

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

*Jäger Katalin*

**MOSONMAGYARÓVÁR**

**2005**

**NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR  
MOSONMAGYARÓVÁR  
NÖVÉNYTERMESZTÉSI INTÉZET**

***Precíziós Növénytermesztési Módszerek Doktori Iskola***

Doktori Iskola vezető:

**Dr. Kuroli Géza**

egyetemi tanár, az MTA doktora

**Mikroszervezetek a növény-talaj rendszerben program**

Programvezető:

**Dr. Ördög Vince**

intézetigazgató, a biológiai tudományok kandidátusa

Témavezető:

**Dr Barnabás Beáta**

tudományos igazgatóhelyettes, a mezőgazdasági tudományok doktora

**Dr. Ördög Vince**

intézetigazgató, a biológiai tudományok kandidátusa

**NÖVÉNYI NÖVEKEDÉSSZABÁLYOZÓ  
ANYAGOKAT (PGR) TERMELŐ  
ALGATÖRZSEK, MINT ALTERNATÍV  
HORMONFORRÁSOK FELHASZNÁLÁSA  
MAGASABB RENDŰ NÖVÉNYEK  
SZÖVETLENYÉSZETEIBEN**

Irta:

***Jäger Katalin***

Mosonmagyaróvár  
2005

**NÖVÉNYI NÖVEKEDÉSSZABÁLYOZÓ ANYAGOKAT (PGR)  
TERMELŐ ALGATÖRZSEK, MINT ALTERNATÍV  
HORMONFORRÁSOK FELHASZNÁLÁSA MAGASABB RENDŰ  
NÖVÉNYEK SZÖVETTENYÉSZETEIBEN**

Írta:

**Jäger Katalin**

Készült a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi  
Kar Precíziós Növénytermesztési Módszerek Doktori Iskola  
Mikroszervezetek a növény-talaj rendszerben programja keretében

Témavezető: Dr. Barnabás Beáta

Dr. Ördög Vince

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton.....%-ot ért el,

Mosonmagyaróvár, .....

.....  
a Szigorlati Bizottság Elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr. ....) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr. ....) igen/nem

(aláírás)

Esetleg harmadik bíráló (Dr. ....) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján .....%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár, .....

A Bírálóbizottság elnöke

Doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Az EDT elnöke

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>6</b>
<b>Kivonat .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>13</b>
2.1. A talajlakó algák mezőgazdasági hasznosítása.....	13
2.1.1. Az algák fitostimuláns és növényvédő hatású anyagcseretermékei.....	16
2.1.2. Növényi növekedésserkentő vegyületek – növényi hormonok .....	17
2.1.2.1. Az auxinok .....	18
2.1.2.2. Citokininek .....	23
2.2. A gabonafélék haploid nemesítése .....	26
2.2.1. A beltenyésztés.....	26
2.2.2. A haploidok és a haploid nemesítési technikák .....	27
2.2.3. Kukorica és búza portokkultúrák.....	29
2.2.3.1. A portoktenyésztést befolyásoló tényezők .....	30
2.2.3.1.1. A genotípus hatása az androgenetikus indukálhatóságra.....	31
2.2.3.1.2. A donor növények fiziológiai állapota .....	32
2.2.3.1.3. Az előkezelés szerepe.....	32
2.2.3.1.4. A mikrospórák fejlődési állapota.....	33
2.2.3.1.5. A portoktenyésztés körülményei .....	35
2.2.3.1.6. Az alkalmazott táptalajok hatása .....	36
<b>3. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>40</b>
3.1. A mikroalga és cianobaktérium törzsek hormonvizsgálata .....	40
3.1.1. A mikroalga és cianobaktérium törzsek felszaporítása.....	40
3.1.2. A citokinin- és auxinszerű hatás igazolása biotesztek segítségével.....	41
3.1.3. Az indol-3-ecetsav kimutatása.....	42
3.1.4. A citokininek kimutatása.....	44
3.1.5. A hormonhatású és tartalmú MACC törzsek vizsgálata kallusztényészetekben ..	45
3.2. In vitro portoktenyészetek .....	45
3.2.1. Az <i>in vitro</i> portoktenyészetekben alkalmazott MACC törzsek .....	45
3.2.2. Az <i>in vitro</i> portoktenyészetekben alkalmazott genotípusok .....	46
3.2.3. A donor növények felnevelési körülményei .....	46
3.2.4. Előkezelések.....	47
3.2.5. Indukciós táptalajok és tenyésztési feltételek .....	48
3.2.6. Regenerációs táptalajok és tenyésztési feltételek .....	50
3.2.7. A mikrospóra eredetű struktúrák ploiditása és szövettani vizsgálata .....	52
3.2.8. A regeneránsok ploiditásának meghatározása .....	53

<b>4. Eredmények</b> .....	<b>54</b>
4.1. Hormonok kimutatása mikroalga és cianobaktérium törzsekből.....	54
4.1.1. Indol-3-ecetsav (IES) kimutatása .....	54
4.1.1.1. Az auxinszerű hatás kimutatása bioteszttel .....	54
4.2.3. Az MACC törzsek alkalmazása búza portoktenyészetekben.....	77
4.3. A regeneráció szempontjából ideális morfortípus meghatározása .....	82
4.3.1. Az indukciós táptalajok és a donor növények felnevelési körülményeinek hatása a portokválaszra .....	84
4.3.2. A struktúra méretének és ploiditásának összefüggései.....	86
4.3.3. A különböző morfortípusok ploiditása .....	87
4.3.4. A mikrospóra eredetű struktúrák szövettani vizsgálata .....	88
4.3.5. A regenerációs fázis során bekövetkezett külső morfológiai változások .....	90
4.3.6. A regeneránsok ploiditása .....	92
<b>5. Eredmények értékelése</b> .....	<b>95</b>
5.1. A biotesztek alkalmazhatósága a hormonszerű hatás kimutatására.....	95
5.2. A mikroalga és cianobaktérium törzsek IES tartalmának meghatározása .....	96
5.3. A cianobaktérium és mikroalga törzsek citokinin tartalmának mennyiségi és minőségi meghatározása.....	97
5.4. Az MACC törzsek kallusztényészetekre gyakorolt hatása .....	101
5.5. Az MACC törzsek alkalmazhatósága gabonafélék portokkultúráiban .....	102
5.6. A legnagyobb számú spontán dihaploid kukorica regeneránst eredményező mikrospóra eredetű struktúra meghatározása .....	105
5.7. Gyakorlati alkalmazhatóság .....	108
5.8. Új tudományos eredmények .....	110
<b>Összefoglalás</b> .....	<b>112</b>
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>114</b>
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>115</b>
<b>Függelék</b> .....	<b>141</b>

## Rövidítések jegyzéke

2,3,5-TIBA	2,3,5-trijód-benzoésav
2,4-D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
GC	gázkromatográfia
HPLC	magasnyomású folyadékkromatográfia
IES	indol-3-ecetsav
IVS	indol-3-vajsav
KIN	kinetin (6-furfuril-amino-purin)
MACC	Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény
MACC 531	<i>Chlamydomonas</i> sp. mikroalga törzs
MACC 534	<i>Coenochloris</i> sp. mikroalga törzs
MACC 553	<i>Klebsormidium flaccidum</i> mikroalga törzs
MACC 560	<i>Chlorella</i> sp. mikroalga törzs
MACC 583	<i>Neochloris</i> sp. mikroalga törzs
MACC <u>642</u>	<i>Leptolyngbya</i> sp. cianobaktérium törzs
MACC <u>643</u>	<i>Anabaena</i> sp. cianobaktérium törzs
MS	tömegspektrometria
NES	1-naftil-ecetsav

## Kivonat

A jelen disszertáció alapjául szolgáló kísérletes munka célja, hogy a hormontermelő cianobaktérium és mikroalga törzsek biomasszájának portokkultúrák táptalajaiban való alkalmazásának kidolgozásával növelje a növénynemesítési alapanyagok előállításának hatékonyságát.

Munkánk a következő problémakörök megoldására irányult:

1. a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményben található cianobaktérium és mikroalga törzsek auxin- és citokininszerű hatásának biotesztekre alapozott felmérése,
2. a legjobb hatást mutató törzsek hormontartalmának mennyiségi és minőségi meghatározása analitikai módszerekkel,
3. a bizonyítottan hormonhatással és tartalommal bíró törzsek kukorica és búza portoktenyészetek táptalajaiban való alkalmazhatóságának vizsgálata.

A bioteszt felhasználásával szelektált auxinhatású mikroalga és cianobaktérium törzsekről gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel igazoltuk, hogy azok szintetizálnak indol-3-ecetsavat. Elsőként mutattunk ki indol-3-ecetsavat *Leptolyngbya* cianobaktériumból. Magasnyomású folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriás módszerrel határoztuk meg a citokininszerű hatást mutató törzsekben található citokininek mennyiségi és minőségi összetételét. Elsőként azonosítottunk benzil-adenint és benzil-adenin-ribozidot cianobaktériumokban. Elsőként mutattunk ki dihidro-zeatint és dihidro-zeatin-ribozidot *Leptolyngbya* és *Anabaena* cianobaktérium törzsekből. Tömegspektrumuk alapján új, izopentenil típusú citokinin vegyületeket detektáltunk mikroalga és cianobaktérium törzsekben. Megállapítottuk, hogy a bizonyítottan auxin és citokinin termelő cianobaktériumok és mikroalgák biomasszája önmagukban nem, de szintetikus hormonnal kiegészítve növelik a kukorica (*Zea mays* L.) és a búza (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* portokválasztát.

Nagyszámú, az új hibridek és fajták alapjául szolgáló homozigóta vonal és törzs előállítása válik lehetővé az alacsony androgenetikus képességű, de kiemelkedő nemesítési/agronómiai értékkel bíró kukorica és búza genotípusok portokválasztát az eddig használt szintetikus táptalajokhoz képest jelentős mértékben megnövelő  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  MACC 643 +  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D kezeléssel. A morfortípusok vizsgálatán alapuló mikrospóra eredetű struktúra szelekciós módszert dolgoztunk ki, melynek alkalmazásával csökkenthető a kukorica portokkultúra munka és eszközigénye. Megállapítottuk, hogy a legtöbb spontán dihaploid növény klímakamrában nevelt donor növények portokjaiban indukálódott 2-3 milliméteres fehér kompakt struktúrából regenerálódik. Meggyőződésünk, hogy a cianobaktérium és mikroalga kivonatok és mikrospóra eredetű struktúra szelekció együttes alkalmazása jelentősen megnövelheti a portoktenyésztés hatékonyságát.



## Abstract

The aim of the experimental work underlying this thesis was to improve the efficiency with which plant-breeding stocks could be produced, by elaborating a technique for using the biomass of hormone-producing cyanobacterial and microalgal strains in anther culture media.

The work focused on the following issues:

1. A survey of the auxin- and cytokinin-like activities of the cyanobacterial and microalgal strains contained in the Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection, using bioassays,
2. Qualitative and quantitative determination of the hormone content in the strains showing the highest hormone-like activity,
3. Studies on the applicability of the strains showing hormone-like effect and confirmed hormone content in the media used for maize and wheat anther cultures.

The gas chromatography-mass spectrometry method was used to confirm that the microalgal and cyanobacterial strains selected for auxin-like activity in the bioassays do in fact synthesize indole-3-acetic acid. This is the first report on indole-3-acetic acid production in the cyanobacterium *Leptolyngbya*. The high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry analytical method was used for the qualitative and quantitative determination of cytokinins in strains with a cytokinin-like effect. This is the first report on the detection of benzyl-adenine and benzyl-adenine-riboside in cyanobacteria, and on that of dihydro-zeatin and dihydro-zeatin-riboside in the cyanobacterium strains *Leptolyngbya* and *Anabaena*. New isopentenyl-type cytokinins were detected in microalgal and cyanobacterial strains on the basis of their mass spectra. It was found that the biomass of proven auxin- and cytokinin-producing cyanobacteria and microalgae was not able to enhance the androgenic response of maize (*Zea*

*mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) alone, compared with the control, but when combined with synthetic hormones, it had a positive effect. A large number of homozygous lines, which could be used to develop new hybrids and cultivars, could be produced from non-responsive elite maize and wheat genotypes by treatment with  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  MACC 643 +  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D, which enhances the anther response compared to the synthetic media applied up to the present. A selection method for microspore-derived structures, based on the analysis of morphotypes, has been elaborated to reduce the labour and equipment demands of maize anther culture. The highest number of spontaneous doubled haploid plants was found to be regenerated from white compact structures 2–3 mm in size, derived from the anthers of phytotron-grown donor plants. It is our conviction that a combination of cyanobacterial and microalgal extracts and the selection method for microspore-derived structures would improve the efficiency of anther culture.

## 1. Bevezetés

A Föld mezőgazdasági művelésbe vonható területeinek véges volta, valamint a népesség dinamikus növekedése következtében az egy főre jutó mezőgazdasági termőterület az utóbbi 40 évben mintegy 44%-al csökkent. Az egyre nagyobb ütemben növekvő élelmiszerigény a növényi produkció növelésével elégíthető ki, ami nagy termés potenciálú genotípusok minőségi és élelmiszerbiztonsági igényeket kielégítő, termőhely-specifikus növénykezeléseket integráló intenzív, de a környezetet nem terhelő termesztése révén valósulhat meg.

A gabonafélék rendkívül fontos szerepet töltenek be az emberi táplálkozásban. Az átlagos földlakó az általa elfogyasztott napi 11 778 Joule energiát biztosító táplálékának 47%-át gabonafélékből fedezi. Világviszonylatban a gabonafélék vetésterületének felén búzát (*Triticum aestivum* L.) és kukoricát (*Zea mays* L.) termesztnek (FAO, 2004). Termeszthetőségük és vetésszerkezetbeli arányuk az egyes országok klimatikus viszonyainak és az ott élő népcsoportok táplálkozási szokásainak megfelelően változó.

A búza és a kukorica Magyarország két legfontosabb, legnagyobb területen és tömegben étkezési, takarmányozási és ipari céllal termesztett árunövénye. A kukorica vetésterülete 2004-ben 1,2 millió hektárt, a búzáé 1,17 millió hektárt tett ki, a megtermelt búza mennyisége 6 millió tonna, a kukoricatermés 8,5 millió tonna volt. A két gabonafajt az ország vetésterületének 51%-án termesztették, mely a gabonafélék vetésterületének 79%-át tette ki. Az exportjukból származó árbevétel 2003-ban a teljes mezőgazdasági kivitel 12%-a volt (FAO, 2004).

Jövedelmező termesztésük előfeltétele, hogy a nemesítés ötvözve a klasszikus és modern nemesítési technológiákat olyan homozigóta törzseket és

vonalat állítson elő, melyek alapjául szolgálnak a mindenkori felhasználói követelményeket kielégítő jó beltartalmi értékkel bíró, környezet- és költségkímélő technológiával gazdaságosan termesztető, nagy termésbiztonságú és termőképességű, biotikus és abiotikus stressz faktorokkal szemben toleranciát mutató modern fajták és hibridek előállításának és köztermesztésbe vonásának.

**Kísérletes munkánk kezdetén a következő problémakörök megoldását tűztük ki célul:**

1. **szelektálni** a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményből (MACC) **az auxin- és citokininszerű hatású cianobaktérium és mikroalga törzseket** biotesztek alkalmazásával,
2. **meghatározni** a legmagasabb hormonszerű hatást mutató MACC törzsekben található **hormonok mennyiségi és minőségi összetételét** analitikai módszerek segítségével,
3. **alkalmazni** a bizonyítottan hormonszerű hatással és tartalommal bíró MACC **cianobaktérium és mikroalga törzsek biomasszáját** kukorica és búza portoktenyészetek táptalajaiban az androgenetikus indukció és növényregenerálás, ezáltal **a növénynemesítési alapanyagok előállítási hatékonyságának növelése érdekében.**

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A talajlakó algák mezőgazdasági hasznosítása

Földünkön az algák termelik az elsődleges fotoszintetikus eredetű szénvegyületek évi csaknem 50%-át (Field és mtsai, 1998), melyből a mikroalgák primér produkciója 50%-ban részesedik (Harlin és Darley, 1988).

Az alga meghatározás az eukarióta makro- és mikroszkópikus méretű algák esetén egyaránt használatos. Az algák tanulmányozásával foglalkozó tudományág a fikológia, mely létrejöttének kezdete óta nem csupán az eukarióta algákkal foglalkozó tudományterület, hanem kiterjed a prokarióta cianobaktériumokra, másnéven kékalgákra is, azoknak algákhoz hasonló morfológiai bélyegei, fiziológiai jellemzői és ökológiai hatása okán. A cianobaktériumokat és mikroalgákat az egyéb mikroorganizmektől klorofill-a tartalmuk különíti el. A pro- és eukarióta mikroalgák felépítése változatos. Ismerünk ostoros egysejtű (*Chlamydomonas*), ostor nélküli kokkoid (*Chlorella*, *Chlorococcum*), 4, 8, 16 vagy 32 sejtből álló szarcinoid (*Chlorosarcina*), nyálkaburokkal körülvett sejtaggregátumos, ún. palmelloid (*Gloeococcus*) és fonalas formákat (*Klebsormidium*, *Anabaena*, *Leptolyngbya*). A fonalas formák egyes sejtjei funkciójukat tekintve lehetnek specializáltak, mint például a légköri N<sub>2</sub> anaerob megkötését végző heterociták. Életmódjukat tekintve lehetnek szabadon élők vagy szimbionták.

A cianobaktériumok és mikroalgák a talajok mikroflórájának mindenütt jelenlevő alkotói. A *Cyanophyceae*, *Chlorophyceae*, *Euglenophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae* és *Rhodophyceae* családba tartozó 185 talajlakó cianobaktérium és mikroalga nemzetséget ismerünk (Metting, 1981; 1991). A leggyakoribb edafikus algák a mészdús és alkalikus talajokat kedvelő

*Anabaena*, *Anacystis*, *Calothryx*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*, és *Synechococcus* nemzetségbe tartozó cianobaktériumok és a savas talajokra kevésbé érzékeny *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Chlorosarcina*, *Neochloris*, *Protococcus*, *Protosiphon* és *Scenedesmus* nemzetségbe tartozó zöldalgák (Painter, 1993).

Az algasejtek életciklusuk folyamán intra- és extracelluláris vegyületeket állítanak elő, halmoznak fel, illetve választanak ki környezetükbe. Az elsődleges anyagcseretermékek esszenciálisak az algák növekedése és szaporodása szempontjából, melyek a sejtek elhalása utáni autolízist követően, vagy a lebontó szervezetek útján kerülnek a talajba és állnak a növények rendelkezésére (Boussiba, 1988). A másodlagos anyagcseretermékek a környezettel való kapcsolattartást szolgálják, melyeket életciklusuk során a talajba bocsátanak. Minőségük és mennyiségük szoros összefüggésben áll a tenyészetek fejlődési fázisával, a rendelkezésre álló tápanyagok mennyiségével, minőségével, valamint a rájuk ható környezeti tényezők változásaival. Az algák számos másodlagos anyagcseretermékének allelopátiás hatást tulajdonítanak. Molisch (1937) az allelopátiát a növényfajok — beleértve a mikroorganizmusokat — közötti előnyös és ártalmas, anyagcseretermék okozta biokémiai kölcsönhatásként határozta meg.

A szántóföldi növénytermesztési gyakorlatban a talajlakó cianobaktériumokat és mikroalgákat biotrágyaként és talajkondicionálóként alkalmazzák sikeresen.

Biotrágyaként alkalmazva jelentős szerepet játszanak a talaj termőképességének javításában és fenntartásában. A diazotróf cianobaktériumokkal történő talajoltást elsősorban Ázsiában, a rizs árasztásos termesztésénél alkalmazzák, ami a légköri N<sub>2</sub> megkötésével vegetációs periódusonként mintegy 30 kg·ha<sup>-1</sup>-ral gyarapítja a talaj nitrogénkészletét (De, 1939; Watanabe, 1951; Fernandez Valiente és mtsai, 2000). A nem árasztásos

termőhelyek cianobaktériumos talajoltásával az olajrepce (Rao és Burns, 1990a) és az őszi búza (Reynauld és Metting, 1988) N-műtrágyázásának kiváltására végeztek kísérleteket. Kínában és Vietnamban évszázadok óta alkalmazzák a rizsföldek trágyázására a kozmopolita *Azolla* moszatpáfrányt. Az *Azolla* zöldtrágyázást követő terméshozadék az *Azolla* – *Anabaena azollae* kölcsönösségen, más néven mutualizmuson alapul. Az endoszimbionta heterocitás N<sub>2</sub>-kötő cianobaktérium ammóniával látja el a gazdaszervezetet, míg attól fotoszintetikus termékeket kap (Van Hove és Lejeune, 2002). Az elért terméshozadék mértéke nagymértékben függ a képződött *Azolla* biomassza mennyiségétől (Nagarajah és mtsai, 1989). Megállapítást nyert, hogy a hektáronként talajba dolgozott 7000 kg *Azolla* zöldtrágya 43,5 kg N hatásával egyenértékű (Carapicho és mtsai, 2000). Más szerzők szerint alkalmazása a rizs N szükségletének 30-50%-kát pótolta (Gevrek, 2000; Choudhury és Kennedy, 2004). Az *Azolla* biomassza porított formában kijuttatva növelte a búza terméshozadékát (Ripley és mtsai, 2003).

Az algák másik fontos mezőgazdasági alkalmazási módja a talajok fizikai tulajdonságait javító talajkondicionálás. A nyálkát kiválasztó cianobaktériumok és palmelloid mikroalgák szoros kapcsolatban állnak a fizikai talajrészecskékkal, a rizoszféra és rizoplánta benépesítő egyéb mikroszervezetekkel és a magasabb rendű növények gyökereivel. A sejtfalakat alkotó és extracelluláris poliszacharidjaik és glükoproteinjeik révén elősegítik a váztalajok kolonizációját és a szerkezetileg leromlott talajok aggregátum képződését. Ezáltal csökkentik az erózió és defláció veszélyét, mobilizálják a talajban levő foszfort, növelik a talajok szervesanyag tartalmát, és víztartó képességét (Metting, 1988; Rao és Burns, 1990b; Evans és Johansen, 1999; Hu és mtsai, 2004). A kéregképző, nyálkaburokkal rendelkező diazotróf cianobaktériumok ezeken a pozitív hatásokon túl növelik a talajok nitrogénkészletét is (Painter, 1993).

Mivel az elsődleges és másodlagos anyagcseretermékek minőségét és mennyiségét, ezen keresztül a talajoltásból eredő mezőgazdasági terméstöbbletet az algákra ható abiotikus környezeti tényezők és az alkalmazott agrotechnika – különösen a gyomirtók és növényvédő szerek használata - negatívan befolyásolhatják (Singh és mtsai, 1988), megbízható pozitív hatás kizárólagosan a kontrollált körülmények között termesztett alga biomasszával vagy annak kivonatával végzett növénykezelésektől várható.

### **2.1.1. Az algák fitostimuláns és növényvédő hatású anyagcseretermékei**

Az algalizálás okozta termésnövekedés nem magyarázható kizárólagosan az algák által megkötött és felhalmozott szervesetlen vegyületek hatásával (Venkataraman és Neelakantan, 1967; Dadhich és mtsai, 1969; Rodgers és mtsai, 1979), ezért napjainkban egyre intenzívebb kutatások folynak a talajlakó algák fitostimuláns hatású vegyületeinek meghatározása érdekében.

Növénypatogén baktérium- (*Agrobacterium vitis*), gomba- (*Armillaria sp.*, *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Gold, *Penicillium expansum*, *Phytophthora cambivora*, *P. cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Rosellinia, sp.*, *Sclerotium rolfsii* (Succ.) Curzi, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium albo-atrum*), rovar- (*Helicoverpa armigera*) és fonálféreg (*Caenorhabditis elegans*) szaporodását és fejlődését gátló vegyületeket mutattak ki *Nostoc* törzsekből (Demule és mtsai, 1991; Zulpa és mtsai, 2003; Biondi és mtsai, 2004) és a *Scenedesmus acutus f. alternans* Hortobagyi törzsből (Cannell és mtsai, 1988). A cianobaktériumok mellett a peszticid és növényi növekedésserkentő hatással bíró talajlakó zöldalgák növénykezelésekbe való bevonását indokolja, hogy szaporodási rátájuk magas, nagy a biomassza kihazataluk és iparszerűen tenyészthetőek (Ördög és Pulz, 1995). Bár az algák által szintetizált biopeszticidok áttételesen, a patogének és



kompetítorok gátlása révén növelik a növényi produkciót, kutatásukban és majdani alkalmazásukban rendkívül nagy potenciál rejlik.

A szárított tengeri makroalgákat a tengermelléki országokban évszázadok óta alkalmazzák zöldtrágyaként. Mivel a nagy tömegű biomassza szárítása és kijuttatása rendkívül költségigényes, ezért jelentős volumenű makroalga feldolgozóipart hoztak létre. Ennek termékei a bizonyítottan IES és citokinin tartalmú, növényi növekedésserkentő hatással bíró algakészítmények, például a Kelpak (Tay és mtsai, 1985; Sanderson és mtsai, 1987; Sanderson és Jameson, 1986; Crouch és van Staden, 1991; Crouch és mtsai, 1992; Stirk, 1997; Stirk és van Staden, 1997; Wu és Lin, 2000).

A talajlakó cianobaktériumok és zöldalgák növényi hormon termeléséről kevés számú adat áll rendelkezésre, kutatásuk az utóbbi tizenöt év során került előtérbe. Az edafikus algatörzsek szelekciója és mesterséges körülmények közötti tenyésztetőségének vizsgálata az előfeltétele annak, hogy a tengeri algakészítményekhez hasonló növényi hormonhatású cianobaktérium és mikroalga készítmények jelenhessenek meg a hazai piacon. A biotesztek alkalmazására alapozott szelekció előnye, hogy alacsony költség- és időigényük révén kiváló eszközei a nagy számú genotípus gyors tesztelésének. Alkalmazásuk mellett szól, hogy az algák által esetlegesen szintetizált fitotoxikus vegyületek növényekre gyakorolt hatása sem marad rejtve.

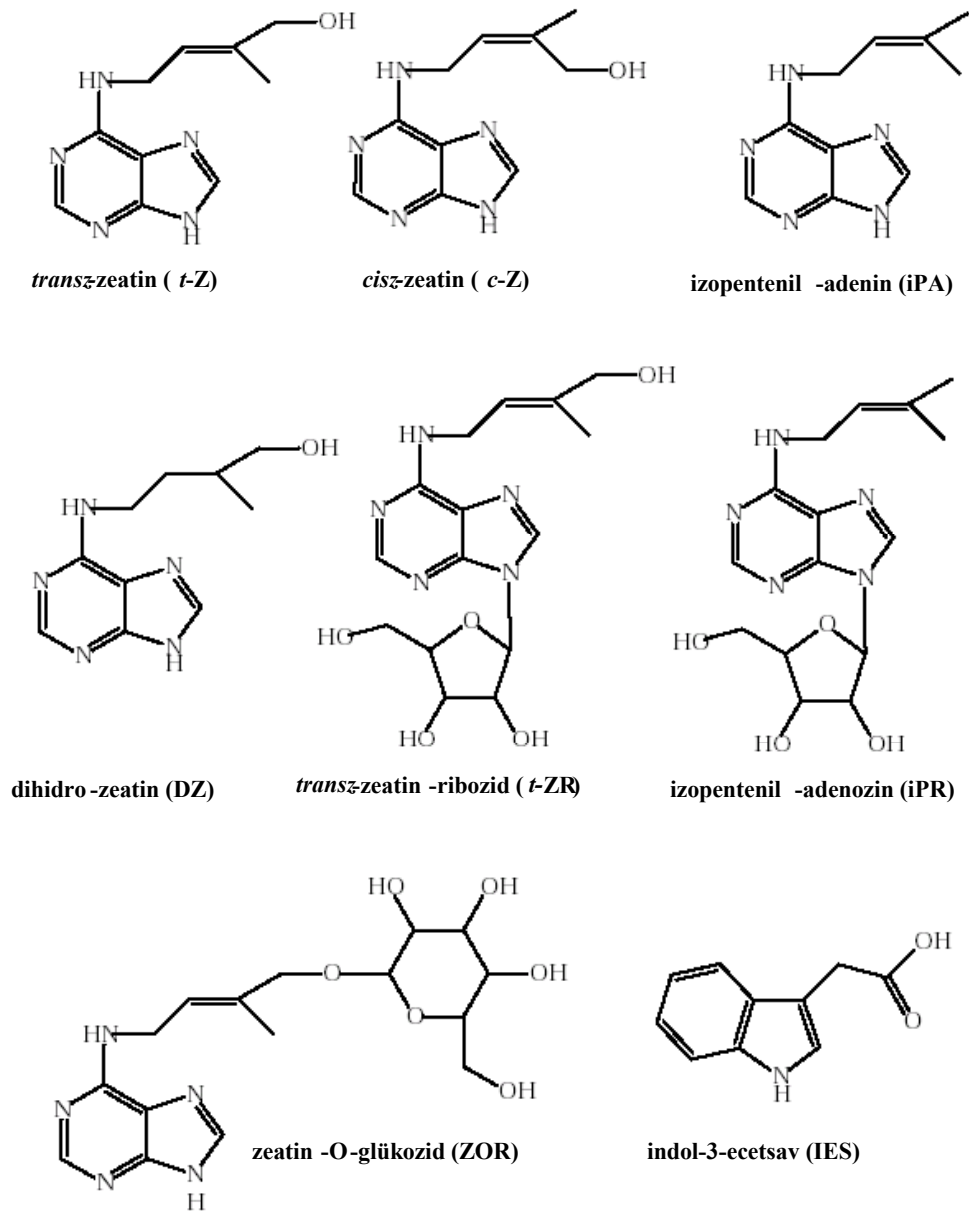
### **2.1.2. Növényi növekedésserkentő vegyületek – növényi hormonok**

A hormon kifejezést Bayliss és Starling (1904) alkotta és „aktivitást kiváltóként” definiálta. A növényélettani terminológiában először Fitting (1910) alkalmazta „a növényben szabályozó funkcióval bíró, a természetben előforduló szerves vegyület” meghatározásaként. Növényi növekedésserkentő vegyületeket, más néven növényi hormonokat, számos szervezet szintetizál,

kezdvé a növényi növekedést elősegítő rizoszféra baktériumoktól - PGPR (lásd Arshad és Frankberger összefoglaló munkáját, 1998) - a talajlakó és tengeri algákon át a magasabb rendű virágos növényekig. A „klasszikus öt” növényi hormoncsoport – auxinok, citokininek, gibberellinek, abszcizinsav és etilén (van Overbeek és mtsai 1954) – közül az első két csoport vegyületeinek fejlődésben és növekedésben betöltött szerepe a legjelentősebb, a növényi szövettényezetekben és a növénytermesztésben is rutinszerűen alkalmazottak, ezért a továbbiakban ezek a vegyületcsoportok kerülnek tárgyalásra.

### **2.1.2.1. Az auxinok**

Bár Darwin neve az evolúciós elmélet megalkotójaként került be a köztudatba, őt tartják von Sachs-sal egyetemben a modern növényi hormonkutató atyjának. Egyidejűleg vetették fel a növényi szervek kialakulásának és növekedésének kémiai jelátvivők általi szabályozását (Darwin, 1880; von Sachs, 1880), és mint utólag kiderült, az általuk megfigyelt folyamatokat auxinok szabályozták. Salkowski (1885) kolorimetriás módszert dolgozott ki az indol-vázis vegyületek kimutatására. Az auxin A és B elnevezést Kögl és Haagen-Smit (1931) adta az általuk emberi vizeletből izolált, a növények növekedését befolyásoló vegyületeknek. Az indol-3-ecetsavként (IES) ismertté vált heteroauxint ismételtén Kögl és munkatársai mutatták ki emberi vizeletből (Kögl és mtsai, 1934). Haagen-Smit és munkatársai (1946) elsőként azonosította az IES-t növényi mintában, éretlen kukorica szemtermésben. Számos természetes auxint ismerünk, ezek az IES (1. ábra), a 4-klórindol-3-ecetsav, az indol-3-aldehid (Ernstsen és Sandberg, 1986) és az indol-3-vaajsav (Ludwig-Müller és Hilgenberg, 1995). Az indolacetil -peptidek, -glükóz-észterek, -mioinozit-észterek a növények raktározott auxinformái. A triptofán – IES bioszintetikus út köztes termékei, az indol-3 tejsav és az



1. ábra A leggyakoribb citokininek és az indol-3-ecetsav szerkezete

indol-3-etanol szintén mutatnak auxinhatást. Az indolvázias auxinok mellett a növényekben számos gyenge auxinhatást mutató fenolgyeület található, mint pl. a fenilecetsav és a fenil-acetamid. Az IES a fiziológiailag legaktívabb auxin forma.

A mikroorganizmusokban és növényekben az IES szintézise több, szimultán végbemenő bioszintetikus folyamat során történik (Bandurski és mtsai, 1995; Frankenberger és Arshad, 1995). Korábban kizárólagosan a triptofánt tartották az IES szintézis egyedüli kiinduló vegyületének, de a triptofán szintáz hiányos növények esetén az IES indol-3-glicerol-foszfátból képződik (Normanly és mtsai, 1993; Ilić és mtsai, 1999; Ouyang és mtsai, 2000). Mikroorganizmusokban az IES szintézis triptofánból zömmel indol-3-acetamidon keresztül valósul meg (Sekine és mtsai, 1988).

Sergeeva és munkatársai (2002) igazolták analitikai módszerrel először, hogy a szabadon élő és szimbióta cianobaktériumok IES-t termelnek és bocsátanak ki környezetükbe. Tengeri zöldalgából IES-t elsőként Jacobs és munkatársai (1985) mutattak ki analitikai módszerrel.

Az IES legjellegzetesebb hatása a megnyúlásos növekedés serkentése az úgynevezett „savas növekedés” révén (Rayle és Cleland, 1970; Cleland, 1987), mely során a plazmalemmában elhelyezkedő  $H^+$ -ATPázra hatva indukálja az apoplast elektrokémiai protongradiensének emelkedését és ezzel kialakítja a sejtfalbontó enzimek működéséhez szükséges optimális kémhatást (Srivastva, 2002). A citokininekkel egyetemben a sejtosztódást (Jablonski és Skoog, 1954), valamint a sejt- és az embrió polaritásának kialakulását szabályozza (Fry és Wangermann, 1976; Fischer és mtsai, 1997). Főszerepet játszik az apikális dominancia (Thimann és Skoog, 1933; Cline, 1997), a tropizmusok (Evans, 1985; Briggs és Baskin, 1988) létrejöttében, a szállítószöveti elemek differenciálódásában (Wetmore és Rier, 1963; Aloni, 2001) valamint a járulékos- és oldalgyökér képződésben (Thimann, 1936). Elősegíti a

terméskötést, szabályozza a termésfejlődést és növekedést (Buta és Spaulding, 1994), indukálja a partenokarpikus termések kialakulását (Rodrigo és García-Martinez, 1998), késlelteti a növényi szervek leválását és a szenescenciát (Zhu és Davies, 1997). Növényi szövettényezetekben a tág auxin/citokinin arány elősegíti a gyökerek differenciálódását (Skoog és Miller, 1957; Bell és McCully, 1970).

A gabonafélék portokkultúráiban leggyakrabban a 2,3,5-trijód-benzoésav (2,3,5-TIBA) antiauxint és a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D) szintetikus auxint alkalmazzák, melyeket a növénytermesztésben herbicidként használnak. A 2,3,5-TIBA auxin transzportgátlóval kiegészített táptalajok esetén megnövekedett a soksejtmagvas androgenetikus mikrospórák aránya, de a struktúrák további fejlődése általában lassú ütemet mutatott (Bouharmont, 1977; Zhou és Yang, 1980). Bouhamont (1977) hasonló módon, a portokok izolálását megelőző 4 órással 1 mg·l<sup>-1</sup> 2,3,5-TIBA előkezelése utáni első pár napban intenzív osztódást figyeltek meg, de a soksejtmagvas mikrospórák további fejlődése elmaradt. A 2,3,5-TIBA már 1 µg·l<sup>-1</sup> koncentrációban is erősen gátolta az embriófejlődést (Choi és mtsai, 2001). Ennek oka, hogy a 2,3,5-TIBA mint poláris auxin transzport inhibitor kötődik a PIN1 IES efflux fehérjéhez és ezáltal a globuláris embriók endogén IES koncentrációja megemelkedik (Goldsmith, 1977). Fischer és Neuhaus (1996) megállapították, hogy a globuláris embriókon belüli auxin gradiens főszerepet játszik a polaritás kialakulásában. A 2,3,5-TIBA antiauxin megakadályozta az IES embrión belüli egyenlőtlen eloszlását (Geldner és mtsai, 2001), ezzel gátolta, hogy a globuláris embriók bilaterális szimmetriájú embriókká fejlődjenek, illetve, hogy a hajtásmerisztéma és a scutellum kialakuljon (Fischer és mtsai, 1997). Az auxin transzport inhibitorokkal kezelt embriók a GNOM mutánsokkal azonos fenotípust mutattak (Hadfi, 1998).

A 2,4-D szintetikus auxint elterjedten alkalmazzák a növényi

szövettenyészetekben intenzív sejtosztódást kiváltó hatása miatt. Magasabb koncentrációban alkalmazva azonban meredeken csökkentette az osztódó sejtek arányát, károsította a sejtmembránt, fokozta a citoplazma és a nukleoplazma vakuoláltságát, a kromatin állomány és a kromoszómák rendellenességeit (Ateeq és mtsai, 2001). A hagyma *Allium cepa* és a rizs *Oryza sativa* regeneránsoknál a magasabb dózisban alkalmazott 2,4-D klorofill hiányt és pollen sterilitást okozott (Kumari és Vaidyanath, 1989). A mikroszóra indukció kiváltásához szükséges 2,4-D mennyiségéről ellentmondóak az irodalmi adatok. Kuo és munkatársai (1994) magas auxin koncentrációt alkalmazva a kukorica embrióindukció növekedését figyelték meg. A  $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D-t és  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kinetint tartalmazó indukciós táptalajon közvetlenül növények fejlődtek. Büter (1997) szerint a magasabb auxin koncentráció növelte ugyan a kukorica androgenetikus indukciós arányát, de csökkentette az embriószerű struktúrák számát. Több kísérletben megfigyelték, hogy kukorica esetén az endogén hormontartalom elegendő volt a mikroszóra eredetű struktúrák kialakulásának kiváltásához, és külső hormonpótlásra nem volt szükség (Nitsch 1981, Tsay és mtsai, 1986; Rashid, 1988). A hormonszükséglet valószínűleg szintén genotípus függő (Mandal and Gupta 1995, Gosal és mtsai 1997, Rakoczy-Trojanowska és mtsai, 1997) és azt a donor növények felnevelési körülményei is befolyásolhatják (Ferrie és mtsai, 1995). A megemelkedett endogén IES szint összefüggést mutatott a kukorica nagyobb mértékű embriogenetikus indukálhatóságával (Jiménez és Bangerth, 2001). A különböző kukorica genotípusok androgenetikus indukciójának különbözőségét okozhatja sejteik exogén növekedést szabályozó anyagokra, főleg a 2,4-D-re adott eltérő válasza (Dolgykh, 1994). Az endogén IES embrión belüli eloszlása tekintetében különbsége volt az embriogén indukcióra alkalmas és kevésbé alkalmas vonalak között, miután azokat 2,4-D-t tartalmazó táptalajon tenyésztették (Bronsema és mtsai, 1998). Sárgarépa esetén a 2,4-D kezelés nagy mennyiségű endogén IES

felhalmozódást okozott (Michalczuk és mtsai, 1992). A szerzők feltételezték, hogy a sárgarépa embriogén útra terelhetősége nagymértékben összefügg endogén IES szintjük 2,4-D hatására bekövetkezett többszörösére növekedésével. Felvetették azt is, hogy a szintetikus vegyületek az endogén auxin anyagcsere megváltoztatása útján közvetett módon hatnak és a 2,4-D közvetlen hatása nem jelentős (Michalczuk és mtsai, 1992). A sárgarépaéhoz hasonló módon 2,4-D jelenlétében tenyésztett lucerna levél protoplasztok endogén IES szintje tetemesen megnőtt a 2. 3. napra (Pasternak, 2002). Az IES felhalmozódási helyének kimutatása éretlen zigotikus embriókban immunocitokémiai módszerekkel közvetlen bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az endogén auxin szintjének hirtelen megemelkedése lehet az első jel, ami a szomatikus embriogenezist kiváltja (Thomas és mtsai, 2002). Ahhoz, hogy az embrió további fejlődését indukáló poláris auxin grádiens kialakulhasson, az IES koncentráció ugrásszerű megemelkedését kiváltó impulzusnak meg kell szűnnie (Jiménez, 2001). Az embriogenitás huzamosan 2,4-D tartalmú táptalajokon tenyésztett kultúrák esetén elvész (Filippini és mtsai, 1992), mivel azok elveszítik érzékenységüket a szintetikus hormonnal szemben, és ezáltal endogén IES szintjük lecsökken (Jiménez, 2001).

#### **2.1.2.2. Citokininek**

A citokininek felfedezése Haberlandt (1913) munkájával vette kezdetét, aki megfigyelte, hogy a burgonya floémnedve a gumó szöveteinek osztódását idézte elő. Mintegy 30 évvel később van Overbeek és munkatársai (1941; 1944) kimutatták, hogy a kókuszdió folyékony endospermiuma, az élesztőgombák, a búzaszem és a mandula mag kivonatai *Datura* embriókultúrákban sejtosztódást indukálnak, ezzel bizonyítva a sejtosztódást kiváltó faktor széleskörű előfordulását. Miller és munkatársai (1955) azonosították az első citokinint, a 6-

furfuriladenint ismertebb nevén kinetint (KIN) hőkezelt heringspermából. Letham (1963; 1964) elsőként mutatta ki kukoricából a KIN-nel azonos hatást mutató növényi citokinint a zeatint, és határozta meg annak kémiai sajátosságait.

A citokininek N<sup>6</sup> szubsztituált adenin származékok. A zeatin felfedezése óta számos, a baktériumokban és növényekben általánosan előforduló citokinint azonosítottak. Túlnyomó többségük izoprenoid citokinin, a gyűrűs citokininek kisebb számban fordulnak elő. A biológiailag legaktívabb izoprenoid citokinin a *transz*-zeatin, annak redukált formája a dihidrozeatin, a zeatin-ribozid és az izopentenil-adenin (1. ábra). A -ribotid-, -ribozid-, -glükózid- és aminosav konjugátumok biológiai hatást nem, vagy csak kismértékben mutató transzport és reverzibilis- vagy irreverzibilis raktározott formák.

A citokinin bioszintézisének mai ismereteink szerint négy útja van, bár bizonyos utak szabályozása mindmáig tisztázatlan. A múltban a szeril-tRNS és tirozil-tRNS degradálódását, és a bomlástermékként megjelenő *cisz*-zeatin *transz*- formává alakulását (Mok és Mok, 2001) tekintették a citokinin bioszintézis lehetséges útjának. Mivel nincs korreláció a tRNS szintézisének és bomlásának folyamata és a *transz*-zeatin akkumuláció között, ezért feltételezték, hogy a sejtekben létezik *de novo* citokinin szintézis is. A *de novo* citokinin szintézis klasszikusaként a DMAPP:AMP út ismeretes, mely során a dimetilallil-difoszfát (DMAPP) izopentenil csoportja izopenteniltranszferáz segítségével jut az adenzin-monofoszfátra (AMP), így első termékként izopentenil-adenozin-monofoszfát (iPMP) jön létre (Taya és mtsai, 1978). Ez a bioszintetikus út a baktériumokra jellemző, de megtalálható a növényekben is. Kakimoto (2001) számolt be a növényekre és gombákra jellemző DMAPP: ATP/ADP útról, mely során az izopentenil oldallánc adenzin-trifoszfátra (ATP) vagy adenzin-difoszfátra (ADP) jut. A magasabb rendű növények és a zöldalgák izopentenil-difoszfát szintézise eltérő. Míg a növényekben a



mevalonsavból, addig a zöldalgákban a deoxixilulóz-5-foszfátból képződik (Schwender és mtsai, 2001). A citokinin bioszintézisének iPMP független alternatív útja során a 4-hidroxi-3-metil-2-butenil difoszfát (HMBPP) biztosítja a hidroxilált izopentenil oldalláncot, mely AMP-re kerülve egy lépésben teszi lehetővé a zeatin-ribozid-monofoszfát szintézisét (Åstot és mtsai, 2000). Feltételezik, hogy egy másik alternatív úton keresztül a HMBPP ATP-re, illetve ADP-re kerülve első lépésben zeatin-ribozid-trifoszfát és zeatin-ribozid-difoszfát keletkezik, de ezidáig zeatin-trifoszfát és zeatin-difoszfát nem volt kimutatható növényi mintákból (Nordström, 2004).

Az izopentenil-adenin volt az első citokinin, melyet a szárazföldi növények őseként számontartott *Characeae* család tagjából, a *Chara globularis* édesvízi zöldalgából Zhang és mtsai (1989) mutattak ki. Farooqi és mtsai (1990) zeatin és izopentenil-adenin tartalmat állapítottak meg a *Valoniopsis pachynema* és *Caulerpa texifolia* tengeri zöldalgában, az *Udotea indica* esetén pedig izopentenil-adenint és zeatin-ribozidot mutattak ki. Stirk és mtsai (1999) izopentenil-adenint határoztak meg a talajlakó *Arthronema africanum* (Schwabe et Simons) Komárek et Lukavský cianobaktérium törzsből. Ugyanezen törzsnél a citokininszerű hatás napi szakaszosságát írták le (Ördög és Pulz, 1996). Talajlakó cianobaktériumok és mikroalgák citokinin- és auxinszerű hatását mutatták ki Stirk és mtsai (2002) biotesztek alkalmazásával. Ördög és munkatársai (2004) biotesztekre alapozott szelekciót követően mutattak ki analitikai módszerek segítségével izoprenoid és gyűrűs citokinineket talajlakó zöldalgákból.

A citokininek szabályozzák a növényi sejtosztódást és az ontogenezis szinte valamennyi fázisát. Legjelentősebb szerepük a sejtciklus és sejtosztódás szabályozásában (Jablonski és Skoog, 1954; den Boer és Murray, 2000), valamint az auxinnal kölcsönhatásban a sejtmegegyülés serkentésében van. Szabályozzák az embriófejlődést, a növényi szervek differenciálódását

(Chaudhury és mtsai, 1993), növekedését (Kuraishi, 1959) és a kloroplasztiszok érését (Fletcher és McCulloch 1971). Gátolják az öregedést (van Staden, 1990), serkentik a tápanyagok felvehetőségét, elősegítik a gumóképződést (Gregory, 1956; Guivarc'h és mtsai, 2002). Az auxin hatásával ellentétesen serkentik az oldalsóágak kihajtását (Wickson és Thimann, 1958). Egyes növényfajok esetén szerepet játszanak a dormancia megszakításában (Miller, 1956) és alkalmazásukkal helyettesíthető a vernalizáció. Szövettenyészetekben a szűk auxin/citokinin arány elősegíti a hajtásképződést (Skoog és Miller, 1957; Yamada és mtsai, 1971).

A növényi szövettenyészetekben leggyakrabban alkalmazott szintetikus citokininnek a benzil-adenin és a kinetin.

## **2.2. A gabonafélék haploid nemesítése**

### **2.2.1. A beltenyésztés**

Darwin 1876-ban számolt be az idegentermékenyülő fajok öntermékenyülést illetve beltenyésztést követő vigorromlásáról. Munkáját Beal folytatta, aki 1877 és 1882 között öntermékenyülő fajtákat keresztezve azt figyelték meg, hogy az utódok, a hibridek terméshozama 40%-kal meghaladta a szülőkéét (Allard, 1960). East és Shull egymástól függetlenül kidolgozta a fenotípusos tulajdonságok rögzítése érdekében számos nemzedéken át beltenyésztett szülővonalak keresztezésén alapuló kukoricaneemesítési módszert (Shull, 1909). Mindkét nemesítő 1908-ban arra a következtetésre jutott, hogy az F<sub>1</sub> nemzedék teljesítménye jóval meghaladja a legjobb szabad elvirágzású fajták átlagát, tehát a termésmennyiség heterózishatás és hibridvigor általi növelésének gondolatát elsőként kukoricaneemesítők fogalmazták meg. A megfigyelés jelentőségét növelte, hogy a hibridek produkciója kiegyenlített volt, mely a betakarítás

gépésítésének szempontjából fontos (Harpstead, 1975). A kor gabonatermesztői és maga East is a mezőgazdasági gyakorlatban alkalmazhatatlannak tartották a módszert, mivel a beltenyészített szülőpárok termésátlagai alacsonynak bizonyultak, így a hibrid vetőmag előállítása rendkívül költséges volt. Miután Jones 1918-ban kidolgozta a négyvonalas hibrid előállítási módszert, megvalósulhatott a nagy termőképességű kukorica hibridek gazdaságos termesztése. Az öntermékenyülő fajok esetén 1922-ben alkalmazták először a beltenyészítést mint módszert, fontos agronómiai tulajdonságok árpafajták közötti átvitelére (Harlan és Martini, 1936).

### **2.2.2. A haploidok és a haploid nemesítési technikák**

A virágos növények egyedfejlődése vegetatív és generatív szakaszra különül. A generatív életszakaszban számszelező osztódás során kialakulnak a haploid generációt képviselő mikro- és makrospórák. A portokokban fejlődő mikrospórából számtartó osztódás (-ok) során kialakul az érett hím gametofiton a pollen, a termőben fejlődő makrospórából a női 8 sejtmagú női gametofiton, benne a petesejttel.

A természetestől eltérő feltételek között a mikrospórák fejlődése a mikrosporogenezisről az androgenézisre, az érett petesejtek fejlődési útja a ginogenezisre, tehát vegetatív fejlődési útra terelhető. Ez haploid vagy spontán dihaploid embrioidokat eredményez, melyekből másodlagos sporofita fejlődésen át életképes, dihaploidok esetén fertilis növények nevelhetők. Az idegentermékenyülő fajok haploidjai a vitalitást csökkentő, a heterozigótákban recesszív voltak miatt fenotípusosan nem manifesztálódó gének kifejeződése miatt csökkent életképességűek. Az öntermékenyülők esetén, mivel az ilyen defektusokat okozó géneket hordozó egyedek az evolúció folyamán kiszelektálódtak, a haploidok külleme és vigora normálisnak mondható. Ez a

tendencia a poliploidoknál is megfigyelhető. Míg az idegentermékenyülő autopoliploidok haploidjainál beltenyésztési leromlás figyelhető meg, addig az öntermékenyülő allopoliploidok haploidjai életrevalóak, és kromoszóma készletük megkettőződése után szaporodóképesek.

Azt követően, hogy Blakeslee és munkatársai 1922-ben elsőként számoltak be Bergner 1921-ben végzett munkája nyomán természetes *Datura stramonium* haploidokról, azok a növény fiziológusok, -embriológusok, -genetikusok és -nemesítők érdeklődésének előterébe kerültek. Bevonásuk a hagyományos nemesítésbe Chase (1952) nevéhez fűződik, aki partenogenetikus kukorica haploidokat kívánt alkalmazni beltenyésztett vonalak előállítására azok kromoszóma garnitúrájának megkettőződése után. Felismerve a módszer távlati nemesítésbeli jelentőségét számos kísérlet irányult a partenogenezis gyakoriságának növelésére a megporzást megelőző pollenbesugárzás, az ikerembrió szelekció, a távoli keresztezések alkalmazásával, valamint az indukciós gyakoriságot növelő és az eltérő ploiditású egyedek elkülönítésére alkalmas vizuális markereket hordozó genetikai anyagok bevonásával.

Áttörő eredményt hozó kísérletében Guha és Maheshwari (1964, 1966) *in vitro* körülmények között *Datura innoxia* portokok pollen embriogenezisét indukálta, valamint Kasha és Kao (1970) kidolgozta az árpa (*Hordeum vulgare* L.) ginogenezisét kiváltó *Bulbosum*-technikát. A homozigóta vonalak és törzsek előállítását célzó technikák számos mezőgazdaságilag fontos növény homozigóta spontán vagy indukált (Barnabás és mtsai, 1991; Wan és mtsai, 1991) dihaploidjainak előállítására használt fontos eszközzé váltak. A búza portoktenyésztés hazai meghonosítása és növénynemesítésbeni alkalmazása Heszky László, Pauk János, Barnabás Beáta és Bedő Zoltán nevéhez fűződik.

A haploid nemesítési technikák a gaméták *in vitro* manipulálását célozzák egészséges és szaporodóképes homozigóta növények előállítására céljából. Napjainkban a gyakorlatban alkalmazott haploid nemesítési technikák a portok

és mikrospóra kultúrák, valamint az apai haploid genom 100%-os eliminációján alapuló távoli keresztezések az embriómentéssel kiegészítve. Ezen módszerek előnye a nemesítés időtartamának rövidülése, így a változó termelői igényekhez való rugalmas alkalmazkodás. A haploid nemesítési módszerek számos mezőgazdaságilag fontos növény homozigóta dihaploidjainak előállítására használt fontos eszközzé váltak (Jähne és Lörz, 1995). Alkalmazásukkal a fajta- és hibrid előállítás időtartama és költsége nagymértékben lecsökkent (Hu és Yang, 1986; Hu, 1997). Napjainkig a DH technikát 259 növényfaj esetén alkalmazták sikeresen, 229 faj esetén portok és mikrospóra kultúrát, 30 faj esetén távoli keresztezést használva (Maluszynski és mtsai, 2003). Jelenlegi ismereteink szerint 207 DH eredetű fajta van köztermesztésben. Ezek közül 95 árpa-, 47 repce-, 8 spárga-, 8 paprika-, 7 rizs-, 6 dohány-, 5 tojásgyümölcs-, 4 triticale-, 3 sárgadinnye- és 2 szareptai mustár fajta (Thomas és mtsai, 2003). Hazánkban az első androgenetikus dihaploid eredetű fajta a Heszky László és Simonné Kiss Ibolya által előállított Dama rizsfajta volt, mely 1992-ben kapott állami minősítést. A sikeresen alkalmazott dihaploid technika eredményeként 21 búzafajtát állítottak elő, közülük a legkorábbiak a Huapei No. 1 - Kína 1978 és a BR43 - Brazília 1990 (Thomas és mtsai, 2003).

Magyarországon 5 portokkultúrából származó dihaploid eredetű búzafajta van köztermesztésben. A GK Délibáb fajtát a világon negyedikként 1992-ben állítottak elő (Pauk és mtsai, 1995). A GK Délibáb, GK Szindbád és GK Tündér fajtákat az MTA Szegedi Gabonakutató Intézetében, az Mv Szigma és az Mv Madrigál fajtákat az MTA Martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézetében nemesítették.

### **2.2.3. Kukorica és búza portokkultúrák**

Sikeres kukorica portokkultúráról kínai kutatók (Anonymus, Research

Group 401, 1975) számoltak be először. A pozitív válaszadás gyakorisága, melyen a portokból kiemelkedő, szemmel látható mikroszpóra eredetű struktúrákat értjük, 1% körüli volt. Ugyancsak Kínában látott napvilágot két másik sikeres eredmény 1978-ban. Miao és munkatársai N6 alaptáptalajt (Chu, 1978) alkalmazva 7%-os portok indukciós gyakoriságot értek el. Az YP alaptáptalaj alkalmazásával 13,1%-ra emelkedett a válaszadó portokok aránya (Ku és mtsai, 1978). Jelenleg a legjobb válaszadó képességű kínai eredetű vonalak keresztezésével előállított hibridek androgenetikus indukciós aránya 50-90%, növényregenerációs aránya 20-30% (Barnabás, 2003). Barnabás (2003) vizsgálatai szerint a magas válaszadó képességű kínai és rekalcitráns elit beltenyésztett vonalak SC hibridjeinek portokkultúrái esetén a mikroszpóra eredetű struktúrák aránya 21,2-123,9%, a növényregeneráció 4,1-22,9% volt a lerakott portokok arányában.

Az első búza portokkultúrákat 1973-ban indították (Chu és mtsai, 1973; Ouyang és mtsai, 1973; Wang és mtsai, 1973). Kezdetben az MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajt alkalmazták, majd azt hormonokkal egészítették ki, illetve a burgonya kivonatot tartalmazó P2 (Chuang és mtsai, 1978) és a rizs portoktenyésztésre kidolgozott N6 (Chu, 1978) táptalajjal javították az indukció és zöldnövény regeneráció arányát. Az alaptáptalaj módosítása idővel meghozta a remélt eredményt: míg 1976-ban Heszky és Mesch az általuk vizsgált 77 genotípus 14%-ánál kapott portokválaszt, és egy fajta volt képes regenerációra, addig 1987-ben Andersen és munkatársai 215 különböző eredetű búzafajta közül már 200 esetén figyeltek meg portok indukciót és 93 fajtából állítottak elő dihaploid törzset.

### **2.2.3.1. A portoktenyésztést befolyásoló tényezők**

Keller és munkatársai (1978) szerint a mikroszpórák androgenetikus

indukciós gyakoriságát a következő tényezők befolyásolják:

- genotípus,
- donor növények fiziológiai állapotát meghatározó környezeti tényezők,
- előkezelések,
- mikrospóra fejlettségi állapota,
- tenyésztési körülmények, az indukciós és regenerációs táptalajok összetétele.

A kiindulási anyag válaszadó képessége az indukálódott portokok, a mikrospóra eredetű struktúrák és a regeneránsok számával mérhető (Barnabás és mtsai, 1986; 1987; Szakács és mtsai, 1989).

#### **2.2.3.1.1. A genotípus hatása az androgenetikus indukálhatóságra**

A genotípus függőség a *Poaceae* családba tartozó fajok portokkultúráinak sikerességét leginkább befolyásoló tényező (Genovesi és Yingling, 1994; Raghavan, 1997). Az extrém genotípus függőséget jól példázza az az elhúzódnó kínai kísérletsorozat, amely a portokkultúrára alkalmas kukorica csíraplazma kiválasztását megelőzte. Ennek során 159 vizsgált genotípusból 9 bizonyult válaszadónak (Miao és mtsai, 1978). A kínai androgenetikus vonalakkal végzett kísérletek után a kutatók kiterjesztették vizsgálataikat más földrajzi elterjedésű genotípusokra is, és jó válaszadó képességű egyesült államokbeli és európai kukorica genotípusokat találtak (Genovesi és Collins, 1982; Dieu és Beckert, 1986; Petolino és Jones, 1986). Ahhoz, hogy a portokkultúrákból származó dihaploid vonalak a gyakorlati nemesítés számára felhasználhatók legyenek, szükséges azok elfogadható nemesítési értéke és magas androgenetikus indukálhatósága (Nitsch és mtsai, 1982). A jó válaszadó képesség átörökítése az alacsony és magas válaszadó képességű vonalak keresztezését követő szelekcióval oldható meg (Petolino és Thompson, 1987). A genotípus függőség

a búzára is jellemző, még ha nem is a kukoricához hasonló szélsőséges módon. Az egyes búzafajták androgenetikus indukálhatósága (6,8–82,3%) és regenerációs képessége (4,1–22,9%) között nagy eltéréseket figyeltek meg (Barnabás, 2003).

#### **2.2.3.1.2. A donor növények fiziológiai állapota**

Bizonyítást nyert, hogy a portokokat szolgáltató növények fiziológiai állapota, más szóval fitnessse jelentős hatással bír azok portokjainak androgenetikus indukálhatóságára (Nitsch és mtsai, 1982; Wassom és mtsai, 2001). A donor növények fiziológiai állapotát befolyásoló környezeti tényezők a megvilágítás hossza, a rendelkezésre álló fény minősége és intenzitása, a hőmérséklet és a növények tápanyag-ellátottsága (Barnabás és mtsai, 1987; Genovesi, 1990). Az üvegházi- és szántóföldi körülmények között nevelt, valamint a különböző vetésidejű növények portokválasza közötti különbségek is jelzik a fiziológiai állapot jelentőségét (Petolino és Genovesi, 1994). A sikeres és ismételhető androgenetikus indukció feltétele a donor növények kontrollált körülmények közötti felnevelése (Ferrie, 1995; Jähne és Lörz, 1995).

#### **2.2.3.1.3. Az előkezelés szerepe**

A stresszt tekintik az egy- és kétszikű növények mikrospóra embriogenezisét kiváltó fő tényezőnek. Ahhoz, hogy a mikrospórák genetikai programja a gametofita fejlődési útról a sporofita útra kapcsoljon át, a folyamatot elindító stresszhatás szükséges (Szakács és Barnabás, 1988; Touraev és mtsai, 1997). Irodalmi adatok szerint négy féle stresszkezelés eredményezett értékelhető arányú mikrospóra embriogenezist: a hidegsokk, a hősokk, a tápanyagok megvonása és a kolhicin kezelés. Az alacsony hőmérsékleti sokk a kukorica



(Gaillard és mtsai, 1991), a búza (Gustafson és mtsai, 1995), az árpa (Huang és Sunderland, 1982), a rizs (Cho és Zapata, 1988) és egyéb fajok esetén bizonyult hatásosnak. A hősokk a repce (Custers és mtsai, 1994), a búza (Touraev és mtsai, 1996a), és a dohány (Touraev és mtsai, 1996b) androgenezisét váltotta ki. A szénhidrát- és nitrogénéheztetés a dohány (Kyo és Harada, 1985), a búza (Touraev és mtsai, 1996a), a rizs (Ogava és mtsai, 1994) és az árpa (Hoekstra és mtsai, 1992), a kolhicin kezelés a repce (Zhao és mtsai, 1996) mikrspórák embriogenezisét eredményezte. Gabonaféléknél általában a hidegkezelést (+4 - +7 °C) alkalmazzák a kalászkok és bugák előkezelésére. A búza esetén az előkezelések, így a hidegsokk androgenezisre gyakorolt hatása genotípusonként eltér. Lazar és mtsai (1985) szoros összefüggést találtak a mikrspóra eredetű struktúrák képződésének gyakorisága és a hidegkezelés intenzitása, valamint annak tartama között. Mások rövid ideig tartó (2 nap, 4 °C) hidegsokk alkalmazásával (Ball és mtsai, 1993), vagy éppen hidegsokk nélkül (Orshinsky és Sadasivaiah, 1985) indukálták a búza androgenezisét. Míg a szükséges hidegsokk intenzitása és hossza a búzánál genotípus függő, addig a kukoricánál általánosan alkalmazott a bugák illetve címerek 7-8 °C-os kezelése (Coumans és mtsai, 1989; Petolino és Jones, 1986; Pescitelli és mtsai, 1990).

#### **2.2.2.1.4. A mikrspórák fejlődési állapota**

A portok indukció sikerességének feltétele az androgenetikus útra terelhető, megfelelő fejlődési stádiumú mikrspóra populációval bíró portokok izolálása. A búza esetén a közép- és kései egy sejtmagvas fejlődési állapotú (Mejza és mtsai, 1993; Hu és Kasha, 1999; Liu és mtsai, 2002), a kukoricánál a korai (Barnabás és mtsai, 1987) és kései egy sejtmagvas (Coumans és mtsai, 1989; Mitchell és Petolino, 1991; Gaillard és mtsai, 1991; Pena-Valdivia és mtsai, 1999) mikrspórákat tartalmazó portokokat tartják legalkalmasabbnak az

izolálásra.

A portokkultúrákban növények két úton át differenciálódhatnak: direkt androgenézissel, mely során a mikrospórákból embrioidok fejlődnek, és indirekt módon kallogenézist követő organogenezissel. Megfigyelések szerint az embrioidokból haploid vagy spontán dihaploid növények fejlődnek, míg a kalluszból haploidok, dihaploidok, aneu-, poli- és mixoploidok. A differenciálódási utak szoros összefüggésben állnak a portoktenyésztés korai fázisában végbemenő első osztódással. Az osztódási utaknak két alaptípusát különböztetjük meg annak megfelelően, hogy az egymagvas mikrospóra egyenlő vagy egyenlőtlen úton osztódik (Sunderland és Dunwell, 1977). Az aszimmetrikus osztódás során (A út) vegetatív és generatív sejt jön létre, de csupán a vegetatív sejt folytatja az osztódást (Sunderland és Wicks, 1971). A szimmetrikus osztódáskor (B út) azonos értékű utódsejtek keletkeznek. A Sunderland és Dunwell (1974) által leírt C út során az első aszimmetrikus osztódást követően az utód sejtmagvak fuzionálnak. A D út első osztódási formája egyenlőtlen, de a generatív sejtmag osztódik tovább, a vegetatív sejtmag pedig eliminálódik (Raghavan, 1978).

A kukorica mikrospórák első osztódási típusa nagyrészt aszimmetrikus és az androgenetikus fejlődési útra lépett mikrospórákból zömmel kalluszok képződnek (Barnabás és mtsai, 1987; 1999). A kukorica korai indukciós fázisában kialakult mikrospóra eredetű struktúrák morfológiai bélyegeinek és regenerációs képességének összefüggését ez idáig nem vizsgálták. A szakirodalom ugyan említi búza mikrospóra eredetű eltérő embriogenetikus képességű kalluszvonalak morfológiai különbségeit, de azokat hosszú ideig (4-10 hét) tartó indukciós fázist követően írták le (Brisibe és mtsai, 2000). A szerzők megállapították, hogy az egyes morfotípusok (sárga poliembrioidok, sárga kompakt kallusz, sárgásfehér törékeny kallusz) gyakorisága nem függött az alkalmazott táptalajok összetételétől. A típusok regenerációs képessége

között szignifikáns különbség volt a sárgásfehér törékeny kallusz javára. A kukorica embrió eredetű kalluszvonalak regenerációs képességét vizsgálva Armstrong és Green (1985) I, II. és NE (nem embriogén) kallusztípust különböztetett meg. A fehér kompakt I típust a magas regenerációs képességű halványsárga törékeny II típust megelőző formaként írja le. A II típus kalluszosító táptalajról regenerációs táptalajra oltva nagy számú regeneránsot eredményezett.

A direkt embriogenezis első lépése a mikrospóra szimmetrikus osztódása, mely a búzára leginkább jellemző osztódási forma (Szakács és Barnabás, 1988).

#### **2.2.3.1.5. A portoktenyésztés körülményei**

Az egyes genotípusok válaszó képessége közti különbség a tenyésztési körülmények, elsősorban a táptalaj összetételének optimalizálásával csökkenthető. Nagyon fontos tényező az indukciós táptalajról való továbboltás ideje és módja, mely nagymértékben befolyásolja a majdani regeneránsok számát és ploiditását. Kovács és munkatársai (1992) megfigyelték, hogy a kukorica portokokban az indukciós fázis korai szakaszában lényegesen nagyobb volt a soksejtmagvas pollenek gyakorisága, mint ahány embriogén struktúra kitüremkedett az antérákól az indukciós időszak végén. Következtetésük szerint ennek az volt az oka, hogy a fejlődő embrioidok nem voltak képesek felszakítani a portok falát, illetve a portok indukció kései szakaszában pusztulni kezdő antérafalban termelődtek olyan anyagok, melyek toxikusak lehetnek a fejlődő embriók számára. Redha és munkatársai (2000) megállapították, hogy az 5 hetes indukciós fázis lerövidítésével csökkent ugyan a mikrospóra eredetű struktúrák száma, de azok regenerációs képességében jelentős növekedés állt be. Számos közlemény számolt be arról, hogy a portokok korának és a belőlük fejlődő struktúrák indukciós táptalajon eltöltött idejének előrehaladtával

megszaporodott a haploidtól eltérő kromoszóma készletű és az euploidtól eltérő kromoszóma számú struktúrák száma (Raghavan, 1997).

#### **2.2.3.1.6. Az alkalmazott táptalajok hatása**

A növényi szövettenyésztésben alkalmazott táptalajok összetevői a makro- és mikroelemek, a szerves nitrogén és szénforrások, a vitaminok, hormonok és egyéb természetes kiegészítők. Számos különböző makro- és mikroelem összetételű táptalaj került kidolgozásra a portokkultúrák alkalmazásának 40 éve alatt. A kukoricánál az N6 (Miao és mtsai, 1978; Brettel és mtsai, 1981; Nitsch és mtsai, 1982;), az YP (Ku és mtsai, 1978; Nitsch és mtsai, 1982; Genovesi és Collins, 1982; Pauk, 1985; Petolino és Jones, 1986; Dieu és Beckert, 1986), a Zheng 14 (Ting és mtsai, 1981; Dieu és Beckert 1986) táptalajokat és változataikat alkalmazzák. A búza portokkultúráiban alkalmazott táptalajok a burgonya kivonatot tartalmazó P2 (Chuyang és mtsai, 1978) és változatai, a 190-2 (He és Ouyang, 1983), és a teljesen szintetikus összetételű W<sub>14</sub> (Ouyang és mtsai, 1989).

A szerves nitrogénforrások fontos alkotói a portokkultúrák indukciós táptalajainak. A leggyakrabban alkalmazottak a laktalbumin hidrolizátum (Ku és mtsai, 1978) a kazein hidrolizátum (Miao és mtsai, 1978), az aminosavak közül az L-aszparagin, a prolin és a glicin (Olsen, 1987).

A portokkultúrák nélkülözhetetlen alkotórészei a szénforrás és ozmoregulátor szerepet egyaránt betöltő cukrok (Sopory, 1979). A szacharóz mindezen szerepeken túl a mikrospórák embriogén fejlődésében is aktív szerepet játszik (Hamaoka és mtsai, 1991). A portoktenyészetekben a szacharóz mellett mono- és egyéb oligoszacharidokat is alkalmaznak. Búza portokkultúrában Chu és munkatársai (1990) szacharóz helyett glükóz alkalmazásával értek el nagy arányú haploid indukciót és növényregenerációt. A

maltóz pollen embriogenezisre gyakorolt előnyös hatását Last és Brettel (1990) és Orschinsky és mtsai (1990) írták le. A kukorica portokkultúráiban legáltalánosabban a szacharózt alkalmazzák változó koncentrációban: 6% (Nitsch és mtsai, 1982), 9% Tsay, és mtsai, 1986), 12% (Ku és mtsai, 1978) és 15% (Ting és mtsai, 1981). A legnagyobb indukciós arány a 12% szacharóz tartalmú táptalajok esetén volt megfigyelhető (Miao, 1978; Dieu és Beckert, 1986). A búza portokkultúrában a legjobb indukciós és zöldnövény regenerációs gyakoriság a 10% szacharóz tartalmú W<sub>14</sub> szintetikus táptalajjal érhető el.

A kukorica és búza portokkultúrákban leggyakrabban használt vitaminok a tiamin (B<sub>1</sub>), a nikotinsav-amid (B<sub>3</sub>), a piridoxin (B<sub>6</sub>), és a vitaminszerű hatással bíró gyűrűs polialkohol a mio-inozitol.

A kétszikű növények pollen indukciójának kiváltásához nem feltétlenül szükséges külső hormonpótlás, azt sokkal inkább környezeti stressz, az alkalmazott előkezelés váltja ki (Touraev és Heberle-Bors, 1999). Ezzel szemben a gabonafélék portokkultúráiban általánosan alkalmaznak szintetikus auxinokat és citokinineket a környezeti stressz által kiváltott embriogenezis megerősítésére. Ezen hormonok indukcióban betöltött pontos szerepe mindmáig ismeretlen. A kukorica indukciós táptalajokban a 2,3,5-TIBA antiauxint, a búza indukciós táptalajokban a 2,4-D szintetikus auxint és kinetin szintetikus citokinint alkalmazzák a legelterjedtebben.

A kukorica portokkultúrák agarral szilárdított táptalajainak nélkülözhetetlen összetevője az aktív szén, mely megkötí az autoklávozást követően és a tenyésztés során a táptalajban megjelenő toxikus vegyületeket, valamint az öregedő portokfalból felszabaduló polifenolokat és etilént (Weatherhead és mtsai, 1978; Johansson, 1983). Alkalmazásának hátránya, hogy egyéb táptalajalkotókat is adszorbeál, így azok növények általi felvételét időlegesen, vagy teljes mértékben megakadályozza (Van Winkle és mtsai, 2003).

A természetes táptalaj kiegészítők nem esszenciális feltételei a szövetek

növekedésének, hanem olyan adalékanyagok, melyek a növekedés és fejlődés intenzitására és időtartamára hatnak (Maróti, 1976). Önmagukban vagy az egyéb táptalaj összetevőkkel kölcsönhatásban növelik a táptalajok hatékonyságát. A természetes táptalaj kiegészítőket a szövettényezetekben hormonszerű hatásuk miatt alkalmazzák. Ilyen anyagok az élesztő és malátakivonat, a kazein hidrolizátum, a laktalbumin hidrolizátum, a paradicsomlé és gyümölcsök kivonatai. A szintetikus táptalajok kiegészítésére szolgál egyes termések folyékony vagy szilárd endospermiuma (kókusztej, mandula), a vadgesztenye a kukorica, az éretlen dió terméskivonata, a banán fiatal terméshalának perikarpiuma, a burgonyagumó forró vizes extraktuma és az egyes gabonafajok keményítői. A két leggyakrabban alkalmazott természetes táptalaj kiegészítő a kókusztej és a burgonyagumó kivonat. A kókusztejet alkalmazzák a legrégebben, elsősorban a sejtosztódásra és embriófejlődésre gyakorolt pozitív hatása miatt (van Overbeek és mtsai, 1941), bár a mai napig sem azonosították a benne található valamennyi vegyületet. A kókusztejnek a kukorica *in vitro* portokválaszára gyakorolt pozitív hatásáról Kovács és munkatársai (1992) számoltak be. A burgonya kivonatos táptalajt és változatait elterjedten alkalmazzák a gabonafélék, elsősorban a búza portokkultúráiban (Chuyang és mtsai, 1978; Schaeffer és mtsai, 1979; De Buyser és Henry, 1980). Nem hagyható figyelmen kívül az a tény, hogy az esetenként változó összetételű szerves táptalaj kiegészítők eltérő hatékonyságú portok indukciót eredményezhetnek. Wenzel és Foroughi-Wehr (1984) leírta hogy a burgonya esetén a fajta, a termesztés körülményei és a burgonyagumó kora jelentősen befolyásolja a kivonat hatékonyságát. Marburger és munkatársai (1987) vizsgálták a burgonya kivonatos táptalaj búza androgenezisre gyakorolt hatását és megállapították, hogy a hámozott burgonyából készített táptalaj hatékonysága 60%-kal meghaladta a hámozatlan gumóból készültét. Ennek okaként a héjban felhalmozó, a pollen embriogenezist gátló polifenolokat

említik. A burgonya kivonat búza androgenetikus indukciójára gyakorolt hatását részben, de nem teljes mértékben helyettesítheti a szintetikus glutamin (De Buyser és Henry, 1986), mio-inozitol (Xu és Sunderland, 1981) és prolin (Sozinov és mtsai, 1981; Nitsch és mtsai, 1982). A fenti tények indokolják, hogy a szövettenyészetekben kizárólag olyan szerves kiegészítők kerüljenek alkalmazásra, melyek összetételének azonos volta biztosítható. Ez az adalékanyagot szolgáltató meghatározott genotípus kontrollált, reprodukálható körülmények közötti termesztésével érhető el.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. A mikroalga és cianobaktérium törzsek hormonvizsgálata

##### 3.1.1. A mikroalga és cianobaktérium törzsek felszaporítása

A Mosonmagyaróvári Algagyűjteményben (MACC) fenntartott 900 cianobaktérium és mikroalga törzs közül kísérleteink céljára 252 törzset választottunk ki az átlagosan 14 nap alatti  $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ -t meghaladó szárazanyag produktójuk alapján.

A szilárd táptalajon fenntartott törzseket tápfolyadékba oltottuk, majd a laboratóriumi algatesztek céljára kidolgozott berendezésben (Ördög, 1981) fotoautotróf körülmények között felszaporítottuk (2. ábra). A 6-8 napig tartó felszaporítás után meghatároztuk a tenyészetek szárazanyag tartalmát, majd azokat  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrációban továbboltva  $25\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ -on  $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fényintenzitású alsó megvilágítás és 12:12 órás sötét/fény periódus mellett tenyésztettük. A csíramentes vattadugóval lezárt tenyészeteken óránként 25 l levegőt juttattunk át, melyet a fényszakaszban 1,5%  $\text{CO}_2$ -vel egészítettünk ki. A kultúrákat naponta kétszer kevertük.



2. ábra Algatermesztő berendezés a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának Növényélettan és Növényi Biotechnológia Tanszékén.



A betakarítás a törzsek szaporodásának kései lineáris - korai stacionáris fázisában történt 15 perces centrifugálással (Sigma 6K15, Osterode am Harz, Germany) 3500 fordulatszámon délután 3 órakor. A felülúszó mentes biomasszát 22 órán át 0,035 mbar nyomáson kíméletesen hűtve szárítottuk (ChristGamma I-20, Osterode am Harz, Germany), majd dörzsmozsárban porítottuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A kísérletek előtt a mélyhűtött mintákat desztillált vízben szuszpendáltuk ( $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), majd 90 másodperces ultrahangos kezelést követően (VirSonic 600, VirTis company, Gardiner, NY, USA) a biotesztekben alkalmazva desztillált vízzel, a haploid indukciós és növényregenerációs kísérleteinkben az aktuális, meghatározott összetételű tápfolyadékmal  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  algatartalomra hígítottuk.

### 3.1.2. A citokinin- és auxinszerű hatás igazolása biotesztek segítségével

Vizsgálataink során a cianobaktérium és mikroalga törzsek citokinin- és auxinszerű hatásának kimutatására az uborka és retek sziklevel növekedési (Latham, 1971; Zhao és mtsai, 1992) és az uborka sziklevel gyökeresedési tesztet (Zhao és mtsai, 1992) alkalmaztuk.

A citokinin- és auxinszerű hatás vizsgálata során tesztnövényként salátauborka (*Cucumis sativus* L. cv. Smaragd F1) és retek (*Raphanus sativus* cv. Jégcsap) szolgált. Annak érdekében, hogy a magvak esetleges méretbeli eltérése ne fedje el a kezelések hatását, azokat méretük alapján osztályoztuk. Az uborka magvakat  $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  agarral szilárdított Knop táptalajon (Knop, 1865), a retek magvakat desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírok között sötétben,  $25\pm 2$  °C-on 5, illetve 3 napig csíráztattuk. A vizsgálni kívánt desztillált vizes alga szuszpenziókat ( $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), illetve a kalibrációs sort alkotó eltérő koncentrációjú KIN és indol-3-vajsav (IVS) desztillált vizes oldatait (0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 10  $\text{mg l}^{-1}$ ) 6 cm átmérőjű Petri csészékbe helyezett szűrőpapírra rétegeztük (3 ml).

Kontrollként a szuszpendálásnál és oldásnál használt desztillált víz szolgált.

A citokininszerű hatás kimutatására alkalmazott uborka és retek sziklevel növekedési tesztben 10 db sziklevelet helyeztünk a Petri csészékbe. A sziklevelek izolálása zöld fényű megvilágítás mellett történt, ezzel kivédtük a proplasztiszok érésének indukcióját, mely megghiúsította volna a citokininszerű hatás igazolásának pontosságát. A szikleveleket 3 napig sötétben,  $25\pm 2$  °C-on inkubáltuk, majd ezt követően mértük a sziklevelek friss tömegét.

Az auxinszerű hatás kimutatására alkalmazott uborka sziklevel gyökeresedési tesztben 10 db, a szik alatti 1 mm-es szárrészt hordozó sziklevelet Petri csészékbe helyeztünk zöld fényű megvilágítás mellett. A szikleveleket 5 napig sötétben,  $25\pm 2$  °C-on inkubáltuk, amit a képződött gyökérszám felvételezése követett.

A bioteszteket 4 ismétlésben, 3 alkalommal végeztük el. A kapott értékeket összehasonlítottuk a desztillált vizes kontroll és a kalibrációs sor eredményeivel, majd elvégeztük az eredmények statisztikai értékelését.

Elővizsgálataink során a hormonszerű hatás kimutatására igyekeztünk más biotesztet is adaptálni. A citokininszerű hatás vizsgálatára a szója szikalatti szárrész növekedési, és az *Amaranthus* sötét betacianin felhalmozódási bioteszt, az auxinszerű hatás igazolására a mungó bab járulékos gyökeresedési bioteszt alkalmazhatóságát vizsgáltuk. Az utóbbi tesztekkel kapott értékek magas szórásértékei, illetve statisztikailag értékelhetetlen volta miatt azokat vizsgálatainkból kizártuk.

### 3.1.3. Az indol-3-ecetsav kimutatása

A liofilizált algamintákban található IES gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) meghatározása a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht. Analitikai laboratóriumában történt. A hűtve szárított algamintából

100 mg mennyiséget 2 ml metanol/víz eleggyel (80/20, v/v) extraháltunk, amely antioxidánsként 2,6-*diterc*-butil-4-metilfenolt tartalmazott ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Az extrakciót 5 ml térfogatú polipropilén centrifugacsőben UltraTurrax T25 homogenizátor segítségével 13 500 fordulatszámon, 4 °C hőmérsékleten, 5 percig végeztük. Az extrakciót követően a kivonatokat 15 percig centrifugáltuk (5000 g).

Az extraktumból 100 µl mennyiséget centrifugális bepárlóval (Jouan RC 10.22) bepároltunk, 100 µl N,O-*bisz*-trimetilszilil-acetamid (BSA)/trimetilszililimidazol (TMSI)/trimetil-klórszilán (TMCS) (3/3/2, v/v) szililező eleggyel származékképeztük és a származékképzett mintákat GC-MS módszerrel analizáltuk. A mennyiségi kiértékelést hatpontos külső standard kalibráció alapján, az IES extrahált ion kromatogramját felhasználva végeztük.

A gázkromatográfiás (GC) mérési körülmények a következők voltak: az alkalmazott gázkromatográf típusa HP 5890 Series II (Hewlett-Packard), a kapilláris oszlop RH-5ms+, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Chromatix Separation Sciences) volt. Split típusú, elektronikus nyomásszabályzású (split arány 1/50) injektort alkalmaztunk, az injektált térfogat: 0,5 µl volt. Az állandó áramlási sebességű (15 psi, 180 °C hőmérsékleten) vivőgázként hélium szolgált. Termosztát-fűtésprogram: 180 °C-tól 290 °C-ig  $10 \text{ °C min}^{-1}$  fűtési sebességgel. A GC-MS „interface” hőmérséklete: 290 °C volt.

A tömegspektrometriás (MS) mérési körülmények a következők voltak: tömegspektrométer típusa: HP 5989B MS Engine (Hewlett-Packard), ionforrás: elektronütköztetési (EI, 70 eV, 240 °C). Analizátor: quadropól (100 °C), üzemmód: szelektív ion figyelés (SIM), figyelt ionok: m/z 202, 319, detektor: elektronsokszorozó, feszültség: 1252 V.

#### 3.1.4. A citokininek kimutatása

A 3.1.3. fejezetben leírt módon előállított extraktumokból folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriás (HPLC-MS) módszerrel végeztük a citokininek meghatározását. A mennyiségi kiértékelést nyolcpontos külső standard kalibráció alapján, az egyes komponensek extrahált ion kromatogramjait felhasználva végeztük.

A folyadékkromatográfiás mérési körülmények a következők voltak: Agilent 1100 folyadékkromatográf bináris pumpával (magasnyomású gradiens keverés), fűthető oszloptermosztáttal és  $\mu$ WPS automata mintaadagolóval kiegészítve. A következő folyadékkromatográfiás oldószereket alkalmaztuk: A: víz + 0,1% (v/v) hangyasav; B: acetonitril + 0,1% (v/v) hangyasav. Az oldószer gradiens: 0 perc 10% B, 9 perc 28% B, 12 perc 100% B, 16 perc 100% B, 18 perc 10% B volt. A HPLC oszlop 250 x 3 mm, Zorbax SB C8 5  $\mu$ m-es töltetű, az előtét oszlop: 20 x 2 mm, Merck, Lichrospher RP-Select B 12  $\mu$ m-es töltetű volt. Az oszloptermosztát hőmérséklete 40 °C, az oldószer áramlási sebesség 0,5 ml·min<sup>-1</sup>, az injektált minta térfogata 2,5  $\mu$ l volt.

A tömegspektrometriás mérési körülmények a következők voltak: tömegspektrométer típusa: Agilent 1100 LC/MSD Trap SL, ionforrás: elektroporlasztásos (API-ES). Az ionforrás üzemmódja pozitív ion ES, az ioncsapdás analizátor üzemmódja teljes pásztázó (50-800 m/z) az elektronsokszorozó detektor feszültsége 1320 V volt. A nitrogén szárítógáz sebessége 8 l·perc<sup>-1</sup>, hőmérséklete 350 °C, a nitrogén porlasztógáz nyomása 280 kPa volt.

### 3.1.5. A hormonhatású és tartalmú MACC törzsek vizsgálata kallusztenyészetekben

A kallusztenyészetekben a MACC 642 (*Leptolyngbya sp.*), 643 (*Anabaena sp.*) cianobaktérium és az 553 (*Klebsormidium flaccidum*), 560 (*Chlorella sp.*) és 583 (*Neochloris sp.*) mikroalga törzsek osztódásra, ezen keresztül tömeggyarapodásra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Mivel az MACC 355 (*Chlorosarcina sp.*), 531 (*Chlamydomonas sp.*) és 400 (*Chlorella sp.*) törzsek hatására bekövetkezett uborka szikleveél gyökeresedés az egyes ismétlések során nagy varianciát mutatott, ezért biomassájukat nem alkalmaztuk az *in vitro* szövettenyészetekben.

Dohány (*Nicotinia tabacum*) bélszövet eredetű kalluszokat helyeztünk  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  alga biomasszával kiegészített MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajra. Kontrollként az  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kinetint és  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  1-naftil-ecetsavat (NES) tartalmazó MS táptalajt szolgált.

A haploid kukorica (*Zea mays* L.) kalluszt  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  alga biomasszával kiegészített módosított BM (Chu és mtsai, 1990) táptalajra oltottuk. Kontrollként a  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D-t tartalmazó kukorica kallusz szaporító BM táptalajt alkalmaztuk.

A tenyészeteket 16 órás  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  intenzitású megvilágítás mellett  $26^\circ\text{C}$ -on 3 hétig inkubáltuk. A szaporodási ciklus végén megmértük a kalluszok friss tömegét. A vizsgálatot három alkalommal, 4 ismétlésben végeztük el.

## 3.2. In vitro portoktenyészetek

### 3.2.1. Az *in vitro* portoktenyészetekben alkalmazott MACC törzsek

A kukorica és búza portoktenyészetekben az MACC 553 (*Klebsormidium*

*flaccidum*), 560 (*Chlorella sp.*), 583 (*Neochloris sp.*) mikroalga és a 642 (*Leptolyngbya sp.*), 643 (*Anabaena sp.*) cianobaktérium törzsek biomasszájának androgenetikus indukcióra és a mikrospóra eredetű struktúrák regenerációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A búza portokkultúrákban a hormonszerű hatás biotesztekkel történő kimutatásának korai fázisában az MACC 531 (*Chlamydomonas sp.*), 534 (*Coenochloris sp.*), és 657 (*Scenedesmus incrassulatus* Bohl.) törzsek hatását is megvizsgáltuk.

### 3.2.2. Az *in vitro* portoktenyészetekben alkalmazott genotípusok

Kukorica portok donorként egyrészt a korábban kínai alapanyagokból portokkultúra segítségével előállított dihaploid vonalak keresztezéséből származó

H1: DH 240 × DH 314 és

H2: DH 109 × DH 314

hibrideket használtunk, melyek jó androgenetikus válaszadó képességgel rendelkeztek, másrészt egy válaszadó kínai dihaploid és egy elit beltenyésztett vonal SC hibridjét, a

H3: DH 105 × HMv 5405-öt alkalmaztuk.

Búza donorként egy köztermesztésben levő francia nemesítésű magas androgenetikus indukciós képességű búzafajta a Benoist, és a közepes androgenetikus indukciót mutató, az egyik legmegbízhatóbb termőképességű magyar malmi búzafajta az Mv Pálma szolgált.

### 3.2.3. A donor növények felnevelési körülményei

Donor növényeket fitotronban és szántóföldön is neveltünk. A 10 l-es tenyészedényekbe ültetett kukorica növények fitotroni nevelésére a Nyár 2

(Ny2) klímaprogramot alkalmaztuk. A program szerint a 7 hetes felnevelési időszak alatt a nappali maximum hőmérséklet 19 °C-ról 24 °C-ra, az éjszakai minimum hőmérséklet 15 °C-ról 20 °C-ra emelkedett. A relatív páratartalom változására is napi ciklusosság volt jellemző, mely a maximális hőmérséklet esetén 64%, a minimális hőmérséklet esetén 76% volt. A 350 µmol·m<sup>-2</sup>·s intenzitású megvilágítás időtartama az első három héten 16 óra, az ezt követő időszakban 15,5 óra volt (Tischner és mtsai, 1997). A búza donor növényeket a 8 hetes vernalizációt követően 2 l-es tenyészedényekbe ültettük és a T2 klímaprogrammal 8 – 9 hét alatt neveltük fel (Tischner és mtsai, 1997). A felnevelési időszak alatt a nappali maximum hőmérséklet 12 °C-ról 18 °C-ra, az éjszakai minimum hőmérséklet 10 °C-ról 14 °C-ra emelkedett. A nappali minimális relatív páratartalom a felnevelési időszak első felében 68%, második felében 64%, az éjszakai maximális páratartalom 76% volt. A megvilágítás intenzitása a felnevelés kezdetétől a végéig 200 µmol·m<sup>-2</sup>·s-ról 350 µmol·m<sup>-2</sup>·s-ra emelkedett. (Tischner és mtsai, 1997). A kukorica és búza növények öntözése 22°C-os ioncserélt vízzel történt, a növénynevelés során pótlólagos tápoldatozást nem alkalmaztunk.

#### 3.2.4. Előkezelések

A kukorica esetén a fiatal címereket a borító levéllel együtt eltávolítottuk a donor növényről, majd kármin-ecetsavas festéssel mikroszkópi úton ellenőriztük a portokokban fejlődő mikrospórák fejlődési állapotát. Megfigyeléseink szerint ebben a címerfejlettségi stádiumban a mikrospórák többsége középső és kései egysejtmagvas állapotú (3. ábra). A címereket alufóliába csomagoltuk és 10 napig 7 °C-os kezelésnek vetettük alá. Az előkezelés alatt a mikrospórák zöme eljutott a kései egymagvas (premitotikus), korai kétmagvas (posztmitotikus) állapotig, amit szintén kármin-ecetsavas



3. ábra Kései egymagvas fejlődési stádiumú kukorica (A) és búza (B) mikrospóra.

festéssel ellenőriztünk. Mivel a címeren belül is eltér a mikrospórák fejlettségi állapota, ezért a felszíni csíramentesítést megelőzően eltávolítottuk a címer oldalágainak és a fő címerág alsó és felső részét.

A búzánál a korábbi vizsgálatok eredményei alapján nem alkalmaztunk előkezelést. Az előkezeletlen fiatal kalászokat kibontottuk a zászlóslevelek takarásából. A mikroszkópos vizsgálattal ellenőrzött kései egy sejtmagvas fejlődési állapotú mikrospórákat (3. ábra) tartalmazó kalászokat előkészítettük az izolálásra.

A címerágak és kalászok felszínét 2%-os (v/v) nátrium-hipoklorit oldattal csíramentesítettük, majd négyszeri steril desztillált vizes öblítést követően a virágokból kiemelt portokokat aseptikus körülmények között lamináris boxban indukciós táptalajra helyeztük.

### 3.2.5. Indukciós táptalajok és tenyésztési feltételek

A kukorica portokkultúrában vizsgálni kívánt MACC 642, 643 cianobaktérium és az MACC 553, 560 és 583 mikroalga törzsek androgenetikus választ befolyásoló hatásának vizsgálatára alkalmas optimális táptalaj



kiválasztása érdekében 4 különböző táptalajt vizsgáltunk. Az alkalmazott táptalajok:

0,1 mg·l<sup>-1</sup> 2,3,5-TIBA-t tartalmazó, 6 g·l<sup>-1</sup> agarral szilárdított Genovesi és Collins (1982) által módosított YP, a későbbiekben **A** táptalaj,

0,1 mg·l<sup>-1</sup> 2,3,5-TIBA tartalmú Dieu és Beckert (1987) által módosított YP (**B<sub>1</sub>**), annak

2 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D (**B<sub>2</sub>**), illetve

1 mg·l<sup>-1</sup> KIN és 0,5 mg·l<sup>-1</sup> NES (**B<sub>3</sub>**) tartalmú változata (1.táblázat).

Az algatörzsek portok indukcióra és regenerációra gyakorolt hatásának vizsgálatára a **B<sub>2</sub>** táptalajt használtuk. Kontrollként változatlan összetételben, az algatörzsek hormonhatásának vizsgálatát célzó kezelésekből egyrészt 50% hormontartalommal és 1 g·l<sup>-1</sup> alga szárazanyag kiegészítéssel, másrészt hormonmentesen 2 g·l<sup>-1</sup> alga szárazanyaggal kiegészítve alkalmaztuk.

A búza esetén indukciós kontroll táptalajaként a  $W_{14}$  (Ouyang és mtsai 1989) táptalajt használtuk (1. táblázat). Az MACC 642, 643 cianobaktérium és 355, 531, 400, 553, 560, és 583 mikroalga törzsek androgenezisre és növényregenerációra gyakorolt hatásának vizsgálatánál a  $W_{14}$  táptalaj 50%-os hormontartalmú és hormonmentes változatait használtuk az MACC törzsek 1 és 2 g·l<sup>-1</sup> szárazanyagával kiegészítve.

Kezelésenként 150 portokot izoláltunk 9 cm átmérőjű Petri csészékben szilárdított 25 ml táptalaj felszínére genotípusonként 8 ismétlésben, 2 alkalommal, szántóföldi és fitotroni nevelésű donor növényeket egyaránt alkalmazva.

A portokokat 3 - 4 héten át 29±1 °C-on, 90% relatív páratartalom mellett sötétben inkubáltuk, majd a kialakult mikospóra eredetű struktúrákat regenerációs táptalajra oltottuk. Az összehasonlítás alapjául az indukálódott portokok, a mikospóra eredetű struktúrák és a regeneránsok száma szolgált a

leoltott portokok %-os arányában.

### 3.2.6. Regenerációs táptalajok és tenyésztési feltételek

A kukorica növények regenerálására kontrollként az  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kinetinnel és  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  NES-sel kiegészített, módosított N6 (Chu, 1978) táptalajt használtunk (1. táblázat). Az alga biomassa regenerációra kifejtett hatásának vizsgálatára annak módosított, 50%-os hormontartalmú és hormonmentes változata szolgált. Az 50% hormontartalmú táptalajt  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , a hormonmentes táptalajt  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  cianobaktérium vagy mikroalga szárazanyaggal egészítettük ki. A növényregeneráció  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ -on,  $16 \text{ óras } 80 \text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ -intenzitású megvilágítás mellett történt. A differenciálódott  $2\text{--}3 \text{ cm}$ -es növényeket  $14\text{--}21$  nap elteltével  $50 \text{ ml } 2\%$  szacharózzal kiegészített vitamin és hormonmentes N6 táptalajt tartalmazó  $3 \text{ dl}$ -es üvegbe oltottuk át. A vitrifikáció elkerülése, tehát a kutikula viaszosodásának elősegítése céljából biztosítottuk a fejlődő növények steril szűrőn keresztüli levegőztetését. A regeneránsokat az átültetéssel járó stressz mérséklése érdekében  $10$  napig átlátszó, vékony plasztik fóliával lezárt tálcákban edzettük, majd áramlási citométerrel mértük a regeneránsok ploiditását. A spontán dihaploid növényeket  $10 \text{ l}$ -es műanyag tenyészedenyekbe ültettük és teljes éréig klímakamrában neveltük.

A búza növényregeneráció céljából az indukálódott struktúrákat  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kinetin és  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  NES tartalmú 190-2 (He és Ouyang, 1983) kontroll táptalajra, illetve annak 50%-os hormontartalmú,  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  cianobaktérium vagy mikroalga szárazanyagot tartalmazó és hormonmentes,  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  biomasszával kiegészített változatára oltottuk át (1. táblázat). A  $4$  hetes, a kukoricával azonos hőmérsékleti és megvilágítási feltételek között végbemenő regenerációs fázist követően a növényeket  $2,5 \text{ cm}$  átmérőjű tőzgehengerbe ültettük. A  $10$  napos

1. táblázat A kukorica és búza portokkultúra során alkalmazott táptalajok összetétele.

Táptalaj összetevő	Kukorica			Búza	
	indukció		regeneráció	indukció	regeneráció
	mg·l <sup>-1</sup>				
	A	B1	N6	W14	190-2
<i>Makroelemek</i>					
KNO <sub>3</sub>	2500	2500	2830	2000	1000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165	165	–	–	–
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	176	176	166	140	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	510	510	400	–	300
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	370	185	200	200
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	463	–	200
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	–	380	–
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	–	700	–
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	100
KCl	–	–	–	–	40
<i>Mikroelemek</i>					
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6	2	1,5	3	3
KI	0,83	0,75	–	0,5	0,5
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	10	4,4	8	8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3	1,6	3	3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	–
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	–
CoCl <sub>2</sub> · 6HH <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	–
<i>Vasforrás</i>					
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
<i>Vitaminok</i>					
Thiamin HCl	0,5	0,25	0,1	2	1
Nikotinsav	–	1,3	0,5	0,05	0,5
Piridoxin HCl	–	0,25	0,5	0,05	0,5
Ca-panthotenát	–	2,5	–	–	–
Mio-inozit	100	–	–	–	100

Táptalaj összetevő	Kukorica			Búza	
	indukció		regeneráció	indukció	regeneráció
	mg·l <sup>-1</sup>				
	A	B1	N6	W14	190-2
<i>Hormonok</i>					
2,4,5-TIBA	0,1	0,1	–	–	–
2,4-D	–	–	–	2	–
Kinetin	–	–	1	0,5	0,5
NAA	–	–	0,5	–	0,5
<i>Egyéb összetevők</i>					
L-aszparagin	150	–	–	–	–
Glicin	–	7,7	2	2	2
Kazein hidrolizátum	500	500	–	–	–
Szacharóz	120000	120000	40000	100000	30000
Gelrite	2000	2000	–	–	–
Agar	–	–	6000	6000	6000
Aktív szén	5000	5000	–	–	–
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	6

edzést követően meghatároztuk a növényképek ploiditását. A dihaploid növényeket 4 héten keresztül jarovizáltuk és a megerősödött növényeket 2 l-es tenyészedényekbe ültettük, majd teljes érésig klímakamrában neveltük. Az izolált kalászok öntermékenyülését követően értékeltük a regeneránsok fertilitását és az ezt követő generációnál az előállított DH törzsek terméslemeit.

### 3.2.7. A mikrspóra eredetű struktúrák ploiditás és szövettani vizsgálata

A 3 hetes indukciós fázist követően a méret, szín és állag szerinti osztályozás után elvégeztük a kifejlődött struktúrák áramlási citométeres (Beckton-Dickinson FACScan) ploiditás vizsgálatát. A struktúrák feltárása pengés roncsolással NBI izoláló folyadékban (Gailbraith és mtsai, 1983) történt. A sejtmagok, illetve a DNS festésére propidium-jodid fluorokrómot (25 µg·ml<sup>-1</sup>) alkalmaztunk, melynek beépülési ideje 3 perc volt. Az áramlási citométer

fényforrása 488 nm-es argon lézer, az alkalmazott optikai szűrő 560 nm-es volt. A minták DNS tartalmára jellemző 2000 mérési esemény után az eredményeket Beckton Dickinson CellQuest programmal értékeltük ki.

A kukorica mikrospóra eredetű struktúrák szövettani vizsgálatának céljára a flow-citometriás mérésekkel párhuzamosan mintákat ágyasztunk be. A struktúrákat az indukciós fázis 3. hetében 0,1 M-os (pH 7.2) foszfát puffert és 2,5%-glutáraldehidet tartalmazó oldatba helyeztük és 24 órán keresztül 4 °C-on fixáltuk. Háromszori foszfát pufferes öblítést követően a mintákat pufferolt 1%-os ozmium-tetroxid oldatban 4 órán keresztül utófixáltuk. Háromszori öblítést követően a mintákat 25, 50, 70, 95 és 100%-os etanol sorozatban víztelenítettük, majd 3:1, 1:1 és 1:3 etanol – Spurr gyanta (Spurr, 1969) keverékkel 8 órán át szobahőn átitattuk. Az impregnálás folyamatának végén a mintákat 24 órára alkoholmentes gyantában helyeztük, majd friss gyantába átrakva 70 °C-os termosztátban 48 órán keresztül polimerizáltattuk. A struktúrákból Reichert-Jung Ultracut-E mikrotom segítségével félvékony (0,5 - 1 µm) metszeteket készítettünk. A metszeteket 0,5%-os toluidinkékkel festettük meg. A keményítő felhalmozódást jó-d - kálium-jodidos, a lipid cseppeket Sudan Black B festéssel mutattuk ki. A megfigyeléseket Olympus BX51 fénymikroszkóppal végeztük.

### **3.2.8. A regeneránsok ploiditásának meghatározása**

Mindkét növényfaj esetén a tápkockába való átültetést követően a legfiatalabb levelek 1 cm-es darabjából a sejtmagok feltárása és azok ploiditásának meghatározása az 3.2.5. pontban leírtakkal azonos módon történt.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Hormonok kimutatása mikroalga és cianobaktérium törzsekből**

#### **4.1.1. Indol-3-ecetsav (IES) kimutatása**

##### **4.1.1.1. Az auxinszerű hatás kimutatása bioteszttel**

A szaporodási ciklusuk alatt több mint  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  szárazanyagot termelő 252 MACC mikroalga és cianobaktérium törzs esetén 4 ismétlésben végeztük el az uborka sziklevel gyökeresedési biotesztet. Ennek alapján kiválasztottuk a desztillált vizes kontroll gyökérszámát  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladó törzseket. A IVS egyenértéket az aktuális IVS kalibrációs sor alapján határoztuk meg. A törzseket kontrollált körülmények között újra felszaporítottuk és a biotesztet további 2 alkalommal megismételtük.

Az 2. táblázatban összefoglalt uborka sziklevel gyökeresedési bioteszt eredményei alapján a kontroll kezelés hatására bekövetkezett gyökeresedést legalább  $p < 0,05$  valószínűségi szinten szignifikánsan meghaladó MACC 531, 400, 355, 553 és 642 törzsek esetén végeztük el az IES analitikai kimutatását.

##### **4.1.1.2. IES kimutatása GC-MS módszerrel**

A GC-MS vizsgálat során a bioteszt eredményei alapján kiválasztott valamennyi törzsben mutattunk ki IES-t (3. táblázat).

A MACC 355 törzs kivételével korreláció ( $\rho = 0,88$ ) volt megfigyelhető a biotesztek során kapott IVS egyenérték és a GC-MS mérés során mért IES mennyiség között, ami alátámasztja az uborka sziklevel gyökeresedési teszt alkalmazhatóságát az auxinszerű hatás kimutatására (3. táblázat).

2. táblázat A desztillált vizes (DV) kontrollon felvételezett gyökérszámot legalább 25%-kal meghaladó auxinszerű hatást mutató algatörzsek.

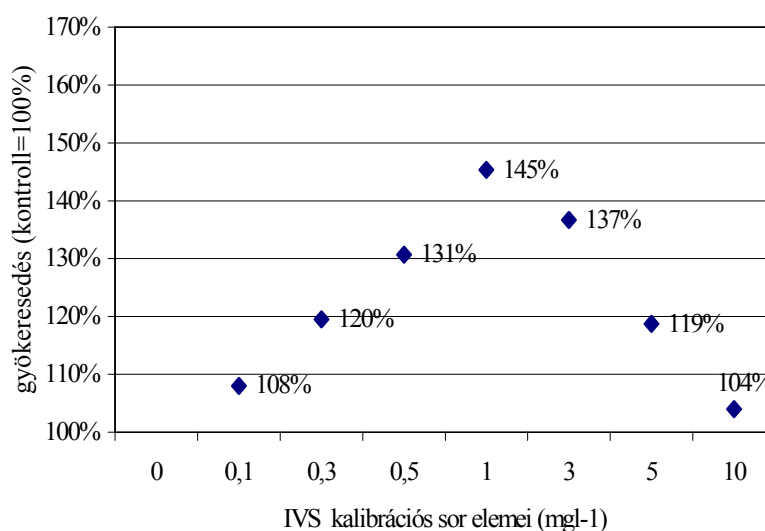
MACC törzs	Gyökérszám átlaga (db)	Auxinszerű hatás (%)	IVS egyenérték (mg·l <sup>-1</sup> )
<i>Kontroll (DV)</i>	36	100	0
359	52 ns	148±7	1,0
<b>531</b>	<b>44 **</b>	<b>142±16</b>	<b>0,3</b>
568	45 ns	141±12	0,5
<b>400</b>	<b>45 **</b>	<b>139±20</b>	<b>0,5</b>
534	43 ns	138±16	0,5
<b>642</b>	<b>48 **</b>	<b>137±7</b>	<b>0,6</b>
409	47 ns	137±4	0,5
657	45 ns	135±13	0,5
397	45 ns	135±11	0,5
<b>355</b>	<b>47 ***</b>	<b>133±15</b>	<b>0,6</b>
<b>553</b>	<b>48 **</b>	<b>132±6</b>	<b>0,5</b>
522	45 ns	132±5	0,4
411	42 ns	132±18	0,5
<b>583</b>	<b>43 *</b>	<b>131±1</b>	<b>0,3</b>
678	44 ns	130±4	0,3
421	44 ns	129±20	0,5
425	44 ns	127±7	0,4
362	41 ns	127±3	0,3

Kétmintás t próba alapján \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$  valószínűségi szinten szignifikáns, ns nem szignifikáns; DV desztillált víz

3. táblázat A biotesztekben legmagasabb auxinszerű hatást mutató algatörzsek IVS egyenértéke és GC-MS módszerrel mért IES tartalma.

Nemzetség/faj (MACC törzs)	2 g·l <sup>-1</sup> algaszuszpenzió IVS egyenértéke (mg·l <sup>-1</sup> )	IES tartalom (mg·2g <sup>-1</sup> )
<i>Chlorella</i> (355)	0,6	0,470
<i>Leptolyngbya</i> (642)	0,6	0,080
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (553)	0,5	0,036
<i>Chlorella</i> (400)	0,5	0,034
<i>Neochloris</i> (583)	0,3	0,018
<i>Chlamydomonas</i> (531)	0,3	0,018

Az MACC 355 törzs esetén a bioteszttel kimutatott IVS egyenérték és a magas mért auxin tartalom közötti nagy eltérésre magyarázatot ad, hogy az auxinok szupraoptimális koncentrációban gátolják a növények fejlődését. A biotesztek során az IVS hatásgörbéje 1 mg·l<sup>-1</sup> koncentráció felett az uborka sziklevek gyökeresedésének gátlását mutatta (4. ábra).



4. ábra Az IVS kalibrációs sor elemeinek hatása az uborka sziklevek gyökeresedésére a desztillált vizes kontroll arányában.



#### 4.1.2. Citokininek kimutatása

##### 4.1.2.1. A citokininszerű hatás kimutatása biotesztek segítségével

A 252 mikroalga és cianobaktérium törzsnél 4 ismétlésben elvégzett uborka sziklevél megnyúlási bioteszt alapján kiválasztottuk a desztillált vizes kontroll eredményeit  $p < 0,05$  szignifikancia szinten felülmúló törzseket. A törzseket kontrollált körülmények között újra felszaporítottuk és a biotesztet további 3 alkalommal megismételtük. A citokininszerű hatást az aktuális kinetin (KIN) kalibrációs sor értékei alapján határoztuk meg. Az MACC 643, 642, 553 és 560 törzsek citokininszerű hatásukban minden alkalommal  $p < 0,05$  szignifikancia szinten felülmúlták a desztillált vizes kontrollt (4. táblázat).

4. táblázat Az uborka sziklevél megnyúlási bioteszt során legnagyobb tömegnövekedést eredményező, citokininszerű hatást mutató alगतörzsek.

MACC törzs	Sziklevelek tömegének átlaga (mg)	Citokininszerű hatás (%)	KIN egyenérték ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )
<i>Kontroll (DV)</i>	254	100	0
<b>643</b>	<b>325 *</b>	<b>128±8</b>	<b>0,5-1</b>
<b>642</b>	<b>326 *</b>	<b>124±3</b>	<b>0,5</b>
<b>553</b>	<b>312 *</b>	<b>118±3</b>	<b>0,3</b>
<b>560</b>	<b>297 *</b>	<b>118±2</b>	<b>0,4</b>
493	288 ns	118±8	0,2
534	293 ns	117±10	0,3
460	284 ns	115±8	0,3
479	278 ns	114±5	0,1
472	281 *	114±8	0,2
693	274 ns	109±10	0,2

Kétmintás *t* próba alapján \*  $p < 0,05$  valószínűségi szinten szignifikáns, ns nem szignifikáns; DV desztillált víz

Az uborka sziklevel megnyúlási bioteszttel párhuzamosan alkalmaztuk a retek sziklevel megnyúlási biotesztet annak érdekében, hogy meggyőződjünk a törzsek által mutatott citokininszerű hatás univerzális voltáról. A 3 alkalommal 4 ismétlésben elvégzett kísérletben az előző bioteszt eredményeihez hasonlóan az MACC 642, 643, 560 és 553 törzs eredményezett magas, a kontrollt legalább  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladó tömegnövekményt (5. táblázat).

5. táblázat Az MACC törzsek viselkedése a retek sziklevel megnyúlási biotesztben.

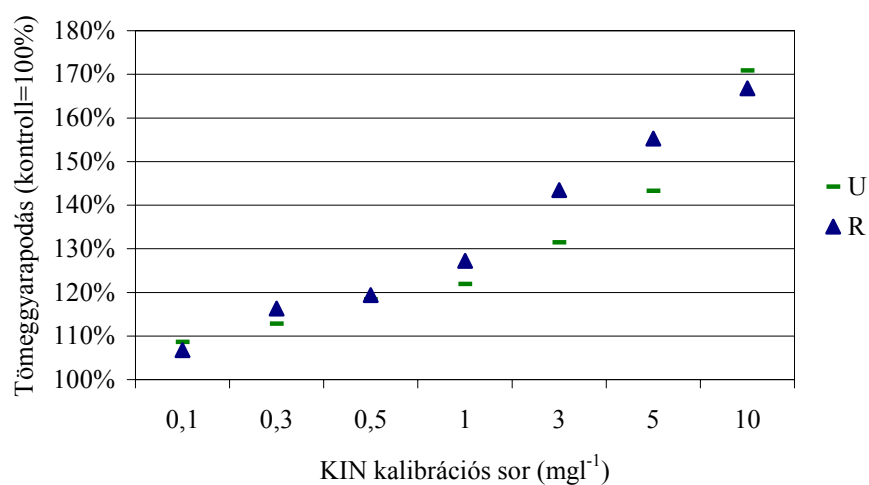
MACC törzs	Sziklevek tömegének átlaga (mg)	Citokinin szerű hatás (%)	KIN egyenérték ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
<i>kontroll</i>	93	100	0
<b>642</b>	<b>132 ***</b>	<b>137±3</b>	<b>1</b>
534	119 ns	124±11	0,5
<b>643</b>	<b>118 **</b>	<b>123±5</b>	<b>0,5</b>
460	112 *	117±9	0,3
<b>560</b>	<b>107 *</b>	<b>112±5</b>	<b>0,1</b>
693	105 ns	109±5	0
<b>553</b>	<b>106 *</b>	<b>110±5</b>	<b>0,1</b>
479	106 ns	109±14	0,1
493	99 ns	104±15	0,1
472	94 ns	98±5	0

\*\*\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,05$  \*  $p < 0,05$  valószínűségi szinten szignifikáns, ns nem szignifikáns

Míg az uborka sziklevel megnyúlási tesztben az MACC 643 törzs mutatta a legmagasabb hatást addig a retek sziklevel megnyúlási tesztben a 642 törzs váltotta ki a legnagyobb mértékű tömegnövekedést. Ez feltehetően a két növényfaj hormonokkal szembeni érzékenységének különbözőségével magyarázható jelenség.

A citokininszerű hatáshoz tartozó KIN egyenértéket mindkét bioteszt esetén a mindenkor aktuális KIN kalibrációs sorok alapján határoztuk meg. Ezek az

adatok esetlegesen eltérhetnek az 5. ábra értékeitől, melyek a kalibrációs sorok átlagértékei alapján készültek. Megfigyelhető a szoros korreláció ( $\rho_{U,R} = 0,94$ ) az uborka- (U) és retek (R) sziklevél növekedési biotesztben felvett KIN kalibrációs sorok között (5. ábra).



5. ábra A KIN kalibrációs sor elemeinek hatása az uborka- U és retek R sziklevél megnyúlási biotesztben.

#### 4.1.2.2. Citokininek kimutatása HPLC-MS analitikai módszerrel

A citokininek analitikai kimutatásába bevontuk az auxinhatású és tartalmú MACC 355, 400, 531 és 583 mikroalga törzset is mint esetleges negatív összehasonlítási alapot. Ezek a törzsek az uborka sziklevél megnyúlási tesztek során a kontrollt kevéssel meghaladó vagy annál kisebb citokininszerű hatást mutattak.

A legnagyobb mennyiségű citokinint az uborka sziklevél növekedési biotesztben szignifikánsan legnagyobb hatást mutató (4. táblázat) *Anabaena* nemzetségbe tartozó MACC 643 cianobaktérium törzsnél mértük (6.táblázat).

6. táblázat A biotesztekben legmagasabb citokininszerű hatású algatörzsek KIN egyenértéke és HPLC-MS módszerrel mért citokinin tartalma.

Nemzetség/faj (MACC törzs)	2 g·l <sup>-1</sup> algaszuszpenzió KIN egyenértéke (mg·l <sup>-1</sup> )	Citokinin tartalom (mg·2g <sup>-1</sup> )
<i>Anabaena</i> (643)	0,5-1,0	0,098
<i>Chlamydomonas</i> (531)	0,1	0,075
<i>Chlorella</i> (400)	0	0,060
<i>Neochloris</i> (583)	0	0,055
<i>Chlorella</i> (355)	0	0,048
<i>Chlorosarcina</i> (560)	0,4	0,036
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (553)	0,3	0,027
<i>Leptolyngbya</i> (642)	0,5	0,001

A *Chlorosarcina* nemzetségbe tartozó MACC 560 és az *Klebsormidium flaccidum* faj 553 törzse is jelentős citokinin mennyiséget tartalmazott. Mindhárom algatörzs esetén szoros korreláció ( $\rho=0,99$ ) volt a biotesztek és az analitikai kimutatás során kapott értékek között, bár konzekvensen egy nagyságrendbeli volt a különbség a biotesztek javára.

A magas auxinhatású *Chlorella* nemzetségbe tartozó MACC 355 és 400, a *Neochloris* nemzetségbe tartozó MACC 583 és a *Chlamydomonas* nemzetségbe tartozó 531 törzsekből annak ellenére, hogy a biotesztekben egyáltalán nem, vagy csak alacsony citokininszerű hatást mutattak, a HPLC-MS vizsgálatokban jelentős citokinin tartalom volt kimutatható (6. táblázat).

A biotesztekben az egyik legmagasabb citokininszerű hatást mutató *Leptolyngbya* nemzetségbe tartozó MACC 642 kékalga törzsnél az analitikai módszerrel kimutatott citokinin mennyisége nagyon alacsony volt (6. táblázat).

A HPLC-MS mérés során izopentenil-adenin egy törzsből sem volt kimutatható, izopentenil-adenozint két törzs esetén azonosítottunk (7. táblázat).

A szabad bázisként előforduló zeatin típusok közül *cisz*-zeatin egy, *transz*-

zeatin két törzs kivételével valamennyi törzsben kimutatható volt. A *cisz* forma mennyisége az MACC 531 törzset kivéve 2,5-12 szerese volt a *transz* formáénak. A *cisz*-zeatin-9-ribozid és *transz*-zeatin-9-ribozid mennyisége között ez a trend csupán két esetben volt megfigyelhető, 6 törzs nagyobb arányban tartalmazott *transz*-zeatin-9-ribozidot. Egy törzsből *transz*-zeatin-ribozid nem volt kimutatható, a glükozilált *transz*-zeatin-ribozid mennyisége azon törzsek esetén, melyekből mindkét típus kimutatható volt, kevéssel alatta maradt a *transz*-zeatin-ribozidnak (7. táblázat).

Valamennyi törzs tartalmazott 2-hidroxi-zeatint. Egyedül ennek a citokininek a mennyiségi meghatározása során volt eltérés a *Cyanobacteria* és *Chlorophyta* phylumba tartozó MACC törzsek között. Az eltérés átlagosan 140-szeres (66–259) volt a *Chlorophyta* phylumba tartozó törzsek javára (7. táblázat). Dihidro-zeatint a nyolc törzsből ötben azonosítottunk, ugyanakkor dihidro-zeatin-ribozidot egy kivétellel valamennyi törzs tartalmazott (7. táblázat). A törzsek feléből kimutattuk a gyűrűs benzil-adenint és benzil-adenin-9-ribozidot (7. táblázat). A citokininek analitikai kimutatása során három olyan, vélhetően az izoprenoid csoportba tartozó, eddig nem azonosított citokinint találtunk, melyek közül az X<sub>3</sub> valamennyi, az X<sub>1</sub> és X<sub>2</sub> típus egy kivétellel valamennyi MACC törzsben jelen volt (8. táblázat). A tömegspektrumok alapján meghatározott, feltételezett citokininek azonosítása szerves kémiai szintézis felhasználásával folyamatban van.

A zöldalgák közül a *Chlorophyceae* családba tartozó MACC 355 és 400 *Chlorella* törzsek az izopentenil-adeninen kívül valamennyi, a HPLC-MS vizsgálat során mért ismert és azonosítatlan citokinint tartalmazták (7., 8. táblázat). Az ugyanezen családba tartozó *Chlorosarcina* MACC 560 törzs nem tartalmazott izopentenil csoportba tartozó citokinineket, *transz*-zeatint, *transz*-zeatin-ribozidot és aromás citokininek sem voltak benne találhatóak (7. táblázat).

7. táblázat Mikroalga és cianobaktérium törzsekben mért izoprenoid - és aromás citokininek.

Nemzetség/faj (MACC törzs)	iPR	cZ	tZ	cZR	tZR	tZOG	2OHZ	DZ	DZR	BA	BAR
	(ng <sup>g</sup> -1)										
<i>Chlorella</i> (355)	35,9	201,8	16,3	31,4	45,5	43,7	19626,9	29,7	25,3	20,5	73,1
<i>Chlorella</i> (400)	58,9	134,5	37,4	102,9	70,0	61,4	27626,3	80,8	107,8	39,0	40,3
<i>Chlamydomonas</i> (531)	-	21,0	26,8	40,2	38,7	35,8	36713,0	30,9	37,1	29,9	-
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (553)	-	93,9	36,8	26,8	29,3	28,3	12461,2	-	-	-	-
<i>Chlorosarcina</i> (560)	-	191,5	-	29,2	-	17,4	16486,0	29,7	27,3	-	-
<i>Neochloris</i> (583)	-	136,8	21,8	19,1	21,6	-	25623,8	-	19,5	-	31,4
<i>Leptolyngbya</i> (642)	-	40,1	15,9	27,8	34,2	20,1	141,8	-	26,9	-	-
<i>Anabaena</i> (643)	-	-	-	51,4	52,1	-	188,6	44,0	38,0	71,4	54,1

IPR: izopentenil-adenin-9-ribosid; cZ: cisz-zeatin; tZ: transz-zeatin; cZR: cisz-zeatin-9-ribosid; tZR: transz-zeatin-9-ribosid; tZOG: transz-zeatin-O-glükosid; 2OHZ: 2-hidroxi-zeatin; DZ: dihidro-zeatin; DZR: dihidro-zeatin-9-ribosid; BA: benzil-adenin; BAR: benzil-adenin-9-ribosid; a mérés során a mintákból izopentenil-adenin és benzil-adenin-9-glükosid nem volt kimutatható

A *Neochloris* MACC 583 zöldalga törzsben sem mértünk izopentenil típusú citokinineket és *transz*-zeatin-O-glükozidot. A dihidro-zeatin és benzil-adenin hiányzott a mintából, de azok ribozidjait tartalmazta (7. táblázat). A *Chlamydomyceae* családba tartozó *Chlamydomonas* MACC 531 törzs az izopentenil típusú citokinineken és a benzil-adenozinon kívül valamennyi citokinint tartalmazta. Ennél a törzsnél mértük a legmagasabb 2-hidroxi-zeatin tartalmat (7. 8. táblázat). A *Charophyceae* családba tartozó MACC 553 *Klebsormidium flaccidum* törzs az azonosítottak közül a zeatin típusú citokinineket, a nem azonosítottak közül az  $X_3$  citokinint tartalmazta (7. 8. táblázat). A vizsgálatunk során analizált zöldalga törzsek citokinin tartalmának döntő részét (97 - 99%) a 2-hidroxi-zeatin tette ki (9. táblázat).

A cianobaktériumok vizsgálata során a mért citokininek mennyiségi és típus szerinti megoszlása jelentősen eltért a zöldalgáknál kapott adatoktól (7., 8. táblázat). Az *Oscillatoriales* rendbe tartozó *Leptolyngbya* MACC 642 törzsnél a dihidro-zeatin kivételével zeatin típusú (87%) és nem azonosított (13%) citokinineket detektáltunk (7., 8., 9. táblázat)

8. táblázat Mikroalgákban és cianobaktériumokban mért, eddig nem azonosított citokininek ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ).

Nemzetség/faj (MACC törzs)	$X_1$	$X_2$	$X_3$
	(ng·g <sup>-1</sup> )		
<i>Chlorella</i> (355)	26,53	77,7	49,3
<i>Chlorella</i> (400)	23,44	34,0	23,8
<i>Chlamydomonas</i> (531)	25,43	38,1	45,9
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (553)	-	-	17,4
<i>Chlorosarcina</i> (560)	13,93	21,5	20,0
<i>Neochloris</i> (583)	6,68	10,9	17,2
<i>Leptolyngbya</i> (642)	6,65	15,7	22,1
<i>Anabaena</i> (643)	7448,63	23842,5	11615,5

$X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ : azonosítatlan citokininek

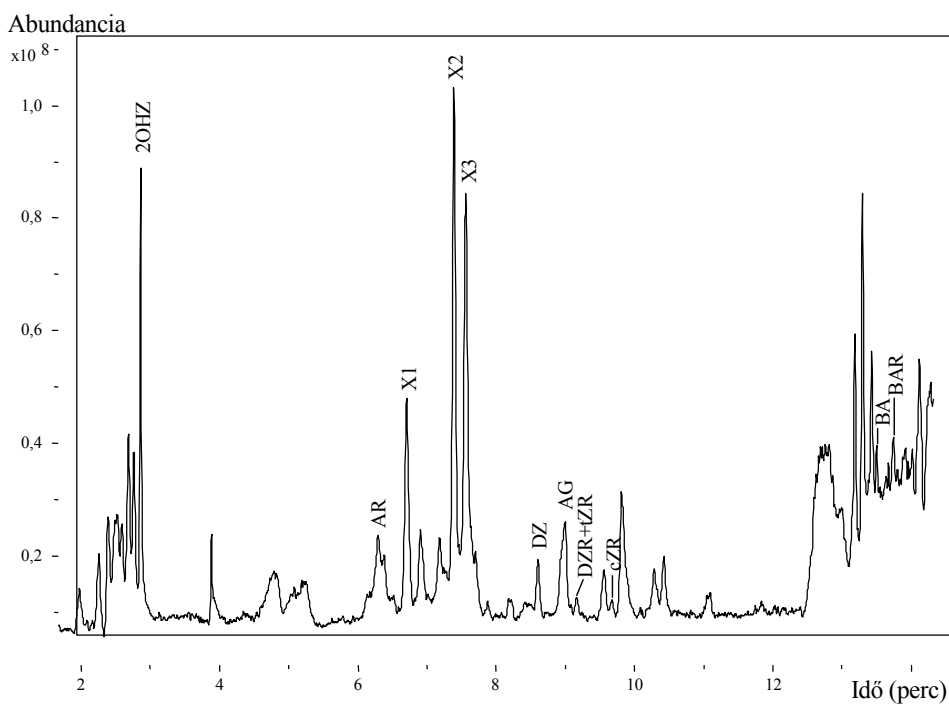
9. táblázat Az MACC törzsekben mért citokininek típus szerinti megoszlása a teljes citokinin tartalom arányában.

Nemzetség/faj (MACC törzs)	Citokinin típusok megoszlása (%)					
	$\Sigma iP$	$\Sigma Z$	2OHZ	$\Sigma DZ$	$\Sigma BA$	$\Sigma X$
<i>Chlorella</i> (355)	0,18	1,67	96,67	0,27	0,46	0,76
<i>Chlorella</i> (400)	0,21	1,43	97,14	0,66	0,28	0,29
<i>Chlamydomonas</i> (531)	-	0,44	99,00	0,18	0,08	0,30
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (553)	-	1,69	98,17	-	-	0,14
<i>Chlorosarcina</i> (560)	-	1,41	97,92	0,34	-	0,33
<i>Neochloris</i> (583)	-	0,77	98,90	0,08	0,12	0,13
<i>Leptolyngbya</i> (642)	-	39,34	40,36	7,67	-	12,63
<i>Anabaena</i> (643)	-	0,24	0,43	0,19	0,29	98,85

$\Sigma iP$ : *iP*, *iPR*;  $\Sigma Z$ : *tZ*, *cZ*, *tZR*, *cZR*, *tZOG*;  $\Sigma DZ$ : *DZ*, *DZR*;  $\Sigma BA$ : *BA*, *BAR*, *BA9G*;  $\Sigma X$ : *X<sub>1</sub>*, *X<sub>2</sub>*, *X<sub>3</sub>*,



A *Nostocales* rend tagjából, az *Anabaena* MACC 643 törzsből zeatin típusú, gyűrűs és jelenleg még nem azonosított citokinineket mutattunk ki (6. ábra). A dihidro-zeatin és dihidro-zeatin-9-ribozid jelen volt a mintában, szabad bázisok és zeatin-9-ribozid nem volt kimutatható. Elsőként mutattunk ki gyűrűs citokinineket: benzil-adenint és benzil-adenin-9-ribozidot cianobaktériumból (7. táblázat). A minta a többi törzssel összehasonlítva az eddig nem azonosított citokininekből nagyságrendekkel többet (415-507%) tartalmazott (8. táblázat), melyek a teljes citokinin tartalom 99%-át tették ki (9. táblázat).



6. ábra Az MACC 643 törzs HPLC-MS teljes ion kromatogramja (TIC).

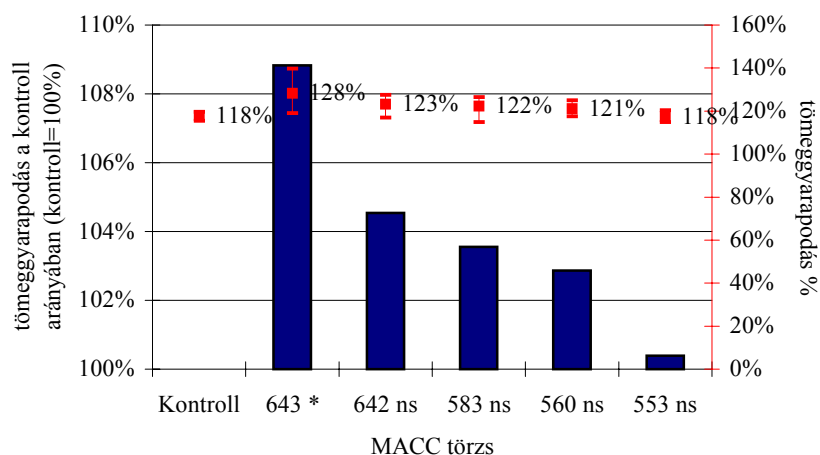
#### **4.1.3. A hormonhatású és tartalmú törzsek vizsgálata kallusztenyészetekben**

A biotesztben szignifikáns hormonszerű hatást mutató MACC 553, 560, 583, 642 és 643 mikroalga és cianobaktérium törzseket szomatikus eredetű dohány- és androgenetikus eredetű haploid kukorica kalluszvonalon vizsgáltuk (6., 7. ábra) annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, megmutatkozik-e az általuk biotesztben produkált hormonszerű hatás más rendszerekben is. Mivel az uborka sziklevel gyökeresedési biotesztben az MACC 355, 531 és 400 törzsek auxinszerű hatása az egyes ismétlések során nagy varianciát mutatott, ezért biomasszájukat nem alkalmaztuk az *in vitro* szövettényészetekben.

A legfontosabb tisztázandó kérdés az volt, hogy milyen formában juttassuk az alga biomasszát a táptalajokba. Mivel nem szerves oldószeres kivonatokkal dolgoztunk, kézenfekvő volt, hogy a biomasszát az autoklávozást megelőzően adjuk a táptalajokhoz. Felmerült azonban a kérdés, hogy mennyire csökken pozitív hatásuk a csíramentesítéssel járó hőhatás következtében? Ennek megválaszolására hőkezeltük az alga szuszpenziókat, majd újra elvégeztük a biotesztet. Az MACC 560 törzs esetén 6% az 553 törzs esetén mintegy 3% volt a hő okozta hatáscsökkenés, a többi törzs esetén a hatás 1–10%-os hatásnövekedéssel járt. Mindezen tények ismeretében bizvást reméltük, hogy az alगतörzsek pozitív hatása a kallusztényészetekben is jelentkezik, annál is inkább, mivel ebben az esetben a növényi szövetek a bioteszttől lényegesen hosszabb időn keresztül voltak kapcsolatban az MACC törzsek hormonhatású vegyületeivel.

A dohány bélszövet eredetű kalluszvonal tömegnövekedése az MACC 643 törzs hatására  $p < 0,05$  valószínűségi szinten meghaladta, a 642, 560, 583 és 553 törzs esetén elérte vagy meghaladta a KIN-t tartalmazó kontroll értékét. Az átlagos tömeggyarapodás 118-138% volt (7. ábra). Bár a tömegnövekedés nem

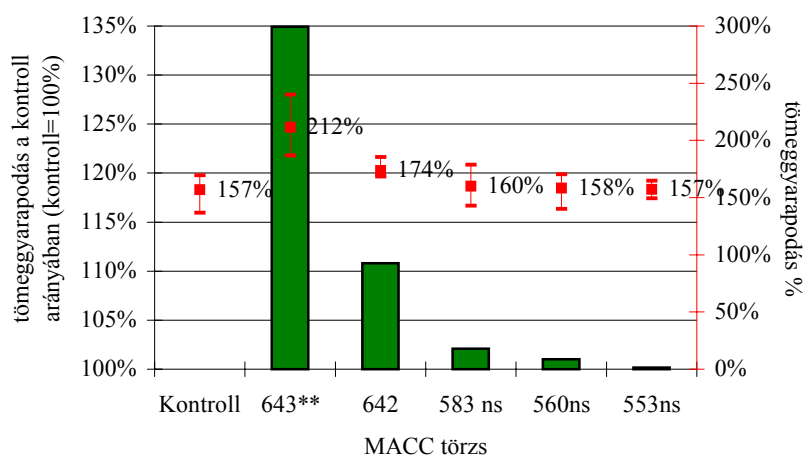
volt tetemes, mégis reményt láttunk arra, hogy a hormonhatású MACC törzsek egyszikűek szövettényezeteiben is sikeresen alkalmazhatóak.



7. ábra Az algatörzsek hatása a dohány kallusz tömegnövekedésére.

Kétmintás *t* próba alapján \*  $p < 0,05$  valószínűségi szinten szignifikáns, ns nem szignifikáns

A dohány kalluszoknál megfigyelték összhangban az androgenetikus eredetű haploid kalluszvonal esetén is a  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  2,4-D-t tartalmazó kontrollhoz viszonyított tömegnövekedés az MACC 643 törzs esetén volt szignifikánsan a legnagyobb. Az MACC 642, 583 és 560 törzs alkalmazásakor a tömegnövekmény ha nem is szignifikáns, de meghaladta, az 553 törzsnél elérte a kontroll hatását. A tényleges tömeggyarapodás átlagosan 157-212% volt (8. ábra). Az algatörzsek hatására bekövetkezett tömeggyarapodás mindkét kallusztípus esetén elérte vagy meghaladta az aktuális kontroll tömegnövekedését (7., 8. ábra).



8. ábra Az algatörzsek hatása a kukorica kallusz tömegnövekedésére.

Kétmintás *t* próba alapján \*\*  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$  valószínűségi szinten szignifikáns, ns nem szignifikáns

## 4.2. Mikroalga és cianobaktérium biomassza alkalmazása portoktenyészetekben

### 4.2.1. A kukorica portokok indukciós gyakoriságát növelő táptalaj kiválasztása

A vizsgálat célja a mindhárom (H1, H2, H3) vizsgált genotípus számára optimális táptalaj kiválasztása volt.

Mivel az irodalmi adatok alapján a 2,3,5-TIBA az IES sejtek közötti transzportjának gátlása révén már nagyon alacsony koncentrációban is a normálistól eltérő embriók fejlődését eredményezi, indokoltnak láttuk, hogy az indukciós táptalajokban azt 2,4-D-vel helyettesítsük.

Első lépésben elővizsgálatokat végeztünk a kukorica portokkultúrákban legerjedtebben alkalmazott, 2,3,5-TIBA-t egyaránt tartalmazó A és B<sub>1</sub>

táptalaj összehasonlítására. Vizsgálatunkban a B<sub>1</sub> táptalaj mindhárom vizsgált genotípus esetén jobb portokválaszt eredményezett. Ennek ismeretében vizsgálatunkban az A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> és B<sub>3</sub> táptalaj összehasonlítását végeztük el. Az A és B<sub>1</sub> és a 2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D-t tartalmazó B<sub>2</sub> táptalaj között az indukcióra gyakorolt hatás tekintetében a H1 és H2 genotípus esetén nem volt szignifikáns különbség. A H3 genotípusnál a B<sub>2</sub> táptalaj mutatta szignifikánsan (p=0,05) a legjobb hatást. Az 1 mg·l<sup>-1</sup> KIN-nel és 0.5 mg·l<sup>-1</sup> NES-sel kiegészített B<sub>3</sub> táptalaj hatása valamennyi genotípusnál szignifikánsan elmaradt a többi táptalajétól (10. táblázat). A mikroszpora eredetű struktúrák gyakorisága a B<sub>2</sub> táptalajon volt szignifikánsan (p<0,005) a legmagasabb, az A és B<sub>1</sub> táptalajok hatása között nem volt jelentős különbség. A B<sub>3</sub> táptalaj hatása szignifikánsan gyengébb volt, mint az A, B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> táptalajé (10. táblázat).

10. táblázat A vizsgált táptalajok hatása a H1, H2 és H3 genotípusok portok indukciójának, a mikroszpora eredetű struktúrák és a regeneránsok előfordulási gyakoriságára.

Genotípus	Táptalaj	Ismétlés	VP/IP (%)	MES/IP (%)	R/IP (%)
H1	A	9	33,0 a	110,9 a	15,2 a
	B <sub>1</sub>	9	36,3 a	106,7 a	14,4 a
	B <sub>2</sub>	9	33,6 a	134,7 b	19,3 b
	B <sub>3</sub>	9	16,7 b	48,9 c	7,2 c
H2	A	6	31,8 a	107,7 a	5,7 a
	B <sub>1</sub>	6	35,3 a	101,7 a	5,2 a
	B <sub>2</sub>	6	35,7 a	112,5 b	6,7 a
	B <sub>3</sub>	6	14,3 b	31,3 c	4,8 a
H3	A	8	8,6 a	17,1 a	1,4 a
	B <sub>1</sub>	8	13,4 a	30,1 b	2,7 b
	B <sub>2</sub>	8	21,0 b	40,2 c	3,8 c
	B <sub>3</sub>	8	7,5 a	12,7 a	1,5 ab

\*táptalajonként az egyes oszlopokban feltüntetett betűk különbözősége az adatok legalább p<0,05 szintű szignifikáns eltérését jelzi; VP: válaszó portok; IP: izolált portok; MES:mikroszpora eredetű struktúra; R: regeneráns;

A regeneránsok száma a H1 és H3 genotípus esetén a B<sub>2</sub> táptalaj alkalmazásakor volt szignifikánsan a legmagasabb ( $p < 0,005$ ,  $p < 0,05$ ). A H2 genotípus regenerációs gyakoriságát illetően a táptalajok hatása között nem volt különbség (10. táblázat).

A vizsgálat eredményeinek összegzéseként megállapítottuk, hogy a B<sub>2</sub> táptalaj hatása egyik paramétert tekintve sem maradt el szignifikánsan az A, B<sub>1</sub> és B<sub>3</sub> táptalaj hatásától. A B<sub>2</sub> táptalaj a portok indukció gyakoriságában a B<sub>3</sub>, a mikropóra eredetű struktúrák számában valamennyi táptalaj hatását szignifikánsan felülmúlta. A regenerációs arány tekintetében a H1 és H3 genotípus esetén szignifikánsan a legjobb hatást adta. A H2 genotípusnál, ha nem is szignifikánsan, de meghaladta a többi táptalaj regenerációra gyakorolt hatását.

#### **4.2.2. Az MACC törzsek alkalmazása kukorica portoktenyészetekben**

Vizsgálatunk során a 4.1. pont szerint bizonyítottan IES és citokinin termelő MACC cianobaktérium és mikroalga törzsek biomasszáját alkalmaztuk a 4.2.1. pontban a legjobb hatásúnak bizonyult B<sub>2</sub> táptalaj természetes kiegészítőjeként a H1, H2 és H3 kukorica genotípusok portoktenyészetekben.

A H1 genotípus esetén klímakamrai és tenyészkerti eredetű donor növényeknél teszteltük az MACC 553, 560, 583 mikroalga és a 642 és 643 cianobaktérium törzsek portok indukcióra, mikropóra eredetű struktúrák és regeneránsok számára gyakorolt hatását (11. táblázat). A klímakamrai eredetű portokok indukciója és a mikropóra eredetű struktúrák gyakorisága tekintetében a  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} 553$ ,  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} 642$  és  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} 643 + 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} 2,4\text{-D}$  kezelés szignifikánsan meghaladta a kontroll hatását. A regeneránsok számát illetően három kezelés eredménye elmaradt a kontrolltól, a többi meghaladta azt.

Mindhárom paramétert vizsgálva a  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\underline{642}$  és az  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\underline{643} + 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}2,4\text{-D}$  kezelés adta a legjobb hatást (11. táblázat).

*11. táblázat A hormontermelő MACC törzsek biomasszájának hatása a klímakamrai nevelésű H1 genotípusú donor növények portok indukciójára, és a mikrospóra eredetű struktúrák (MES) és a regeneránsok gyakoriságára.*

Kezelés	Portok indukció	MES gyakoriság	Regenerációs gyakoriság
	az izolált portok arányában (%)		
<i>Kontroll (2 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D)</i>	27	121	14
1 g·l <sup>-1</sup> 553 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	30 ns	128 ns	5
2 g·l <sup>-1</sup> 553	43 *	218 *	13
1 g·l <sup>-1</sup> 560 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	44 ns	254 ns	15
2 g·l <sup>-1</sup> 560	39 ns	183 ns	16
1 g·l <sup>-1</sup> 583 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	46 *	171 ns	22
2 g·l <sup>-1</sup> 583	38 ns	174 ns	9
1 g·l <sup>-1</sup> 642 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	40 ns	192 ns	17
2 g·l <sup>-1</sup> <b>642</b>	<b>53 *</b>	<b>242 **</b>	<b>20</b>
1 g·l <sup>-1</sup> <b>643</b> + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	<b>51 *</b>	<b>216 *</b>	<b>24</b>
2 g·l <sup>-1</sup> 643	48 ns	185 ns	18

\*\* $p < 0,005$ ; \*  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja a kontroll értékét; ns nem szignifikáns

A tenyészkerti eredetű portokok indukciója és a mikrospóra eredetű struktúrák gyakorisága valamennyi kezelés alkalmazásakor meghaladta a kontroll értékét (12. táblázat). Mindkét vizsgált paraméternél a  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}553$ , az  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\underline{642} + 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}2,4\text{-D}$  és  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\underline{642}$  kezelés hatása volt szignifikáns ( $p < 0,05$ ). A növényregeneráció gyakorisága a  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\underline{642}$  kezelés alkalmazásánál érte el a kontroll értékét (12. táblázat).

A 11. és 12. táblázat adatait összevetve megállapítható, hogy a cianobaktérium és mikroalga táptalaj kiegészítők hatása a portok indukcióra és a mikrospóra eredetű struktúrák gyakoriságára meghaladta a kontroll kezelést.

értékét mind a klímakamrai, mind a tenyészkerti nevelésű H1 donor növényeknél. A növényregenerációra gyakorolt hatásukat vizsgálva nem volt ilyen egyértelmű a hatás. Míg az optimális körülmények között nevelt donor növényekből származó regeneránsok száma a legjobb hatású cianobaktériumos kezelés esetén 71%-kal meghaladta a kontroll értékét, addig ez a javító hatás a tenyészkertben nevelt donor növényeknél elmaradt. Mivel a portok indukció és növényregeneráció folyamatának genetikai szabályozása eltérő, a H1 genotípus portok indukciója a tenyészkerti időjárási körülmények hatására ugyan csökkent, de korántsem olyan mértékben mint a mikrospóra eredetű struktúrák és a regeneránsok száma. Mindhárom paraméter tekintetében a legjobb hatása a  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  642 kezelésnek volt.

A H2 genotípus esetén tenyészkerti nevelésű donor növényeknél teszteltük a cianobaktérium és mikroalga törzsek biomasszájával kiegészített B<sub>2</sub> táptalaj hatását az indukálódott portokok, a mikrospóra eredetű struktúrák és a regeneránsok számának alakulására. A  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  560,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  642 +  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D és  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  643 +  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D kezelések hatására a portok indukcióban és a mikrospóra eredetű struktúra gyakoriságban bekövetkezett növekedés  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladta a kontroll hatását. A regeneránsok száma mindhárom kezelés esetén elérte, illetve meghaladta a kontroll értékét (13. táblázat). A H1 és H2 genotípus apai szülővonala azonos, a két genotípus portok indukciós, mikrospóra eredetű struktúra és regenerációs aránya közel megegyező volt (12., 13. táblázat).

A H3 genotípus klímakamrai eredetű növényeinek portok indukciója az  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  643 +  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  2,4-D kezelés kivételével elmaradt a kontrolltól (14. táblázat). A mikrospóra eredetű struktúrák aránya csupán az  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  560 +  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  2,4-D és  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  643 +  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  2,4-D kezelés hatására volt magasabb, mint a kontroll értéke. A regeneránsok számában hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  643 +  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  2,4-D kezelés mind a portok indukcióban, mind a mikrospóra eredetű



12. táblázat A vizsgált törzsek hatása a tenyészkerti eredetű H1 donor növények portok indukciójára, a mikospóra eredetű struktúrák (MES) és a regeneránsok számára.

Kezelés	Portok indukció	MES gyakoriság	Regenerációs gyakoriság
	az izolált portok arányában (%)		
<i>Kontroll (2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D)</i>	20	36	2,0
1 g·l <sup>-1</sup> 553 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	34 ns	86 *	1,5
2 g·l <sup>-1</sup> 553	41 *	97 *	0,2
1 g·l <sup>-1</sup> 560 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	38 ns	88 ns	1,0
2 g·l <sup>-1</sup> 560	31 ns	84 ns	1,5
1 g·l <sup>-1</sup> 583 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	23 ns	69 ns	0
2 g·l <sup>-1</sup> 583	30 ns	91 ns	0,3
1 g·l <sup>-1</sup> 642 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	42 *	82 *	1,8
2 g·l <sup>-1</sup> 642	44 *	99 *	2,0
1 g·l <sup>-1</sup> 643 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	31 ns	82 *	0,5
2 g·l <sup>-1</sup> 643	24 ns	50 ns	1,3

\*\* $p < 0,005$ ; \*  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja a kontroll értékét; ns nem szignifikáns

13. táblázat Az MACC törzsek biomasszájának hatása a tenyészkerti nevelésű H2 genotípus portok indukciójára, a mikospóra eredetű struktúrák (MES) és regeneránsok gyakoriságára.

Kezelés	Portok indukció	MES gyakoriság	Regenerációs gyakoriság
	az izolált portok arányában (%)		
<i>Kontroll (2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D)</i>	23	45	1,3
1 g·l <sup>-1</sup> 553 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	37 ns	97 *	1,5
2 g·l <sup>-1</sup> 553	34 ns	91 ns	0,2
1 g·l <sup>-1</sup> 560 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	21 ns	40 ns	0,3
2 g·l <sup>-1</sup> 560	36 *	96 **	1,7
1 g·l <sup>-1</sup> 583 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	35 ns	78 ns	0
2 g·l <sup>-1</sup> 583	43 ns	97 **	0,8
1 g·l <sup>-1</sup> 642 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	41 *	95 **	1,3
2 g·l <sup>-1</sup> 642	33 ns	61 ns	0,5
1 g·l <sup>-1</sup> 643 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	34 *	95 **	1,5
2 g·l <sup>-1</sup> 643	22 ns	56 ns	0,8

\*\* $p < 0,005$ ; \*  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja a kontroll értékét; ns nem szignifikáns

struktúrák mennyiségében  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladta a kontroll értékét. Míg a H1 és H2 genotípusok esetén nem figyeltük meg az ugyanazon algát különböző koncentrációban tartalmazó kezelések közötti tendenciózus különbséget, addig a H3 genotípus klímakamrai nevelésű növényei esetén az megfigyelhető volt. Valamennyi  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  alga +  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D kezelés magasabb értéket eredményezett mint a  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  alga kezelés (14. táblázat).

A H3 genotípus tenyészkerti nevelésű donor növényeinek portokjainál mindhárom mutató alacsony gyakoriságú volt (15. táblázat). A kezelések hatására bekövetkezett portok indukciós és mikrospóra eredetű struktúra gyakoriság meghaladta a kontrollt. Ennek a genotípusnak ideális termesztési körülmények között is alacsony a regenerációs rátája, ami esetünkben az aszályos időjárás következtében méginkább lecsökkent. A portok indukcióra és mikrospóra eredetű struktúra gyakoriságra bizonyítottan pozitív hatással bíró  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  643 +  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D kezelés nem váltott ki növényregenerációt. Az  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  alga biomassza +  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D kezelések klímakamrai eredetű portokoknál megfigyelt pozitív hatása a tenyészkerti eredetű portokok esetén jelentősen mérséklődött (15. táblázat).

A vizsgálat eredményeinek összegzéseként megállapíthatjuk, hogy az auxin és citokinin hatású és tartalmú MACC cianobaktérium és mikroalga törzsek, különös tekintettel az 560, 642 és 643 törzsre, alkalmasak arra, hogy a kukorica portokkultúrákban a 2,4-D szintetikus auxint részben vagy egészében helyettesítsék.

A vizsgálatok során regenerálódott növények ploidszintjét áramlási citométerrel meghatároztuk, a dihaploid növényeket klímakamrákban nevelve öntermékenyítettük, a szemtermést betakarítottuk és vonalelőállítás céljára megőriztük (9. ábra).

14. táblázat Az MACC törzsek biomasszájának hatása a klímakamrai nevelésű H3 genotípusú donor növények portok indukciójára, a mikrspóra eredetű struktúrák (MES) és a regeneránsok gyakoriságára.

Kezelés	Portok indukció	MES gyakoriság	Regenerációs gyakoriság
	az izolált portok arányában (%)		
<i>Kontroll (2 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D)</i>	24	39	1,2
1 g·l <sup>-1</sup> 553 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	16 ns	27 ns	0,8
2 g·l <sup>-1</sup> 553	7 ns	18 ns	0,4
1 g·l <sup>-1</sup> 560 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	20 ns	55 ns	1,6
2 g·l <sup>-1</sup> 560	5 ns	11 ns	0,2
1 g·l <sup>-1</sup> 583 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	21 ns	38 ns	0,2
2 g·l <sup>-1</sup> 583	8 ns	20 ns	0
1 g·l <sup>-1</sup> 642 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	18 ns	37 ns	1,8
2 g·l <sup>-1</sup> 642	8 ns	19 ns	0
1 g·l <sup>-1</sup> <b>643</b> + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	<b>51 *</b>	<b>100 *</b>	<b>2,4</b>
2 g·l <sup>-1</sup> 643	13 ns	18 ns	0

\* $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja a kontroll értékét; ns nem szignifikáns

15. táblázat Az MACC törzsek biomasszájának hatása a tenyészkerti eredetű H3 genotípusú donor növények portok indukciójára, a mikrspóra eredetű struktúrák (MES) és a regeneránsok gyakoriságára.

Kezelés	Portok indukció	MES gyakoriság	Regenerációs gyakoriság
	az izolált portok arányában (%)		
<i>Kontroll (2 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D)</i>	3	5	0,7
1 g·l <sup>-1</sup> 553 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	6 ns	12 ns	0,7
2 g·l <sup>-1</sup> 553	6 ns	11 ns	0,3
1 g·l <sup>-1</sup> 560 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	7 ns	17 ns	0,5
2 g·l <sup>-1</sup> 560	7 ns	14 ns	0
1 g·l <sup>-1</sup> 583 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	9 ns	16 ns	0
2 g·l <sup>-1</sup> 583	5 ns	11 ns	0
1 g·l <sup>-1</sup> 642 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	7 ns	9 ns	0,3
2 g·l <sup>-1</sup> 642	5 ns	7 ns	0
1 g·l <sup>-1</sup> <b>643</b> + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	<b>9 *</b>	<b>15 *</b>	0
2 g·l <sup>-1</sup> 643	8 ns	15 ns	0

\*\* $p < 0,005$ ; \*  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja a kontroll értékét; ns nem szignifikáns



9. ábra  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  MACC 643 cianobaktérium biomasszával kiegészített táptalajon indukálódott és regenerálódott H1 genotípusú fertis kukorica növény.

### 4.2.3. Az MACC törzsek alkalmazása búza portoktenyészetekben

A hormonhatás biotesztekkel történő kimutatásának korai fázisában vizsgáltuk az MACC 531, 534, 643 és 657 alगतörzsek klímakamrai nevelésű búza fajták portok indukciójára, valamint a mikrospóra eredetű struktúrák és regeneránsok számára gyakorolt hatását (16. táblázat). A Benoist búzafajta mindhárom vizsgált paraméterben, ha nem is szignifikánsan de felülmúlta az Mv Pálma búzafajtát. Mivel az ismétlések szórása nagy volt, és az algás kezelések nem eredményeztek a kontrollhoz képest kiugróan pozitív hatást, így szignifikáns javító hatást egyik kezelésnél sem tudtunk kimutatni. A Benoist fajtánál az  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{643} + 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} 2,4\text{-D}$  és  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{643}$  kezelés, az Mv Pálma fajtánál a  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{643}$  kezelés haladta meg mindhárom paraméterben a kontroll hatását (16. táblázat). Csupán az MACC 643 tözs alkalmazásával kaptunk a kontrollt meghaladó értékeket, így további vizsgálatunkból az 531, 534 és 657 törzset kizártuk. Ugyanakkor a párhuzamosan végzett kukorica portoktenyészetekben pozitív hatásúnak bizonyult 553, 583 és 642 törzseket bevontuk vizsgálatunkba (17. táblázat).

A szabadföldi nevelésű donor növények portokkultúráiban mindkét fajta esetén ismételtén a  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{643} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$  kezelés eredményezett jobb hatást mint a kontroll. A Benoist búzafajtánál mindhárom paraméter gyakoriságát növelte. Az Mv Pálma fajtánál a portok indukciót szignifikánsan megemelte, a mikrospóra eredetű struktúrák és regeneránsok arányát ha nem is szignifikánsan, de javította (17. táblázat). Az  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{642} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$  kezelés hasonló eredményeket adott, bár az Mv Pálma fajtánál a kezelés hatására képződött mikrospóra eredetű struktúrák mennyisége elmaradt a kontrolltól (17. táblázat).

A vizsgálat eredményeinek összegzéseként megállapítottuk, hogy a kukoricánál megfigyeltekkel megegyezően a búza portokkultúrákban is az

16. táblázat Az MACC törzsek hatása a fitotroni nevelésű búza genotípusok portok indukciójára, a mikroszóra eredetű struktúrák (MES) és a regeneránsok gyakoriságára.

Kezelés	Benoist			Mv Pálma		
	Portok indukció	MES	Regeneránsok	Portok indukció	MES	Regeneránsok
	az izolált portok arányában (%)					
<i>Kontroll</i>	17±6	39±14	2,2	9±3	26±7	3,5
1 g·l <sup>-1</sup> 531 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	17±5	33±8	0	4±2	6±4	0
2 g·l <sup>-1</sup> 531	9±3	18±8	1,0	5±2	7±4	0
1 g·l <sup>-1</sup> 534 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	14±7	28±18	0,3	10±2	24±8	0
2 g·l <sup>-1</sup> 534	13±7	25±12	2,0	12±6	25±12	0,3
1 g·l <sup>-1</sup> 643 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	<b>17±4</b>	<b>40±6</b>	<b>3,2</b>	<b>12±4</b>	<b>31±9</b>	2,7
2 g·l <sup>-1</sup> 643	<b>21±3</b>	<b>49±5</b>	<b>2,6</b>	<b>14±5</b>	<b>34±11</b>	<b>3,6</b>
1 g·l <sup>-1</sup> 657 + 1 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D	6±4	9±6	0,3	6±2	11±1	0
2 g·l <sup>-1</sup> 657	17±9	37±18	0	7±4	12±7	0

17. táblázat Az MACC törzsek hatása a szabadföldi nevelésű búza donor növények portokjainak indukciójára, a mikroszpóra eredetű struktúrák (MES) és a regeneránsok gyakoriságára.

Kezelés	Benoist			Mv Pálma		
	Portok indukció	MES	Regeneránsok	Portok indukció	MES	Regeneránsok
	az izolált portok arányában (%)					
<i>Kontroll</i>	20	34	4,4	10	23	1,5
1 g·L <sup>-1</sup> 553 + 1 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D	15 ns	38 ns	0	9 ns	24 ns	0
2 g·L <sup>-1</sup> 553	12 ns	28 ns	1,0	6 ns	19 ns	0,3
1 g·L <sup>-1</sup> 583 + 1 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D	5 *	11 *	0,6	9 ns	23 ns	0
2 g·L <sup>-1</sup> 583	16 ns	29 ns	0	5 *	11 *	0
1 g·L <sup>-1</sup> 642 + 1 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D	25 ns	41 ns	5,0	10 ns	18 ns	1,5
2 g·L <sup>-1</sup> 642	12 ns	24 ns	0,9	7 ns	16 ns	0
<b>1 g·L<sup>-1</sup>643 + 1 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D</b>	<b>27 ns</b>	<b>39 ns</b>	<b>5,3</b>	<b>15 *</b>	<b>26 ns</b>	<b>1,8</b>
2 g·L <sup>-1</sup> 643	22 ns	41 ns	0,9	11 ns	22 ns	0

\*  $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja a kontroll értékét; ns nem szignifikáns

18. táblázat Az MV Pálma búzafajtából előállított homozigóta törzsek terméselemei.

DH vonal	Szárhossz (cm)	Kalász hossz (cm)	Kalaszszám (db)	Kalászonkénti szemszám (db)	Ezerszemtömeg (g)	Kalászonkénti szemtömeg (mg)
642f231	<b>53,7 **</b>	<b>13,4 ***</b>	18,9 ns	17,9 ns	22,6 ns	513 ***
642f264	<b>55,2 **</b>	<b>11,3 ***</b>	<b>19,2 **</b>	40,0 ns	25,0 ns	1045 ns
642f322	51,6 ns	<b>11,6 ***</b>	18,1 ns	31,0 **	<b>30,5 *</b>	910 *
<b>642f393</b>	<b>57,1 ***</b>	<b>13,0 ***</b>	<b>20,2 ***</b>	<b>46,8 *</b>	26,2 ns	1251 ns
642f2101	52,7 ns	<b>11,7 ***</b>	18,8 ns	37,7 ns	<b>32,6 *</b>	1144 ns
<b>643f144</b>	<b>58,5 ***</b>	<b>11,4 ***</b>	18,5 ns	41,6 ns	<b>29,7 *</b>	1219 ns
<b>643f232</b>	<b>55,7 ***</b>	<b>11,6 ***</b>	18,7 ns	38,1 ns	<b>34,5 ***</b>	<b>1301 *</b>
643f423	<b>60,3 ***</b>	<b>11,7 ***</b>	18,4 ns	35,3 *	<b>31,1 *</b>	1157 ns
643f433	51,4 ns	<b>11,8 ***</b>	<b>19,7 ***</b>	33,8 **	25,2 ns	891 *
643f441	51,8 ns	<b>11,7 ***</b>	18,9 ns	37,6 ns	25,7 ns	1031 ns
643f451	51,0 ns	<b>12,2 ***</b>	<b>19,3 *</b>	35,5 *	<b>32,8 ***</b>	1153 ns
643f4142	52,6 ns	<b>11,5 ***</b>	18,7 ns	35,8 ***	27,5 ns	994 ns
kontroll283	50,5 ns	<b>10,9 *</b>	17,3 ***	20,1 ***	27,1 ns	585 ***
kontroll2121	<b>63,3 ***</b>	<b>11,5 *</b>	17,5 *	17,1 ***	<b>46,9 **</b>	799 *
kontroll2122	53,7 ns	<b>11,7 ***</b>	<b>19,1 *</b>	30,4 **	29,7 ns	889 *
kontroll362	48,9 *	10,7 ns	18,4 ns	37,9 ns	<b>30,7 *</b>	1154 ns
MV Pálma	51,8	10,5	18,4	41,4	26,5	1126
<i>SzD</i> <sub>5%</sub>	1,5	0,3	0,5	3,7	2,6	127

\*\*\* $p < 0,0005$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \* $p < 0,05$  szignifikancia szinten meghaladja az Mv Pálma értékét; ns nem szignifikáns



1 g·l<sup>-1</sup> 643 természetes táptalajkiegészítő hozzáadásával felére volt csökkenthető a potokválasz kiváltásához szükséges 2,4-D szintetikus auxin mennyisége.

Az Mv Pálma búzafajtából előállított homozigóta DH<sub>0</sub> növények közül kiválasztottuk azokat, melyeknek főkalászcsoportok száma  $\geq 20$  db kalásonkénti szemszámot és  $>30$  g ezerszemtömeget produkáltak. A legígéretesebb főkalászcsoportokból származó 16 törzsből 10-10 növényt fitotronban felneveltünk, majd értékeltük a DH<sub>1</sub> törzsek termésselemeit (18. táblázat). Az eredményeket az azonos körülmények között felnevelt donor genotípus termésselemeihez és teljesítményéhez hasonlítottuk. A növénymagasságban csupán a kontroll361 törzs maradt el szignifikánsan a diploid Mv Pálma fajtától, 7 törzs szignifikánsan meghaladta azt. A kiindulási populációtól 15 törzs kalászcsoportjai voltak szignifikánsan hosszabbak, 5 törzs a kaláscsoportszámában haladta meg azt. A kalásonkénti szemszám csupán a 642f393 törzsnél volt szignifikánsan magasabb, mint az Mv Pálmáé, 8 törzsnél szignifikánsan elmaradt attól. A 642f231 törzs növényeinek 50%-a, a kontroll283 törzs növényeinek 30%-a részben vagy egészében steril volt. Mivel az ezerszemtömeg alakulása erősen függ a szemkötéstől így a kalásonkénti szemtömeg értékelésére szorítkoztunk. Egyedül a 643f232 törzs növényeinek volt az Mv Pálmától szignifikánsan magasabb teljesítménye, 6 törzs elérte, 5 törzs produkciója szignifikánsan elmaradt attól. A morfológiai jellemzők közül a kalásonkénti szemszámban volt eltérés a cianobaktériumos és a kontroll kezelésekből származó DH<sub>1</sub> törzsek között. Ugyanezen törzsek 75%-ának teljesítménye elmaradt a donor Mv Pálma fajtától, a cianobaktériumos kezelésekből származó törzsek esetén ez az arány csupán 25% volt. A termésselemek és a teljesítmény alapján a 642f292, 643f144 és 643f232 törzseket (10. ábra) ítéltük tenyészkerti kispárcellás vizsgálatokra alkalmasnak (18. táblázat).



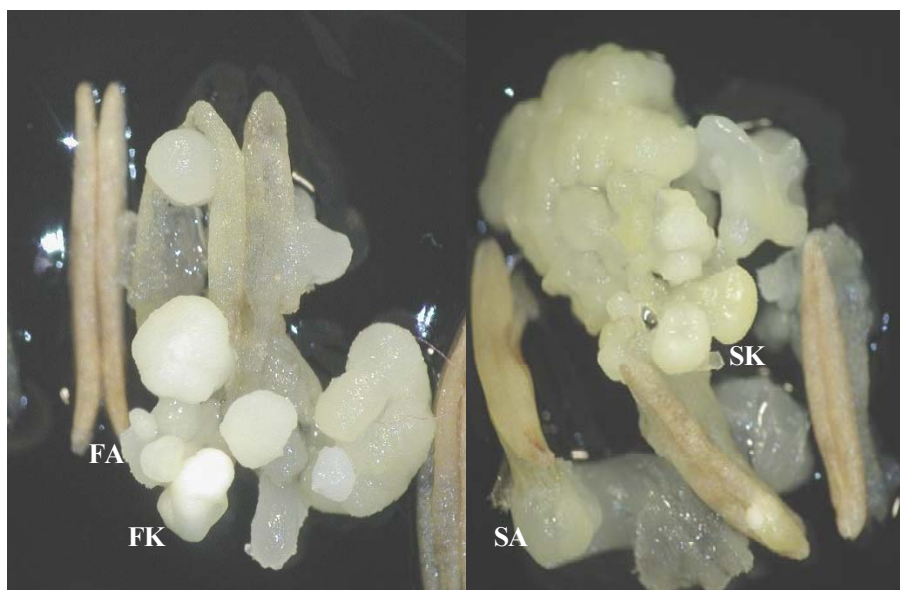
10. ábra A 2f393, 3f144 és 3f232 dihaploid törzsek kalászai.

#### 4.3. A regeneráció szempontjából ideális morfortípus meghatározása

A kukorica portokkultúrák vizsgálatának során megfigyeltük, hogy a sporofita úton tovább fejlődő mikrospórákból változatos küllemű embrió- és kalluszszerű struktúrák fejlődtek. Az indukció második hetében a szemmel alig észrevehető proembriók még egyöntetűen fehérek és áttetszők voltak. Ebben a stádiumban az áttetsző jelleg a kis méretből és az alacsony sejtszámból adódott. Az indukciós fázis előrehaladtával egyre inkább kiütköztek a morfológiai eltérések. A 3. hétre szinte valamennyi osztódásnak indult mikrospórából fejlődő struktúra makroszkopikus méretűre fejlődött. Amennyiben az indukciós periódus a 5 hetet meghaladta, a struktúrák méretüknél és súlyuknál fogva kifordultak a portokokból és kalluszosodás volt megfigyelhető valamennyi morfortípus táptalajjal érintkező részén. Ezekből a struktúrákból a regenerációs táptalajra passzálást követően alacsony gyakorisággal regeneráltak növények. Megfigyeltük, hogy bár az indukciós fázis 3. hetet követően a portokokban

megfigyelhető volt még néhány, az osztódás korai fázisában levő „elkészt” mikospóra is, az ezek kifejlődésével járó számbeli többlet nem kompenzálta a már kifejlődött struktúrák elkalluszosodásával, illetve előregedésével járó regenerációban bekövetkező csökkenést.

A 4.2.1. fejezetben ismertetett vizsgálat során az A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> és B<sub>3</sub> táptalajra izolált H1, H2 és H3 genotípusú portokokban fejlődött mikospóra eredetű struktúrák között az indukció második hetét követően szín-, állag- és méretbeli különbségeket figyeltünk meg (11. ábra). Függetlenül a genotípustól valamennyi táptalajnál megfigyelhető volt néhány alapvető morfológiai sajátosságú struktúra.



11. ábra A kukorica mikospóra eredetű struktúrák morfortípusai

FA: fehér áttetsző; FK: fehér kompakt; SA: sárga áttetsző; SK: sárga kompakt

#### **4.3.1. Az indukciós táptalajok és a donor növények felnevelési körülményeinek hatása a portokválaszra**

A struktúrákat fehér áttetsző (FA), fehér kompakt (FK), sárga áttetsző (SA) és sárga kompakt (SK) morfortípusokba soroltuk (11. ábra). A fehér stuktúrák átlagos előfordulási gyakorisága 67%, a sárga struktúráké átlagosan 33% volt. A kompakt (46%) és áttetsző (54%) struktúrák közel azonos arányban fordultak elő (19. táblázat).

Az összes kísérletet tekintve a H1 genotípus esetén kaptuk a legnagyobb számú mikrospóra eredetű struktúrát, ezért további vizsgálataink során ennek a genotípusnak tenyészkertben és klímakamrában felnevelt donor növényeit alkalmaztuk.

A szántóföldi nevelésű donor növények portokválasza átlagosan 53%-ban, a mikrospóra eredetű struktúrák száma 67%-ban, a regeneránsok száma 62%-ban maradt el  $P < 0,005$  valószínűségi szinten a klímakamrában nevelt donor növények átlagától.

Vizsgáltuk az indukciós táptalajok és az eltérő nevelési körülmények hatását a kifejlődött mikrospóra eredetű struktúrák morfortípusonkénti megoszlására. A klímakamrai és tenyészkerti eredetű portokokból indukálódott sárga és fehér struktúrák között az áttetsző és kompakt részarány közel azonos volt (19. táblázat). A tenyészkerti eredetű fehér struktúrák esetén az A táptalaj kivételével szignifikánsan megnőtt az áttetsző struktúrák aránya a kompakt struktúrák rovására (19. táblázat).

Szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) a legjobb regenerációs képességű morfortípusnak a fehér kompakt struktúra bizonyult (20. táblázat). Az FA, SA és SK morfortípusok átlagos regenerációs aránya között egy esetet kivéve nem volt szignifikáns különbség (20. táblázat).

19. táblázat Tenyészkerti és klímakamrai nevelésű H1 genotípus mikrospóra eredetű struktúráinak morfortípus szerinti megoszlása eltérő táptalajokon.

Táptalaj	Felnevelési körülmények	MES előfordulási gyakoriság (%)			
		FA	FK	SA	SK
A	K	37 a	31 a	17 b	15 b
	T	32 a	27 ab	21 bc	19 c
B <sub>1</sub>	K	36 a	34 a	16 b	14 b
	T	41 a	25 b	19 c	15 c
B <sub>2</sub>	K	38 a	31 a	19 b	13 c
	T	41 a	30 b	16 c	13 c
B <sub>3</sub>	K	36 a	33 a	13 b	18 b
	T	39 a	26 b	16 c	19 bc

FA: fehér áttetsző; FK: fehér kompakt; SA: sárga áttetsző; SK: sárga kompakt

Az azonos sorban levő betűk eltérése az adatok  $P < 0,05$  szignifikancia szintű különbözőségét jelöli

20. táblázat Tenyészkerti és klímakamrai nevelésű H1 genotípus mikrospóra eredetű struktúráinak regenerációs képessége.

Táptalaj	Felnevelési körülmények	MES regenerációs arány (%)			
		FA	FK	SA	SK
A	K	13,9 a	55,5 b	14,6 a	16,1 a
	T	11,2 a	50,6 b	19,1 a	19,1 a
B <sub>1</sub>	K	12,3 a	56,9 b	14,6 a	16,2 a
	T	10,4 a	53,2 b	15,8 a	20,7 a
B <sub>2</sub>	K	17,2 a	46,0 b	15,5 a	21,3 a
	T	10,0 a	60,2 b	13,1 a	16,7 a
B <sub>3</sub>	K	15,4 a	50,8 b	18,5 a	15,3 a
	T	12,0 a	44,8 b	19,2 a	24,0 c

FA: fehér áttetsző; FK: fehér kompakt; SA: sárga áttetsző; SK: sárga kompakt

Az azonos sorban levő betűk különbözősége az adatok  $P < 0,05$  szignifikancia szintű különbözőségét jelöli

Nem volt szignifikáns különbség az eltérő táptalajok morfortípus-megoszlásra és a morfortípusok regenerációs képességére gyakorolt hatása között (19., 20. táblázat). Nem találtunk szignifikáns különbséget a klímakamrai és tenyészkeri eredetű portokokból indukálódott mikroszpóra eredetű struktúrák egyes morfortípusainak gyakorisága, és azok regenerációs potenciálja között sem (19., 20. táblázat).

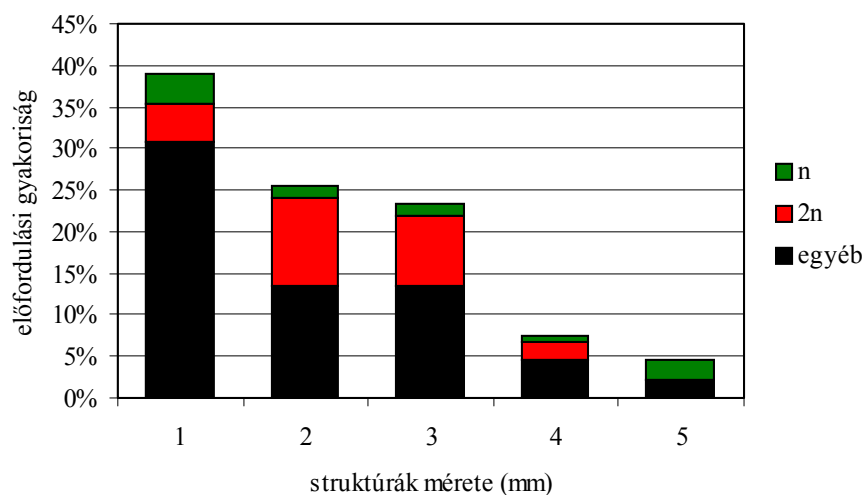
#### **4.3.2. A struktúra méretének és ploiditásának összefüggései**

Előkísérleteket végeztünk a ploiditásvizsgálat megfelelő időpontjának meghatározása céljából. Ezek során megállapítottuk, hogy a ploiditás flow-citometriás meghatározásának optimális ideje a portokok indukciós táptalajra izolálását követő 3. - 4. hét.

Az indukció 3. hetében a mikroszpóra eredetű struktúrák ploiditásának méret szerinti megoszlását vizsgálva a következő összefüggéseket figyeltünk meg: az indukció 3. hetében legtöbb dihaploidot (38%) a színtől és konzisztenciától függetlenül a 2 és 3 mm-es struktúráknál állapítottunk meg, melyek az összpopuláció 49%-át adták.

A 0,5 - 1 mm-es struktúrák aránya 39% volt, és ezen belül mindösszesen 21% bizonyult dihaploidnak. A fennmaradó 79% aneu-, mixo- vagy poliploid volt.

A 3 mm-t meghaladó struktúrák gyakoriságát (12%) és dihaploid arányát (15%) találtuk a legalacsonyabbnak. A leírtakat a 12. ábra szemlélteti.



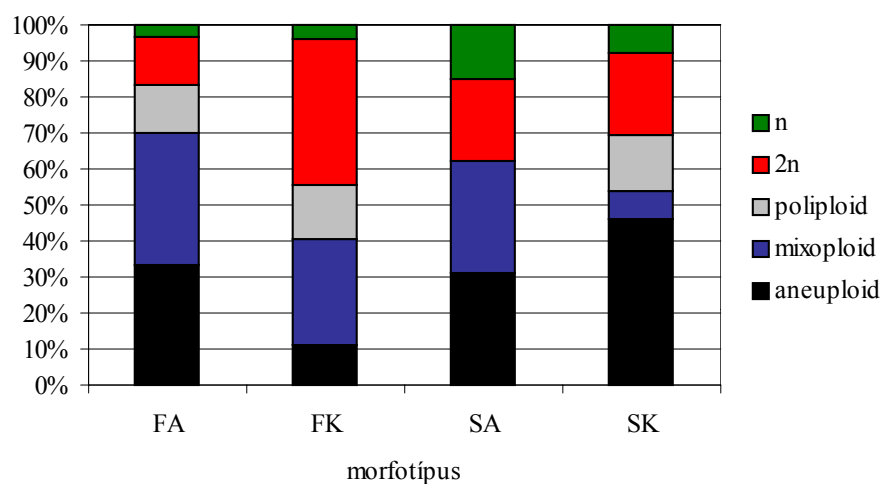
12. ábra A mikrospóra eredetű struktúrák ploiditása méretük függvényében az indukció 3. hetében.

\*az egyéb kategóriába az aneu-, mixo- és poliploid struktúrákat soroltuk

#### 4.3.3. A különböző morfortípusok ploiditása

Mint az a 13. ábrán látható, a legnagyobb számban előforduló, leggyengébb regenerációs képességű fehér áttetsző struktúrák 3%-a haploid, 13%-a dihaploid és 84%-a aneu-, mixo vagy poliploid volt. A legjobb regenerációs képességű fehér kompakt struktúrák 4%-a haploid, 41%-a dihaploid, 56%-a aneu-, mixo- vagy poliploid volt. A sárga áttetsző struktúrák között nem volt poliploid, 15% haploidnak, 23% dihaploidnak, 62% mixo- vagy aneuploidnak bizonyult. A sárga kompakt struktúrák 8%-a haploid, 23%-a dihaploid és 69%-a aneu-, mixo- vagy poliploid volt (13. ábra).

Összességében megállapítható, hogy a dihaploid növények regenerációja szempontjából a 2-3 mm-es FK struktúrák a legperspektívikusabbak.



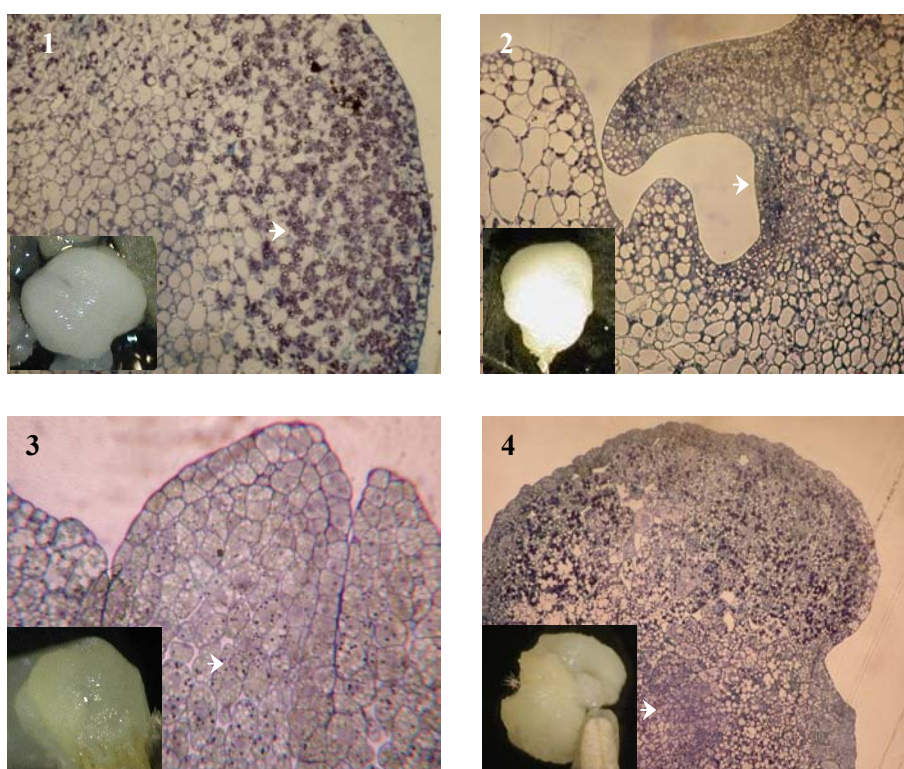
13. ábra A mikrospóra eredetű morfortípusok ploiditás-megoszlása a regenerációs periódus kezdetén.

#### 4.3.4. A mikrospóra eredetű struktúrák szövettani vizsgálata

A szövettani vizsgálatokat morfortípusonként 10 mintán végeztük el. A fehér áttetsző struktúrák vizsgálata során nem figyeltünk meg embryo- vagy organogenezisre utaló szöveti változásokat. A vakuolizált, keményítőt felhalmozó sejtek voltak jellemzőek erre a morfortípusra. A 14. ábra 1. képen nyíllal jelölt keményítő felhalmozódás nem mutatott a szerveződő merisztematikus zónákra jellemző polaritást. A fehér kompakt struktúrákon egyaránt megfigyelhető volt a hajtás- és gyökérmerisztéma szerveződése és közöttük a szállítószöveti elemek kezdeti differenciálódása. A merisztematikus régiókra az apró, nagy sejtmagvú sejtek voltak jellemzők. A régiók külső határán a protoderma kialakulása volt látható (14. ábra, 2. kép, nyíl). A sárga áttetsző struktúrák külsőleg mutattak esetenként organogenezisre utaló morfológiai változásokat, azonban a metszeteket vizsgálva csupán differenciálatlan, lazán kapcsolódó, lipid cseppeket felhalmozó (14. ábra, 3.



kép, nyíl) nagy sejteket figyeltünk meg. A sárga kompakt struktúrákra a felszínen szorosan egymáshoz simuló apró, a struktúra belsejében lazán kapcsolódó nagy, erősen vakuolált, keményítőt felhalmozó sejtek voltak jellemzőek. A struktúrák egyes részein megfigyelhető volt az apró, sűrű citoplazmájú sejtek csoportosulása (14. ábra, 4. kép, nyíl), de azokból csupán szállítószöveti elemek differenciálódása következett be.

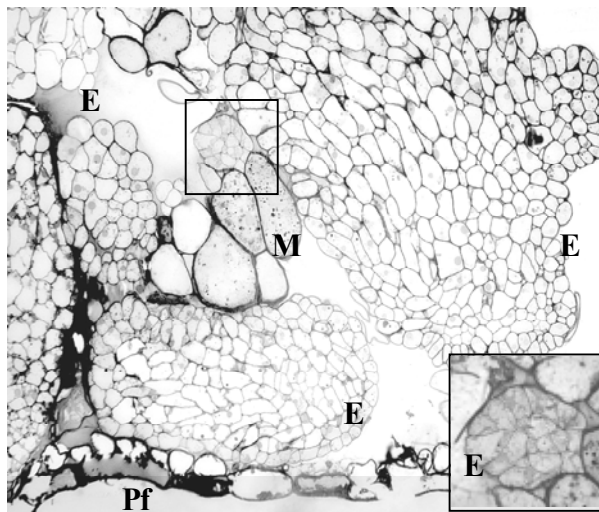


14. ábra A mikrospóra eredetű struktúrák morfológiai jellemzői.

1: fehér áttetsző; 2: fehér kompakt; 3: sárga áttetsző; 4: sárga kompakt.

A morfológiai különbségek a regenerációs fázis során egyre szembetűnőbbé váltak. Mivel az indukció során a mikrospórák osztódása nem egy időben indul meg, a portokból kitörő struktúrák magukon hordozhatnak, vagy magukba zárhatnak olyan kezdeti osztódási fázisban levő mikrospórákat, melyek csak a

regenerációs fázisban válnak megfigyelhetővé (9. ábra). Ez az oka annak, hogy a regenerációs fázisban nem csak az eredetileg szelektált morfortípusok voltak megtalálhatók a tenyészetekben (15. ábra).



15. ábra A nagyobb embriogén struktúra oldalához simuló, a mikrospóra falát éppen felrepszto néhány sejtés proembrió.

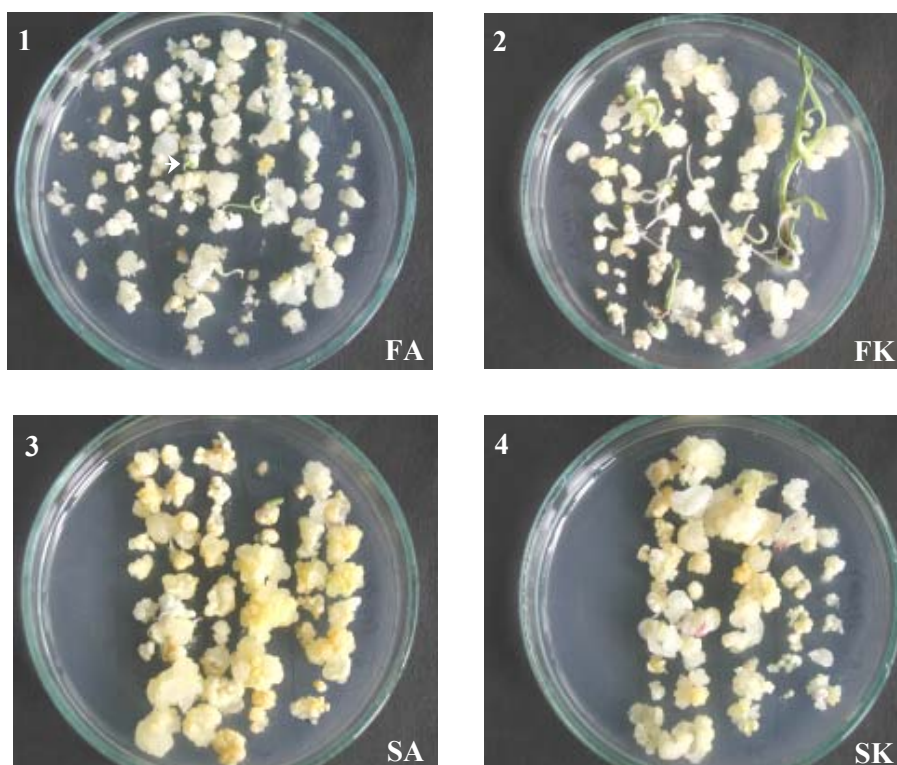
Pf: portok fal; E: embrió; M: mikrospóra.

#### 4.3.5. A regenerációs fázis során bekövetkezett külső morfológiai változások

Az indukció 3. hetét követően a struktúrákat morfortípusonként szelektálva regenerációs táptalajra passzáltuk. Már az inkubáció 1. hetében megindult a fehér kompakt struktúrákból a ritkán elsődleges, zömében másodlagos embriogenezisen át bekövetkező növénydifferenciálódás. A második hétre gyökérrel és hajtással rendelkező, esetenként részben etiolált növénykék is láthatóvá váltak. A 16. ábra 1. kép szemlélteti a nagy számú, ebben a fázisban még csak gyökérrel és apró, zöld hajtással rendelkező regeneránst. Az alacsony regenerációs potenciálú fehér áttetsző struktúrákon is megjelentek apró hajtást

fejlesztő regeneránsok, de ezek nagy része megrekedt a két, esetenként három leveles állapotban és elkalluszosodott (16. ábra, 1. kép, nyíl). Megfigyelhető volt a szalagszerű, fehér képletek megjelenése is. A hólyagszerű, elkalluszosodó struktúrákon gyakran másodlagos embrioidok jelentek meg, melyekből azonban növények nem regenerálódtak.

A sárga kompakt és sárga áttetsző struktúrák közel hasonló, karfiolszerű, belül üreges képletekké növekedtek. Felszínükön nagy számú nem regenerálódó, gyakran antociános elszíneződésű szomatikus embrió volt megfigyelhető. A hólyagszerű képleteken elvétve zöld sávok jelentek meg. A gyökértelen, aljukon gyakorta elkalluszosodó zömök, hajtásszerű képletekből ritkán fejlődtek növények (16. ábra 3., 4. kép).

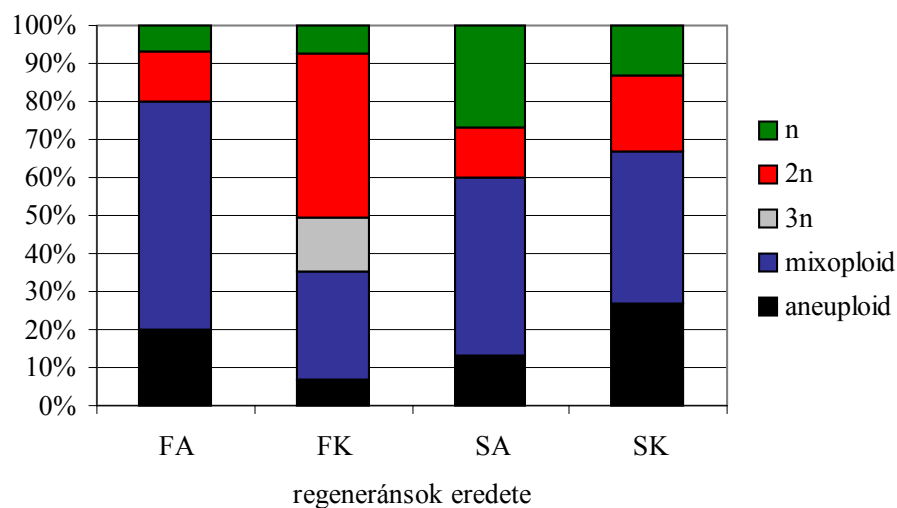


16. ábra Az egyes morfortípusok a regenerációs periódus második hetében.

#### 4.3.6. A regeneránsok ploiditása

Az 5 hetes regenerációs periódus után a növényeket tápkockába ültettük annak érdekében, hogy a felnevelésre szánt dihaploidokat ne pusztítsuk el az áramlási citometriai vizsgálatokhoz szükséges levéltömeg eltávolításával. A kiültetést követő 10. napon mértük a regeneránsok ploiditását.

A leggyengébb regenerációs képességű fehér áttetsző struktúra eredetű növények 80%-a aneu- és mixoploid volt. A növények 7%-a haploidnak, 13%-a dihaploidnak bizonyult (17. ábra). A legtöbb növényt eredményező fehér kompakt struktúra regeneránsainak 43%-a dihaploid, 35%-a aneu- és mixoploid volt. A sárga áttetsző morfortípusból regenerálódott növények 27%-a volt haploid, 13%-a diploid és 60%-a aneu- és mixoploid. A sárga kompakt struktúrákból fejlődő növények 67%-a aneu- és mixoploid, 20%-a dihaploid és 13%-a haploid volt (17. ábra).



17. ábra Az regeneránsok ploiditásának morfortípus szerinti megoszlása.

FA: fehér áttetsző; FK: fehér kompakt; SA: sárga áttetsző; SK: sárga kompakt

Összevetve a mikrspóra eredetű morfortípusok és a belőlük regenerált növények ploeditás megoszlását (13., 17. ábra) a következő tendenciák voltak megfigyelhetők:

A fehér kompakt struktúrák és a belőlük regenerálódott növények ploeditás megoszlása szinte azonos volt, azzal a különbséggel, hogy a haploid regeneránsok aránya magasabb, az aneuploidoké alacsonyabb volt, mint a struktúráké. Kisebb volt a sárga struktúrák esetén a dihaploid növények regenerációs aránya, mint az a struktúrák ploeditás megoszlása alapján várható lett volna.

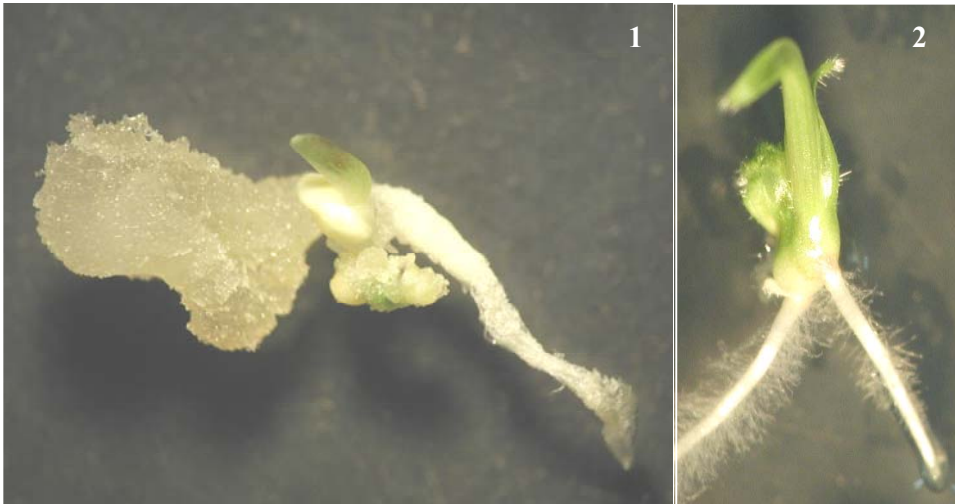
Az euploid és attól eltérő ploidszint részaránya a különböző morfortípusokba tartozó struktúráknál és az azokból regenerált növényeknél közel azonos volt. Valamennyi morfortípus esetén magasabb volt a haploid regeneránsok részaránya, mint a haploid struktúrák előfordulási gyakorisága.

Az aneuploid struktúrák regenerációs gyakorisága valamennyi morfortípus esetén alacsony volt. Ez érthető jelenség, mivel a mikrspóra eredetű struktúrák ploeditásának áramlási citométeres meghatározása során nagy gyakorisággal talákoztunk a haploid kromoszóma mennyiség felét tartalmazó embriókkal vagy kalluszokkal, míg a regeneránsok között ilyen növényeket nem találtunk.

Poliploid növények egyedül a fehér kompakt struktúrákból származó regeneránsok között fordultak elő.

Érdekességként említjük, hogy a portokkultúrákból származó dihaploid regeneránsok G1 és G2 osztódási fázisban levő sejmagjai mintegy 10%-kal több DNS-t tartalmaztak, mint a kontrollként használt diploid H1 genotípusú növények.

A regeneránsok túlnyomó része másodlagos embriogenezissel fejlődött növényé (18. ábra, 1. kép), de primér embriogenezis is megfigyelhető volt (18. ábra, 2. kép). A kromoszóma szám vagy -garnitúra rendellenességű aneu- és mixoploidok a kiültetést követő 2.-3. héten elpusztultak.



*18. ábra Primér (1) és szekundér (2) embriogenezis során létrejött regeneránsok a regeneráció 2. hetében.*

## 5. Eredmények értékelése

### 5.1. A biotesztek alkalmazhatósága a hormonszerű hatás kimutatására

A dolgozatban leírt eredmények alapján megállapítható, hogy a mikroalga és cianobaktérium törzsek kontrollált körülmények közötti felszaporításával és betakarításával biztosítható azok tesztnövényekre gyakorolt hormonszerű hatásának állandó volta. A magasabb rendű növényekhez hasonló módon a mikroalgák és cianobaktériumok anyagcseréje is napi -, más néven cirkadián ritmust mutat (Mittang, 2001; Golden és Canales, 2003). Az algasejtek a tenyészetek korai stacionárius szaporodási fázisában szintetizálják a legnagyobb mennyiségben a környezettel való kapcsolattartásukat szolgáló másodlagos anyagcseretermékeket. Ördög és Pulz (1996) számolt be az *Arthronema africanum* cianobaktérium biomasszája által mutatott citokininszerű hatás napi változásáról, mely során a legmagasabb hatást a megvilágítás kezdetét követő 8. órában mérték. Megfigyelésüket kísérletes munkánk során alkalmazva nem volt ingadozást a törzsek többszöri ismétlésben felszaporított, a tenyészetek szaporodásának korai stacionárius szakaszában, azonos időpontban (15 óra) betakarított mikroalga vagy cianobaktérium biomassza hormonszerű hatása között.

Szoros korrelációt figyeltünk meg a biotesztek alapján szelektált törzsek magas hormonszerű hatása és hormontartalma között. Ez alátámasztja az biotesztek alkalmazhatóságát és egyben nélkülözhetetlenségét a nagy számú mikroalga és cianobaktérium törzs hormonszerű hatásának gyors tesztelésére annak ellenére, hogy a növényi hormontartalom biotesztekre alapozott kimutathatóságát számos kritika érte a múltban (Reeve és Crozier, 1980). A hormonszerű hatás kimutatására szolgáló biotesztek alkalmazásának ellenzői

arra hivatkozva vonták kétségbe a módszer alkalmazhatóságát, hogy az nem alkalmas a hatást kiváltó vegyületek azonosítására és mennyiségük pontos meghatározására. Napjainkban a biológiai minták tényleges növényi hormontartalmának meghatározása rendkívül érzékeny és pontos műszerekkel (GC-MS, HPLC-MS) végezhető el. Alkalmazásukkal azonban nem kapunk információt, a kivonatok növényi szervezetekre gyakorolt hatásáról (Weyers és Paterson, 2001).

## **5.2. A mikroalga és cianobaktérium törzsek IES tartalmának meghatározása**

A talajlakó cianobaktériumok és mikroalgák auxinszerű hatásának vizsgálata napjainkig zömmel indirekt módon, az indolvázias vegyületek jelenlétére utaló kolorimetriás mérések és az auxinszerű hatás kimutatására szolgáló biotesztek révén történt (Misra és Kaushik, 1989; Stirk és mtsai, 2002). Egyetlen cikk számol be diazotróf cianobaktériumok GC-MS módszeres IES meghatározásáról. Sergeeva és munkatársai (2002) egy diazotróf szabadon élő és egy szimbionta *Nostoc* törzs IES tartalmát mutatták ki GC-MS módszerrel. Az általuk vizsgált szabadon élő *Nostoc268* törzs IES tartalma elmarad a dolgozat keretében vizsgált cianobaktériumok és mikroalgák IES tartalmától. A legnagyobb mennyiségű auxint termelő MACC 355 törzs 23-szor magasabb IES-t tartalmazott, mint a nem szimbionta *Nostoc268* törzs. Tudomásunk szerint elsőként igazoltuk talajlakó *Leptolyngbya* faj IES termelését. A vizsgált *Leptolyngbya* törzs 3,9-szer magasabb IES tartalmat mutatott, mint a Sergeeva és munkatársai által vizsgált szabadon élő cianobaktérium. Az MACC 355 törzs kivételével szoros volt a korreláció a biotesztek során kapott IVS egyenérték és a GC-MS mérés során mért IES mennyiség között, ami alátámasztja az uborka sziklevél gyökeresedési teszt alkalmazhatóságát az auxinszerű hatás



kimutatására. Az MACC 355 többszörös esetén az aránytalanság az IVS szupraoptimális koncentrációjának gátló hatásával volt magyarázható. Ezért célszerűnek látjuk, hogy a jövőben az auxinhatás kimutatására irányuló biotesztekben a cianobaktérium és mikroalga törzsek biomasszáját  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ -nél kisebb koncentrációban is megvizsgálják.

*A bioteszt alkalmazásával szelektált auxinhatású mikroalga és cianobaktérium törzsekről GC-MS módszerrel igazoltuk, hogy azok szintetizálnak indol-3-ecetsavat. Elsőként mutattunk ki indol-3-ecetsavat Leptolyngbya cianobaktériumból.*

### **5.3. A cianobaktérium és mikroalga törzsek citokinin tartalmának mennyiségi és minőségi meghatározása**

A szakirodalom szerint az evolúció előrehaladásával változott a növények citokinin összetétele (Auer, 1997). A növények citokinin tartalmuk alapján két nagy csoportra oszthatók. Míg a zöldalgák, mohák és zuzmók izopentenil-adenin és zeatin szabad bázisokat és azok ribozidjait tartalmazzák, addig a nyitva és zárvatermők citokinin tartalma sokkal összetettebb: izopentenil-adenint, zeatint, dihidro-zeatint és azok származékait: ribozidokat, O- és N-glükozidokat tartalmaznak Auer (1997). Mok és Mok (2001) megállapítása szerint a benzil-adenin és benzil-adenin-ribozid szintézisére való képesség a magasabb rendű növényekre jellemző. Vizsgálataink részben megerősítik a fentieket, részben ellentmondanak azoknak. Minél több vizsgálat irányul a mikroalgák és cianobaktériumok citokinin összetételének megállapítására, annál inkább megdőlni látszik ez a citokinin evolúciós elmélet, bár végső következtetések csupán nagy számú vizsgálat után lesznek levonhatók.

Az általunk vizsgált cianobaktériumok és zöldalgák nem tartalmaztak izopentenil-adenint. Csupán két *Chlorella* törzs tartalmazott izopentenil-adenozint. Ez megerősíti Stirk és mtsai (2002) megfigyeléseit. Cianobaktérium és mikroalga törzsek szerves oldószeres kivonatait fracionálták, majd szója kallusz biotesztnben vizsgálták az egyes frakciók citokininszerű hatását. Megfigyelésük szerint a vizsgált cianobaktériumok és mikroalgák nagyon kevés izopentenil-adenint és adenin származékot tartalmaztak. Eredményeink ellentétben állnak Auer (1997) megállapításával, valamint Ördög és mtsai (2004) vizsgálatának eredményével, mely során valamennyi általunk vizsgált zöldalgában mutattak ki izopentenil-adenint és annak ribozidját.

A szabad zeatin bázisok közül a szakirodalommal megegyezően saját méréseink szerint is a *cisz* forma dominált, mintegy 2,5 – 12 szerez mennyiségben. Ez a trend a zeatin-ribozidokra nem volt jellemző, a *cisz* és *transz* forma közel azonos arányban volt jelen a mintákban.

Valamennyi törzs tartalmazott 2-hidroxi-zeatint. Egyedül ennek a citokininnek a mennyiségi meghatározása során volt jelentős eltérés a *Cyanobacteria* és *Chlorophyta* phyllumba tartozó törzsek között, mégpedig az utóbbiak javára. Az eltérés oka véleményünk szerint a mikroalgák eukarióta voltával magyarázható, de ennek kiderítése további vizsgálatokat igényel. A kevés mintaszám okán a mérési eredményekből messzemenő következtetéseket lehetőség szerint nem vonnánk le.

A vizsgált nyolc törzsből ötben mutattunk ki dihidro-zeatint (DHZ) és hétben dihidro-zeatin-ribozidot (DHZR). Ez ellentétben áll az eddigi megfigyelésekkel, mivel a DHZ meglétét a magasabb rendű növények sajátosságának tekintik (Auer, 1997), bár egy zöldalga törzsből Ördög és mtsai (2004) is kimutatták. Egy utalást találtunk prokarióta DHZ és DHZR termelésére, mégpedig Upadhyaya és mtsai (1991) számoltak be arról *Rhizobium* spp. esetén.

Talajlakó mikroalgák benzil-adenin termeléséről Ördög és mtsai (2004) számoltak be először. Eredményeink megerősítik megfigyelésüket. A vizsgált hat zöldalga törzsből négyben kimutattuk a benzil-adenin jelenlétét. Elsőként azonosítottunk benzil-adenint és benzil-adenin-ribozidot cianobaktériumban, mégpedig a legmagasabb citokininhatású és össz-citokinin tartalmú MACC 643 *Anabaena* törzsben.

Tömegspektrumuk alapján három új citokinin vegyületet detektáltunk mikroalga és cianobaktérium törzsekben. Ezek feltételezhetően magas citokinin aktivitású vegyületek. Az MACC 643 magas citokinin hatásának 99%-ért valószínűleg ezek a vegyületek felelősek. A minták HPLC-MS analízise során kapott csúcs retencióidők, illetve a tömegspektrumokban található molekulaion és a jellemző fragmensionok alapján következtettünk arra, hogy a kérdéses vegyületek izopentenil típusú citokininnek. A tömegspektrum a szerkezetre utal, de csak akkor mondhatjuk ki a komponensektől, hogy valójában milyen típusú citokininnek, ha szerves kémiai módszerekkel a komponenseket előállítottuk és azokat HPLC-MS módszerrel visszamérve ugyanazon csúcs retencióidőket, illetve tömegspektrumokat kapjuk. A vegyületek azonosítása szerves kémiai szintézis felhasználásával folyamatban van. A kémiai szintézis után hatásukat biotesztekben is megvizsgáljuk.

A magas citokininhatású MACC 642 cianobaktérium mért citokinin tartalma rendkívül alacsonynak bizonyult. Feltételezésünk szerint ennek a háttérben az analitikai vizsgálat során nem mért vagy jelenleg még ismeretlen citokinin vegyület, vagy egyéb faktor áll, mely kiváltotta a magas citokininszerű hatást. A hatáshoz feltételezhetően hozzájárultak a *Leptolyngbya* vastag kocsonyás burkát alkotó poliszacharidok is.

Mivel az MACC 643, 560 és 553 törzs esetén a citokinin tartalom egy nagyságrenddel kisebb volt, mint a kinetin egyenérték, valamint az MACC 642 törzs citokinin tartalma nagyon alacsonynak bizonyult, annak eldöntésére, hogy

a HPLC vizsgálatot megelőző metanolos feltárás során degradálódik-e a minták citokinin tartalmának egy része, szerves oldószereket alkalmazva extraháltuk az MACC 642 törzs liofilizált biomasszáját, majd elvégeztük az uborka sziklevél növekedési biotesztet. A vizsgálat során alkalmazott vizes metanolos extrahálás után 19%-os hatásnövekedést mértünk a desztillált vizes kivonathoz képest. Mivel a metanolos extrakciót követően a citokininszerű hatás jelentősen megemelkedett, arra következtettünk, hogy a vizes extrahálással nem vonható ki az összes citokinin a biomasszából, annak egy része a sejtörmelékhez kötötten inaktív marad. Megállapítható, hogy a kinetin egyenérték és a citokinin tartalom közötti nagyságrendbeli különbséget a mintákban azonosított természetes citokinineknek a kinetinnél egy nagyságrenddel erősebb hatása okozta, mivel a sziklevelek sokkal érzékenyebbek a természetes, mint a mesterséges citokininekkel szemben (Letham, 1967). A jövőbeni kísérletes munka során célszerűbb lenne a teljes biomassza felhasználása helyett csupán a cianobaktériumok és mikroalgák metanolos kivonatait alkalmazni.

Szerettük volna kideríteni, hogy a magas citokininszerű hatású és hatást nem mutató mikroalga törzsek eltérnek-e citokinin összetételükben. Ezért a HPLC-MS vizsgálatba bevontunk olyan auxinhatású és tartalmú MACC törzseket, melyek a biotesztek során nem, vagy csak kismértékben mutattak citokininszerű hatást. Arra ugyan számítottunk, hogy az analitikai módszerrel ezekben a törzsekben is kimutathatóak lesznek citokininek – mivel a sejtosztódás (citokinézis) elképzelhetetlen citokinin nélkül, de arra nem, hogy ilyen nagy mennyiségben. Eredményeink azt mutatták, hogy nem volt számottevő mennyiség- és megoszlásbeli eltérés a citokininhatású és hatást nem mutató törzsek citokinin összetétele között. Ez a megfigyelés megegyezik Ördög és mtsai (2004) eredményeivel. A citokinin - auxin interakció a szinergizmustól az antagonizmusig terjed, melyet az egyes komponensek aránya befolyásol (Wareing, 1977), így a citokininszerű hatás gátlásában a törzsek által szintetizált

IES is szerepet játszhatott. A közelmúltban számos publikáció számolt be arról, hogy egyes növényi hormonok nem csak egymás hatását befolyásolják, hanem kölcsönösen, koncentráció-függően gátolják, vagy éppen elősegítik egymás szintézisét (McCourt, 1999; Ross és O'Neil, 2001; Nordström, 2004).

*A HPLC-MS analitikai módszerrel meghatároztuk a biotesztek alkalmazásával szelektált citokininhatású mikroalga és cianobaktérium törzsekben található citokininnek mennyiségét és minőségi összetételét. Elsőként azonosítottunk benzil-adenint és benzil-adenin-ribozidot cianobaktériumban. Elsőként mutattunk ki dihidro-zeatin és dihidro-zeatin-ribozid citokininint Leptolyngbya és Anabaena cianobaktérium törzsekből. Tömegspektrumuk alapján új, izopentenil típusú citokinin vegyületeket detektáltunk mikroalga és cianobaktérium törzsekben.*

#### **5.4. Az MACC törzsek kallasztyénészetekre gyakorolt hatása**

A biotesztben szignifikáns hormonszerű hatást mutató, igazoltan hormontermelő MACC 553, 560, 583, 642 és 643 mikroalga és cianobaktérium törzsek hatása igazolást nyert szomatikus eredetű dohány- és androgenetikus eredetű haploid kukorica kallasztyénvonalak esetén is. Ezzel meggyőződünk arról, hogy a törzsek által a biotesztekben mutatott hormonszerű hatás a bioteszektől eltérő rendszerben is megmutatkozott.

A mikroalga és cianobaktérium biomasszában található hormonok hatása nem csökkent az autoklávozással járó hőhatás következtében. A hormonszerű hatás stabil voltát – egyes törzsek esetén kismértékű hatásváltozás, illetve csökkenés - annak tulajdonítjuk, hogy a rövid ideig tartó hőhatás következtében feltárodtak és oldatba kerültek a membránokkal határolt kompartmentekben található hormonhatású vegyületek, de a hőhatás nem okozott jelentős

volumentű degradálódást.

### **5.5. Az MACC törzsek alkalmazhatósága gabonafélék portokkultúráiban**

A kukorica portokok indukcióját kiváltó táptalajok összehasonlításakor megállapítottuk hogy a 2,4-D szintetikus auxinhoz képest a 2,3,5-TIBA auxin transzport inhibitor csökkentette a mikospóra eredetű struktúrák és a regeneránsok számát. Megfigyelésünk megegyezik Bouhamont, (1977), valamint Choi és munkatársai (2001) eredményeivel, akik a 2,3,5-TIBA embriófejlődést gátló hatásáról számoltak be. A KIN és NES szintetikus hormonokat tartalmazó B3 táptalajra izolált portokok in vitro válasza nagymértékben elmaradt a 2,3,5-TIBA-t és 2,4-D-t tartalmazó táptalajokétól, a benne található hormonok mennyisége tehát nem volt elégséges az erős portokválasz kiváltásához.

A kukorica genotípusok portokválasza ugyan mutatott némi MACC törzsbeni specificitást, de az 1 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D-vel kiegészített 1 g·l<sup>-1</sup> MACC 643 törzs univerzális in vitro portokválaszt szignifikánsan megnövelő hatása mindhárom hibrid esetén bizonyítást nyert. Az MACC 643 törzs önmagában egyik vizsgálatunkban sem adott jobb hatást, mint 2,4-D-vel együttesen alkalmazva. Következtetésünk szerint a kontrollt szignifikánsan felülmúló hatást a 2,4-D és az MACC 643 cianobaktériumban található hormonok, vagy hormonhatású vegyületek szinergista hatása okozta. Az alacsony indukciós képességű H3 hibridnél minden MACC törzs esetén a 2,4-D-t is tartalmazó kezelések okoztak magasabb portokválaszt. Ennek oka valószínűleg az alacsony androgenetikus válaszadó képességű genotípus magas endogén auxin szintjében keresendő, melynek lökészerű megemelkedéséhez a 2,4-D hatása nélkülözhetetlennek bizonyult.

H1 genotípus portok indukciója a tenyészkerti időjárási körülmények hatására ugyan csökkent (22%), de korántsem olyan mértékben, mint a mikrospóra eredetű struktúrák (58%) és a regeneránsok (93%) száma. Hasonló csökkenés volt megfigyelhető a H3 genotípus esetén is, melynél a tenyészkerti nevelésű portokok indukciója 62%-kal a mikrospóra eredetű struktúrák száma 65%-kal, a regeneránsok száma 82%-kal maradt el a klímakamrai nevelésű növények azonos paramétereitől. Ez csökkenés a 2002. év május – júniusi aszályos időjárásnak volt tulajdonítható. Május hónap átlaghőmérséklete 2,4 °C-al, június hónapé 1,6 °C-al haladta meg a harminc éves átlaghőmérsékletet. Június első dekádjában 6, második dekádjában 4 hőségnap volt, ami csökkentette a portokokban fejlődő mikrospórák életképességét. A magas hőmérséklet májusban –22,3 mm, júniusban –43,9 mm csapadékhiánnyal társult (Függelék).

A vizsgált két búzafajta esetén a H3 kukorica genotípushoz hasonlóan a 2,4-D-vel kombinált cianobaktérium és mikroalga törzses kezelések magasabb hatást váltottak ki, mint a szintetikus hormonmentes, kizárólag mikroalga vagy cianobaktérium biomasszát tartalmazó kezelések. Az MACC törzsek búza androgenetikus indukálhatóságára gyakorolt hatását vizsgálva ismételtén az 1 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D-vel kiegészített 1 g·l<sup>-1</sup> MACC 643 törzs hatását találtuk a kontrollnál szignifikánsan magasabbnak. Véleményünk szerint ebben az esetben is az algákban található hormonok és a 2,4-D szinergista hatása okozhatta az in vitro portokválasz növekedését.

Annak, hogy a búza esetén – szemben a kukorica portokkultúrák kísérletek eredményeivel - a klímakamrában nevelt növényeknél az algás kezelések nem eredményeztek a kontrollhoz képest kiugró hatást valószínűleg az volt az oka, hogy a búza esetén a cianobaktérium és mikroalga biomassza hormonösszetétele és -tartalma nem volt megfelelő, vagy elegendő az erősebb portokválasz kiváltásához. Ez megegyezik Dolgykh (1994), valamint Weyers és

Paterson (2001) megfigyelésével, mely szerint az egyes hormonokkal szembeni érzékenység tekintetében különbség van fajok, a genotípusok, a növényi szervek és szövettípusok között.

Az Mv Pálma fajtából előállított DH<sub>1</sub> törzsek közül a cianobaktérium törzsek biomasszájával kiegészített táptalajokról származó növények teljesítménye magasabb volt, mint a kontroll táptalajról származó regeneránsoké. Feltételezzük, hogy az egyes búzatörzsek teljesítménybeli eltérése főként a fajtában meglévő genetikai variabilitásnak volt köszönhető, melyhez additív módon hozzájárult a cianobaktérium biomassza növények fiziológiai állapotára gyakorolt pozitív hatása. Amennyiben a a donor Mv Pálma fajtát terméselemeiben és a teljesítményében meghaladó 642f292, 643f144 és 643f232 homozigóta törzsek kiindulási fajtát meghaladó termőképessége és jó beltartalmi értéke igazolást nyer, azok a növénynemesítés számára fajtaelőállítási alapanyagokként lehetnek felhasználhatóak.

Az MACC 643 törzs portoktenyészetekre gyakorolt pozitív hatása mindkét növényfaj esetén bizonyítást nyert. Megítélését bonyolítja, hogy az ismert citokinineket ez a törzs csak rendkívül alacsony koncentrációban tartalmazza. Ennek okán a jövőben folytatni kívánjuk az MACC törzs analitikai elemzését, illetve elvégezzük az abban nagy mennyiségben detektált, tömegspektrumuk alapján izoprenoid citokinin vegyületek azonosítását.

Annak ellenére, hogy a vizsgált genotípusok a donor növények felnevelési körülményeitől függetlenül ugyanazon algtörzs vagy törzsek hatására mutattak pozitív választ, indokoltnak tűnik, hogy a bioaktív anyagok vizsgálata a jövőben kizárólagosan kontrollált körülmények között felnevelt növényanyagra korlátozódjon. A tenyészkerti körülmények között felnevelt növényanyag ugyanis statisztikailag nehezen értékelhető eredményeket ad (magas szórás, évjáráthatás stb.). Ezzel megakadályozzuk, hogy a biotikus és abiotikus



környezeti tényezők hatására bekövetkező portokválaszbeli módosulás elfedje a vizsgálni kívánt természetes táptalaj kiegészítő hatását.

*A biotesztekkel szelektált és analitikai módszeres meghatározás alapján bizonyítottan auxin és citokinin termelő cianobaktériumok és mikroalgák biomasszája önmagában nem, de szintetikus hormonnal kiegészítve növeli a kukorica és a búza in vitro portokválaszt az eddig használt szintetikus táptalajokhoz képest.*

#### **5.6. A legnagyobb számú spontán dihaploid kukorica regeneráns eredményező mikrospóra eredetű struktúra meghatározása**

A kukorica portokkultúrás vizsgálatainak során megfigyeltük, hogy a sporofita úton tovább fejlődő mikrospórákból változatos küllemű embrió- és kalluszszerű struktúrák fejlődtek. A struktúrákat fehér áttetsző, fehér kompakt, sárga áttetsző és sárga kompakt morfortípusokba soroltuk. Vizsgálataink során két kérdésre kerestük a választ: van-e összefüggés a mikrospóra eredetű struktúrák morfológiai jellemzői és regenerációs képessége között, illetve mikor következnek be a struktúrákat alkotó sejtek kromoszómális változásai.

A szántóföldi nevelésű donor növények portokválasza szignifikánsan elmaradt a klímakamrában nevelt donor növények átlagától. Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy 2003-ban volt az elmúlt száz év egyik legmelegebb és legszárazabb tavasza – nyara. Májusban az átlaghőmérséklet 2,7 °C-al, júniusban 3,2 °C-al haladta meg az elmúlt harminc év átlagát. Májusban a csapadék deficit 39,2 mm, júniusban 50 mm volt. A helyzetet súlyosbította, hogy májusban 11, júniusban 17 hőségnap volt. Mindezen időjárási körülmények negatívan befolyásolták a szántóföldi nevelésű donor növények

fiziológiai állapotát, és ezen keresztül a portokjaikban fejlődő mikrospóra anyasejtek fejlődését és ezen keresztül a mikrospórák életképességét.

Brisibe és munkatársainak (2000) búza embriogén kalluszvonalakon végzett megfigyelésével összhangban vizsgálatainkból arra következtettünk, hogy az alkalmazott indukciós táptalajok különbözősége nem volt döntő hatással a mikrospóra eredetű struktúrák egyes morfortípusainak statisztikai megoszlására, sem azok regenerációs képességére. Ugyanez vonatkozott a donor növények felnevelési körülményeire is.

Az indukció 3. hetében struktúrák méretének és ploiditásának összefüggését vizsgálva a legtöbb dihaploid szintől és konzisztenciától függetlenül a 2-3 mm-es struktúrák között fordult elő. Meg kell azonban jegyezni, hogy bár ebben a mérettartományban valamennyi morfortípus előfordult, a struktúrák döntő részét a fehér kompakt típus tette ki.

A struktúrák egyharmadát kitevő fehér kompakt morfortípus 52%-a növényt regenerált, melyek 43%-a dihaploidnak bizonyult. A többi morfortípus átlagos regenerációs gyakorisága és a dihaploid regeneránsok aránya ettől szignifikánsan elmaradt, melyek közül a leggyengébb regenerációs képességgel a legnagyobb arányban (37%) előforduló fehér áttetsző morfortípus bírt (13%). Az eredmények ismeretében meggondolandó hogy elvégezzük-e a nagy portokmennyiséget igénylő vizsgálatok során a nagy számban előforduló, gyenge regenerációs képességű és kevés (13%) dihaploid regeneráns eredményező apró, fehér áttetsző struktúrák időigényes és kevés eredménnyel járó átpasszálását.

Megállapítottuk, hogy a ploiditás flow-citometriás meghatározásának optimális ideje a portokok indukciós táptalajra izolálását követő 3. - 4. hét. Az ennél idősebb struktúrákban nagy mennyiségű keményítő halmozódott fel, mely autofluoreszcenciája miatt megghiúsította a mérést. A 2 hetes struktúrák ploiditás

vizsgálatának azok apró volta, így a mérés objektumául szolgáló sejtmagok kis mennyisége szabott gátat.

Megállapítottuk, hogy az indukció 3. hetére már bekövetkezett a kormoszómakészlet szám- és garnitúrabeli változása.

A szövettani metszeteket elemezve megfigyeltünk olyan, még a pollenfalon belül osztódó embrioidokat, melyek más struktúrákba ágyazódtak be. Ez megerősíti Wilson és munkatársai (1978) azon megállapítását, hogy a mikrospóra eredetű kalluszok mixoploid státuszának az lehet az egyik legfőbb oka, hogy kialakításukban több mint egy pollensejt vesz részt.

Mivel a portokon belül osztódó mikrospórák nem egyenlő eséllyel jutnak a tápanyagokhoz elképzelhető, hogy a kromoszómaszám és -garnitúra változások a tápanyaghiány okozta stressz következményei. Az indukálódott embriók számára lehetővé kell tenni a tápanyagokhoz való hozzájutást, ami kizárólagosan mikrospóra kultúrával, illetve folyékony tápközegű portokkultúrával lenne megoldható. Mivel a kukorica esetén a mikrospóra kultúra csak speciális genotípusok esetén használható (Pescitelli és mtsai, 1990) és több lépcsős, összetett regenerációs fázisból áll (Zheng és mtsai, 2003), így véleményünk szerint az indukció 2. hetét követően a folyékony, 2,4-D mentes tápközegű portokkultúra (float culture) alkalmazása jelenthet megoldást a struktúrák embriogenezisének megerősítésére.

A regeneránsok döntő többsége másodlagos embriogenezissel jött létre. Ez a megfigyelés megegyezik Barnabás és munkatársai (1987; 1999) megállapításával, mely szerint a kukorica mikrospórák első osztódási típusa nagyrészt aszimmetrikus és az androgenetikus fejlődési útra lépett mikrospórákból képződött kalluszok felületi sejtjeiből szomatikus embriók fejlődnek.

Megállapítottuk, hogy a legtöbb spontán dihaploid növény klímakamrában nevelt donor növények portokjaiban indukálódott 2-3 milliméteres fehér kompakt struktúrából regenerálódik.

### 5.7. Gyakorlati alkalmazhatóság

**Nagyszámú, az új hibridek és fajták alapjául szolgáló homozigóta vonal és törzs előállítása válik lehetővé az** alacsony androgenetikus képességű, de kiemelkedő nemesítési - agronómiai értékkel bíró kukorica és búza genotípusok portokválasztát jelentős mértékben megnövelő **1 g·l<sup>-1</sup> MACC643 + 1 mg·l<sup>-1</sup>2,4-D kezelés alkalmazásával.**

**A morfortípusok vizsgálatán alapuló** mikrspóra eredetű **struktúra szelekció alkalmazásával csökkenthető a kukorica portokkultúra munka és eszközigénye.** Meggyőződésünk, hogy **a cianobaktérium és mikroalga kivonatok és a mikrspóra eredetű struktúra szelekció együttes alkalmazása jelentősen megnöveli a portoktenyésztés hatékonyságát.**

A kísérletes munkánk eredményeként szelektált IES és citokinin termelő, a gabonafélék andro- és embriogenezisét elősegítő **cianobaktérium és mikroalga törzseket** a jövőben az ***in vitro* gamétafúzióval előállított, illetve mikroinjektált búza zigóták növényregenerációs rendszerében kívánjuk vizsgálni, és pozitív hatásuk beigazolódását követően alkalmazni.**

**Fontosnak tartjuk, hogy az** általunk vizsgált, gabonafélék portokkultúráiban pozitív hatásúnak bizonyult **MACC törzsek egyéb növényfajok *in vitro* tenyésztése esetén is vizsgálat tárgyát képezzék.** Elsősorban a **dísznövények és gyümölcsfa alanyok mikroszaporításában való**

alkalmazhatóságuk vizsgálatát javasoljuk, mivel ezen rendszerek hatékonyságának növelése **jelentős gazdasági hasznot eredményezhet**.

Amennyiben a jövőben bebizonyosodik az **intakt növényekre gyakorolt pozitív hatásuk**, megnyílhat az út a tényleges mezőgazdasági felhasználásuk felé.

### 5.8. Új tudományos eredmények

1. A Mosonmagyaróvári Alga Törzsgyűjteményből (MACC) indol-3-ecetsavat termelő mikroalga és cianobaktérium törzseket szelektáltunk.

Elsőként mutattunk ki indol-3-ecetsavat *Leptolyngbya* cianobaktériumból.

2. Citokinineket termelő mikroalga és cianobaktérium törzseket szelektáltunk biotesztek alkalmazásával az MACC törzsgyűjteményből.

Elsőként mutattunk ki gyűrűs citokinint: benzil-adenint és benzil-adenin-ribozidot *Anabaena* cianobaktériumból.

Elsőként mutattunk ki dihidro-zeatint *Anabaena*-, valamint dihidro-zeatint és dihidro-zeatin-ribozidot *Leptolyngbya* cianobaktérium törzsekből.

Tömegspektrumuk alapján új, izopentenil típusú citokinin vegyületeket detektáltunk mikroalga és cianobaktérium törzsekben.

3. Kukorica portokkultúrákban a 2,4-D szintetikus auxint helyettesíteni tudtuk az MACC 560, 642 és 643 mikroalga és cianobaktérium törzsekkel. A 643 törzs és a 2,4-D optimális kombinációban szignifikánsan megnövelte az indukciós paramétereket.

Búza portokkultúrákban az  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  643 +  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D kezelés alkalmazásával csökkenthető volt az *in vitro* válasz kiváltásához szükséges 2,4-D szintetikus auxin mennyisége.

4. Meghatároztuk a mikrospóra eredetű struktúrák 2 - 3 mm-es fehér kompakt morfortípusát, amely a legnagyobb számú, a gyakorlati felhasználás szempontjából előnyös spontán dihaploid kukorica regeneránst eredményezte.

Megállapítottuk, hogy az indukálódott kukorica mikrospórák genomjának megkettőződése a tenyésztés harmadik hetéig végbement.

## Összefoglalás

A jelen disszertáció alapjául szolgáló kísérletes munka során a Mosonmagyaróvári Alga Törzsgyűjteményből citokinin- és auxinszerű hatás kimutatására szolgáló biotesztek alapján szelektált, bizonyítottan hormontermelő mikroalga és cianobaktérium törzsek biomasszájának portokkultúrák táptalajaiban való alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

Az uborka sziklevel gyökeresedési bioteszt alkalmazásával szelektált MACC 355, 400, 531, 553, 583 és 642 auxinhatású mikroalga és cianobaktérium törzsekről GC-MS módszerrel igazoltuk, hogy indol-ecetsavat szintetizálnak. Szoros korrelációt figyeltünk meg a biotesztek során kapott IVS egyenérték és a GC-MS mérés során mért IES mennyiség között, ami alátámasztja az uborka sziklevel gyökeresedési teszt alkalmazhatóságát az auxinszerű hatás kimutatására. Elsőként mutattunk ki indol-3-ecetsavat *Leptolyngbya* cianobaktériumból.

A HPLC-MS analitikai módszerrel meghatároztuk az uborka és retek sziklevel megnyúlási biotesztek alkalmazásával szelektált MACC 553, 560, 642 és 643 citokininhatású mikroalga és cianobaktérium törzsekben található citokininek mennyiségét és minőségi összetételét. Az irodalomban található adatokkal ellentétben (Auer, 1997; Mok és Mok, 2001) vizsgálataink során olyan citokinineket mutattunk ki, melyek szintézisét a magasabb rendű növényeknek tulajdonítják. Elsőként azonosítottunk benzil-adenint, benzil-adenin-ribozidot, dihidro-zeatint és dihidro-zeatin-ribozidot cianobaktériumban. Tömegspektrumuk alapján új, izopentenil típusú citokinin vegyületeket detektáltunk mikroalga és cianobaktérium törzsekben.

A talajlakó mikroalga és cianobaktérium törzsek biomasszájának portokkultúrákra gyakorolt hatásáról nincs irodalmi adat. Klímakamrában és tenyészertben nevelt kukorica (*Zea mays* L.) és búza (*Triticum aestivum* L.)



donor növények portokkultúráiban vizsgáltuk a biotesztekkel szelektált, bizonyítottan hormontermelő MACC 553, 560, 583, 642 és 643 törzsek hatását.

Az MACC törzsek biomasszájával ( $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) az 50%-os hormontartalmú és hormonmentes kukorica és búza portok indukciós és regenerációs táptalajokat egészítettük ki. Az  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D-t és az MACC 643 cianobaktérium biomasszáját ( $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) tartalmazó kezelés univerzális, az in vitro portokválaszt az eddig használt szintetikus táptalajokhoz képest szignifikánsan megnövelő hatása mindhárom hibrid esetén bizonyítást nyert. Az alacsony indukciós képességű H3 hibridnél valamennyi MACC törzs alkalmazásakor a 2,4-D-t is tartalmazó kezelések okoztak magasabb portokválaszt. Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy az alacsony androgenetikus válaszadó képességű genotípusnál az endogén indol-3-ecetsav lőkésszerű megemelkedését az MACC törzsekben található hormonok nem tudták biztosítani. Az MACC törzsek búza androgenetikus indukálhatóságára gyakorolt hatását vizsgálva ismételtén az  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D-vel kiegészített  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  MACC643 törzs hatását találtuk a kontrollnál szignifikánsan magasabbnak. A két búzafajta esetén is a 2,4-D-vel kombinált cianobaktérium és mikroalga törzses kezelések magasabb hatást váltottak ki, mint a szintetikus hormon mentesek. Véleményünk szerint ebben az esetben is az algákban található hormonok és a 2,4-D szinergista hatása okozhatta az in vitro portokválasz növekedését.

Vizsgálatokat végeztünk a legnagyobb számú spontán dihaploid kukorica regeneráns eredményező mikrospóra eredetű struktúra meghatározására. A portokkultúrákban indukálódott mikrospóra eredetű struktúrák morfológiai sajátosságainak, ploiditásának és a különböző morfortípusok növényregenerációs képességének összefüggéseit tártuk fel vizsgálataink során. Megállapítottuk, hogy a legtöbb spontán dihaploid növény klímakamrában nevelt donor növények portokjaiban indukálódott 2-3 milliméteres fehér kompakt struktúrából regenerálódik.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni az Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézete Vezetőségének, hogy lehetővé tette számomra a disszertáció elkészítését.

Hálásan köszönöm témavezetőm Dr. Barnabás Beáta tudományos igazgatóhelyettes asszony figyelmes segítségét és szakmai iránymutatását, mellyel a haploidindukció területén végzett munkámat kísérte és lehetővé tette.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ördög Vince intézetigazgató úrnak szakmai irányításáért és segítségéért mellyel a mikroalga-biotechnológia területén végzett munkámat a kezdetektől támogatta.

Köszönöm Dr. Bartók Tibornak a növényi hormonok analitikai kimutatása során nyújtott segítségét.

Köszönöm az MTA MgKI Szaporodásbiológiai Csoport kutatóinak a szakmai kérdések megvitatásában nyújtott segítségét és az asszisztenciának a lelkiismeretes technikai közreműködést.

Köszönettel tartozom a Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Növényélettan és Növényi Biotechnológia Tanszék valamennyi munkatársának segítőkészségükért és támogatásukért.

## Irodalomjegyzék

- Allard, R. W.** 1960. General features of inbreeding depression and heterosis. In: Allard, R. W. (ed.), Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, New York, pp. 213-223.
- Aloni, R.** 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. J. Plant Growth Regul. 20: 20-34.
- Andersen, S. B, Due, I. K., Olesen, A.** 1987. The response of anther culture in genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding 99: 181-186.
- Anonymous, 401 Research Group** 1975. Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays*. Acta Genet. Sin. 2: 143.
- Armstrong, C. L., Green, C. E.** 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164: 207-214.
- Arshad, M., Frankenberger, W. T.** 1998. Plant Growth-Regulating Substances in the Rhizosphere: Microbial Production and Functions. In: Sparks, D. L. (ed.), Advances in Agronomy, Academic Press, San Diego, pp. 45-151.
- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, O., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N. H., Sandberg, G.** 2000. An alternative cytokinin biosynthesis pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14778-14783.
- Ateeq, B., Farah, A. M., Ali, M. N., Ahmad, W.** 2001. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. Mutat. Res. 514: 105-113.
- Auer, C. A.** 1997. Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. Plant Growth Reg. 23: 17-32.

- Ball, S. T., Zhou, H., Konzak, C. F.** 1993. Influence of 2, 4-D, IAA and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Sci.* 90: 195-200.
- Bandurski, R. S., Cohen, J. D., Slovin, J. P., Reinecke, D. M.** 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P.J. (ed.), *Plant Hormones*, Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 39-65.
- Barciszewski, J., Rattan, S. I. S., Siboska, G., Clark, B. F. C.** 1999. Kinetin – 45 years on. *Plant Sci.* 148: 37-45.
- Barnabás, B., Franz, P.F., Schel, J. N. H.** 1987. Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 6: 212-215.
- Barnabás, B., Sági, L., Szakács, É.** 1986. In vitro növényregenerálás búza antérakultúrákból. *Napjaink biotechnológiája. A 2. Növényi sejtgenetikai és Szövettenyésztési szimpózium Előadásai.* Budapest, OMIK-OMFB, pp. 100-101.
- Barnabás, B., Sági, L., Szakács, É.** 1987. Androgenetikus haploidok előállítása búzánál és kukoricánál. *A biotechnológia jelentősége a mezőgazdaságban.* VEAB, Veszprém, pp. 28-32.
- Barnabás, B., Pfahler, P. L., Kovács, G.** 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Gen.* 81: 675-678.
- Barnabás, B., Obert, B., Kovács, G.** 1999. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep.* 18: 858-862.
- Barnabás, B., Szakács, E., Karsai, I., Bedő Z.** 2000. *In vitro* androgenesis of wheat from fundamentals to practical application. In: Bedő, Z., Láng, L. (eds.) *Wheat in a Global Environment.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 517-525.

- Barnabás, B.** 2003. Anther culture of maize (*Zea mays* L.). In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 103-108.
- Barnabás, B.** 2003. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 65-76
- Bayliss, W. M., Starling, E.** 1904. The chemical regulation of the secretory process. Proc. Royal Soc. B73: 310-322.
- Bell, J. K., McCully, M. E.** 1970. A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays*. Protoplasma 70: 179-205.
- Biondi, N., Piccard, R., Margheri, M. C., Rodolfi, L., Smith, G. D., Tredici, M. R.** 2004. Evaluation of Nostoc Strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. Appl. Environ. Microbiol. 70(6): 3313-20.
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E., Begner, A. D.** 1922. A haploid mutant in *Datura stramonium*. Science 55: 646-647.
- Bouharmont, J.**, 1977. Cytology of microspores and calli after anther culture in *Hordeum vulgare*. Caryologia 30: 351-360.
- Boussiba, S.** 1988. *Anabaena azollae* as a nitrogen biofertilizer. In: Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M. C., Karamanos, Y., Moryan, H., Christiaen, D. (eds.), Algal Biotechnology, Elsevier Applied Sciences, England, pp. 169-178.
- Brettel, R. I. S., Thomas, E., Wernicke, W.** 1981. Production of haploid maize plants by anther culture. Maydica 26: 101-111.
- Briggs, W. R., Baskin, T. I.** 1988. Phototropism in higher plants – controversies and caveats. Botanica Acta 101: 133-139.

- Brisibe E. A., Gajdosova, A., Olesen, A., Andersen, S. B.** 2000. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat. *J. Exp. Bot.* 51(343): 187-196.
- Bronsema, F. B. F., van Oostveen W. J. F., Prinsen, E., van Lammeren, A. A. M.** 1998. Distribution of [<sup>14</sup>C] dichlorophenoxyacetic acid in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. *J. Plant Growth Regul.* 17: 81-88.
- Buta, J. G., Spaulding, D. W.** 1994. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. *J. Plant Growth Regul.* 13: 163-166.
- Büter, B.** 1997. *In vitro* haploid production in maize. In: Jain, S. M., Sopory, S.K., Veilleux, R. E. (eds), *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, Vol. 4. Kluwer, Dordrecht, pp 37-71.
- Cannell, R. J. P., Owsianka, A. M. & Walker, J. M.** 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *Br. Phycol. J.* 23: 41-4.
- Carapico, F., Teixeira, G., Diniz, M. A.** 2000. *Azolla* as a biofertilizer in Africa. A challenge for the future. *Revista de Ciências Agrárias* 23 (3-4): 120-138
- Chase, S. S.** 1952. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44: 263-267.
- Chaudhury, A. M., Letham, S., Craig, S., Dennis, E. S.** 1993. AMP1 – a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J.* 4: 907-916.
- Cho, M. S., Zapata, F. J.** 1988. Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice *Oryza sativa* L., cv. Taipei. *Plant Sci.* 58: 239-244.

- Choudhury, A. T. M. A. és Kennedy, I. R.** 2004. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biol. Fert. Soils* 39(4): 219-227.
- Choi, Y. E., Katsumi, M., Sano, H.** 2001. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Sci.* 160: 1183-1190.
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Chien, N. P., Yin, K. C., Hsu, C.** 1973. Investigation on the induction and morphogenesis of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants. *Acta Bot. Sin.* 15: 1-11.
- Chu, C. C.** 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Plant Tissue Culture, Proceedings of the Beijing Symposium, 1981*, Pitman, Boston, pp. 43-50.
- Chu, C. C., Hill, R. D., Brücé-Babel, A.** 1990. High frequency of plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci.* 66: 255-266.
- Chuang, C. C., Ouyang, T. W., Chia, H., Chou, S. M., Chink, C. K.** 1978. A set of potato media for wheat anther culture. In: *Plant Tissue Culture. Proc. Symp. Beijing, 1981*, Pitman, Boston, pp. 51-56.
- Cleland, R. E.** 1987. Auxin and cell elongation. In: *Davies, P.J., (ed.) Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pp. 132-148.
- Cline, M. G.** 1997. Concept and terminology of apical dominance. *Am. J. Bot.* 84: 1064-1069.
- Coumans, M. P., Sohota, S., Swanson, E. B.** 1989. Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep.* 7: 618-621.
- Crouch, I. J., van Staden, J.** 1991. Evidence for rooting factors in a seaweed concentrate prepared from *Ecklonia maxima*. *J. Plant Phys.* 137: 319-322.

- Crouch, I. J., Smith, M. T., van Staden, J., Lewis, M. J., Hoad, G. V.** 1992. Identification of auxins in a commercial seaweed extract/concentrate. *J. Plant Physiol.* 139: 590-594.
- Custers, J. B. M., Gordewener, J. H. G., Nöllen, Y., Dons, J. J. M., Van Lookeren-Campagne, M. M.** 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 13: 267–271.
- Dadhich, K. S., Varma, A. K., Venkataraman, G. S.** 1969. The effect of *Calothrix* inoculation on vegetable crops. *Plant Soil* 31: 377-379.
- Darwin, C.** 1876. *The Effects of Cross and Self Fertilization in the Vegetable Kingdom*. New York, D. Appleton & Co. p. 482.
- Darwin, C.** 1880. *The Power of Movement in Plants*, Muray, London.
- De, P. K.** 1939. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-fields. *Proc. Royal Soc. Lond. B* 121-139.
- De Buysse, J., Henry, Y.** 1980. Induction of haploid and diploid plants through in vitro anther culture of haploid wheat ( $n = 3x = 21$ ). *Theor. Appl. Genet.* 57: 57-58.
- De Buysse, J., Henry, Y.** 1986. Wheat: Production of haploids, performance of doubled haploids, and yield trials. In: Bajaj Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 2. Crops 1., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 73-88.
- Demule, M. C. Z., Decaire, G. Z., Decano, M. S., Dehalperin, D. R.** 1991. Bioactive compounds from *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria). *Cytobios* 66 (266-267): 169-172.
- den Boer, B. G. W., Murray, A. H.** 2000. Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* 10: 245-250.



- Dieu, P., Beckert, M.** 1986. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from in vitro cultured anthers in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 31: 245-259.
- Dolgykh, Y. I.** 1994. Establishment of callus cultures and regeneration of maize plants. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Maize*, Vol. 25, Springer, Berlin, pp. 197-209.
- Ernstsen, A., Sandberg, G.** 1986. Identification of 4-chloroindole-3-acetic acid and indole-3-aldehyde in seeds of *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 68: 511-518.
- Evans, M. L.** 1985. The action of auxin on plant cell elongation. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2: 317-365.
- Evans, R. D., Johansen, J. R.** 1999. Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18 (2): 183-225.
- Farooqi, A. H. A., Shukla, Y. N., Shukla, N., Bhakuni, D. S.** 1990. Cytokinins from marine organisms. *Phytochem.* 29(7): 2061-2063.
- Fernandez Valiente, E., Ucha, A., Quesada, A., Leganes, F., Carreres, R.** 2000. Contribution of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from <sup>15</sup>N-labeled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant Soil* 221: 109–114.
- Ferrie A. M. R., Palmer C. E., Keller W. A.** 1995. Haploid embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (ed.), *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer, Dodrecht, pp 309-344.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., Falkowski, P.** 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237-240.
- Filippini, F., Trezi, M., Cozzani, F., Vallone, D., Lo Schiavo, F.** 1992. Modulation of auxin-binding proteins in cell suspensions. II. Isolation and initial characterization of carrot cell variants impaired in somatic embryogenesis. *Theor. Appl. Gen.* 84: 430-434.

- Fischer, C., Neuhaus, G.** 1996. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant J.* 9: 659-669.
- Fischer, C., Speth, V., Fleig-Eberenz, S., Neuhaus, G.** 1997. Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of auxin polar transport. *Plant Cell* 9: 1767-1780.
- Fitting, H.** 1910. Weitere entwicklungsphysiologische untersuchungen an Orchideenbluten. *Wiss. Bot.* 44: 177-253.
- Fletcher, R. A., McCulloch, D.** 1971. Cytokinin-induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons. *Planta* 101: 88.
- Frankerberger, W. T., Arshad, M.** 1995. *Phytohormones in Soils: Microbial Production and Function.* Marcel Dekker, New York, p. 503.
- Fry, S. C., Wangerman, E.** 1976. Polar transport of auxin through embryos. *New Phytol.* 77: 313-317.
- Gaillard, A., Vergne, P., Beckert, M.** 1991. Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plan Cell Rep.* 10: 55-58.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M Ayres, D. P. Sharma, E. Firoozabady.** 1983. Rapid flow cytophotometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049–1051.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G., Palme, K.** 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Genovesi, A. D.** 1990. Maize (*Zea mays* L.) *in vitro* production of haploids. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12, *Haploids in Crop Improvement I*, Springer Verlag, New York, pp.176-203.
- Genovesi, A. D., Collins, G. B.** 1982. *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22: 1137-1144.

- Genovesi, A. D., Yingling, R. A.** 1994. Isolated microspore and anther culture of corn. United States Patent, Patent Number: 5,322,789, June 21 1994, United States Patent and Trademark Office, Washington DC, USA.
- Gevrek, M. N.** 2000. A study on Azolla as a nitrogen source in rice farming. Turk. J. Agric. For. 24: 165-172.
- Golden, S. S., Canales, S. R.** 2003. Cyanobacterial circadian clocks – Timing is everything. Nature Rev. Microbiol. 1 (3): 191-199.
- Goldsmith, M. H. M.** 1977. The polar transport of auxin. Annu. Rev. Plant Physiol. 28:439-478.
- Gosal, S. S., Sindhu, A. S., Sandhu, J. S., Sandhu-Gill, R., Singh, B., Khehra, G. S., Sidhu, G. S., Dhaliwal, H. S.** 1997. Haploidy in rice. In: Jain, S. M., Sopory, S. K., Veilleux, R. E. (eds.), In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 4. Kluwer, Dodrecht, pp. 1-35.
- Gregory, L. E.** 1956. Some factors for tuberization in the potato. Ann. Bot. 41: 281-288.
- Guha, S., Maheshwari, S. C.** 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*, Nature 4957: 497.
- Guha, S., Maheshwari, S. C.** 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. Nature 5057: 97-98.
- Guivarc'h, A., Rembur, J., Goetz, M., Roitsch, T., Noin, M., Schmülling, T., Chriqui, D.** 2002. Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. J. Exp. Bot. 53: 621–629.
- Gustafson, V. S., Baenziger, P.S., Wright, M. S., Stroup, W. W., and Yen, Y.** 1995. Isolated wheat microspore culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 42: 207-213.

- Haagen-Smit, A. J., Dandliker, W. B., Wittwer, S. H., Murneek, A. E.** 1946. Isolation of 3-indolacetic acid from immature corn kernels. *Amer. J. Bot.* 33: 118-120.
- Haberlandt, G.** 1913. Zur Physiologie der Zellteilung. *Sitzber. K. Preuss. Akad. Wiss.* p. 318.
- Hadfi, k., Speth, V., Neuhaus, G.** 1998. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* 125: 879-887.
- Hamaoka, Y., Fujita, Y., Iwai, S.** 1991. Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiol. Plant.* 82: 67-72.
- Harlan, H. V., Martini, M. L.** 1936. Problems and results in barley breeding. In: *Yearbook of Agriculture 1936*, US Department of Agriculture. (<http://barley.ipk-gatersleben.de/archives/Harlan&Martini1936.htm>)
- Harlin, M. M., Darley, W. M.** 1988. The algae: an overview. In: Lembi, C. A., Jones, M. C. (eds.), *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 3-27.
- Harpstead, D. D.** 1975. Man-molded cereal: hybrid corn story. In: Haye, J. (ed.), *The 1975 yearbook of agriculture: what we may eat*. US Gov. Washington DC, pp. 213-224.
- He, D. G., Ouyang, J. W.** 1983. Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. *Plant Sci. Lett.* 3: 71-79.
- Heszky, L., Mesch, J.** 1976. Anther culture investigation in cereal gene bank collection. *Z. Pflanzenzüchtg.* 77: 187-197.
- Heszky, L. E., Simon-Kiss, I. Binh, D. Q.** 1996. Release of rice variety 'DAMA' developed through haploid somaclone breeding. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 36. Somaclonal variation in Crop Improvement II. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 46-54.

- 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: 89-96.
- Hong, Y. P., Chen, C. C., Cheng, H. L., Lin, C. H.** 1995. Analysis of auxin and cytokinin activity of commercial aqueous seaweed extract. Gartenbauwissenschaft 60(4): 191-194.
- Hu, H.** 1997. In vitro induced haploids in wheat. In: Jain, M. S. (ed.), In vitro haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 73-97.
- Hu, T. C., Kasha, K. J.** 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome 42 (3): 432-441.
- Hu, C. X., Zhang, D. L., Liu, Y. D.** 2004. Research progress on algae of the microbial crusts in semiarid regions. Prog. Nat. Sci. 14(4): 289-295.
- Hu, H., Yang, H. Y.** 1986. Haploids of higher plants in vitro. China Academic Publishers, Beijing, Springer-Verlag, Berlin.
- Huang, B., Sunderland, N.** 1982. Temperature stress pretreatment in barley anther culture. Ann. Bot. 49: 77-88.
- Iliæ, N., Östin, A., Cohen, J.D.** 1999. Different inhibition of indole-3-acetic acid and tryptophan biosynthesis by indole analogues. I. Tryptophan-dependent IAA biosynthesis. Plant Growth Regul. 27: 57-62.
- Jablonski, J. R., Skoog, F.** 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith callus. Physiol. Plant. 7: 16-24.
- Jacobs, W. P., Falkenstein, K., Hamilton, R. H.** 1985. Nature and amount of auxin in algae: IAA from extracts of *Caulerpa paspaloides* (Siphonales). Plant Physiol. 78: 844-848.
- Jähne, A., Lörz, H.** 1995. Cereal microspore culture. Plant Sci. 109: 1-12.

- Jiménez, V. M.** 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13(2): 196-223.
- Jiménez, V. M., Bangerth, F.** 2001. Hormonal status of maize explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci.* 160: 247-257.
- Johansson, L.** 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiol. Plant.* 59: 397-403.
- Kakimoto, T.** 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677-685.
- Kasha, K. J., Kao, K.N.** 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874-876.
- Keller, W. A., Armstrong, K. C.** 1978. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzenzucht.* 80: 100-108.
- Knop, W.** 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. *Landw. Vers. Sta.* 7:93.
- Kögl, F., Haagen-Smit, A.J.** 1931. Über die Chemie des Wuchsstoffs. *K. Akad. Wetenschap. Amsterdam Proceedings. Section Science* 34: 1411-1416.
- Kögl, F., Haagen-Smit, A.J., Erxleben, H.** 1934. Über ein neues Auxin ("Heteroauxin") aus Harn. *XI. Z. Physiol. Chem.* 228: 90-103.
- Kovács, G., Kovács, M., Barnabás, B.** 1992. A genotípus és az indukciós táptalaj hatásának vizsgálata kukorica antérakultúrában. *Növénytermelés* 41(3): 193-200.
- Ku, M. K., Cheng, W. C., Kuo, L. C., Kuan, Y. L., An, H. P., Huang, C. H.** 1978. Induction factors and morphocytological characteristics of pollen-derived

plants in maize (*Zea mays*). In: Plant Tissue Culture. Proc. Symp. Beijing, 1981, Pitman, Boston, pp. 35-42.

**Kumari, T. S., Vaidyanath, K.** 1989. Testing of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) using multiple genetic assay system of plants. *Mutat. Res. Lett.* 226: 235-238.

**Kuo, C, Guo, Z. C, Li, Z, Gui, Y.** 1994. Anther culture for rice improvement in China. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 14. Rice, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 151-179.

**Kuraishi, S.** 1959. Effect of kinetin analogs on leaf growth. *Sci. Pap. Coll. Gen. Ed. Univ. Tokyo* 9: 67.

**Kyo, M., Harada, H.** 1985. Studies on conditions for cell divisions and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol.* 79: 90-94.

**Last, D. I., Brettell, R. I. S.** 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep.* 9:14-16.

**Lazar, M. D., Baenziger, P. S., Schaeffer, G. W.** 1985. The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 102: 99-107.

**Letham, D. S.** 1963. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* 2: 569-573.

**Letham, D. S., Shannon, J. S., McDonald, I. R.** 1964. The structure of zeatin, a factor inducing cell division. *Proc. Chem. Soc.* 230-231.

**Letham, D.S.** 1967. Regulators of cell division in plant tissues. *Planta* 74:228-242.

**Letham, D. S.** 1971. Regulators of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. *Physiol. Plant.* 25: 391.

- Liu, W. G., Zheng, M. Y., Polle, E. A., Konzak, C. F.** 2002. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci.* 42 (3): 686-692.
- Ludwig-Müller, J., Hilgenberg, W.** 1995. Characterization and partial purification of indole-3-butyric acid synthetase from maize (*Zea mays*). *Physiol. Plant.* 94: 651-660.
- Maluszynsky, M., Kasha, K. J., Szarejko, I.** 2003. Published protocols for other crop species. In: Maluszynsky, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual.* Kluwer, Dordrecht, pp 309-337.
- Mandal, N., Gupta, S.,** 1995. Effect of genotype and culture medium on androgenic callus formation and green plant regeneration in indica rice. *Indian J. Exp. Biol.* 33: 761-765.
- Marburger, J. E., Sammonds, D. J., Schaeffer, G. W.** 1987. Effect of a modified potato medium on anther culture of wheat. *Crop Sci.* 27: 351-354.
- Maróti, M.** 1976. A növényi szövettenyésztés. Akadémiai Kiadó, Budapest, 89. old.
- McCourt, P.** 1999. Genetic analysis of hormone signalling. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 50: 219-243.
- Mejza, S. J., Morgant, V., DiBon, D. E., Wong, J. R.** 1993. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep.* 12: 149-153.
- Metting, F. B.** 1981. The systematics and ecology of soil algae. *Bot. Rev.* 47: 195-312.
- Metting, F. B.** 1988. Micro-algae in agriculture. In: Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. (eds.), *Micro-algal Biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge pp. 289-303.



- Metting, F. B.** 1991. Biological surface features of semiarid lands and deserts. In: J. Skujins (ed.), *Semiarid Lands and Deserts. Soil Resource and Reclamation*. Marcel Dekker, New York. pp. 257-293.
- Miao, S. H., Kuo, C. S., Kwei, Y. L., Sun, A. T., Ku, S. Y., Lu, W. L., Wang, Y. Y.** 1978. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: *Plant Tissue Culture. Proc. Symp. Beijing, Pitman, 1981, Boston*, pp. 23-34.
- Michalczuk, L., Cooke, T. J., Cohen, J. D.** 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochem.* 31: 509-521.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Saltza, M. H., Strong, F. M.** 1955. Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 2662-2663.
- Miller, C. O.** 1956. Similarity of some kinetin and red light effects. *Plant Physiol.* 31: 318.
- Misra, S., Kaushik, B. D.** 1989. Growth substances of cyanobacteria. II. Detections of amino acids, sugars and auxins. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad. B* 55:5-6.
- Mitchell, J. C., Petolino, J. F.** 1991. Plant regeneration from haploid suspension and protoplast cultures from isolated microspores of maize. *J. Plant Physiol.* 137(5): 530-536.
- Mittag, M.** 2001. Circadian rhythms in microalgae. *Int. Rev. Cytol.* 206: 213-247.
- Mok, D. W., Mok, M. C.** 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rew. Plant Mol. Biol.* 52: 89-118.
- Molisch, H.** 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie*. Fischer, Jena. pp. 106.
- Murashige, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- Nagarajah, H., Neue, U., Alberto, M. C. R.** 1989. Effect of *Sesbania*, *Azolla* and rice straw incorporation on the kinetics of NH<sub>4</sub>, K, Fe, Mn, Zn and P in some flooded rice soils. *Plant Soil*. 116: 37–48.
- Nitsch C.** 1981. Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In: Thorpe, T. A. (ed.), *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, pp. 241-252.
- Nitsch, C., Andersen, S., Godard, M., Neuffer, M. G., Sheridan, W. F.** 1982. Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In: Earle, E. D., Demarly, Y. (eds.), *Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture*, Praeger, New York, pp 69-91.
- Nordström, A.** 2004. Cytokinins in *Arabidopsis*, Tools, Pathways and Interaction with Auxin. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå.
- Normanly, J., Cohen, J. D., Fink, G. R.** 1993. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-dependent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90: 10355-10359.
- Ogawa, T., Fukuoka, H., Ohkawa, Y.** 1994. Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice. *Breed. Sci.* 44: 75-77.
- Olsen, F.** 1987. Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagines as nitrogen sources. *Carlsberg Re. Commun.* 52: 393-404.
- Orshinsky, B. R., Sadasivaiah, R. S.** 1985. Effects of media on embryoid induction and plant regeneration from cultures of soft white spring wheats (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* 121: 103-109.
- Orshinsky, B. R., McGregor, L. J., Johnson, G. I. E., Hucl, P., Kartha, K. K.** 1990. Improved embryoid formation and green plant regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.* 9: 365-369.

- Ouyang, J., Hu, H., Chuang, C. C., Tseng C. C.** 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sin.* 16: 79-95.
- Ouyang, J. W., Jia, S. E., Zhiang, C., Chen, X., Geng, G.** 1989. A new synthetic medium (W<sub>14</sub>) for wheat anther culture. *Annu. Rep. Genet. Sin.* Beijing, pp. 91-92.
- Ouyang, J., Shao, X., Li, J.** 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24: 327-333.
- Ördög, V.** 1981. Apparatus for laboratory algal bioassay. *Internat. Revue Ges. Hydrobiol.* 67: 127-136.
- Ördög, V., Pulz, O.** 1995. Potential use of microalgae in the crop production. 2<sup>nd</sup> European Workshop on Biotechnology of Microalgae, September 11-12. Bergholz-Rehbrücke, pp. 123-126.
- Ördög, V., Pulz, O.** 1996. Diurnal changes of cytokinin-like activity in a strain of *Arthonema africanum* (Cyanobacteria), determined by bioassays. *Alg. Stud.* 82: 57-67.
- Ördög, V., Stirk, W. A., van Staden, J., Novák, O., Strnad, M.** 2004. Endogenous cytokinin in three genera of microalgae from the Chlorophyta. *J. Phycol.* 40(1): 88-95.
- Painter, T. J.** 1993. Carbohydrate polymers in desert reclamation: the potential of microalgal biofertilizers. *Carboh. Polym.* 20: 77-86.
- Pasternak, T., Prinsen, T., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H., Dudits, D., Fehér, A.** 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 129: 1807-1819.
- Pauk J.** 1985. Production of haploid plants of maize (*Zea mays* L.) through androgenesis. *Cereal Res. Commun.* 13: 47-53.

- Pauk, J., Kertész, Z., Beke, B., Bóna, L., Csosz, M., Matuz, J.** 1995. New winter wheat variety: 'GK Delibab' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. *Cereal Res. Commun.* 23(3): 251-256.
- Pena-Valdivia, C. B., Rodriguez-Gracia, R.,** 1999. Free amino acids in maize (*Zea mays* L.) anthers during microsporogenesis. *Cereal Res. Commun.* 27(4): 395-402.
- Petolino, J. F., Jones, A. M.** 1986. Anther culture of elite genotypes of maize. *Crop Sci.* 26: 1072-1074.
- Petolino, J. F., Thompson, S. A.** 1987: Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.* 74: 284-286.
- Petolino, J. F., Genovesi, A. D.** 1994. Anther and microspore culture. In: Freeling, M., Walbot, V. (eds.), *The Maize Handbook*, Springer-Verlag, New York, pp. 701-704.
- Pescitelli, S. M., Johnson, C. D., Petolino, J. F.** 1990. Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique reduced temperature and sucrose level. *Plant Cell Rep.* 8: 628-631.
- Raghavan, V.** 1978. Origin and development of pollen embryoids and pollen in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane). *Am. J. Bot.* 65: 984-1002.
- Raghavan, V.** 1997. Embryogenic development of pollen grains. In: *Molecular Embryology of Flowering Plants*, Cambridge Univ. Press, New York, p. 505.
- Rakoczy-Trojanowska, M., Smiech, M., Malpszy, S.** 1997. The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48: 15-21.
- Rao, D. L. N., Burns, R.G.** 1990a. Use of blue-green algae and bryophyte biomass as a source of nitrogen for oil-seed rape. *Biol. Fertil. Soils* 10: 61-64.

- Rao, D. L. N., Burns, R. G.** 1990b. The effect of surface growth of blue-green algae and bryophytes on some microbiological, biochemical, and physical soil properties. *Biol. Fertil. Soils* 9: 239-244.
- Rashid, A.** 1988. Induction of haploid plant/cell. In: *Cell Physiology and Genetics of Higher Plants*, Vol 1. CRC, Boca Raton, pp. 119-158.
- Rayle, D. L., Cleland, R. E.** 1970. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
- Redha, A., Islam, S. M. S., Büter, B., Stamp, P., Schmid, J. E.** 2000. The improvement in regenerated doubled haploids from anther culture of wheat by anther transfer. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63: 167-172.
- Reeve, D. R., Crozier, A.** 1980. Quantitative analysis of plant hormones. In: MacMillan, J. (ed.) *Hormonal regulation of Development I. Molecular Aspects of Plant Hormones. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 9.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 203-280.
- Reynald, P. A., Metting, B.** 1988. Colonization potential of cyanobacteria on temperate irrigated soils in Washington State, USA. *Biol. Agric. Hortic.* 5(3): 197-208.
- Ripley, B. S., Kiguli, L. N., Barker, N. P.** 2003. *Azolla filiculoides* as a biofertiliser of wheat under dry-land soil conditions. *South Afr. J. Bot.* 69(3): 295-300.
- Rodgers, G. A., Bergman, B., Henriksson, E., Urdis, M.** 1979. Utilization of blue-green algae as biofertilizers. *Plant Soil* 52: 99-107.
- Rodrigo, M. J., García-Martínez, J. L.** 1998. Hormonal control of the parthenocarpic ovary growth by the apical shoot in pea. *Plant Physiol.* 116: 511-518.
- Ross, J., O'Neill, D.** 2001. New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci.* 6: 2-4.

- Salkowski, E.** 1885. Über das Verhalten der skatolcarbonsäure im Organismus. Zeitschr. Physiol. Chem. 9: 23-33.
- Sandreson, K. J., Jameson, P. E.** 1986. The cytokinins in a liquid seaweed extract: could they be the active ingredients? Acta Horticult. 179: 113-116.
- Sanderson, K. J., Jameson, P. E., Zabkiewicz, J. A.** 1987. Auxin in a seaweed extract: Identification and quantitation of indole-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry. J. Plant Physiol. 129: 363-367.
- Schaeffer, G. W., Baenziger, P. S., Worley, S.** 1979. Haploid plant development from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. Crop Sci. 19: 697-702.
- Schwender, J., Gemünden, C., Lichtenthaler, H. K.** 2001. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. Planta 212: 416-423.
- Sekine, M., Ichikawa, T., Kobayashi, M., Sakurai, A., Syono, K.** 1988. Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamide in *Bradyrhizobium* spp.. Plant Cell Physiol. 29: 867-874.
- Sergeeva, E., Liaimer, A. and Bergman, B.** 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. Planta 215: 229-238.
- Shull, G. H.** 1909. A pure - line method in corn breeding. Rep. Am. Breeders' Ass. 5: 51-59.
- Singh, A. L., Singh, P. K., Sing, P. L.** 1988. Effects of different herbicides on the *Azolla* and blue-green algal biofertilization of rice. J. Agric. Sci. Camb. 111: 451-458.
- Skoog, F., Miller, C. O.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.
- Sopory, S. K.** 1979. Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther culture of dihaploid *Solanum tuberosum*. Can. J. Bot. 57: 2691-2694.

- Sozinov, A., Luksansuks, S., Ignatova, S.** 1981. Anther cultivation and induction of haploid plants in *Triticale*. *Z. Pflanzenzücht* 86: 272-285.
- Spurr, A. R.** 1969. A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26: 31-43.
- Srivastava, L. M.** 2002. How do hormones cause cell expansion? In: *Plant Growth and Development. Hormones and Environment*. Academic Press, San Diego, pp. 362-370.
- Stirk, W. A.** 1997. Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. *J. Appl. Phyc.* 9: 327-330.
- Stirk, W. A., van Staden, J.** 1997. Comparison of cytokinin and auxin-like activity in some commercially used seaweed extract. *J. Appl. Phycol.* 8: 503-508.
- Stirk, W. A., Ördög, V., van Staden, J.** 1999. Identification of the cytokinin *iso*-pentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 35: 89-92.
- Stirk, W.A., Ördög, V., Van Staden, J., Jäger, K.** 2002. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phyc.* 14: 215-221.
- Sunderland, N., Dunwell, J. M.** 1974. Pathways in pollen embryogenesis. In: Street, H. E. (ed.), *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, London, pp. 141-167.
- Sunderland, N., Dunwell, J. M.** 1977. Anther and pollen culture. In: Street, H. F. (ed.) *Plant Tissue and Cell Culture*, University of California Press, Berkeley, pp. 223-265.
- Sunderland, N., Wicks, F.** 1971. Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* 22: 213-226.

- Szakács, É., Barnabás, B.** 1988. Cytological aspects of in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) using fluorescent microscopy. Sex. Plant Reprod. 1: 217-222.
- Szakács, É., Kovács, G., Pauk, J., Barnabás, B.** 1989. Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep. 7: 127-129.
- Tay, S. A. B., MacLeod, J. K., Palni, L. M. S., Letham, D. S.** 1985. Detection of cytokinins in a seaweed extract. Phytochem. 24(11): 2611-2624.
- Taya, Y., Tanaka, Y., Nishimura, S.** 1978. 5I-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostellium discoideum*. Nature 271: 545-547.
- Thimann, K. V., Skoog, F.** 1933. Studies on the growth hormones of plants. III. The inhibition action of growth substance on bud development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 19: 714-716.
- Thimann, K. V.** 1936. Auxins and the growth of roots. Am. J. Bot. 23: 561-569.
- Thomas, C., Bronner, R., Molinier, J., Prinsen, E., van Onckelen, H., Hahne, G.** 2002. Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. Planta 215(4): 577-583.
- Thomas, W. T. B., Forster, B. P., Gertsson, B.** 2003. Doubled haploids in breeding. In: Maluszinsky, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko I. (eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual, Kluwer, Dordrecht, pp. 309-337.
- Ting, Y. C., Yu, M., Zheng, W. Z.** 1981. Improved anther culture of maize (*Zea mays*). Plant Sci. Lett. 23: 139-145.
- Tischner, T., Kőszegi, B., Veisz, O.** 1997. Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. Acta Agron. Hung. 45: 85-104.



- Touraev, A., Heberle-Bors, E.** 1999. Microspore embryogenesis and in vitro pollen maturation in tobacco. In: Hall, R. D. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. III, *Plant Cell Culture Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 281-291.
- Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., Heberle-Bors, E.** 1996a. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant Reprod.* 9(4): 209–215.
- Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E.** 1996b. Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.* 15: 561-565.
- Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E.** 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci. Rev.* 2(8):297–302.
- Tsay, H. S., Miao, E. H., Widholm, J. M.** 1986. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *J. Plant Physiol.* 126: 33-40.
- Upadhyaya, N. M., Letham, D. S., Parkar, C. W., Hocart, C., W., Dart, P. J.** 1991. Do rhizobia produce cytokinins? *Biochem. Intl.* 24: 123-130.
- van Hove, C., Lejeune, A.** 2002. The *Azolla-Anabaena* symbiosis. *Biology and Environment. Proceedings of the Royal Irish Academy* 102(1): 23-26.
- van Overbeek, J., Conklin, M. E., Blakeslee, A. F.** 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos. *Science* 94: 350.
- van Overbeek, J., Siu, R., Haagen-Smith, A. J.** 1944. Factors affecting the growth of *Datura* embryos *in vitro*. *Am. J. Bot.* 31:219.
- van Overbeek, J., Tukey, H. B., Went, F. W., Muir, R. M.** 1954. Nomenclature of chemical plant regulators. *Plant Physiol.* 29: 307-308.
- van Staden, J., Bayley, A. D., Upfold, S. J., Drewes, F. E.** 1990. Cytokinins in cut carnation flowers. VIII. Uptake, transport and metabolism of benzyladenine and the effect of benzyladenine on flower longevity. *J. Plant Physiol.* 135: 703-707.

- Van Winkle, S. C., Johnson, S., Pullman, G. S.** 2003. The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Cell Biol. Morphogen.* 21: 1175-1182.
- Venkataraman, G. S., Neelakantan, S.** 1967. Effect of cellular constituents of the nitrogen-fixing blue-green alga *Cylindrospermum muscicola* on growth of rice seedlings. *J. Gener. Microbiol.* 13: 53-58.
- Von Sachs, J.** 1880. Stoff und Form der Pflanzenorgane. I. Arb. Bot. Inst. Wurzburg, 2: 452-488.
- Wan, Y., Duncan, D. R., Rayburn, A. L., Petolino, J. F., Widholm, J. M.** 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled-haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 81: 205-211.
- Wang, C. C., Chu, C. C., Sun, C. S., Wu, S. H., Yin, K. C., Hsu, C.** 1973. The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured *in vitro*. *Sci. Sin.* 16: 218-222.
- Wareing, P. F.** 1977. Growth substances and integration in plants. In: Jennings, D. H. (ed.) *Integration of Activity in the Higher Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 337-365.
- Watanabe, I.** 1951. Effect of nitrogen fixing blue-green algae on the growth of rice plants. *Nature* 168: 748-749.
- Wassom, J. J., Mei, T. R., Rocheford, T. R., Widholm, J. M.** 2001. Interaction of environment and ABA and GA treatments on the maize anther culture response. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64: 69-72.
- Weatherhead, M. A., Bourdon, L., Henshaw, G. G.** 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol.* 89: 141-147.
- Weyers, J. D. B., Paterson, N. W.** 1987. Quantitative assessment of plant hormone sensitivity with reference to stomatal responses to abscisic acid. In:

Karssen, C. M., van Loon, L. C., Vreugdenhill, D. (eds.) Progress in Plant Growth Regulation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 226-236.

**Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B.** 1984. Anther culture of cereals and grasses. In: Vasil, I. K. (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Academic Press, New York.

**Wetmore, R. H., Rier, J. P.** 1963. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. Am. J. Bot. 50: 418-430.

**Weyers, J.D.B., Paterson, N.W.** 2001. Plant hormones and the control of physiological processes. New Phytol. 152: 375-407.

**Wickson, M., Thimann, K. V.** 1958. The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. Physiol. Plant. 11: 62.

**Wilson, H. M., Mix, G., Foroughi-Wher, B.** 1978. Early microspore divisions and subsequent formation of microspore callus at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare*. J. Exp. Bot. 29: 227-238.

**Wu, Y. T., Lin, C. H.** 2000. Analysis of cytokinin activity in commercial aqueous seaweed extract. Gartenbauwissenschaft, 65: 170-173.

**Xu, Z. H., Sunderland, N.** 1981. Glutamine, inositol and conditioning factors in the production of barley pollen callus in vitro. Plant Sci. Lett. 23: 161-168.

**Yamada, K., Sekiya, J., Koshimizu, K.** 1971. Cytokinin-induced shoot formation. Phytochem. 11: 1019-1021.

**Zhang, W., Yamane, H., Takahashi, N., Chapman, D. J., Phinney, B. O.** 1989. Identification of a cytokinin in the green-alga *Chara globularis*. Phytochem. 28(2): 337-338.

**Zhao, Z. R., Wu, Z. L., Huang, G. Q., Li, G. R.** 1992. An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. J. Plant Growth Regul. 11: 209-213.

**Zheng, M. Y., Weng, Y., Sahibzada, R., Konzak, C. F.** 2003. Isolated microspore culture in maize (*Zea mays* L.), production of doubled-haploids *via*

induced androgenesis. In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 95-102.

**Zhou, J. Y., Yang, H. Y.** 1980. Anther culture and androgenesis of *Hordeum vulgare* L.. Acta Bot. Sin. 22: 211-215.

**Zhu, Y. X., Davies, P. J.** 1997. The control of apical bud growth and senescence by auxin and gibberellin in genetic lines of peas. Plant Physiol. 113: 631-637.

**Zulpa, G., Zaccaro, M. C., Boccazzi, F., Parada, J. L., Storni, M.** 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on "wood blue stain" fungi. Biol. Contr. 27 (3): 345-348.

*A 2002. év május – június hónapok csapadék és hőmérsékleti adatai.*

Hónap	Dekád	Csapadék (mm)			Átlaghőmérséklet (°C)			Hőségnapok száma ( $t_{\max} > 30^{\circ}\text{C}$ )
		2003	30 éves átlag	Eltérés	2003	30 éves átlag	Eltérés	
május	1.	18,9	18	0,9	17,9	14,8	3,1	0
	2.	10	16	-6,0	19	17,0	2,0	0
	3.	4,8	22	-17,2	19,5	17,3	2,2	0
június	1.	20,9	26	-5,1	17,9	19,1	-1,2	6
	2.	7,3	22	-14,7	23	19,5	3,5	4
	3.	0,9	25	-24,1	23	20,6	2,4	0

*A 2003. év május – június hónapok csapadék és hőmérsékleti adatai.*

Hónap	Dekád	Csapadék (mm)			Átlaghőmérséklet (°C)			Hőségnapok száma ( $t_{\max} > 30^{\circ}\text{C}$ )
		2002	30 éves átlag	Eltérés	2003	30 éves átlag	Eltérés	
május	1.	0,0	18	-18,0	19,9	14,8	5,1	4
	2.	11,8	16	-4,2	17,7	17,0	0,7	2
	3.	5,0	22	-17,0	19,5	17,3	2,2	5
június	1.	13,6	26	-12,4	24,6	19,1	5,5	9
	2.	9,0	22	-13,0	22,5	19,5	3,0	3
	3.	0,4	25	-24,6	21,8	20,6	1,2	5

