S., Perkovic S. M., Pearson C., Postman B. and Beres B. L. (2004)** Registration of “AC Andrew” wheat. *Crop Sci* 44: 696–697. doi:10.2135/cropsci2004.6960
- 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
- Schmid J. (1990)** *In vitro* production of haploids in *Triticum spelta*. In: Bajaj Y. P. S., editor, Biotechnology and in Agriculture and Forestry-13 Wheat. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg p. 363-381.
- 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

- Seldimirova O. A., Kruglova N. N., Titova G. E. and Batygina T. B. (2017)** Comparative ultrastructural analyses of the *in vitro* microspore embryoids and *in vivo* zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development. *Russ J Dev Biol* 48: 185-197. doi: 10.1186/s12870-016-0782-8
- Sen A. (2017)** Retrotransposon insertion variations in doubled haploid bread wheat mutants. *Plant Growth Regul* 81: 325-333. doi:10.1007/s10725-016-0209-4
- 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. doi:10.1007/s00299-006-0205-7
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006b)** Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plant* 127 (4): 519-534. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00675.x
- Sharma P., Chaudhary H. K., Manoj N. V., Kumar, P. (2019)** New protocol for colchicine induced efficient doubled haploidy in haploid regenerants of tetraploid and hexaploid wheats at *in vitro* level. *Cereal Res Commun* 47: 356-368. doi:10.1556/0806.47.2019.09
- Shchukina, L. V., Pshenichnikova T. A., Khlestkina E. K., Misheva S., Kartseva T., Abugalieva A. and Borner A. (2018)** Chromosomal location and mapping of Quantitative Trait Locus determining technological parameters of grain and flour in strong-flour bread wheat cultivar Saratovskaya 29. *Cereal Res Commun* 46: 628-638. doi:10.1556/0806.46.2018.047
- Singh D., Mohler V. and Park R. F. (2013)** Discovery, characterisation and mapping of wheat leaf rust resistance gene *Lr71*. *Euphytica* 190:131-136 doi:10.1007/s10681-012-0786-x
- 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. doi:10.1007/s11032-017-0715-8
- Soriano M., Cistue L. and Castillo A. M. (2008)** Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep* 27: 805-811. doi:10.1007/s00299-007-0500-y

- 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. doi:10.1007/s11240-007-9288-2
- Soriano M., Li H. and Boutilier K. (2013)** Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod* 26: 181-196. doi:10.1007/s00497-013-0226-7
- Stein N., Feuillet C., Wicker T., Schlagenhauf E. and Keller B. (2000)** Subgenome chromosome walking in wheat: a 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13436-13441. doi:10.1073/pnas.230361597
- Suchowilska E., Wiwart M., Kandler W. and Krska R. (2012)** A comparison of macro- and microelement concentration in the whole grain of four *Triticum* species. *Plant Soil Environ* 58: 141-147. doi:10.17221/688/2011-PSE
- Sunderland N., Huang B. and Hills G. J. (1984)** Disposition of pollen *in situ* and its relevance to anther/pollen culture. *J Exp Bot* 35: 521-530. doi:10.1093/jxb/35.4.521
- Szabó-Hevér Á., Lehoczki-Krsjak S., Varga M., Purnhauser L., Pauk J., Lantos C. and 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 population. *Euphytica* 200: 9-26. doi:10.1007/s10681-014-1124-2
- 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. doi:10.1007/BF00270121
- Szarejko I (2003)** Doubled haploid mutant production, in: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 351-361.
- Takács I., Kovács G. and Barnabás B. (1994)** Analysis of the genotypic effect on different developmental pathways in gametophyte cultures. *Plant Cell Rep* 13: 227-230. doi:10.1007/BF00239898

- Tan B. and Halloran G. (1982)** Pollen dimorphism and the frequency of inductive anthers in anther culture of *Triticum monococcum*. *Biochem Physiol Pflanz* 177: 197-202 doi: 10.1016/S0015-3796(82)80024-3
- 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. doi:10.1016/j.xplc.2023.100569
- Testillano P. S. (2019)** Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J Exp Bot* 70: 2965-2978. doi:10.1093/jxb/ery464
- 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. and Andersen S. B. (2009)** Albinism in microspore culture, In: A. Touraev, B. P. Forster, and S. M. Jain (eds), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 155-160. Springer Science + Business Media B. V. 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. doi:10.1023/A:1017554129904
- Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O. and Heberle-Bors E. (1996)** Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum*L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex Plant Reprod* 9: 209–215. doi:10.1007/BF02173100
- Turesson I. K. D. and Öhlund R. C. V. (1993)** Plant regeneration through culture of isolated microspores *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Tiss Org* 34: 163-167. doi:10.1007/BF00036097
- Turesson I. K. D., Pedersen S., Olesen A., Andersen S.B. (1991)** An effect of the 1BL/1RS chromosome on albino frequency in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *J Genet Bred* 45: 345-348. doi:10.5555/19921632243

- Turesson I. K. D., Peterson S. and Anderson S. B. (1989)** Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theor Appl Genet* 78: 879-961. doi:10.1007/BF00266675
- Turesson S. A., von Post R. and Ljungberg A. (2003)** Wheat anther culture, in: M. Maluszynski M, K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko (eds), *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual*, 71-76. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 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. doi:10.1007/978-1-0716-1335-1_3
- 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. doi:10.1007/s10681-006-9239-8
- 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. doi:10.1046/j.1439-0523.2000.00536.x
- Valero-Rubira I., Castillo A. M., Burrell M. A., Valles M. P. (2023)** Microspore embryogenesis induction by mannitol and TSA results in a complex regulation of epigenetic dynamics and gene expression in bread wheat. *Front Plant Sci* 13. doi: 10.3389/fpls.2022.1058421
- Vu N. T., Chin J., Pasco J. A., Kovacs A., Wing L. W., Békés F., Suter D. A. I. (2015)** Prevalence of Wheat and Spelt sensitivity in a randomly selected Australian population. *Cereal Res Commun* 43: 97-107 doi:10.1556/CRC.2014.0026
- Wang C. C., Chu C. C., Sun C. S., Wu H. S., Yin K. C. and Hsu C. (1973)** The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers cultured *in vitro*. *Acta Genetica Sinica* 16: 218-222.

- Wang H. M., Enns J. L., Brost J. M., Orr T. D. and Ferrie A. M. R. (2019)** Improving the efficiency of wheat microspore culture evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. *Plant Cell Tiss Org* 139: 589-599. doi:10.1007/s11240-019-01704-5
- Wang P. and Chen Y. R. (1986)** A study on the application of C17 medium for anther culture. *Acta Bot Sin* 28: 38-45.
- Wang Y., Peng H., Liu G., Xie C., Ni Z., Yang T., Liu Z. and Sun Q. (2010)** Identification and molecular mapping of a leaf rust resistance gene in spelt wheat landrace Altgold. *Euphytica* 174: 371-375. doi:10/1007/s10681-010-0134-y
- Wanic M., Denert M. and Treder K. (2019)** Effect of forecrops on the yield and quality of common and spelt wheat grain. *J Elementol* 24: 369-383. doi:10.5601/jelem.2018.23.1.1585
- Wedzony M., Forster B. P., Zur I., Golemić E., Szechyńska-Hebda M., Dubas E. and Gotebiowska G. (2009)** Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants, In: Touraev A., Forster B. P. and Jain S. M. (eds), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 1—35. Springer Science + Business Media B. V. The Netherlands
- 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 - Pl* 52: 619-625. doi:10.1007/s11627-016-9793-2
- Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zypych-Walczak J., Tomkowiak A. and Kwiatek M. (2020)** Comparison of androgenic response of spring and winter wheat. *Plants* 9: 49. doi:10.3390/plants9010049
- Weigt D., Niemann J., Siatkowski I., Zypych-Walczak J., Przemysław O. and Kurasiak-Popowska D. (2019)** Effect of zearalenone and hormone regulators on microspore embryogenesis in anther culture of wheat. *Plants* 8: 487. doi:10.3390/plants8110487
- Werner K., Friedt W., Ordon F (2007)** Localisation and combination of resistance genes (BaMMV, BaYMV) against soil-borne viruses of barley (*Hordeum vulgare* L.) using doubled haploids and molecular markers. *Euphytica* 158: 323-329. doi: 10.1007/s10681-006-9206-4

- Werner K., Friedt W., Ordon F (2005)** Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Mol Breed* 16:45-55. doi: 10.1007/s11032-005-3445-2
- 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. doi:10.1080/02571862.2014.903434
- 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. doi:10.1007/978-1-0716-1315-3_2
- Wuerschum T., Tucker M. R., Reif J. C. and Maurer H. P. (2012)** Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by *in vitro* chromosome doubling. *BMC Plant Biol* 12: 109. doi:10.1186/1471-2229-12-109
- 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. doi:10.1007/s10535-008-0152-y
- Zaharieva M. and Monneveux P. (2014)** Cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*): the long life of a founder crop of agriculture. *Genet Resour Crop Evol* 61: 677-706. doi:10.1007/s10722-014-0084-7
- Zhang K. P., Tian J. C., Zhao L. and Wang, S.S. (2008)** Mapping QTLs with epistatic effects and QTL × environment interactions for plant height using a doubled haploid population in cultivated wheat. *J Genet Genomics* 35: 119–127. doi:10.1016/S1673-8527(08)60017-X
- 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. doi:10.1002/jsfa.6691
- 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 Plantarum* 61: 255-265. doi:10.1007/s10535-016-0662-y
- Zheng M. Y., Weng Y., Liu W. and Konzak C. F. (2002)** The effect of ovaryconditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 20 (9): 802-807. doi: 10.1007/s00299-001-0411-2
- Zielinski H., Ceglinska A. and Michalska A. (2008)** Bioactive compounds in spelt bread. *Eur Food Res Technol* 226: 537-544. doi:10.1007/s00217-007-0568-1
- Zur I., Dubas E., Krzewska M. and Janowiak F. (2015)** Current insight into hormonal regulation of microspore embryogenesis. *Front Plant Sci* 6: 424. doi:10.3389/fpls.2015.00424
- Zur I., GajECKa M., Dubas E., Krzewska M. and Szarejko I (2021)** Albino plant formation in androgenic cultures: an old problem and new facts. In: Segui-Simarro, J. M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2288. Humana, New York, NY. pp. 3-24. doi: 10.1007/978-1-0716-1335-1_1