

DIPLOMADOLGOZAT

Markó Ferenc

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Genetika és Biotechnológia Intézet

mesterképzési szak

ÁRPA *IN VITRO* PORTOKTENYÉSZTÉS FEJLESZTÉSE

Belső konzulens:	Dr. Veres Anikó egyetemi docens
Belső konzulens intézete/tanszéke:	Genetika és Biotechnológia Intézet / Genetika és Genomika Tanszék
Külső konzulens:	Dr. Lantos Csaba Laborvezető, Gabonakutató Nonprofit Kft.
Készítette:	Markó Ferenc

**Gödöllő
2024**

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Az árpa bemutatása, termesztési jelentősége	5
2.2. Doubled Haploid (DH) technológia jelentősége és alkalmazása	7
2.3. A haploidia történeti áttekintése.....	7
2.4. Haploid árpák előállítása	8
2.5. Az árpa androgenezis indukciója <i>in vitro</i> portoktenyészetben.....	9
2.6. Az <i>in vitro</i> portoktenyésztést befolyásoló tényezők.....	10
2.6.1. A genotípus hatása	10
2.6.2. A mikrospórák fejlettségi állapota	10
2.6.3. Stressz-előkezelések szerepe.....	11
2.6.4. Tenyésztési körülmények	11
2.7. Albinizmus	12
3. Anyag és módszer	13
3.1. Növényanyag.....	13
3.2. A donorhajtások begyűjtése és előkezelése.....	13
3.3. <i>In vitro</i> portoktenyészetek készítése.....	14
3.4. Növényregenerálás, gyökeresítés	15
3.5. Üvegházi kiültetés és akklimatizáció	18
3.6. Betakarítás.....	18
3.7. Statisztikai elemzés	19
4. Eredmények.....	20
4.1. Az <i>in vitro</i> portoktenyésztés folyamata.....	20
4.2. Portoktenyésztésből származó embriószerű struktúrák vizsgálata növény regenerációs kísérletekben.....	22
4.3. Portoktenyésztés során létrejött ELS növény regenerálása	22

4.5. Portoktenyésztésből származó <i>in vitro</i> zöld növénykéek gyökeresítése.....	26
4.6. Az <i>in vitro</i> gyökeresített zöld növénykéek akklimatizációja	27
4.7. <i>In vitro</i> portoktenyésztés alkalmazása nyolc F ₁ kombináció felhasználásával	29
5. Következtetések és javaslatok	31
5.1. Növénykéek regenerálása portoktenyésztetben fejlődött ELS-ből	31
5.2. Portoktenyésztésből származó <i>in vitro</i> zöld növénykéek gyökeresítése.....	32
5.3. Módszer hatékonyságának ellenőrzése	33
6. Összefoglalás.....	34
7. Irodalomjegyzék.....	36
8. Köszönetnyilvánítás	44

1. Bevezetés

A mezőgazdaság fejlődése során a növénynemesítés mindig kulcsfontosságú szerepet játszott a termésbiztonság és a fenntartható élelmiszerellátás biztosításában. A konvencionális nemesítési módszereket évszázadok óta alkalmazzák a nemesítők a termesztett növényfajok, így a gabonafélék esetében is. Azonban a gyorsan változó klimatikus és gazdasági környezet, valamint a növekvő élelmiszerigény új kihívásokat támasztott, ezért a hagyományos technikák már egyre gyakrabban igénybe veszik a modern laboratóriumi módszerek által nyújtott lehetőségeket.

Ezzel párhuzamosan a tudományos fejlődés új eszközöket kínált a növénynemesítésben. A modern nemesítési módszerek, mint a marker alapú szelekció (MAS), a genetikai transzformáció, genomszelekció, génszerkesztés, új távlatokat nyitottak a hatékonyabb és célzottabb nemesítési eljárások előtt, támogatva ezzel a konvencionális nemesítést. Ezek a technológiák lehetővé teszik, hogy a nemesítők hatékonyabban és gyorsabban ériék el a kívánt tulajdonságokkal rendelkező új fajtákat, csökkentve ezzel a nemesítési folyamatok időtartamát, miközben növelik a termesztett fajták versenyképességét, ellenállóképességét és terméshozamát.

Ilyen módszer a kettőzött haploid vagy doubled haploid (DH) technológia alkalmazása a növénynemesítők körében. A fajta előállítás ideje a hagyományos nemesítési módszerekkel akár 12 évet is igénybe vehet, ezért jelentős mennyiségű idő és költség takarítható meg a DH technológia alkalmazásával, mivel egy generáció alatt is elérhető a homozigóta állapot. Ez az egyik fő oka annak, hogy a nemesítő cégek és kutatócsoportok széles körben alkalmazzák a homozigóta vonalak, egyedek előállítását. Ezen kívül a DH technológia alkalmas a recesszív tulajdonságok fenotípusos rögzítésére, géntérképezésre, kombinálható a marker alapú szelekcióval (MAS), továbbá alkalmazzák a mutációs nemesítésben és epigenetikai kutatásokban.

A gabonafélék közül az árpa (*Hordeum vulgare* L.) az egyik legsikeresebb faj a tömeges DH növény előállításban, az androgenezis kutatás modell növényének is tartják. Az *in vitro* androgenezisre alapozott izolált mikrospóra- és portoktenyésztést több évtizede alkalmazzák kutatók és nemesítőházak. Több módszer is publikálásra került, viszont a hatékonyság javítása továbbra is a kutatások középpontjában áll.

Laboratóriumunk az elmúlt években sikeresen állított elő DH növényeket az árpa nemesítési programunk számára, viszont célul tűztük ki a hatékonyság további javítását.

Diplomamunkám kezdetén a következő célkitűzéseket határoztuk meg:

1. *In vitro* androgenezissel előállított ELS-k regenerálása során az alkalmazott regeneráló táptalajok hatékonyságának összehasonlítása négy F₁ genotípussal.
2. *In vitro* androgenezissel előállított zöld növénykéek gyökeresítése és akklimatizációja során az alkalmazott táptalajok hatékonyságának összehasonlítása négy F₁ genotípussal.
3. Az ideális protokoll tesztelése további négy F₁ genotípusok bevonásával.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az árpa bemutatása, termesztési jelentősége

Az árpa az egyik legrégebben termesztett növényfaj az emberiség történelmében, melynek primer gécenctruma Kelet- Ázsia, szekunder gécenctruma pedig Etiópia. A termesztett árpa hét pár kromoszómával rendelkező, diploid faj, melynek kromoszómaszáma $2n=2x=14$ (Takahashi 1955). A termesztett árpák között tetraploid egyedek is előfordulhatnak (Harlan 1976). Metafázisban a kromoszómák hossza 6-8 μm (Smith 1951).

Köztermesztésben, napjainkban a két- és hatsoros árpák szerepelnek. Gyenge termőképességű talajokon kiválóan terem, és szárazságtűrő képessége is figyelemre méltó. 2022-ben termőterülete a világon 47,15 millió hektár volt, össztermése 154,65 millió tonna, termésátlaga 3,28 t/ha ([http1](#)). Magyarországon 2022-ben 412 438 hektáron, 2,2 millió tonna került betakarításra, melynek termésátlaga 5,46 t/ha volt ([http2](#)). Világon a búza, kukorica, rizs és a szója után az ötödik helyet foglalja el a termesztésben lévő fajok közül ([http1](#)). Kiváló alkalmazkodó képességének köszönhetően világviszonylatban a tavaszi árpa, míg hazánkban az őszi árpatermesztés a meghatározó. Előbbit kiváló söripari minőség, míg utóbbit vitamin-, nyersrost és aminosav-összetétele teszi kiemelkedővé a monogasztrikus állatok takarmányozásában (Antal 2005).

Az árpa nemzetség (*Hordeum* L.) rendszertani besorolása ([http3](#)):

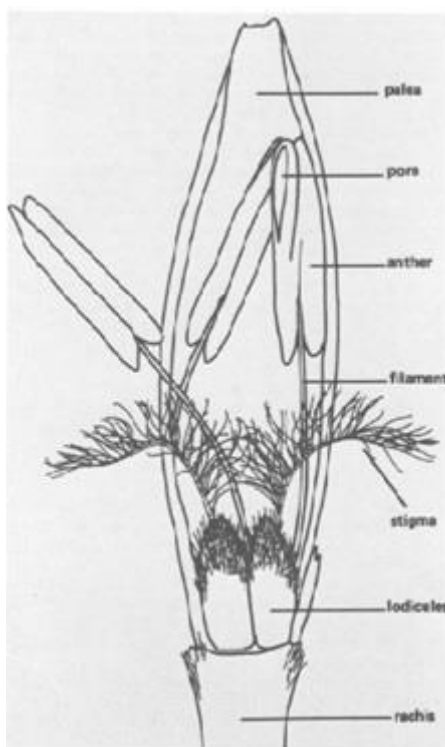
- Ország: Növények (*Plantae*)
- Törzs: Zárvatermők (*Magnoliophyta*)
- Osztály: Egyszikűek (*Liliopsida*)
- Rend: Perjevirágúak (*Poales*)
- Család: Pázsitfűfélék (*Poaceae*)
- Nemzetség: *Hordeum* L.
- Faj: *Hordeum vulgare* L.

A *Hordeum* nemzetségnek körülbelül 30-40 faja ismert. Köztermesztésben a kétsoros (convar. *distichon* L. Alef), négysoros (convar. *vulgare*) és a hatsoros (convar. *hexastichon* Alef) árpák szerepelnek (Szabó 2004).

A hajtástengelyek végén kalászvirágzatok találhatók, melyek kalászkákból állnak. Egy kalászpadkán három egyvirágú kalászka helyezkedik el. Egy kalászka kettő pelyvalevél között található, melyek 0,5 cm-es szálkával rendelkeznek. A kétsoros árpák esetében csak a középső kalászka tud megtermékenyülni, a szélsők terméketlenek. A négy-, és hatsoros

árpáknál mind a három kalászka termékenyül. A pelyvák között található virágot a külső és a belső toklász fogja közre. A külső toklász hosszú szálkával rendelkezik. A kalász szálkái alulról felfelé kis mértékben rövidülnek. A toklászokon belül két hártyszerű lepelpikkely található. A porzótáj háromtagú, mely három portok rövidebb a porzószálnál (1. ábra). Egyetlen portok két portokfélre tagolódik, melyeket a csatló köt össze, bennük kettő-kettő pollenzsák található. A termő két csúcsából indul ki egy-egy tollas bibe. Virágképlete: $\downarrow P_{1+2} A_3 G_{(1)}$ (Czímber 2004).

1. ábra. Az árpa virága (Reid 1985): rachis- nyelecske; lodicules- lepelsérték; stigma- tollas bibe; filament- porzószáll; anther- portok; pore- portoknyílás; palea- belső toklász



Öntermékenyülő faj, a portokokban található pollenek még a virág kinyílása előtt beérnek, öntermékenyülése ennek is köszönhető. A portokok szétnyílását követően a kikerült érett pollenek a szétnyílt tollas bibékre kerülnek. A pollenek tömlőt hajtanak és pollenenként két hímivarsejt behatol a bibébe. Ez után az egyik összeolvad a központi sejttel, a másik hímivarsejt pedig megtermékenyíti a petesejtet. Beporzás után a magház növekedni kezd és kialakul az együregű szemtermés. Idegentermékenyülésre kis mértékben hajlamos, mely függ az időjárástól, a hőmérséklettől, vagy akár a termőhelytől is (Briggs 1978).

A Magyarországon termesztett árpák többsége zárva virágzik. A zárva virágzást kleisztogamiának nevezzük, mely genetikailag kódolt tulajdonság, viszont függ a gentípustól és a környezeti tényezőktől is. A zárvatermő fajták lepelpikkelyei kevésbé fejlettek, ez nem teszi lehetővé nagymértékű víz felvételét, melynek hiányában a lepelpikkelyek nem duzzadnak meg és nem nyitják szét a toklászokat. A porzósálak gyors ütemben hosszabbodnak, de a portokok a toklászokon belül maradnak, ezért a beporzás egyedileg, a virágokon belül történik (Karsai 2004).

2.2. Doubled Haploid (DH) technológia jelentősége és alkalmazása

A vetőmag piacon jelentős verseny zajlik a nemesítő cégek között. A változó ökológiai körülmények mellett a termelők, a feldolgozók és a fogyasztók igényeihez folyamatosan igazodni kell. Ezen okokból adódóan a növény-nemesítésben kiemelt szerepe van a nemesítési időnek, mivel egy fajta előállítási ideje akár 10-12 évet is igénybe vehet konvencionális nemesítési módszereket alkalmazva, és jelentős költségekkel jár. A kettőzött haploid vagy doubled haploid (DH) technológiát széles körben alkalmazzák a növény-nemesítők az említett tényezők redukálására, mivel már egyetlen generáció alatt elérhető a homozigóta állapot. Nemesítési programokban való alkalmazása (Werner és mtsai. 2000, Lantos és mtsai. 2013) mellett használják alkalmazott genetikai kutatásokban is. Ide értjük a recesszív tulajdonságok fenotípusos rögzítését (Maluszynski, 2003), géntérképezést és markerre alapozott szelekciót (Tyrka és mtsai. 2018), genomszelekciót (Marulanda és mtsai. 2016), genetikai transzformációt (Otto és mtsai. 2015), mutációs nemesítést (Lee és mtsai. 2003), genomszerkesztést (Ferrie és mtsai. 2020) és epigenetikai kutatásokat (Machczyńska és mtsai. 2015).

Magyarországon először 1992-ben Simonné Dr. Kiss Ibolya és Prof. Dr. Heszky László állított elő portoktenyésztéssel, államilag elismert rizs fajtát, mely a Dáma nevet kapta (Heszky 1996). Szintén 1992-ben, Szegeden Prof. Dr. Pauk János és munkatársai hozták létre az első DH búza fajtát, a GK Délibábot (Pauk és mtsai. 1995).

2.3. A haploidia történeti áttekintése

A haploidiaival kapcsolatos kutatómunka több mint egy évszázados múltra tekint vissza. 1922-ben Blakeslee és munkatársai figyeltek meg a természetben először, spontán haploid növényt, mely *Datura stramonium* L. volt (Blakeslee és mtsai. 1922). Ezt követően indultak meg a kutatások a haploidok alkalmazásának lehetőségeiről a nemesítésben és a genetikában. Chase (1952) volt az első, aki marker gént felhasználva *in vivo* haploidokat

hozott létre partenogenezissel, majd azokból diploidizálást követően nemesítési vonalat állított elő.

Az első *in vitro* haploid növényt, *in vitro* androgenezisre alapozott portoktenyésztéssel állították elő *Datura innoxia* L. fajban (Guha és Maheswari 1964). A következő években számos más faj esetében is sikerrel alkalmazták az *in vitro* portoktenyésztést; rizsben (Niizeki és Oono 1968), dohányban (Heszky és Paál, 1972), búzában (Ouyang és mtsai. 1973) és árpában (Clapham 1973). Mára már közel 400 növényi fajban vált kutatott területté az *in vitro* androgenezis indukciója (Forster és Thomas 2005). Az első sikeres indukciós kísérletek után hamarosan megjelent az izolált mikrospóra tenyésztés módszere is (Hunter 1988), melynek előnye, hogy csak a független, haploid mikrospórák kerülnek tenyésztésre, a portokok szomatikus sejtjei nincsenek jelen a tenyésztő oldatban.

2.4. Haploid árpák előállítása

Haploid genezis létrejöhet természetes vagy indukált úton. Természetben az első spontán haploid árpa felfedezése 1934-ben történt (Johansen 1934). Ezt követően indultak el olyan módszertani-fejlesztések, melyek lehetővé tették nagy mennyiségű DH növény előállítását.

Az indukált módszerek között megkülönböztetünk *in vivo* és *in vitro* technikákat. *In vivo* technika a távoli fajok keresztezésén és genom elimináción alapuló bulbosum-módszer (Kasha és Kao 1970). Lényege, hogy *Hordeum vulgare* L. (anya) és *Hordeum bulbosum* L. (apa) keresztezését követően a hibrid zigóta osztódik, majd a *Hordeum bulbosum* L. kromoszómái eliminálódnak. A fejlődő embrió pedig csak a *Hordeum vulgare* L. genommal fog rendelkezni. Mivel a fejlődő embrió csupán 10-14 napig életképes, azt követően pedig abortál, ezért szükséges embriómentés alkalmazása. Kolhicin kezeléssel a haploid növényekből DH növények állíthatók elő (Kasha 2005).

In vitro technikák között megkülönböztetünk androgenezisen és ginogenezisen alapuló módszereket. Alkalmazásuk során az osztódó mikro-, és makrospórák gametofita fejlődésmenetét át kell programozni sporofita fejlődésmenetre. *In vitro* androgenezisen alapuló módszer a portoktenyésztés és az izolált mikrospóra tenyésztés. Az *in vitro* androgenezis lényege, hogy redukált kromoszóma számú, haploid mikrospórákból, megtermékenyítés nélkül, közvetlenül haploid növények regenerálhatók.

In vitro portoktenyésztéssel először Clapham (1973) állított elő haploid árpát. A következő húsz évben az *in vitro* portoktenyésztés módszerét jelentősen továbbfejlesztették, mely módosítások legfőbb lépéseit Pickering és Devaux (1992) foglalták össze. Jelenleg is

számos protokoll áll a kutatók rendelkezésére (Cistué és mtsai.2003; Makowska és mtsai. 2015). *In vitro* portoktenyésztés alkalmazása során az izolált portokok korai-, vagy középső egy-sejtmagvas vakuólumos fejlettségi állapotú mikrospórákat tartalmaznak. A mikrospórák fejlődésmenete stressz előkezeléssel megváltoztatható (Cistué és mtsai. 2003) és belőlük *in vitro* körülmények között, nagyszámú zöld növényke regenerálható.

Az izolált mikrospóra tenyésztés módszerét először Sunderland és Roberts (1977) írták le árpában. Szemben a portoktenyésztéssel, az izolált mikrospóra tenyésztés során kései egy-sejtmagvas-, vagy korai két-sejtmagvas vakuólumos fejlettségű mikrospórák kerülnek izolálás után az indukciós közegre. Izolálás során és cukor-grádiens centrifugálással lehet a szuszpenzió tisztaságát emelni. Tisztítást követően csak a független, haploid mikrospórák lesznek jelen az indukciós tápoldatban, a portokok szomatikus diploid sejtjei nem. További előnye, hogy akár 200-szor is több zöld növényke regenerálható (Hoekstra és mtsai. 1992) a portoktenyésztéshez képest. A hatékonyságára viszont negatívan hat a regenerált albínó növénykéek magas száma (Makowska és mtsai. 2014) és a genotípus függőség (Weyen 2009).

In vitro portok-, és izolált mikrospóra tenyésztés esetében is a regenerált zöld növénykéek 70-80%-a spontán diploid, így árpa *in vitro* androgenezist indukciója során nem szükséges kolhicin kezelés alkalmazása (Kasha 2005).

Az *in vitro* ginogenezis egy alternatív eljárás, melynek során az embriózsák redukált sejtjéből, megtermékenyítés nélkül lehetséges haploidok előállítása. Indukálható az termékenyítetlen ovárium vagy ovulum steril kultúráiban. *In vitro* ginogenezissel először San Noeum (1976) állított elő haploid árpát. Később Castillo és Cistué (1993) regeneráltak sikeresen árpa haploid növényeket megtermékenyítetlen ovárium tenyészetből, hatékonysága viszont csupán 0,75 % volt az izolált ováriumokra vonatkoztatva.

Napjainkban az árpa nemesítésben és kutatásban az *in vitro* androgenezisre alapozott módszerek terjedtek el, kedvezőbb hatékonyságuk miatt.

2.5. Az árpa androgenezis indukciója *in vitro* portoktenyésztésben

Az *in vitro* androgenezis indukciója során hím haploid sejtekből történik a haploid vagy dihaploid növények előállítása. A mikrospórák gametofita fejlődésmenete, *in vitro* vagy *in vivo* körülmények között végrehajtott stressz előkezelés által átprogramozásra kerül sporofita fejlődésmenetté, ezáltal megtermékenyítés nélkül embriók, embriószerű struktúrák hozhatók létre.

Az árpa esetében a mikrospórák korai fejlődés szakaszában van lehetőség a mikrospóra embriógenézis indukálására, mivel fejlődésük ekkor még nem determinált. *In*

in vitro portoktenyésztés során ez a korai-, vagy középső egy-sejtmagvas vakuólumos fejlettségi állapot. Az embriogenezis sikeres indukálásához szükséges stressz előkezeléseket alkalmazni, melyek lehetnek fizikai (alacsony-, magas hőmérséklet) illetve kémiai (éheztetés) előkezelések. Az androgenézis hatékonysága függ a genotípustól, a mikrospórák fejlettségi állapotától és számos további tényezőtől (Segui-Simarro és mtsai. 2021).

2.6. Az *in vitro* portoktenyésztést befolyásoló tényezők

2.6.1. A genotípus hatása

Nemesítési programokban használt, különböző genotípusok androgénikus válaszadó képessége eltérő (Foroughi-Wehr és mtsai. 1982), melynek számos oka lehet. Additív-, és nem additív génhatások magyarázzák a genotípusok közötti eltérő válaszadó képességet, de szerepet játszanak benne a citoplazma génjei is (Zhou 1996). Kiváló válaszadó képességű az Igri, őszi két-soros takarmányárpa (Hoekstra és mtsai. 1992).

2.6.2. A mikrospórák fejlettségi állapota

Az árpa esetében, mint sok más fajban is, a korai- vagy középső egy-sejtmagvas vakuólumos fejlettségi állapotú mikrospórák a legalkalmasabbak (2. ábra) *in vitro* portoktenyésztetek indításához (Datta 1987). Izolált mikrospóra tenyésztéshez a korai két-sejtmagvas fejlettségi állapot a legkedvezőbb (Jähne és Lörz 1995).

2. ábra Egy-sejtmagvas vakuólumos mikrospóra fejlettségi állapot (saját forrás)



2.6.3. Stressz-előkezelések szerepe

A mikrospóra embriogenezis indukciójához szükséges különböző stressz-előkezelések alkalmazása a folyamatot megelőzően. A stresszek lehetnek fizikai-, vagy kémiai előkezelések, illetve *in situ* vagy *in vitro* (Zorinians és mtsai. 2005). Alkalmazásuk fajonként eltérő lehet, egyes fajok esetében ezek együttes alkalmazása is szükséges (Shariatpanahi és mtsai. 2006; Makowska és mtsai. 2017). Stresszek alkalmazása a legtöbb fajban mikrospóra eredetű embriókat, embriószerű struktúrákat eredményez, azonban egyes fajok esetében a mikrospórákból differenciálatlan struktúrák fejlődnek, melynek eredményeként kalluszok jönnek létre (Corral-Martínez és mtsai. 2012; Rivas-Sendra és mtsai. 2015).

Ozmotikus stressz az éheztetés, mely szilárd vagy folyékony mannit közegen történik. Az éheztetés alkalmazása növeli a válaszadó képességet *in vitro* portoktenyésztetben (Touraev és mtsai. 1996; Cistué és mtsai. 2003), de szükséges fajonként történő optimalizálása. A manniton történő éheztetés során a plazmamembránt alkotó lipidek anyagcseréi és permeabilitásuk megváltozik (Huang 2006), melyek hatással vannak a génexpresszióra (Echávarri és Cistué 2016).

Fizikai stressz az alacsony és magas hőmérsékleten történő előkezelés. Az alacsony hőmérséklet csökkenti-, a magas hőmérséklet növeli a plazmamembrán átjárhatóságát (Los és Murata 2004; Los és mtsai. 2013). Hideg előkezelést sikerrel alkalmazott árpában Davies és Morton (1998), hő sokkot pedig Touraev és munkatársai (1996).

2.6.4. Tenyésztési körülmények

A táptalaj komponensek meghatározóak az androgenezis sikeressége szempontjából. A komponensek között a leggyakrabban módosított összetevők a szerves nitrogénforrás, szénhidrátok és a növekedés szabályozó hormonok.

Olsen (1987) csökkentette az ammónium nitrát tartalmat *in vitro* portoktenyésztetben, melyet glutaminnal helyettesített. Indukciós és regeneráló táptalajokban is használják a glutamint (Cistué és mtsai. 2003; Makowska és mtsai. 2015). Az aminosavak jobb nitrogénforrásként szolgálhatnak az embriószerű struktúrák kialakulásában, mint a szervesetlen nitrátok (Wędzony és mtsai. 2009).

A szénhidrátok energiaforrásként szolgálnak, illetve szabályozzák a táptalaj ozmotikus tulajdonságait. Hunter (1987) helyettesített először szaharózt maltózzal, indukciós közegben. Ficoll-400 alkalmazása indukciós közegben szintén növelte a zöld növénykéik mennyiségét portoktenyésztetben (Devaux és Kasha 2009). Regeneráló táptalajokban is sikeresen alkalmazott a maltóz használata (Sriskandarajah és mtsai. 2015).

A növényi hormonok *in vitro* növekedésszabályozóként játszanak szerepet az embriogenezis kialakulásában és a regeneráció során. Benzilaminopurint általában indukciós közegben alkalmazzák (Cistué et al, 2003; Castillo és mtsai. 2014), kombinálják 2,4-D-vel is (Ohnoutkova és mtsai. 2019). Regeneráló táptalajban a benzilaminopurint önmagában (Makowska és mtsai. 2015) és indolecetsavval (Esteves és mtsai. 2014) kombinálva használják.

2.7. Albinizmus

Az *in vitro* androgenézis indukciója során a genotípusfüggőség mellett az albinizmust említik szükkeresztmetszetként. Albínó növénykéek regenerálása gyakoribb néhány genotípus estében, ami genetikai meghatározottságra utal (Torp és Andersen 2009).

Árpa *in vitro* portoktenyészetben először Knudsen és munkatársai (1989) figyeltek fel az albinizmusra. Az albínó növénykéek olyan plasztiszokat tartalmaznak, melyek fejlődése funkcionális kloroplasztiszokká nem fejeződik be, ezért csak szénhidrát (szaharóz, maltóz) tatalmú táptalajon életképesek (Caredda és mtsai. 1999). Egy feltételezés szerint kapcsolat áll fenn az albinizmus és a plasztiszok anyai öröklődése között a legtöbb zárvatermő faj estében (Vaughn és mtsai. 1980). Ez később bebizonyosodott, mivel számos gabonaféle esetében a mikrospóra eredetű albínó növénykéek kloroplasztisz genomjaiban deléciók és átrendeződések történtek (Day és Ellis 1984). Ennek ellenére árpában találtak olyan albínó növénykéeket melyek nem tartalmaztak deléciókat a kloroplasztisz genomjaikban (Dunford és Walden 1991). Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy az albínó növénykéeknek hiányozhatnak a funkcionális plasztisz riboszómáik (Hofinger et al, 2001). Ezen riboszómák hiányát okozhatják olyan recesszív mutációk a kódoló génekben, melyek egy adott szövetben riboszóma hiányhoz vezetnek (Knoth és Hagemann 1977).

A hat-soros árpa esetében általában nagyobb számú albínó növényke kerül regenerálásra, mint a két-soros árpa esetében (Marchand és mtsai. 2008).

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

Kísérleteinkhez használt növényanyagot a Gabonakutató Nonprofit Kft. kiszombori tenyészkertjében vetettük el. A szükséges agrotechnikáról és tápanyag utánpótlásról gondoskodtunk. Ősszel NPK műtrágya (1:1:1) kijuttatása történt, melyet áprilisban NH_4NO_3 -al egészítettünk ki, illetve preemergens és posztemergens gyomirtást végeztünk. A növényanyagok a Gabonakutató Nonprofit Kft. árpanemesítési programjában szereplő F_1 utódnemzedékből származó, nemesítési alapanyagok voltak. Öt genotípus hat-soros őszi árpa ('GK Árpád×Quadriga', 'GKH-36-20×GKH-88-19', 'SU Ellen×GKH-88-19', 'GKH-88-19×GKH-39-18', 'GW3801×GKH-36-20') és három genotípus két-soros őszi árpa ('Leopard×GK Judy', 'Monroe×Leopard', 'GK Stramm×Leopard') volt.

A nyolc genotípus közül kettő hat-soros ('SU Ellen×GKH-88-19', 'GKH-88-19×GKH-39-18') és kettő két-soros ('Leopard×GK Judy', 'GK Stramm×Leopard') őszi árpa genotípust választottunk ki további *in vitro* növényregeneráló-, és gyökereztető táptalaj összehasonlítási kísérletek elvégzése céljából.

3.2. A donorhajtások begyűjtése és előkezelése

A donorhajtásokat április harmadik hetében gyűjtöttük be, amikor a portokokban található mikrospórák korai-, vagy középső egy-sejtmagvas vakuólumos fejlettségi állapotúak voltak. A hajtásokat keskeny-, csapvízzel megtöltött befőttes üvegben helyeztük el, melyeket PVC fóliával fedtünk le. A begyűjtött hajtások esetében nem alkalmaztunk hő stresszt (alacsony-, illetve magas hőmérsékleten való előkezelést).

A kalászokat kipreparáltuk a levélhüvelyből, szálkáikat visszavágtuk. Ezt követően felületi fertőtlenítést alkalmaztunk. 250 ml-es kiöntőgyűrűvel ellátott, táptalajkiöntő üvegben helyeztük el a kalászokat, melyet 2%-os nátrium-hipoklorit oldattal töltöttünk félig. Az oldathoz 1 csepp Tween-80 detergenst is adtunk, majd a kalászokat 15 percre rázógépre helyeztük. Ezt követően steril desztillált vízzel, háromszor öblítettük le a kalászokat, lamináris fülkében, *in vitro* körülmények között.

Fertőtlenítést követően izoláltuk a hajtásokban található portokokat előkezelő közegre, stressz előkezelésként éheztetést alkalmaztunk. Az előkezelés 4g/l agarral szilárdított, 40mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -val kiegészített 0,7 M manniton zajlott (Cistué és mtsai. 2003). Az előkezelés 55 mm átmérőjű, műanyag Petri-csészékben történt, melyekbe 100-100 portokot izoláltunk.

Izolálást követően a Petri-csészéket 3 napra, 24 °C-os, világítás nélküli termosztátba helyeztük el az androgenezis indukciója céljából.

3.3. *In vitro* portoktenyészetek készítése

Steril, műanyag transzfer pipetta segítségével 55 mm átmérőjű, műanyag Petri-csészékbe 5-5 ml folyékony FHGI (1. táblázat) indukciós tápoldatot pipettáztunk (Cistué és mtsai. 2003). Az előkezelési idő letelte után a portokokat áthelyeztük az indukciós tápoldatra. A tenyészeteket 24 °C-os, világítás nélküli termosztátba helyeztük.

1. táblázat. FHGI indukciós tápoldat (Cistué és mtsai. 2003)

Komponens	mg/L
KNO ₃	1 900
NH ₄ NO ₃	165
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370
FeNa ₂ EDTA	37,5
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025
Tiamin HCl	0,4
Inozitol	100
Glutamin	730
Maltóz	62 000
BAP	1
Ficoll	200 000
pH	5,8

3.4. Növényregenerálás, gyökeresítés

Egy hónappal az indukciót követően, embriószerű struktúrákat figyeltünk meg a tenyészetekben. Az embriószerű struktúrákat lamináris fülkében, steril körülmények között regeneráló táptalajra helyeztük, amikor elérték az 1-2 mm-es méretet. A regeneráláshoz 92 mm átmérőjű, műanyag Petri-csészéket használtunk, melyekre 30-30 embriószerű struktúrát helyeztünk. A növényregenerálás során FHGR (Cistué és mtsai. 2003) és K4NB (Makowska és mtsai. 2015) regeneráló táptalajokat (2. táblázat) hasonlítottunk össze a regenerált zöld- és albínó növénykéek vonatkozásában. A tenyészeteket klimatizált tenyésztőszobában helyeztük el, 24 °C, állandó hőmérsékleten, napi 16 órás megvilágítás mellett.

Egy-két héttel a regenerálás megkezdését követően a tenyészetekben zöld- és albínó hajtással rendelkező növénykéek fejlődtek. A legalább 1 cm-es hajtással rendelkező zöld növénykéket steril, lamináris fülkében gyökereztető táptalajra helyeztük. Gyökeresítéshez steril üvegfiolákat használtunk, melyek különböző gyökeresítő táptalajokat tartalmaztak. Az FHGR táptalajon regenerált zöld növénykéket MSr táptalajon (Cistué és mtsai. 2003) gyökeresítettük, viszont a K4NB táptalajon regenerált zöld növénykéek esetében három különböző gyökeresítő táptalaj is összehasonlításra került. A három táptalaj (3. táblázat) a következők voltak: MSr (Cistué és mtsai. 2003), N6I (Makowska és mtsai. 2015) és $\frac{1}{2}$ N6I+Ca. Ez utóbbit kiegészítettük 220 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -val a táptalaj szilárdságának megőrzése okán. Az albínó növénykéek megszámlálás után kidobásra kerültek.

2. táblázat. FHGR (Cistué és mtsai. 2003) és K4NB (Makowska és mtsai. 2015) regeneráló táptalajok

Komponens	FHGR (mg/L)	K4NB (mg/L)
KNO ₃	1 900	3 640
NH ₄ NO ₃	165	320
KH ₂ PO ₄	170	340
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	441
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	246
FeNa ₂ EDTA	37,5	27,5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	11,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	7,2
H ₃ BO ₃	6,2	3,1
KI	0,83	0,17
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,12
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,024
Glutamin	-	143
Tiamin HCl	0,4	10
Inozitol	100	100
Piridoxin HCl	-	1
Maltóz	31 000	36 000
BAP	1	0,225
IAA	0,5	-
Gelrite	2 800	4 000
pH	5,8	5,8

3. táblázat. MSr (Cistué és mtsai. 2003), N6I (Makowska és mtsai.2015) és ½ N6I+Ca gyökeresítő táptalajok

Komponens	MSr (mg/L)	N6I (mg/L)	½ N6I+Ca (mg/L)
KNO ₃	950	2830	1 415
NH ₄ NO ₃	825	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	463	231,5
KH ₂ PO ₄	85	400	200
CaCl ₂ ×2H ₂ O	220	125	220
MgSO ₄ ×7H ₂ O	185	90	45
FeNa ₂ EDTA	18,8	36,7	18,35
MnSO ₄ ×4H ₂ O	11,2	-	-
MnSO ₄ ×H ₂ O	-	3,33	1,665
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	4,3	1,5	0,75
H ₃ BO ₃	3,1	1,6	0,8
KI	0,42	0,8	0,4
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,13	-	-
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,013	-	-
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,013	-	-
TiaminHCl	0,4	1	0,5
Inozitol	100	100	50
PiridoxinHCl	-	0,5	0,25
Nikotinsav	-	0,5	0,25
Aszkorbinsav	-	1	0,5
Kazein hidrolizátum	1000	-	-
Glicin	-	2	1
Biotin	-	1,5	0,75
Folsav	-	0,5	0,25
Szacharóz	20000	30 000	20 000
IAA	-	2	2
NAA	2	-	-
Agar	-	11 000	11 000
Gelrite	2800	-	-
pH	5,8	5,8	5,8

3.5. Üvegházi kiültetés és akklimatizáció

A kiültetésre júniustól augusztusig került sor a Gabonakutató Nonprofit Kft. üvegházában. A jól gyökeresedő zöld növénykéket 66 férőhelyes palántanevelő tálcába ültettük, melyet virágföld-tőzeg-homok 1-1-1 arányú keverékével töltöttünk fel. Kiültetést követően a palántanevelő tálcákat PVC fóliával fedtük le, a magas páratartalom megőrzése érdekében. Az akklimatizáció időtartama 3-4 nap volt, mely idő alatt a növénykéket direkt fénytől védett helyre helyeztük. Az akklimatizációt követően a növényápolásról és tápanyag utánpótlásról folyamatosan gondoskodtunk.

Az akklimatizációt túlélő növénykéket november első hetében, a Gabonakutató Nonprofit Kft. szegedi tenyészkertjébe ültettük ki, a megfelelő talaj-előkészítést követően. Palántázás során ügyeltünk a genotípus keveredés kizárására és a növények ideális mélységbe történő ültetésére. Palántázást követően a növények számára öntözőberendezéssel készítő öntözést biztosítottunk (3. ábra).

3. ábra. Szántóföldi palántázást követő öntözés (saját forrás)



3.6. Betakarítás

A kiültetést követő év júliusában került sor a fertilis kalászokkal rendelkező növények betakarítására. A betakarítás során metszőollót, papírzacskót használtunk. Minden spontán diploid növény esetében 7-8 fertilis kalászt takarítottunk be. A kalászok cséplését követően a DH törzseket átadtuk az árpanemesítési programunk részére.

3.7. Statisztikai elemzés

Kísérletünk során nyolc őszi árpa genotípus, F_1 utódnemzedékből származó növények hajtásait használtuk fel *in vitro* portoktenyésztéshez. Az embriószerű struktúrák-, a regenerált növénykék-, a zöld növénykék-, és az albínók számát vizsgáltuk. A kísérletek során nyolc ismétlést alkalmaztunk. Az embriószerű struktúrák számát egytényezős varianciaanalízissel, a regenerált-, a zöld- és albínó növénykék számát kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltuk. A statisztikai elemzéshez Microsoft Excel 2019 programot használtuk.

4. Eredmények

4.1. Az *in vitro* portoktenyésztés folyamata

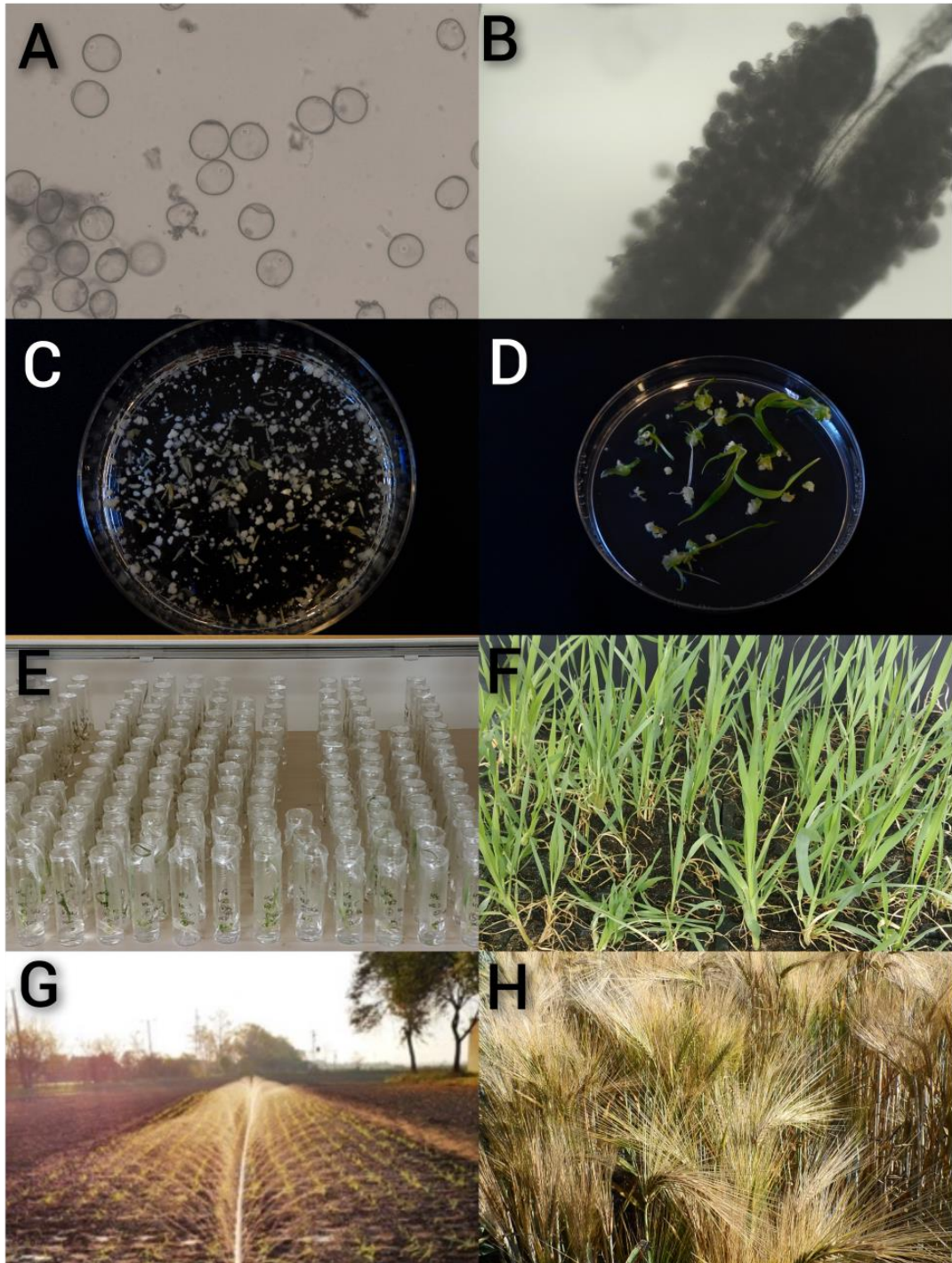
Az androgenezis sikeres indukciójához elengedhetetlen a mikrospórák ideális fejlettségi állapota, ezért a portoktenyésztést megelőzően invert mikroszkóppal (Olympus CK-2) ellenőriztük a mikrospórák fejlettségi állapotát. Portoktenyésztéshez ideális a korai- illetve középső egy-sejtmagvas vakuólumos fejlettségi állapot (4/A ábra). A felületi fertőtlenítést követően az izolálás 0,7 M mannit előkezelő közegre történt, majd 3 nap elteltével a portokokat az FHGI indukciós tápoldatra helyeztük át. A tenyésztés harmadik hetében fejlődő, soksejtes leánysejteket figyeltünk meg a tápoldatban (4/B ábra). A tenyésztés ötödik hetében az indukciós oldatban már szabad szemmel is jól láthatóvá vált a fejlődő ELS (4/C ábra).

Az egy-két milliméteres nagyságú, ELS-t regeneráló táptalajokra helyeztük, ahol elindult a hajtásnövekedés néhány napon belül. A fejlődő növénykéek között megkülönböztettünk zöldeket- és albínókat (4/D ábra). Az albínó növénykéket a megszámolás után kidobtuk. A 2-3 centiméteres zöld hajtással rendelkező zöld növénykéket gyökeresítő táptalajokra helyeztük át (4/E ábra).

Három-négy héttel később a fejlett hajtással és gyökérrel rendelkező zöld növénykéket üvegházban ültettük ki, 25 °C hőmérsékleten, 66 férőhelyes palántanevelő tálcába, melyet átlátszó PVC fóliával fedtünk le a magas páratartalom megőrzése érdekében. Az akklimatizáció három-négy napon át tartott, ezt követően a fóliát eltávolítottuk (4/F ábra).

Az akklimatizáció után a fejlődő növénykéket fitotron kamrában helyeztük el 15 °C hőmérsékleten, 16 órás megvilágítás mellett. Szeptember első hetében a növénykéket üvegházba helyeztük el, ahol mesterséges megvilágítást nem használtunk a növénykéek alkalmazkodó képességének fokozása érdekében. November első felében a fejlett hajtással és gyökérrel rendelkező palántákat szántóföldön ültettük ki (4/G ábra), majd a fertilis növények betakarítására a következő év júliusában került sor (4/H ábra).

4. ábra Az *in vitro* portoktenyésztés folyamata: (A) Egy-sejtmagvas vakuólumos mikrospórák izoláláskor; (B) Soksejtes leánysejtek, izolálást követően 14 nappal; (C) ELS 6 héttel az izolálást követően; (D) Zöld- és albínó növénykék a regeneráló táptalajon; (E) Zöld növénykék a gyökeresítő táptalajokon; (F) Akklimatizált zöld növénykék; (G) Kiültetés tenyészertben; (H) Fertilis növények aratás előtt



4.2. Portoktenyésztésből származó embriószerű struktúrák vizsgálata növény regenerációs kísérletekben

Négy, F₁ utódnemzedékből származó nemesítési alapanyagot használtunk fel kísérleteinkhez ('SU Ellen×GKH-88-19', 'GKH-88-19×GKH-39-18', 'Leopard×GK Judy', 'GK Stramm×Leopard'). Nagyszámban előállított ELS-t minden genotípus esetében megfigyeltünk, viszont jelentős különbségeket találtunk az ELS mennyiségét vizsgálva. Az ELS száma genotípustól függően 221,71 és 435,50 között mozgott. Az átlag 324,80 ELS/100 portok volt (4. táblázat).

4. táblázat. Az ELS száma őszi árpa F₁ kombinációkban. Az azonos kisbetűvel jelölt értékek (a-c) között nincs szignifikáns különbség.

Genotípus	'SU Ellen × GKH-88-19'	'GKH-88-19 ×GKH-39- 18'	'Leopard × GK Judy'	'GK Stramm × Leopard'	Genotípusok átlaga
Átlag (ELS/100 portok)	317,00 b	435,50 a	221,71 c	325,00 b	324,80 b

4.3. Portoktenyésztés során létrejött ELS növény regenerálása

Kísérleteink során megvizsgáltuk a K4NB és FHGR regeneráló táptalajok regenerációra gyakorolt hatását. Továbbá megvizsgáltuk a genotípus hatást, illetve a genotípus × kezelés kölcsönhatást. Az elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist alkalmaztunk. A statisztikai elemzés alapján megállapítottuk, hogy a regeneráló táptalajok szignifikáns hatást gyakoroltak a regenerált növénykékre, illetve a zöld-, és albínó növénykékre mennyiségére. A genotípusnak is szignifikáns hatása volt a mért paraméterekre, viszont a genotípus × kezelés kölcsönhatása nem okozott szignifikáns változást (5. táblázat).

5. táblázat A regeneráló táptalajok, a genotípus és genotípus x kezelés hatásának vizsgálata, kéttényezős varianciaanalízissel.

	df	Négyzetes középérték Zöld növényké/100 portok	Négyzetes középérték Albínó növényké/100 portok	Négyzetes középérték Összes növényke/100 portok
Regeneráló táptalaj	1	5632,145*	1453,062**	12806,690**
Genotípus	3	31738,660***	3007,715***	49421,820***
Interakció	3	117,447ns	435,030ns	1003,139ns
Hiba	56	930,846	169,334	1555,050

ns nem szignifikáns

* szignifikáns 95%-os valószínűség mellett

** szignifikáns 99%-os valószínűség mellett

*** szignifikáns 99,9%-os valószínűség mellett

Minden kezelés során regeneráltunk zöld-, és albínó növénykéket. A regenerált növénykéek száma 26,86/100 portok és 164,83 növényke/100 portok között változott, függően a genotípustól és a táptalajtól. Az átlag 105,38 növényke/100 portok volt K4NB táptalajon, a regenerált növénykéek átlaga 77,09 növényke/ 100 portok volt FHGR táptalaj használatával (6. táblázat).

6. táblázat A regeneráló táptalajok hatása a regenerált növénykéek számára. Az azonos kisbetűkkel (a–b) jelölt adatok nem különböznek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) ugyanazon genotípuson belül. Az azonos nagybetűkkel (A–C) jelölt adatok statisztikailag megegyeznek ($p \leq 0,05$) ugyanazon kezelések esetén.

Genotípus	Regenerált növények száma/100 portok		
	Növényregeneráló táptalaj		
	FHGR	K4NB	Táptalajok átlaga
‘SU Ellen × GKH-88-19’ (6-soros)	143,5 b A	164,83 a A	154,17
‘GKH-88-19×GKH-39-18’ (6-soros)	99,5 b B	138,67 a A	119,08
‘Leopard×GK Judy’ (2-soros)	26,86 a C	36,19 a C	31,52
‘GK Stramm×Leopard’ (2-soros)	38,5 b C	81,83 a B	60,17
Genotípusok átlaga	77,09	105,38	91,24

Az albínók számát szintén befolyásolta a táptalaj és a genotípus. A legtöbb albínót a ‘GKH-88-19×GKH-39-18’ kombinációból regeneráltuk (50,33 növényke/100 portok) K4NB táptalajon, a legkevesebb regenerált albínó (7,00 növényke/100 portok) FHGR táptalajon a ‘GK Stramm×Leopard’ kombináció esetében regeneráltuk. A regenerált albínó növénykéek átlaga 21,32 albínó/100 portok és 30,85 albínó/100 portok volt FHGR és K4NB regeneráló táptalajon (7. táblázat).

7. táblázat A regeneráló táptalajok hatása az albínó növénykéek számára. Az azonos kisbetűkkel (a–b) jelölt adatok nem különböznek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) ugyanazon genotípuson belül. Az azonos nagybetűkkel (A–D) jelölt adatok statisztikailag megegyeznek ($p \leq 0,05$) ugyanazon kezelések esetén.

Genotípus	Albínók száma/100 portok		
	Növényregeneráló táptalaj		
	FHGR	K4NB	Táptalajok átlaga
‘SU Ellen × GKH-88-19’ (6-soros)	30,00 a A	35,17 a B	32,58
‘GKH-88-19×GKH-39-18’ (6-soros)	34,00 b A	50,33 a A	42,17
‘Leopard×GK Judy’ (2-soros)	14,29 a B	11,24 a D	12,76
‘GK Stramm×Leopard’ (2-soros)	7,00 b B	26,67 a C	16,83
Genotípusok átlaga	21,32	30,85	26,09

A regenerált *in vitro* zöld növénykéek száma minden genotípusban jelentősen meghaladta az albínók számát. A regenerált zöld növénykéek száma 12,57 zöld növényke/100 portok és 129,67 zöld növényke/100 portok között változott a genotípustól és a táptalajtól függően (8. táblázat). Átlagosan 55,77 zöld növénykét/100 portok és 74,53 zöld növényke/100 portok regeneráltunk az FHGR és a K4NB regenerációs táptalajok használatával. A regenerált zöld növénykéek száma magasabb volt a K4NB táptalajon, mint az FHGR táptalajon, ezek a különbségek a 'SU Ellen×GKH-88-19', a 'GKH-88-19×GKH-39-18' és a 'GK Stramm×Leopard' alapanyagok esetében szignifikánsak voltak.

8. táblázat A regeneráló táptalajok hatása a zöld növénykék számára. Az azonos kisbetűkkel (a–b) jelölt adatok nem különböznek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) ugyanazon genotípuson belül. Az azonos nagybetűkkel (A–D) jelölt adatok statisztikailag megegyeznek ($p \leq 0,05$) ugyanazon kezelések esetén.

Genotípus	Zöld növénykék száma/100 portok		
	Növényregeneráló táptalaj		
	FHGR	K4NB	Táptalajok átlaga
‘SU Ellen × GKH-88-19’ (6-soros)	113,50 b A	129,67 a A	121,58
‘GKH-88-19 × GKH-39-18’ (6-soros)	65,50 b B	88,33 a B	76,92
‘Leopard×GK Judy’ (2-soros)	12,57 a C	24,95 a D	18,76
‘GK Stramm×Leopard’ (2-soros)	31,50 b C	55,17 a C	43,33
Genotípusok átlaga	55,77	74,53	65,15

A növényregenerációs kísérletekben, a vizsgált szempontok (regenerált növénykék, zöld és albínó növénykék) a 6-soros árpa keresztezési kombinációkban magasabbak értékeket mutattak a 2-soros árpa keresztezési kombinációkhoz képest.

4.5. Portoktenyésztésből származó *in vitro* zöld növénykék gyökeresítése

Különböző gyökereztető táptalajok hatását vizsgáltuk a regenerált zöld növénykék gyökerezésére és akklimatizációjára. A statisztikai elemzések azt mutatták, hogy a táptalaj és a genotípus szignifikánsan befolyásolta a mért paramétereket. A regenerációs és a gyökereztető táptalaj erős hatással volt a zöld növénykék gyökerezésére ($p \leq 0,001$) és akklimatizációjára egyaránt ($p \leq 0,001$) (9. táblázat).

9. táblázat A gyökeresítő táptalajok hatása a gyökeresített, és az akklimatizált növénykéek számára.

	df	Négyzetes középérték Gyökeresített növénykéek	Négyzetes középérték Akklimatizált növénykéek
Genotípus	3	8597,083*	90,816**
Táptalaj	3	44734,420***	187,982***
Hiba	9	1341,250	10,583

* szignifikáns 95%-os valószínűség mellett

*** szignifikáns 99,9%-os valószínűség mellett

A négy különböző növényregenerálási módszer között szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a zöld növénykéek gyökeresedése tekintetében (10. táblázat). A K4NB növényregeneráló táptalajon regenerált növénykéek felhasználásával az MSr gyökereztető táptalajon értük el a legtöbb gyökeres növénykét (átlagosan 139 növényke), míg ez az érték az FHGR és MSr táptalajon volt a legalacsonyabb (átlagosan 54,2 gyökeres növényke).

4.6. Az *in vitro* gyökeresített zöld növénykéek akklimatizációja

A gyökereztetett növénykéeket fitotron kamrában akklimatizáltuk, és a kiültetés után 3 héttel megszámoltuk az akklimatizálódott növénykéeket (10. táblázat). Az akklimatizálódott növénykéek száma akkor volt a legmagasabb, amikor a K4NB növényregeneráló táptalajt és az MSr gyökereztető táptalajt kombináltuk (átlagosan 63,8 akklimatizálódott növényke). Hasonló értékeket kaptunk a K4NB növényregeneráló táptalaj és az ½N6I+Ca gyökereztető táptalaj esetében (átlagosan 60,2 akklimatizálódott növény). Az akklimatizálódás százalékos aránya is e növényregenerációs módszerek esetében volt a legmagasabb (10. táblázat). A K4NB növényregeneráló táptalaj és az MSr gyökereztető táptalaj alkalmazása hatékony növényregenerálási módnak bizonyult, amelyet másik négy F₁ utódnemzedékből származó nemesítési alapanyag esetében is teszteltünk.

10. táblázat A regeneráló- és gyökeresítő táptalajok hatása a gyökeresített- és az akklimatizált növények számára, illetve az akklimatizáció hatékonyságára. Az azonos kisbetűkkel (a–c) jelölt adatok nem különböznek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) ugyanazon genotípuson belül. Az azonos nagybetűkkel (A–C) jelölt adatok statisztikailag megegyeznek ($p \leq 0,05$) ugyanazon kezelések esetén.

Genotípus	Gyökeresített növények száma				
	Növényregeneráló (FHGR vagy K4NB) és gyökeresítő táptalaj (MSr, N6I vagy $\frac{1}{2}$ N6I+Ca)				
	FHGR, MSr	K4NB, N6I	K4NB, $\frac{1}{2}$ N6I+Ca	K4NB, MSr	Táptalajok átlaga
‘SU Ellen×GKH-88-19’ (6-soros)	130 b A	285 a A	309 a A	341 a A	266,25
‘GKH-88-19×GKH-39-18’ (6-soros)	102 b A	214 a B	35 c B	75 bc B	172,75
‘Leopard×GK Judy’ (2-soros)	11 a B	35 a C	29 a B	53 a B	32,00
‘GK Stramm×Leopard’ (2-soros)	27 b B	75 ab C	66 ab B	110 a B	69,50
Genotípusok átlaga	54,2	122,2	119,0	139,0	108,6
	Akklimatizált növények száma				
	Növényregeneráló (FHGR vagy K4NB) és gyökeresítő táptalaj (MSr, N6I vagy $\frac{1}{2}$ N6I+Ca)				
	FHGR, MSr	K4NB, N6I	K4NB, $\frac{1}{2}$ N6I+Ca	K4NB, MSr	Táptalajok átlaga
‘SU Ellen×GKH-88-19’ (6-soros)	11 c A	72 b A	186 a A	183 a A	113,00
‘GKH-88-19×GKH-39-18’ (6-soros)	1 b A	60 ab AB	85 a B	70 a B	54,00
‘Leopard×GK Judy’ (2-soros)	1 a A	3 a B	11 a C	14 a B	7,25
‘GK Stramm×Leopard’ (2-soros)	0 a A	7 a B	16 a C	48 a B	17,75
Genotípusok átlaga	2,8	28,8	60,2	63,80	38,90
	Akklimatizáció hatékonysága (%)				
	Növényregeneráló (FHGR vagy K4NB) és gyökeresítő táptalaj (MSr, N6I vagy $\frac{1}{2}$ N6I+Ca)				
	FHGR, MSr	K4NB, N6I	K4NB, $\frac{1}{2}$ N6I+Ca	K4NB, MSr	Táptalajok átlaga
‘SU Ellen×GKH-88-19’ (6-soros)	8,50 c A	25,30 b A	60,20 a A	53,70 a A	36,9
‘GKH-88-19×GKH-39-18’ (6-soros)	1,00 c A	28,00 b A	45,20 a B	37,40 ab B	27,9
‘Leopard×GK Judy’ (2-soros)	9,10 b A	8,60 b B	37,90 a BC	26,40 a B	20,5
‘GK Stramm×Leopard’ (2-soros)	0,00 c A	9,30 c B	24,20 b C	43,60 a AB	19,3
Genotípusok átlaga	3,91	14,64	34,12	33,03	21,42

4.7. *In vitro* portoktenyésztés alkalmazása nyolc F₁ kombináció felhasználásával

Az *in vitro* portoktenyésztési módszert nyolc F₁ utódnemzedékből származó nemesítési alapanyaggal teszteltük. Célunk a módszer hatékonyságának ellenőrzése volt a fent említett növényregenerációs protokoll (K4NB növényregenerációs táptalaj és MSr gyökereztető táptalaj) alkalmazásával. Az androgenezist minden kombinációban indukáltuk (11. táblázat), a zöld növénykéek száma (átlagosan 66,93) meghaladta a regenerált albínók számát (átlagosan 24,44). Az *in vitro* zöld növénykéek száma 24,95 és 129,67 zöld növényke/100 portok között mozgott, a genotípustól függően. Ezen kívül több mint kétezer *in vitro* zöld növényke került kiültetésre az üvegházban. Az akklimatizálódás aránya 61,83% volt, amely a genotípustól függően 26,4% és 82,9% között változott.

Összesen 1403 akklimatizált palántát állítottunk elő árpanemesítési programjaink számára.

11. táblázat Növényregenerációs protokoll tesztelése.

Genotípus	Zöld növényké száma/ 100 portok	Albínók száma/ 100 portok	Összes kiültetett növény	Összes akklimatizálódott növény	Akklimatizáció hatékonysága
‘GK Árpád×Quadriga’	89,38	15,38	432	358	82,9%
‘GKH-36- 20×GKH-88-19’	56,33	13,75	391	290	74,2%
‘SU Ellen × GKH- 88-19’	129,67	35,17	341	183	53,7%
‘GKH-88- 19×GKH-39-18’	88,33	50,33	187	70	37,4%
‘GW3801×GKH- 36-20’	28,13	17,38	195	146	74,9%
‘Leopard×GK Judy’	24,95	11,24	53	14	26,4%
‘Monroe×Leopard’	63,50	25,63	560	294	52,5%
‘GK Stramm×Leopard’	55,17	26,67	110	48	43,6%
Összesen (átlag)	(66,93)	(24,44)	2269 (283,625)	1403 (175,375)	61,83%

5. Következtetések és javaslatok

Az *in vitro* portoktenyésztés legfontosabb lépései közé tartozik az *in vitro* androgenezis indukciója, az ELS előállítása, a zöld növénykéek regenerációja, akklimatizációja és a genom megkettőzése. Különböző regenerációs és gyökereztető tápközegeket hasonlítottunk össze kísérleteink során annak érdekében, hogy javítsuk a DH növények előállításának hatékonyságát az árpa nemesítési programunkban. Kísérleteinkhez négy F₁ utódnemzedékből származó nemesítési alapanyagot használtunk fel ('SU Ellen×GKH-88-19', 'GKH-88-19×GKH-39-18', 'Leopard×GK Judy', 'GK Stramm×Leopard').

5.1. Növénykéek regenerálása portoktenyésztésben fejlődött ELS-ből

A portoktenyésztés során fejlődött ELS-eket, FHGR (Cistué és mtsai. 2003) és K4NB (Makowska és mtsai. 2015) regeneráló táptalajokra helyeztük, ezt követően a két táptalaj hatékonyságát hasonlítottuk összeregenerált-, zöld- és albínó növénykéek tekintetében. Megvizsgáltuk továbbá a genotípus-, illetve a genotípus × kezelés kölcsönhatást. Az FHGR táptalajt gyakran használják árpa portok- és izolált mikrospóra tenyésztéshez (Cistué és mtsai. 2021). A K4NB táptalajt haploid szövetek genetikai transzformációját követően, az árpa regeneráció hatékonyságának fokozására fejlesztették tovább (Kumlehn és mtsai. 2006), majd módosították (Makowska és mtsai. 2015), illetve alkalmazták DH növény előállításához, különböző kutatási programokban (Makowska és mtsai. 2017; Bednarek és mtsai. 2020). A két táptalaj makroelem tartalma azonos. A K4NB táptalaj szervesen nitrogén tartalma jelentősen magasabb. Továbbá a K4NB táptalaj 100-szor több $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmaz, mint az FHGR. Orłowska és munkatársai (2020) megállapították, hogy a Cu^{2+} ion koncentrációjának optimalizálása az indukciós tápközegben növeli a zöld növénykéek számát az árpa portoktenyésztésben. Az FHGR táptalaj vitaminokból kevesebbet tartalmaz. Továbbá az FHGR táptalaj több növényi hormont tartalmaz, mint például 1 mg/l benzilaminopurint és 0,5 mg/l indolecetsavat, miközben a K4NB csupán 0,225 mg/l benzilaminopurint. Mindkettő táptalajban maltóz a szénforrás. A regenerált növénykéek száma K4NB táptalajon jóval meghaladta az FHGR táptalajon regenerált növénykéek számát. K4NB táptalajon átlagosan 105,38 növényke/100 portok, FHGR táptalajon 77,09 növényke/100 portok került regenerálásra. A sokkal komplexebb összetételű K4NB táptalaj kedvezőbb volt az albínó- és zöld növénykéek regenerációja során.

Egyes genotípusok hajlamosak az albinizmusra, mely visszavetheti a DH növény előállítás hatékonyságát. Kísérletünkben a genotípusnak szignifikáns hatása volt a mért paraméterekre. Lu és munkatársai (2008) szerint a genotípus hatással van az albínók számára és a regeneráció hatékonyságára. Egyes 6-soros árpa genotípusok esetében nagyobb arányban kerültek albínók regenerálásra (Cistué és mtsai. 1999; Marchand és mtsai. 2008). Makowska és munkatársai (2015) szerint az albínók gyakrabban fordulnak elő tavaszi típusú árpában, mint őszi típusúban. A kísérletünkben alkalmazott mindkét regeneráló táptalaj mérsékelte az albínók számát. Az albínók aránya kevesebb, mint 30 százalék volt a regenerált növénykéket figyelembe véve. A regenerált növénykéek dominánsan zöldek voltak a 6-soros- és a 2-soros genotípusok esetében is. A K4NB táptalajon regenerált zöld növénykéek száma, minden vizsgált genotípusban meghaladta az FHGR táptalajon regenerált zöld növénykéek számát. K4NB táptalajon átlagosan 74,53/100 portok, FHGR táptalajon 55,77/100 portok volt. A zöld növénykéek száma magasabb volt 6-soros genotípusok esetében, mint a 2-soros genotípusokban.

5.2. Portoktenyésztésből származó *in vitro* zöld növénykéek gyökeresítése

Kísérleteinkben három különböző gyökereztető táptalaj hatékonyságát vizsgáltuk. A kísérletekhez fejlett, 1-2 cm-es hajtással rendelkező zöld növénykét használtunk. A három gyökereztető táptalaj az MSr, N6I és 1/2N6I+Ca voltak. Az MS alapú (Cistué és mtsai. 2003; Cistué és mtsai. 2021) és az N6 alapú (Makowska és mtsai. 2017; Bednarek és mtsai. 2020) regeneráló táptalajokat gyakran alkalmazzák gyökereztetésre is árpa portok- és mikrospóra tenyésztés során. A két táptalaj makroelemei azonosak, viszont azokból eltérő mennyiségeket tartalmaznak. Az MSr gyökereztető táptalaj több mikroelemet tartalmaz, mint az N6I táptalaj. Az MSr táptalaj viszont kevesebb vitamint tartalmaz, csupán tiamint és mio-inozitolt. Az N6I tartalmaz 2 mg/l indolecetsavat, az MSr táptalaj pedig 2mg/l naftilecetsavat. Az MSr táptalaj tartalmaz továbbá kazein-hidrolizátumot is. A szénforrás mindkét táptalaj esetében szacharóz volt. Kísérletünk során szignifikáns különbséget találtunk a két táptalaj alkalmazása során a jól gyökeresedő és az akklimatizált növénykéek számát illetően, továbbá az akklimatizálódás százalékos arányának tekintetében. A legtöbb DH növényt K4NB regeneráló- és MSr gyökereztető táptalaj alkalmazásával állítottuk elő. E két táptalaj alkalmazásával új kísérletet indítottunk.

5.3. Módszer hatékonyságának ellenőrzése

A korábbi négy F₁ utódnemzedékből származó nemesítési alapanyag mellett bevontunk újabb négy F₁ utódnemzedékből származó nemesítési alapanyagot ('GK Árpád×Quadriga', 'GKH-36-20×GKH-88-19', 'GW3801×GKH-36-20', 'Monroe×Leopard'). Az akklimatizáció hatékonysága átlagosan 61,83 % volt, melyet befolyásolt a genotípus. Az androgenezis indukciója minden genotípus esetében sikeres volt, az *in vitro* zöld növénykék száma minden esetben meghaladta az albínó növénykéké számát.

6. Összefoglalás

Kísérleteink fő célja volt, hogy javítsuk a DH növény előállítás hatékonyságát, különösen a növényregenerációra árpa nemesítési programunk számára. Kísérleteinkhez négy F_1 utódnemzedékből származó alapanyagot használtunk fel, melyből kettő 2-soros ('Leopard×GK Judy', 'GK Stramm×Leopard') és kettő 4-soros ('SU Ellen×GKH-88-19', 'GKH-88-19×GKH-39-18') őszi árpa volt.

Az *in vitro* portok tenyésztés során egy előkezelő közeget alkalmaztunk (Cistué és mtsai. 2003), mely 0,7 M mannit volt 40 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -val kiegészítve. Az előkezelés 3 napig tartott 24 °C-os, világítás nélküli termosztátban, melyet követően a portokokat indukciós táptalajra helyeztük. Indukciós táptalaj az FHGI (Cistué és mtsai. 2003) volt. Az indukció során nagyszámú ELS-t állítottunk elő minden genotípus esetében.

A DH növény előállítás hatékonyságának javítása érdekében célul tűztük ki, hogy tesztelünk kettő szakirodalomban publikált regeneráló táptalajt, ezért az előállított ELS-t az FHGR (Cistué és mtsai. 2003) és a K4NB (Makowska és mtsai. 2015) táptalajokra helyeztük. Megvizsgáltuk továbbá a genotípus-, illetve a genotípus $\times$ kezelés kölcsönhatását. Az elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist alkalmaztunk. A vizsgálat során szignifikáns különbséget találtunk a két táptalaj között a regenerált-, a zöld-, és az albínó növénykétek tekintetében is a K4NB táptalaj javára. A mért paraméterekre szignifikáns hatása volt a genotípusnak is, viszont nem volt szignifikáns hatása a genotípus $\times$ kezelésnek. A regenerált *in vitro* zöld növénykétek száma minden genotípusban jelentősen meghaladta az albínók számát.

Célkitűzéseink között szerepelt továbbá, hogy megvizsgáljuk három gyökereztető táptalaj hatását a gyökerezésre és az akklimatizációra. A gyökereztető táptalajok az MSr (Cistué és mtsai. 2003), N6I (Makowska és mtsai. 2015) és $\frac{1}{2}$ N6I+Ca voltak. A statisztikai elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist alkalmaztunk. A vizsgálataink szerint a táptalaj és a genotípus szignifikánsan befolyásolta a gyökeresített- és akklimatizált növénykétek számát. A vizsgált növényregenerálási módszerek közül a K4NB táptalajon regenerált zöld növénykétek felhasználásával az MSr gyökereztető táptalajon értük el a legtöbb gyökeres növénykét. A legtöbb akklimatizálódott növénykét szintén a K4NB regeneráló- és az MSr gyökeresítő táptalaj alkalmazásával kaptuk.

Célkitűzésünknek megfelelően bevontunk további négy F_1 utódnemzedékből származó nemesítési alapanyagot. Ebből három 6-soros ('GK Árpád×Quadriga', 'GKH-36-20×GKH-88-19', 'GW3801×GKH-36-20') és egy 2-soros ('Monroe×Leopard') őszi árpa volt, így

összesen nyolc genotípussal teszteltük növényregenerációs protokollunkat (K4NB regeneráló- és az MSr gyökeresítő táptalaj). Az androgenezis indukciója minden genotípus esetében sikeres volt, és az *in vitro* zöld növénykék száma minden esetben meghaladta az albínó növénykék számát.

Kísérletünk végeztével összesen 1403 akklimatizált palántát állítottunk elő árpa nemesítési programunk számára.

7. Irodalomjegyzék

1. **ANTAL, J. (szerk.) (2005):** Növénytermesztés tan 1. Gabonafélék. Őszi és tavaszi árpa. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p. 202-231.
2. **BEDNAREK, P.T. - ZEBROWSKI, J. - ORLOWSKA, R. (2020):** Exploring the Biochemical origin of DNA sequence variation in barley plants regenerated via in vitro anther culture. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, p. 5770.
3. **BLAKESLEE, A.F. – BELLING, J. – FARNHAM, M.E. – BERGNER, A.D. (1922):** A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55: p. 646–647.
4. **BRIGGS, D.E. (1978):** Barley. Chapman & Hall, London
5. **CAREDDA, S. – DEVAUX, P. – SANGWAN, R.S. – CLÉMENT, C. (1999):** Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208: p. 248–256.
6. **CASTILLO, A.M. – CISTUÉ, L. (1993):** Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Rep* 12: p. 139–143.
7. **CASTILLO, A.M. – NIELSEN, N.H. – JENSEN, A. – VALLÉS, M.P. (2014):** Effects on n-butanol on barley microspore embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org* 117: p. 411-418.
8. **CHASE, S.S. (1952):** Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron J* 44: p. 263–267.
9. **CISTUÉ, L. - ECHÁVARRI, B. (2021):** Barley isolated microspore culture. In *Doubled Haploid Technology; Methods in Molecular Biology*; Segui-Simarro, J., Ed.; Humana: New York, NY, USA, 2021; Volume 2287, p. 187–197.
10. **CISTUÉ, L. - RAMOS, A. - CASTILLO, A.M. (1999):** Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 55, p. 159–166.
11. **CISTUÉ, L. - VALLES, M. - ECHÁVARRI, B. - SANZ, J. - CASTILLO, A. (2003):** Barley anther culture. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Kluwer, Dordrecht. p. 29–34.
12. **CLAPHAM, D. (1973):** Haploid *Hordeum* plants from anther in vitro. *Z Pflanzenzucht* 69. p. 142-155.

13. **CORRAL-MARTÍNEZ, P. - SEGUI-SIMARRO, J.M. (2012):** Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica* 187(1): p. 47–61.
14. **CZIMBER, GY.(2004):** Az árpa külső alaktana; in: TOMCSÁNYI A. - TURCSÁNYI, G. (szerk.): Az árpa. Magyarország kultúrflórája, VIII. kötet, 14. füzet. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 99-107.
15. **DATTA, S. K. (1987):** Plant regeneration by pollen embryogenesis from cultured whole spikes of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.*, 74, p. 121–124.
16. **DAVIES, P.A. – MORTON, S. (1998):** A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Rep* 17: p. 206–210.
17. **DAY, A. – ELLIS, T.H.N. (1984):** Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen. Possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell* 39: p. 359–368.
18. **DEVAUX, P. – KASHA, K.J. (2009):** Overview of barley doubled haploid production. In: Touraev A és mtsai. (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, New York. p. 47-63.
19. **DUNFORD, R. – WALDEN, R.M. (1991):** Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr Genet* 20: p. 339–347.
20. **ECHÁVARRI, B. – 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, Tissue and Organ Culture* 125 (1). p. 11-22.
21. **ESTEVEZ, P. – BELZILE, F. (2014):** Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: I-optimization of key physical factors. *Plant Cell Rep.* 33(6): p. 993-1001.
22. **FERRIE, A.M.R. – BHOWMIK, P. – RAJAGOPALAN, N. – KAGALE, S. (2020):** CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in Wheat Doubled Haploids. *Methods Mol Biol.*;2072: p. 183-198.
23. **FOROUGHI-WEHR, B. - FRIEDT, W. - WENZEL, G. (1982):** On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L.. *Theoret. Appl. Genetics* 62, p. 233–239.

24. **FORSTER, B.P. – WTB, T. (2005):** Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev* 25: p. 57–88.
25. **GUHA, S. – MAHESHWARI, S.C. (1964):** In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: p. 497.
26. **HARLAN, J. R. (1976):** Barley, *Hordeum vulgare* (Gramineae-triticeae). In: N.W. Simmonds, ed. : *Evolution of Crop Plants*. Longman Group, London, p. 93–98.
27. **HESZKY, L. – PAÁL, H. (1972):** Haploid növények felnevelése pollenekből a *Nicotiana tabacum* L. portokkultúrájában. *Botanikai Közlemények* 59 (2): p. 125–127.
28. **HESZKY, L.E. - SIMON-KISS, I. – BINH, D.Q. (1996):** Release of the Rice Variety Dama Developed by Haploid Somaclone Breeding. In: *Somaclonal Variation in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 36. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 46-54.
29. **HOEKSTRA, S. - VAN ZIJDERVELD, M.H. – LOUWERSE, J.D. – HEIDEKAMP, F. - VAN DER MARK, F. (1992):** Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Sci* 86: p. 89–96.
30. **HOFINGER, B.J. – ANKELE, E. – GÜLLY, CH. - HEBERLE-BORS, E. – PFOSSER, M.F. (2001):** The involvement of the plastid genome in albino plant regeneration from microspores in wheat. In: Bohanec B (Ed.), *Biotechnological approaches for utilisation of gametic cells*. COST 824 final meeting, Bled, Slovenia, 1–5 July 2000, p. 215–228.
31. **http1:** <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (letöltve:2024.05.13.)
32. **http2:** https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0073.html (letöltve:2024.05.13.)
33. **http3:** <https://plants.usda.gov/home/classification/23447> (letöltve:2024.10.01.)
34. **HUANG, B. (2006):** Cellular membranes in stress sensing and regulation of plant adaptation to abiotic stresses. In: *Plant-environment interactions*, 3rd edn. Taylor and Francis group. p. 1–26.
35. **HUNTER, C.P. (1987):** Plant generation method. European patent application, No. 87200773.7
36. **HUNTER, C.P. (1988):** Plant Regeneration from Microspores of Barley (*Hordeum vulgare*). MS Thesis, Wye College, University of London, London.

37. **JÄHNE, A. - LÖRZ, H. (1995):** Cereal microspore culture. *Plant Sci*, 109, p. 1–12.
38. **JOHANSEN, D.A. (1934):** Haploids in *Hordeum vulgare*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 20, p. 98–100.
39. **KARSAI, I. (2004) :** Az árpa virágzásbiológiája; in: TOMCSÁNYI A. - TURCSÁNYI, G. (szerk.): Az árpa. Magyarország kultúrflórája, VIII. kötet, 14. füzet. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 190-193.
40. **KASHA, K.J. – KAO, K.N. (1970):** High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Nature (London)* 225. p. 874-876.
41. **KASHA, K.J. (2005):** Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Palmer D, Keller W, Kasha K (eds) *Haploids in crop improvement II*. Springer, Heidelberg, p. 123–152.
42. **KNOTH, R. – HAGEMANN, R. (1977):** Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. *Biol Zbl* 96: p. 141–150.
43. **KNUDSEN, S. – DUE, I.K. – ANDERSEN, S.B. (1989):** Components of response in barley anther culture. *Plant Breed* 103: p. 241–246.
44. **KUMLEHN, J. – SERAZETDINOVA, L. – HENSEL, G. – BECKER, D. – LOERZ, H. (2006):** Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J* 4: p. 251-261.
45. **LANTOS, C. - WEYEN, J. - ORSINI, J. M. - GNAD, H. - SCHLIETER, B. - LEIN, V. - KONTOWSKI, S. - JACOBI, A. - MIHÁLY, R. - BROUGHTON, S. - PAUK, J. (2013):** Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breed*, 132: p. 149-154.
46. **LEE, S.Y. – CHEONG, J.I. – KIM, T.S. (2003):** Production of doubled haploids through anther culture of M1 rice plants derived from mutagenized fertilized egg cells. *Plant Cell Rep.*;22(3): p. 218-23.
47. **LOS, D.A. – MIRONOV, K.S. – ALLAKHVERDIEV, S.I. (2013):** Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res* 116. p. 489–509.
48. **LOS, D.A. – MURATA, N. (2004):** Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochem Biophys Acta* 1666. p. 144–157.

49. **LU, R. – WANG, Y. – SUN, Y. – SHAN, L. – CHEN, P. – HUANG, J. (2008):** Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.): the effect of floret co-culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93. p. 21–27.
50. **MACHCZYŃSKA, J. – ZIMNY, J. – BEDNAREK, PT. (2015):** Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticales ($\times$ *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol Biol.*;89(3): p. 279-92.
51. **MAKOWSKA, K. - KALUZNIAK, M. - OLESZCZUK, S. - ZIMNY, J. - CZAPLICKI, A. - KONIECZNY, R. (2017):** Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 131, p. 247–257.
52. **MAKOWSKA, K. - OLESZCZUK, S. - ZIMNY, A. - CZAPLICKI, A. - ZIMNY, J. (2015):** Androgenic capability among genotypes of winter and spring barley. *Plant Breed*, 134: p. 668-674.
53. **MAKOWSKA, K. – OLESZCZUK, S. (2014):** Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Rep.*;33(3): p. 385-92.
54. **MALUSZYŃSKI, M. – KASHA, K.J. – FORSTER, B.P. – SZAREJKO, I. (2003):** Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer Academic Publisher, Dodrecht, the Netherlands. p. 309-335.
55. **MARCHAND, S. - FONQUERNE, G. - CLERMONT, I. - LAROCHE, L. - HUYNH, T. T. - BELZILE, F. J. (2008):** Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. *Plant Cell Rep*, 27, 443–445.
56. **MARULANDA, J.J. – MI, X. – MELCHINGER, A.E. – XU, J.L. – WÜRSCHUM, T. – LONGIN, CF. (2016):** Optimum breeding strategies using genomic selection for hybrid breeding in wheat, maize, rye, barley, rice and triticales. *Theor Appl Genet.*;129(10): p. 1901-13.
57. **NIIZEKI, H. - OONO, K. (1968):** Induction of Haploid Rice Plant from Anther Culture, *Proceedings of the Japan Academy*, Volume 44, Issue 6, p. 554-557.
58. **OHNOUTKOVA, L. – VLCKO, T. – AYALEW, M. (2019):** Barley Anther Culture. *Methods Mol Biol.*;1900: p. 37-52.
59. **OLSEN, F.L. (1987):** Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carsberg Res Commun* 52: p. 393–404.

60. **ORŁOWSKA, R. - PACHOTA, K. A. - MACHCZYŃSKA, J. - NIEDZIELA, A. - MAKOWSKA, K. - ZIMNY, J. - BEDNAREK, P.T. (2020):** Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electron. J. Biotechnol*, 43, p. 8–15.
61. **OTTO, I. – MÜLLER, A. – KUMLEHN, J. (2015):** Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using embryogenic pollen cultures. *Methods Mol Biol.*;1223: p. 85-99.
62. **OUYANG, J.W. – HU, H. – CHUANG, C.C. – TSENG, C.C. (1973):** Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. *Sci Sinica* 16: p. 79-95.
63. **PAUK, J. - KERTÉSZ, Z. - BEKE, B. - BÓNA, L. - CSÓSZ, M. - MATUZ, J. (1995):** New winter-wheat variety – GK-Délibáb developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Research Communications* 23 (3). p. 251-256.
64. **PICKERING, R.A. – DEVAUX, P. (1992):** Haploid production: approaches and use in plant breeding. In: Shewry PR (ed) *Barley: genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB International, Wallingford, p. 511–539.
65. **REID, D.A. (1985):** Morphology and anatomy of the barley plant; in: RASMUSSEN, D.C. (ed.): *Barley. Agronomy Monograph No. 26*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of American, Soil Science Society of America, Publishers, Madison, Wisconsin. p. 73-101.
66. **RIVAS-SENDRA, A. - CORRAL-MARTÍNEZ, P. - CAMACHOFERNAÑDEZ, C. - SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2015):** Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 122(3): p. 759–765.
67. **SAN NOEUM, L.H. (1976):** Haploldes d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondes. *Ann Amel Plantes* 26. p. 751-754.
68. **SEGUÍ-SIMARRO, J.M. - JACQUIER, N.M.A. - WIDIEZ, T. (2021):** Overview of In Vitro and In Vivo Doubled Haploid Technologies. In: Seguí-Simarro, J.M. (eds) *Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology*, vol 2287. Humana, New York, NY.
69. **SHARIATPANAH, M.E. – BAL, U. - HEBERLE-BORS, E. – TOURAEV, A. (2006):** Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol Plant* 127 (4): p. 519–534.

70. **SMITH, L. (1951):** Cytology and genetics of barley. Bot. Rev 17, p. 1–51.
71. **SRISKANDARAJAH, S. - SAMERI, M. - LERCETEAU-KÖHLER, E. - WESTERBERGH, A. (2015):** Increased Recovery of Green Doubled Haploid Plants from Barley Anther Culture. Crop Science 55. p. 2806–2812.
72. **SUNDERLAND, N. - ROBERTS, M. (1977):** New approach to pollen culture. Nature 270. p. 236–238.
73. **SZABÓ, T.A. (2004):** Az árpa rendszertani helye; in: TOMCSÁNYI A. - TURCSÁNYI, G. (szerk.): Az árpa. Magyarország kultúrflórája, VIII. kötet, 14. füzet. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 23-44.
74. **TAKAHASHI, R. (1955):** The origin and evolution of cultivated barley. Adv. Genet. 7: p. 227–266.
75. **TORP, A.M. – ANDERSEN, S.B. (2009):** Albinism in microspore culture. In: Touraev A et al (eds) Advances in haploid production in higher plants. Springer, New York
76. **TOURAEV, A. - INDRIANTO, A. - WRATSCHKO, I. - VICENTE, E. - HEBERLE-BORS, E. (1996):** Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sex. Plant Repdn, 9, p. 209–215.
77. **TYRKA, M. – OLESZCZUK, S. - RABIZA-SWIDER, J. – WOS, H. – WEDZONY, M. – ZIMNY, J. – PONITKA, A. - ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA, A. – METZGER, R.J. – BAENZIGER, P.S. – LUKASZEWSKI, A. J. (2018):** Populations of doubled haploids for genetic mapping in hexaploid winter triticales. Mol Breed. 38(4): p. 46.
78. **VAUGHN, K.C. – DEBONTE, L.R. – WILSON, K.G. (1980):** Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance. Science 208: p. 196–198.
79. **WĘDZONY, M. (2009):** Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In: Touraev, A., Forster, B.P., Jain, S.M. (eds) Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer, Dordrecht.
80. **WERNER, K. - FRIEDT, W. - ORDON, F. (2000):** Strategies for Pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex based on molecular markers and DH-lines. – 8th International Barley Genetics Symposium, Adelaide, Australia. Vol II, p. 203-206.

81. **WEYEN, J. (2009):** Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding. In: Touraev, A., Forster, B.P., Jain, S.M. (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer, Dordrecht.
82. **ZHOU, H. (1996):** Genetics of green plant regeneration from anther culture in cereals. In *Vitro Haploid Production in Higher Plants* (eds Jain, S. M., Sopory, S. K, and Veilleux, R. E.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Vol. 2. p. 169– 187.
83. **ZORINIANTS, S. – TASHPULATOV, A.S. - HEBERLE-BORS, E. – TOURAEV, A. (2005):** The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis. In: Palmer D, Keller W, Kasha K (eds) *Haploids in crop improvement II*. Springer, Heidelberg, p. 35–52.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Gabonakutató Nonprofit Kft. Biotechnológiai laboratóriumának, hogy biztosította dolgozatom kísérleteinek szakmai és tárgyi feltételeit!

Meg szeretném köszönni Dr. Lantos Csabának, hogy támogatta tanulmányaimat, illetve hogy konzulensként irányította a kísérletek elvégzését és segítette a dolgozat elkészültét.

Köszönöm Dr. Veres Anikónak belső konzulensi munkáját!

Köszönettel tartozom Dr. Pauk Jánosnak az elmúlt évek szakmai támogatásáért!

Köszönöm volt kollégáim szakmai és baráti segítségét! Köszönöm Beregszászi-Kéri Krisztinának, Palaticki Szilviának, Pataki Mártának és Vizi Sándornak!

Hálával tartozom páromnak Gieth Evelinnek és családomnak, akik türelmükkel és biztatásukkal támogattak tanulmányaim és a dolgozat elkészülte során.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: MARKÓ FERENC
A Hallgató Neptun kódja: M4MFSU
A dolgozat címe: ARPA IN VITRO PORTOKTELEVÉSZTÉS FEJLESZTÉSE
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: GENETIKA ÉS BIOTECHNOLÓGIA INTÉZET
A konzulens tanszékének a neve: GENETIKA ÉS GENOMIKA TANSZÉK

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítotam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumba. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumban.

Kelt: 2024 év 10 hó 16 nap

Markó Ferenc
Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

MARKÓ FERENC (név) (hallgató Neptun azonosítója: M4MFS4)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem²

Kelt: Győr 2024 év október hó 25 nap

Ur. N.
belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendő.

² A megfelelő aláhúzendő.