

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

CITOPLAZMATIKUS ÉS KROMOSZÓMÁLIS SZABÁLYOZÁS

A BÚZA (*Triticum aestivum* L.)

ANTÉRAKULTÚRÁBAN

Sági László

1989

**"There are two types of inheritance:  
nuclear and unclear."**

***(B. Ephrussi)***

## Tartalomjegyzék

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| BEVEZETÉS                                         | 1  |
| IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS ÉRTÉKELÉS                  | 5  |
| ANYAG ÉS MÓDSZER                                  | 13 |
| Növényanyag                                       | 13 |
| Kromoszómavizsgálat                               | 13 |
| Antérakultúra                                     | 16 |
| EREDMÉNYEK                                        | 19 |
| Az alloplazmás vonalak vizsgálatának eredményei   | 19 |
| A transzlokációs vonalak vizsgálatának eredményei | 25 |
| AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE                          | 28 |
| Citoplazmatikus hatás                             | 28 |
| A transzlokációk hatása                           | 32 |
| ÖSSZEFOGLALÁS                                     | 35 |
| IRODALOMJEGYZÉK                                   | 37 |

## Táblázatok

|              |    |
|--------------|----|
| 1. táblázat. | 14 |
| 2. táblázat. | 15 |
| 3. táblázat. | 17 |
| 4. táblázat. | 20 |
| 5. táblázat. | 21 |
| 6. táblázat. | 23 |
| 7. táblázat. | 24 |
| 8. táblázat. | 26 |

## **BEVEZETÉS**

Haploid szervezetek, szervek, sejtek mindenütt körülvesznek bennünket. Még a "modern" nagyvárosi ember is nap mint nap találkozik velük a parkokban, botanikus kertekben, virágkiállításokon vagy egyszerűen csak a munkahelyén, a lakásán. A lombos mohák és a hajtásos növények, pl. a páfrányok előtelepeitől a virágos növények pollensejtjeiig a haploidok gyakran látható, ám nem szembetűnő vagy szabad szemmel láthatatlan, de mindenképpen elmaradhatatlan kísérői hétköznapi életünknek. Ezt használják fel rutinszerűen a kriminalisztikában, de még a turini lepel hitelességének vizsgálatai során is.

A növényvilág evolúciójának egyik alapszabálya, hogy a szabályos kétszakaszos nemzedékváltakozású (diplobionta) szervezetek életciklusában a törzsfelföldés során a haploid gametofiton nemzedék térben és/vagy időben fokozatosan redukálódik. A gazdasági szempontból jelentős növényfajok döntő többsége - meddig még? - a zárvatermők törzsébe tartozik, ahol a haploid nemzedék már a mikroszkópikus tartományba zsugorodik. Nem véletlenül adta **Heslop-Harrison** egyik review-jának a "*The forgotten generation ...*" címet (1980), melyben ennek az elméleti szempontból addig elhanyagolt nemzedéknek a jelentőségére hívta fel a figyelmet. Bár a hatás nem maradt el, a professzor részben már nyitott kapukat döngetett. A sejt- és szövettenyésztési technikák (antéra- majd

mikrospóra-, ovárium- és ovulumkultúrák), elsősorban tapasztalati úton ugyan, már eljutottak arra a szintre, hogy *in vitro* tenyésztéssel nagyszámú haploidot lehessen előállítani még a néhány sejtre redukálódott gametofitonból is. Az addig és azóta felhalmozódott tudás pedig lassan elérhetővé teszi a következő lépést, a növényi ivarsejtek izolációját és *in vitro* manipulációját.

Az ivaros szaporodás adta evolúciós előnyök miatt a természet - sajnos (vagy szerencsére?) - meglehetősen szűkmarkú volt a magasabbrendű növények, így a gabonafélék *in vivo* haploidelőállításának lehetőségeit kutatókhoz (Blakeslee et al. 1922, Katayama 1934, Kihara 1940, Chase 1948, Kihara és Tsunewaki 1962, Kermicle 1969, Hagberg és Hagberg 1980). Talán ez is közrejátszott abban, hogy a különböző növényfajokból történő sikeres *in vitro* haploidelőállításról beszámoló közlemények sorozatából (Guha és Maheshwari 1964, Bourgin és Nitsch 1967, Niizeki és Oono 1968, Clapham 1971, Gresshoff és Doy 1972, Ouyang et al. 1973) úgy tűnhetett, csak metodikai akadályokat kell leküzdeni, és tömegesen lehet termelni a haploidokat. A felfokozott várakozást a mindenképpen kecsegtető, de ma még csak szórványos gyakorlati eredmények mellett azóta az is lehütötte, hogy világossá vált: az *in vitro* haploidelőállítás módszere elméletileg még nem teljesen megalapozott, és számos időközben felmerült probléma vár tisztázásra.

Kevéssé ismert többek között a folyamat genetikai szabályozása, a gametoklonális variáció magyarázata, vagy a regenerált növények egyes esetekben,

elsősorban a gabonaféléknél, nagyfokú albinizmusának az oka. Nem minden részletében tisztázott az *in vitro* haploidok morfogenezisének folyamata sem.

Visszatekintve a mából, a gabonafélék antéra-kultúrájának genetikai szabályozásával kapcsolatos kutatást 3 szakaszra lehet bontani:

- a tenyésztés *in vitro* és *in vivo* feltételeinek optimalizálásával párhuzamosan, genotipusos variáció feltárása a kallusz- v. embrió-indukciót ill. a növényregenerációt mutató paraméterekre (kb. a nyolcvanas évek elejéig);
- az eltérő reakciójú genotipusokból kialakított hagyományos genetikai elrendezések (reciprok keresztezések; diallél populációk;  $F_1$ , backcross és  $F_2$  nemzedékek) és genetikai vonalak (addíciós, aneuploid és szubsztitúciós sorozatok) segítségével a genetikai szabályozás klasszikus vizsgálata ill. kromoszómaszintű lokalizációja (napjainkig);
- a regeneránsok genomiális és citoplazmatikus DNS-vizsgálatával az *in vitro* tenyésztés által előidézett genetikai variabilitás, valamint az albinizmus vizsgálata, ebben a szakaszban a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) mint genetikai marker bevezetése forradalmasítja az *in vitro* haploidok kutatását (Rivard et al. 1989) (napjainkban);

A Haeckel-törvény ebben az esetben kiterjeszthető a biológiai evolúcióról a szellemi mozgásra is, hiszen a magasabb szintű szakasz magában foglalja és feltételezi az előző lépcsőfok(ok) bejárását, megismerését.

A búza antérakultúrával végzett munkám előrehaladtával a tenyésztés optimális körülményeinek meghatározásától az én érdeklődésem is fokozatosan a genetikai szabályozás kérdései felé fordult. Ebben a dolgozatban a citoplazmának ill. az 1BL.1RS és 1AL.1RS transzlokációnak a búza antérakultúrában játszott szerepével kapcsolatban végzett munkámat foglaltam össze.



## IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS ÉRTÉKELES

A gabonafélék *in vitro* haploidindukciójának genetikai szabályozásáról viszonylag kevés közlemény látott napvilágot, és olykor azok is ellentmondanak egymásnak. (Meg kell jegyezni, hogy más növényfajoknál - pl. dohány, repce, burgonya - alig végeztek ilyen vizsgálatokat, mert technikai nehézségek miatt a genetikai úton történő javítás igénye fel sem merült.)

Az egyik ilyen vitatott kérdés: az *in vitro* haploidindukció sporofitikus vagy gametofitikus kontroll alatt áll-e?

**Ouyang** (1986) megfigyelései szerint 17  $F_1$  hibridből 15 (88%) mutatott a szülői átlagnál magasabb, és 12 (71%) a jobbik szülőét - egyes esetekben többszörösen - meghaladó, heterotikus embrióindukciót. Ha azonban a szuperdomináns regeneránsokból újabb antérakultúrát indított, minden esetben az embrióindukció kisebb-nagyobb mértékű csökkenését tapasztalta. Mivel a heterózishatás a donornövények heterozigótaságához kötődött, és elveszett, ha azok homozigóta állapotba kerültek, továbbá mivel a mikrospórák hemizigóta állapotban vannak és csak a sporofitikus szövet lehet heterozigóta, a szerző arra következtetett, hogy az embrióindukció főleg sporofitikus gének által szabályozott.

**Picard és De Buyser** eredményei (1977) első látásra homlokegyenest ellenkezőek és gametofitikus kontrollra utalóak. Két fajtánál és egy  $F_1$  hibridnél azt kapták, hogy az eredeti genotípusokét

többszörösen felülmúlta a belőlük indított dihaploid vonalak embrióindukciója. Hiányosságai ellenére ezt a közleményt mindmáig gyakran idézik, mert tápot adott annak a reménynek, hogy az *in vitro* tenyésztéssel közvetlenül lehetne szelektálni jó embriogén genotípusokat. Ez feltétlenül vonzóbbnak tűnhetett a másik alternatíva által kínált hagyományos, keresztezéses úton történő javításnál. A szerzők egy hipotézisben (**Rives és Picard 1978**) összegezve, eredményeiket **Waddington** genetikai asszimilációs teóriájához (1961) kapcsolták, mely szerint az indukált vagy spontán mindig előforduló ritka fenotípusok a szelekció során fixálódhatnak. Mindezzel azonban még nem magyarázták a tapasztalt ugrásszerű növekedést. Ugyanakkor figyelmen kívül hagyták azt az egyáltalán nem mellékes tényt, hogy a dihaploid vonalak antérakultúráját nem azonnal, hanem csak 3-4 öntermékenyítés után iktatták be. Ezenfelül ugyanebben a kísérletben látható, hogy egy, dihaploid vonalakból előállított  $F_1$  hibrid heterotikus embrióindukciót mutatott (**Picard és De Buyser 1977**).

A további idevágó eredmények is nehezen értékelhetők, mert a teljes kísérletnek mindig csak a felét végezték el. Vagy csak az  $F_1$  hibridek reakcióját hasonlították a szülőkéhez, vagy fajtákat viszonyítottak ( $F_1$  hibridek helyett) a belőlük indított dihaploid vonalakhoz. Ezekből a kísérletekből a következők körvonalazódtak. Az  $F_1$  hibridek az embrióindukció és a növényregeneráció szempontjából egyaránt jórészt felülmúlták a szülők átlagát őszi árpánál (**Foroughi-Wehr és Friedt 1984**), búzánál (**Lazar et al. 1984b**) és tritikálénál (**Charmet és**

**Bernard** 1984), és gyakran meghaladták a jobbik szülőt is. Az így kapott dihaploid vonalak *in vitro* reakcióját azonban már nem vizsgálták tovább. Ugyanakkor **Lazar et al.** (1984a) a **Kitt** búzafajtát és dihaploid vonalait összehasonlítva a fajta jobb embrióindukcióját és regenerációját tapasztalták, és ennek alapján az antérakultúra *per se* szelekciós eszközként való felhasználhatósága ellen foglaltak állást. Hasonló következtetésre jutott tritikálénál **Charmet és Bernard** (1984). **Agache et al.** (1989) szintén azt tapasztalták búzánál, hogy a szülővonalak embrióindukcióban és növényregenerációs képességben egyaránt felülmúlták dihaploid vonalaikat.

E két részleges kísérleti elrendezés eredményei tehát kiegészíteni látszanak egymást, és azt az alternatívát támasztják alá, hogy a mikrospóra haploidindukció főleg sporofitikus szabályozás alatt áll. Ezt többé-kevésbé öntudatlanul egyébként szinte minden szerző már elfogadta, amikor a keresztezéses úton történő genetikai javítást javasolta és alkalmazta (**Bullock et al.** 1982, **Foroughi-Wehr et al.** 1982, **Lazar et al.** 1984b, **Charmet és Bernard** 1984).

Ugyanezt igazolja már önmagában is az a tény, hogy felvetődött a második kérdéscsoport: milyen jellegű genetikai szabályozás és génhatások működnek közre az *in vitro* haploidindukcióban?

Ebben a vonatkozásban már sokkal egybehangzóbbak az eredmények. Az embrióindukció és a növényregeneráció genetikailag meghatározott kvantitatív tulajdonságok, és ezek szabályozása egymástól

eltérő és független, amint azt kimutatták tavaszi árpánál (**Foroughi-Wehr et al.** 1982), búzánál (**Lazar et al.** 1984a, 1984b) és tritikálénál (**Charmet és Bernard** 1984). Ahol a kísérleti elrendezés (diallél,  $F_2$  és reciprok  $BC_1$  nemzedékek) lehetővé tette a matematikai elemzést, általában az additív génhatásokat emelték ki (**Lazar et al.** 1984b, **Charmet et al.** 1985, **Deaton et al.** 1987), de **Dunwell et al.** (1987) az árpa mikrospóra embrióindukcióra és növényregenerációra nem-allélikus kölcsönhatásokat ill. episztatikus génhatást is kimutattak. Egyes szerzők az embrióindukcióra és a növényregenerációra szűkebb vagy tágabb értelemben vett örökölhetőségi értékeket is meghatároztak, de ezek nagy szórást mutattak: búzánál 0,6-0,7 (**Lazar et al.** 1984b) ill. egy kombinációban 0,9 (**Deaton et al.** 1987), tritikálénál 0,5-0,6 (**Charmet és Bernard** 1984) és árpánál 0,2-0,3 (**Dunwell et al.** 1987) értékkel.

Fentiek fényében természetesen felmerült a harmadik kérdés is: melyik kromoszómákon találhatóak a szabályozó gének?

Az első ilyen irányú vizsgálatokat **Shimada és Makino** (1975) végezte a Chinese Spring tavaszi búzában előállított ditelocentrikus sorozattal. Az ő eredményeiket azonban óvatosan kell kezelni, mert antérakultúrát csináltak ugyan, de csupán szomatikus eredetű filament-kalluszokat kaptak.

**Henry és De Buyser** (1985) jól regeneráló vonalakat vizsgálva felfigyelt arra az összefüggésre, hogy az 1B/1R transzlokáció jelenléte serkentette a növényregenerációt, és feltételezték,

hogy az 1R rozs kromoszóma rövid karján (1RS) ezzel kapcsolatos gén(ek) található(k).

**Lazar et al.** (1987) a Chinese Spring/Imperial rozs addíciós sorozatot vizsgálva a 4R és az 1R kromoszómák embrióindukciót növelő hatását tapasztalták, és ugyanez a két kromoszóma - a 4R erőteljesebben - hatott pozitívan a növényregenerációra is.

Más kísérleti rendszert alkalmaztak **Szakács et al.** (1988). Ők a Chinese Spring/Cheyenne szubsztitúciós sorozatot használták, és azt találták, hogy a mikrospóra embriogenezisben a 7A és az 1B kromoszóma, míg a növényregenerációban a 3A és a 2D kromoszóma játszhat szerepet.

**Agache et al.** (1989) monoszóm és szubsztitúciós vonalakkal azt találták, hogy a Chinese Spring 1D kromoszóma és az 5BL kromoszómák serkenti az embrióindukciót, és hogy ugyancsak a Chinese Spring 5B kromoszómán az albinó növényregenerációt serkentő gén található.

E téren a szomatikus szövettenyészetek vizsgálata némileg előrébb tart (**Baroncelli et al.** 1978, **Hotileva és Jermisin** 1979, 1980, **Galiba et al.** 1986, **Mathias és Fukui** 1986, **Higgins és Mathias** 1987, **Felsenburg et al.** 1987), ezért kézenfekvő volt megvizsgálni azt a lehetőséget, hogy azonos kromoszómák vagy hasonló szabályozás működnek-e szomatikus és haploid szinten. **Agache et al.** (1988) azonban nem találtak szignifikáns korrelációt a haploid ill. szomatikus *in vitro* reakciót jellemző mutatók között.

Mindezidáig az *in vitro* haploidindukció nukleáris szabályozásának kérdéseit érintettem, de nyitott kérdés az is, hogy a citoplazmának (v. anyai hatásnak) van-e szerepe ebben a folyamatban?

Ezen a téren ismét egymásnak ellentmondó adatok láttak napvilágot. Reciprok fajtakeresztezéseket használva búzában nem találtak citoplazmatikus hatást semmilyen vizsgált paraméterre (Bullock et al. 1982, Henry és De Buyser 1985). Árpa reciprok keresztezésekkel ugyancsak gyenge vagy nulla citoplazmahatást találtak (Foroughi-Wehr et al. 1982, Foroughi-Wehr és Friedt 1984, Dunwell et al. 1987). Ezzel szemben búza (Lazar et al. 1984b) és tritikále (Charmet és Bernard 1984, Charmet et al. 1985) diallélkeresztezésekben szignifikáns citoplazmahatást tapasztaltak. Az eltérés oka valószínűleg nem a különböző kísérleti elrendezésben rejlik, bár egy 7x7-es v. 9x9-es diallélban nyilvánvalóan nagyobb valószínűséggel lehet eltérő citoplazmájú partnereket találni, mint egy 2 v. 3 szülőpartneres reciprok keresztezésben. Az viszont figyelemreméltó, hogy a citoplazmahatást a tritikálénál csaknem kizárólag az idézte elő, hogy az egyik partner egy *Triticum timopheevi* citoplazmát hordozó genotípus volt. Korábban a *Triticum timopheevi* citoplazma pozitív hatását búzánál is kimutatták (Picard et al. 1978).

Ugy tűnik tehát, hogy az ellentmondó eredmények magyarázata a kísérletek során felhasznált genotípusok citoplazmatikus eltérésének esetlegességében rejlik. Ha a kombinációban résztvevő partnerek citoplazmája közt éppen van különbség, akkor ki lehet mutatni a citoplazmahatást, ha nincs

eltérés, akkor nem. Mindez arra utal, hogy legalábbis a vizsgálatok eddigi körét alkotó genotípusok közt meglehetősen kicsi a citoplazmatikus variabilitás.

Ismert az irodalomból, hogy a kloroplasztisz-DNS (cp-DNS) változékonysága evolúciós léptékkal mérve is kicsi (**Palmer és Stein 1986**). Igaz ez a gabonaféléken belül is, a cp-DNS (**Ogihara és Tsunewaki 1982, Bowman et al. 1983, Terachi et al. 1984, Clegg et al. 1984**) és a mitokondriális-DNS (mt-DNS) (**Quetier és Vedel 1977, Oro et al. 1985, Holwerda et al. 1986, Rines et al. 1988**) intraspecifikus variabilitására egyaránt. Ezt a konzervativitást az is igazolja, hogy míg éppen az antérakultúra jelentős nukleáris-DNS variabilitást képes előidézni (**De Paepe et al. 1982, Dhillon et al. 1983, Rode et al. 1987, Benslimane et al. 1988**), addig a cp- és mt-DNS restrikciós mintázatban nem okozott változást (**Rode et al. 1985, Charmet et al. 1985**).

További kritikája a fajon belüli reciprok keresztezések felhasználásának, hogy ebben az esetben nem feltétlenül stabil, hibrid genomot helyeztek - a fentiek szerint - igen hasonló citoplazmatikus háttérbe. Ez az elrendezés valóban alacsony hatásfokkal működhetett. Ehelyett olyan kísérleti rendszer kívánatos, amelyben egy stabil genom van jelen különböző, igen eltérő citoplazmákban.

A **Kihara (1951)** által elindított japán iskola jóvoltából a búzánál nagyszámú alloplazmás vonalat állítottak elő, melyeknél különböző búza genotípusok

genomját ismételt visszakeresztezéssel behelyettesítették a hexaploid búzával rokon, de evolúciósan távoli *Triticum* és *Aegilops* fajok citoplazmájába. Ezzel párhuzamosan kimutatták, hogy ezek a fajok valóban eltérő citoplazmatípusokat képviselnek (Tsunewaki et al. 1976).

Munkám célja az volt, hogy az alloplazmás vonalak felhasználásával egyértelműen kimutassam: a citoplazma szerepet játszik-e a búza *in vitro* haploidindukciójában vagy sem? A kérdést még érdekesebbé teszi, hogy ezen alloplazmák egy része - főleg éppen az 1B/1R transzlokációt hordozó genomokkal kölcsönhatásban (Salmon módszer) - képes partenogenezissel *in vivo* haploidiát is indukálni (Kihara és Tsunewaki 1962, Tsunewaki et al. 1974, Tsunewaki et al. 1984). Ezért előzetes vizsgálatokat indítottam még az 1BL.1RS és 1AL.1RS transzlokációnak a búza antérakultúrában játszott szerepére vonatkozóan.



## **ANYAG ÉS MÓDSZER**

### *Növényanyag*

A citoplazmahatás vizsgálatához a Siete Cerros 66 (SC) és a Penjamo 62 (PJ) tavaszi búzafajták 7-7 alloplazmás vonalát használtam (1. táblázat). A fertilis alloplazmás vonalakat **dr. Purnhauser László** (Gabonatermesztési Kutatóintézet, Szeged) bocsátotta rendelkezésre, és **dr. I. Panayotovtól** (Bulgária) származnak. A transzlokációs fajtákat (2. táblázat) az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet Búzanemesítési Főosztályának fajtagyűjteményéből választottam **dr. Bedő Zoltán** és **dr. Szunics László** jóvoltából.

A transzlokációs fajták magvait 1986 októberében, míg az alloplazmás vonalakéit 1987 márciusában vetettük szabadföldön. Az antérakultúrára alkalmas kalászokat mindkét kísérletben május végétől szedték.

### *Kromoszóma vizsgálat*

Az 1BL.1RS transzlokáció kimutatásához csiranövények 1-2 cm-es gyökércsúcsait telített 1-monobrómnaftalinban 5 óra hosszat tartottuk szobahőmérsékleten, majd jégcetben fixáltuk és 4°C-on tároltuk. Festés előtt 60°C-os 1N sósavban hidrolizáltuk a gyökércsúcsokat, majd a festést

## 1. táblázat.

Az alloplazmás vonalak listája és jellemzése

| Alloplazmás vonal          | Citoplazmadonor |                | Nemzedék         |
|----------------------------|-----------------|----------------|------------------|
|                            | 2n=             | Plazmatípus*   |                  |
| ( <i>aestivum</i> )-SC     | 6x              | S              | -                |
| ( <i>aestivum</i> )-PJ     | 6x              | S              | -                |
| ( <i>aegilopoides</i> )-SC | 2x              | A              | BC <sub>7</sub>  |
| ( <i>longissima</i> )-SC   | 2x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>longissima</i> )-PJ   | 2x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>speltoides</i> )-SC   | 2x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>speltoides</i> )-PJ   | 2x              | S              | BC <sub>5</sub>  |
| ( <i>bicornis</i> )-SC     | 2x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>variabilis</i> )-SC   | 4x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>variabilis</i> )-PJ   | 4x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>kotschyi</i> )-PJ     | 4x              | S              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>ventricosa</i> )-SC   | 4x              | D              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>ventricosa</i> )-PJ   | 4x              | D              | BC <sub>12</sub> |
| ( <i>juvenalis</i> )-PJ    | 6x              | D <sup>2</sup> | BC <sub>12</sub> |

SC - Siete Cerros 66

PJ - Penjamo 62

\* - Ogihara és Tsunewaki (1982) alapján

## 2. táblázat.

A transzlokációs fajták listája és jellemzése

| Fajta            | T r a n s z l o k á c i ó |        | SAT-kromo-<br>szómapár |
|------------------|---------------------------|--------|------------------------|
|                  | tipus                     | forrás |                        |
| Auróra           | 1BL.1RS                   | Petkus | 1                      |
| Benoist (H77022) | 1BL.1RS                   | Petkus | 1                      |
| Bezosztaja 2     | 1BL.1RS                   | Petkus | 1                      |
| Clement          | 1BL.1RS                   | Petkus | 1                      |
| Lovrin 24        | 1BL.1RS                   | Petkus | 1                      |
| Amigo            | 1AL.1RS                   | Insave | 2                      |

bázikus fukszinnal szobahőmérsékleten végeztük 30-60 percig.

Mivel az 1R rozs kromoszóma másodlagos befűződésének megnyilvánulása búza háttérben gátolva van (Cormeño et al. (1987), az 1BL.1RS transzlokációt hordozó fajtákban csak 1 pár szatellites kromoszóma (6B) volt látható, míg az Amigonál - a várakozásnak megfelelően - 2 pár szatellites kromoszóma (1B és 6B) volt megfigyelhető (2. táblázat).

### *Antérakultúra*

Az antérák lerakása a mikrospórák középső vagy kései egysejtmagvas állapotában történt, amit kárminecetsavas festéssel kalászonként ellenőriztünk. A kiválasztott kalászokat 0,1%-os higany-kloridban 7-8 percig sterilizáltuk, majd 4-5 alkalommal steril desztillált vízzel öblítettük.

Az antérák tenyésztése steril Petri csészékben Potato-2 (P2) indukciós táptalajon (Chuang et al. 1978) történt (3. táblázat).

A tenyésztés 4 hétig sötétben, 29°C-on történt. Az indukálódott embriókat hajtásdifferenciáció céljából 190-2 táptalajra (Zhuang et al. 1984) tettük át (3. táblázat), és 150 cm<sup>3</sup>-es sterilizált üvegekben újabb 4 héten át 26°C-on tartottuk napi 16 órás megvilágítás mellett.

### 3. táblázat.

Az indukciós és a regenerációs táptalaj összetétele

| Összetevő (mg/l)                                      | P2    | 190-2 |
|-------------------------------------------------------|-------|-------|
| KNO <sub>3</sub>                                      | 1 000 | 1 000 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 200   | 300   |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                 | 125   | 200   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 100   | 200   |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O | 100   | 100   |
| KCl                                                   | 35    | 40    |
| FeSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O                 | 27,8  | 27,8  |
| Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O              | 37,3  | 37,3  |
| MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O                 | -     | 8     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | -     | 3     |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                 | -     | 3     |
| KJ                                                    | -     | 0,5   |
| m-Inozit                                              | -     | 100   |
| Glicin                                                | -     | 2     |
| Tiamin x HCl                                          | 1     | 1     |
| Piridoxin x HCl                                       | -     | 0,5   |
| Nikotinsav                                            | -     | 0,5   |
| 2,4-D                                                 | 1,5   | -     |
| Kinetin                                               | 0,5   | 0,5   |
| NES                                                   | -     | 0,5   |
| Burgonyakivonat (ml/l)                                | 100   | -     |
| Szaharóz (g/l)                                        | 90    | 30    |
| Agar (Difco) (g/l)                                    | 6     | 6     |
| pH (autoklávozás előtt)                               | 5,8   | 6,0   |

2,4-D: 2,4-Diklorofenoxiecetsav  
 NES : 1-Naftilecetsav

A kiértékeléshez alapadatként az embriogén antéraválasz (EAV) ill. az összes, a zöld és az albinó növényregeneráció paramétereit vettük fel. Az embriogén antéraválasz a 4 hét után legalább 1 embriót képező antérák számának arányát jelentette az összes lerakott antéráéhoz viszonyítva. Az újabb 4 hét után differenciálódott hajtáskezdemények számának a regeneráltatott embriókéhoz viszonyított aránya jellemezte a növényregenerációt. A statisztikai kiértékeléshez Chi-négyzet homogenitásvizsgálatot és Chi-négyzet analízist alkalmaztam.

## EREDMÉNYEK

### 1. Az alloplazmás vonalak vizsgálatának eredményei

A vizsgált vonalak közt nem volt különbség az embriók első megjelenési időpontjában - ez egységesen a 3. hét volt -, sem pedig az embriók morfológiájában. Ugyanakkor jelentős volt az eltérés az embriók relatív gyakoriságában és az embriogén antéraválaszban (EAV).

A Siete Cerros 66 donorfajtánál (4. táblázat) az *Ae. longissima* és az *Ae. variabilis* citoplazmája szignifikánsan növelte az EAV-t az euplazmához viszonyítva. Ezzel szemben az *Ae. ventricosa* citoplazma hatástalannak mutatkozott. A többi citoplazma gyengén serkentette az EAV-t. Mindezek eredőjeként a Chi-négyzet homogenitás értéke erősen szignifikáns volt jelezvén, hogy a citoplazmatikus háttér - ennél a genotipusnál - lényeges szerepet játszik a mikrospóra embriogenezisben.

A Penjamo 62 genomdonor esetében (5. táblázat) - más eloszlásban ugyan - ugyanez volt megfigyelhető. Az *Ae. kotschyi* citoplazmája szignifikánsan magasabb, míg a (*speltoides*)-PJ, a (*variabilis*)-PJ és a (*ventricosa*)-PJ szignifikánsan alacsonyabb EAV-t mutatott az euplazmás vonaléhoz képest. A vonalak több egymásközti szignifikáns eltérése miatt ebben a csoportban a Chi-négyzet homogenitás értéke még magasabb volt.

#### 4. táblázat.

A Siete Cerros 66 donorfajta hét alloplazmás vonalának embriogén antéraválasza

| Citoplazma          | Antéra       |              |
|---------------------|--------------|--------------|
|                     | embriogén, % | lerakott, db |
| <i>aestivum</i>     | 0,0 a        | 180          |
| <i>aegilopoides</i> | 0,9 b        | 3 624        |
| <i>bicornis</i>     | 1,0 c        | 621          |
| <i>speltoides</i>   | 1,0 d        | 210          |
| <i>longissima</i>   | 4,5 abcde    | 693          |
| <i>variabilis</i>   | 2,7 abc      | 481          |
| <i>ventricosa</i>   | 0,0 e        | 125          |

Chi-négyzet homogenitás-vizsgálat df. 6      65,11 \*\*\*

Az azonos betűvel jelzett citoplazmák szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) különböznek az ugyanazzal a betűvel a listán először jelzett citoplazmától (az embriogén antérák számának Chi-négyzet analízise).



5. táblázat.

A Penjamo 62 donorfajta hét alloplazmás vonalának embriogén antéraválasza

| Citoplazma                              | Antéra       |              |
|-----------------------------------------|--------------|--------------|
|                                         | embriogén, % | lerakott, db |
| <i>aestivum</i>                         | 1,7 a        | 572          |
| <i>speltoides</i>                       | 0,0 ab       | 670          |
| <i>longissima</i>                       | 0,8 bc       | 390          |
| <i>variabilis</i>                       | 0,4 ad       | 711          |
| <i>kotschyi</i>                         | 8,9 abcde    | 335          |
| <i>ventricosa</i>                       | 0,0 acef     | 585          |
| <i>juvenalis</i>                        | 3,2 bcdef    | 253          |
| -----                                   |              |              |
| Chi-négyzet homogenitás-vizsgálat df. 6 |              | 153,46 ***   |

Az azonos betűvel jelzett citoplazmák szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) különböznek az ugyanazzal a betűvel a listán először jelzett citoplazmától (az embriogén antérák számának Chi-négyzet analízise).

Annak érdekében, hogy a citoplazma és a genom hatását külön-külön, ill. kölcsönhatásukat is lehessen vizsgálni, a két csoportban közös alloplazmás vonalak EAV adatait összevetettem (6. táblázat). A Chi-négyzet analízis szignifikáns citoplazma ill. genomhatást mutatott ki, de a citoplazma-genom kölcsönhatás nem volt szignifikáns. A (*speltoides*)-SC, a (*longissima*)-SC és a (*variabilis*)-SC szignifikánsan felülmúlták a megfelelő Penjamo 62 vonalakat.

A már ismert genomhatás mellett tehát megbízhatóan kimutathatóvá vált a citoplazma hatása is a mikrospóra embriogenezis szabályozásában.

Megnéztem a citoplazmának a növényregenerációra gyakorolt hatását is (7. táblázat). Ehhez kevesebb alloplazmás vonalat vettem figyelembe, mivel több vonalban nulla vagy csak néhány embrió indukálódott. A Siete Cerros 66 alloplazmás vonalai nem mutattak szignifikáns citoplazmahatást sem a zöld, sem az összes növényregeneráció tekintetében. A (*variabilis*)-SC-ből csak zöld növények regenerálódtak, és összes növényregenerációja szignifikánsan alacsonyabb volt az (*aegilopoides*)-SC-éhoz képest. Bár a két genomdonorra közös alloplazmás vonalak nem szerepeltek, a Siete Cerros 66 genomot tartalmazó vonalakból általában több zöld és összes növény regenerálódott. A Penjamo 62 alloplazmás vonalai közül a (*kotschyi*)-PJ szignifikánsan kevesebb zöld és összes növényt produkált, mint az euplazmás vonal. A (*kotschyi*)-PJ tehát az EAV-t és a növényregenerációt tekintve éppen ellenkező reakciót mutatott.

## 6. táblázat.

A Siete Cerros 66 (SC) és a Penjamo 62 (PJ) donorfajták öt közös alloplazmás vonalának embriogén antéraválasza

Az azonos betűvel jelzett citoplazmák szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) különböznek az ugyanazzal a betűvel a listán először jelzett citoplazmától. A csillaggal jelzett citoplazmáknál a SC és a PJ genomdonorok szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) különböznek egymástól (az embriogén antérák számának Chi-négyzet analizise). n= a lerakott antérák száma

| Citoplazma        | SC      | n   | PJ     | n     |
|-------------------|---------|-----|--------|-------|
| <i>aestivum</i>   | 0,0 a   | 180 | 1,7 a  | 572   |
| <i>speltoides</i> | 1,0 ab  | 210 | 0,0 ab | 670 * |
| <i>longissima</i> | 4,5 abc | 693 | 0,8 bc | 390 * |
| <i>variabilis</i> | 2,7 a   | 481 | 0,4 a  | 711 * |
| <i>ventricosa</i> | 0,0 c   | 125 | 0,0 ac | 585   |

Chi-négyzet homogenitás-

vizsgálat      df. 4      **19,04 \*\*\***      **22,66 \*\*\***

Az embriogén antéraválasz Chi-négyzet analizise a Siete Cerros 66 (SC) és a Penjamo 62 (PJ) donorfajták öt közös alloplazmás vonalában.

|              |       |           |
|--------------|-------|-----------|
| SC vs PJ     | df. 1 | 38,32 *** |
| Citoplazma   | df. 4 | 44,32 *** |
| Kölcsönhatás | df. 4 | 3,04 NS   |
| Összesen     | df. 9 | 85,68 *** |

# 7. táblázat.

A Siete Cerros 66 (SC) és a Penjamo 62 (PJ) donorfajták alloplazmás vonalainak zöld és összes növényregenerációja (csak a min. 10 embriót produkáló vonalak szerepelnek)

| Alloplazmás vonal                     | Átrakott<br>embrió,<br>db | Növényregeneráció, % |         |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------|---------|
|                                       |                           | zöld                 | összes  |
| ( <i>aegilopoides</i> )-SC            | 45                        | 37,8                 | 55,6 a  |
| ( <i>longissima</i> )-SC              | 53                        | 32,0                 | 45,2    |
| ( <i>variabilis</i> )-SC              | 22                        | 27,2                 | 27,2 a  |
| Összevonva                            | 120                       | 33,3                 | 45,8    |
| Chi-négyzet homogenitás-<br>vizsgálat | df. 2                     | 0,80 NS              | 4,77 NS |
| ( <i>aestivum</i> )-PJ                | 20                        | 25,0 a               | 50,0 a  |
| ( <i>kotschyi</i> )-PJ                | 65                        | 1,5 ab               | 21,5 a  |
| ( <i>juvenalis</i> )-PJ               | 12                        | 25,0 b               | 33,3    |
| Összevonva                            | 97                        | 9,3                  | 28,9    |
| Chi-négyzet homogenitás-<br>vizsgálat | df. 2                     | 14,02 ***            | 6,17 *  |

Az azonos betűvel jelzett citoplazmák szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) különböznek az ugyanazzal a betűvel a listán először jelzett citoplazmától (a zöld ill. az összes hajtáskezdemények számának Chi-négyzet analízise).

## 2. A transzlokációs vonalak vizsgálatának eredményei

Az 1BL.1RS transzlokációt hordozó fajták (1BL.1RS fajták) között az EAV-ra szignifikáns különbségek voltak (8. táblázat). Az Auróra kevesebb embriogén antérát produkált, mint az összes többi 1BL.1RS fajta, továbbá a Benoist és a Bezosztaja 2 közti különbség is szignifikáns volt.

Az összes növényregenerációra a Chi-négyzet homogenitás értéke szintén erősen szignifikáns volt, a Clement rendkívül alacsony - a többiekétől szignifikánsan különböző - regenerációja, valamint az Auróra és a Benoist közti különbség miatt. Mivel a Clementből összesen 1 zöld növény regenerálódott, ezt az adatot a további bontásban nem vettem figyelembe.

A zöld és albinó növényregenerációt vizsgálva viszont nulla vagy gyenge szignifikanciát mutatott a Chi-négyzet homogenitás értéke. A Lovrin 24-ből több zöld növény regenerálódott, mint az Aurórából, és a Lovrin 24 ugyancsak szignifikánsan különbözött a Benoist-tól és a Bezosztaja 2-től az albinó növényregeneráció tekintetében.

Az 1BL.1RS fajtákat az - 1AL.1RS transzlokációt hordozó - Amigoval összehasonlítva, szignifikáns különbségek mutatkoztak az EAV-ra, a zöld és az albinó növényregenerációra, de alig az összes növényregenerációra. Az Amigoban szignifikánsan kevesebb embriogén antéra volt, mint az összes 1BL.1RS fajtában, kivéve az Aurórát. Az összes 1BL.1RS fajta zöld növényregenerációja szignifikánsan magasabb volt az Amigoénál, az albinó

# 8. táblázat.

A transzlokációs vonalak embriogén antéraválasza és növényregenerációja.

| Fajta                    | Antéra          |              |                 | Embrió        |         |         |
|--------------------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|---------|---------|
|                          | lerakott,<br>db | embriogén, % | átvakott,<br>db | regeneráló, % |         |         |
|                          |                 |              |                 | összes        | zöld    | albinó  |
| Auróra                   | 1 043           | 3,4a         | 52              | 13,4a         | 9,6a    | 3,8a    |
| Benoist                  | 591             | 11,2ab       | 112             | 32,1ab        | 21,4b   | 10,7b   |
| Bezostaja                | 2 932           | 6,7abc       | 138             | 21,8c         | 16,7c   | 5,1c    |
| Clement                  | 205             | 9,8ad        | 42              | 2,3bcd        | NJ      | NJ      |
| Lovrin 24                | 286             | 7,7ae        | 84              | 23,8d         | 23,8ad  | 0,0bcd  |
| Chi-négyzet homogenitás- |                 |              |                 |               |         |         |
| vizsgálat                |                 | df. 4        | 41,01***        | 18,53***      |         |         |
|                          |                 | df. 3        |                 |               | 5,20NS  | 11,18*  |
| Amigo                    | 960             | 2,0bcde      | 52              | 25,0d         | 0,0abcd | 25,0abc |

Az azonos betűvel jelzett tételek szignifikánsan ( $P \leq 0,05$ ) különböznek az ugyanazzal a betűvel a listán először jelzettektől (az embriogén antérák számának ill. az összes, a zöld valamint az albinó hajtáskezdemények számának Chi-négyzet analizise). NJ - nincs jelezve

növényregeneráció viszont az Amigonál volt szignifikánsan magasabb bármelyik 1BL.1RS fajtáénál. Ugyanakkor az összes növényregenerációra csak a Clement és az Amigo között volt szignifikáns különbség.

## AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

### 1. Citoplazmatikus hatás

A citoplazmatikus háttér jelentősen befolyásolta a vizsgált genotípusok embriogén képességét antérakultúrában. A két *T. aestivum* genotípus eltérő EAV-t mutatott az euplazmában, és a jobbik, a Penjamo 62, értéke az irodalomban találhatóéhoz hasonló.

Az euplazmához képest magasabb és alacsonyabb EAV-t mutató alloplazmákat lehetett találni. A két legjobb és meglepően magas EAV-t a (*kotschyi*)-PJ és a (*juvenalis*)-PJ mutatta. Az *Ae. kotschyi* és az *Ae. variabilis* ugyanazt a genomot ( $S^V$ ) tartalmazza, azonos a plazmatípusuk (S), és sem a mt-DNS, sem a cp-DNS restrikciós mintázatban nem találtak köztük különbséget (Terachi és Tsunewaki 1985, Ogiwara és Tsunewaki 1988). A két faj citoplazmájának eltérő reakciója a Penjamo 62 genomdonornál (5. táblázat) arra utal, hogy lehetséges a két faj között citoplazmatikus variáció feltárása. Figyelemreméltó, hogy éppen ezek a fajok azok, amelyek citoplazmája a legjobb *in vivo* partenogenetikus haploidindukciót adja (Kobayashi és Tsunewaki 1980), különösen az 1B/1R transzlokációt tartalmazó genomokkal kölcsönhatásban (Tsunewaki et al. 1984). Ez a téma további kutatást érdemelne, mert talán elvezethet a haploiditást indukáló génekhez.

Szintén jó EAV-t mutatott az *Ae. longissima*, amely ugyancsak az S plazmatípusba tartozik, és



amelyet egyúttal a hexaploid búza citoplazma- ill. B genomdonorának is tartanak (**Ogihara és Tsunewaki** 1982). Más citoplazmaforrások azonban szintén fontosak lehetnek az *in vitro* haploidindukció szempontjából, amint azt a D<sup>2</sup> plazmatipusú (*juvenalis*)-PJ példája is mutatja, melynek eredete még tisztázatlan.

A Siete Cerros 66 donorfajta legtöbb alloplazmás vonalában az euplazmás vonaléhoz képest magasabb volt az EAV, szemben a Penjamo 62 alloplazmás vonalaival, melyek közül csak kettő múlta felül az euplazmás vonalat. Ugyanakkor az euplazmában a Siete Cerros 66 nulla EAV-szal jóval alacsonyabb volt, mint az euplazmás Penjamo 62, bár a két fajta genetikailag közeli rokonságban van (**Zeven és Zeven-Hissink** 1976). A Siete Cerros 66 genomjának az eu- ill. alloplazmában mutatott eltérő reakciójára magyarázat lehet, hogy a fajta pedigréjében afrikai eredetű introdukció és palesztinai *T. durum* tájfajta szerepel (**Zeven és Zeven-Hissink** 1976), amelyek a genom és/v. az euplazma-genom működési egységét megbonthatják. Ennek ellenére (v. éppen emiatt?) a Siete Cerros 66 alloplazmás vonalak mindig felülmúlták a megfelelő Penjamo 62 vonalakat.

Mindezek alátámasztják az EAV-ra megfigyelt erős genotipusos hatást. Szignifikáns citoplazma-genom kölcsönhatás nem jelentkezett a kísérletben. Ez lehetővé teszi olyan alapanyag előállítását, amely magas *in vitro* haploidindukciót biztosító, kedvező citoplazma-genom kombinációt tartalmaz. Az ilyen genetikai alapanyag alkalmas a citoplazma és az *in vitro* haploidindukció kapcsolatának molekuláris biológiai vizsgálatára, valamint kiindulási alapot

jelent a kedvező tulajdonság széles genetikai bázisba történő átviteléhez.

Az EAV-szal szemben az alloplazmák nem mutattak jelentős hatást a zöld és az összes növényregenerációra. A Siete Cerros 66 donorfajta alloplazmás vonalai általában több zöld és összes növényt regeneráltak. A (*variabilis*)-SC-ből csak zöld növény regenerálódott, míg a citoplazmásan legközelebbi (*kotschy*)-PJ-nél főleg albinók keletkeztek. A fentiek arra utalnak, hogy a növényregenerációnál elsősorban nukleáris és/v. citoplazma-genom kölcsönhatások játszhatnak szerepet, hasonlóan a diploid kultúráknál már megfigyeltekhez (Mathias és Fukui 1986, Mathias et al. 1986). Ez egyben azt is jelenti, hogy az embrióindukció és a növényregeneráció egymástól eltérő és független genetikai kontroll alatt áll, amint arra korábban is rámutattak (Foroughi-Wehr et al. 1982, Lazar et al. 1984, Barnabás et al. 1988).

Az alloplazmás vonalakkal való munkánál kockázatot jelenthet, hogy egyes esetekben egy, önmagának az utódnemzedékekbe történő átvitelét elősegítő, ún. gametocid kromoszóma visszamaradhat a citoplazmadonor genomjából az ismételt visszakeresztezések során is (Maan 1975, Miller et al. 1982). Ez az idegen kromoszóma súlyosabb esetben sterilitást, enyhébb formában meiotikus rendelleneséget és genomátrendeződést idézhet elő (Endo 1988). A gametocid hatásért felelős gén(ek) rekombinálódhat(nak) is a búzagenomba (Tsujimoto és Tsunewaki 1984), és az F<sub>1</sub> utódnemzedékben defektes tüneteket (morfológiai mutációk, magránkosodás) okozhat(nak), de csak apai partneren keresztül. Ez a

jelenség, amit hibrid diszgenezisnek neveznek, hőmérsékletfüggő is lehet (**Tsujimoto és Tsunewaki** 1985), és nagyon hasonlít a *Drosophilánál* leirthez, ahol mozgékony genetikai elemekkel van kapcsolatban (**Engels** 1983).

Ezért a citoplazma és az *in vitro* haploidindukció kapcsolatának ill. annak molekuláris biológiai vizsgálatánál szét kell választani a tisztán citoplazmatikus hatást a citoplazmadonor esetleges reziduális genomhatásától.

Ebben a kísérletben ez a veszély nem fenyegetett, mert a vizsgált alloplazmás vonalakkal saját megfigyeléseink szerint sem voltak fertilitási problémák, és a vonalakat előállító **Panayotov** sem talált gametocid kromoszómát (1980).

Az itt közölt eredmények azt mutatják, hogy a citoplazma az *in vitro* reakciót nemcsak diploid (**Mathias és Fukui** 1986, **Mathias et al.** 1986), hanem haploid szinten is meghatározza, és az *in vivo* haploidindukáló citoplazmák *in vitro* is működhetnek. A szomatikus hibridizációra épülő citoplazma-genetika és -manipuláció más növényfajoknál már komoly előrehaladást ért el (**Lonsdale** 1987, **Galun és Aviv** 1988). Ujabban búzánál is regeneráltak növényt antérakultúra eredetű embriogén szuszpenzióból izolált protoplasztokból (**Harris et al.** 1988), és Kínában szintén sikerrel jártak (**Barnabás**, személyes közlés). Ezzel összhangban a fenti eredmények hozzájárulhatnak a búza citoplazmagenetikájának fejlődéséhez, és az *in vitro* haploidindukció genetikai szabályozásának jobb megértéséhez.

## 2. A transzlokációk hatása

Az azonos 1RS-t eltérő genetikai háttérben tartalmazó 1BL.1RS csoporton belül is eltérő volt az EAV, ami arra utal, hogy az 1RS nem hordoz az EAV-ért felelős főgént, és ez a tulajdonság valószínűleg poligénus jellegű. **Lazar et al. (1987)** és **Szakács et al. (1988)** már idézett munkáikban az 1R ill. az 1B kromoszómák erős hatását jelezték az embrióindukcióra. Az itt megfigyelt szignifikáns különbség az Amigo és az 1BL.1RS fajták zöme között szintén arra utal, hogy az 1-es homeológ kromoszómacsoport - ha nem is az első helyen - résztvesz az EAV szabályozásában, esetleg más génekkel kölcsönhatásban.

A zöld és az albinó növényregenerációt tekintve az 1RS hasonló reakciót mutatott az 1BL.1RS fajtákban. Az a tény, hogy mindegyik 1BL.1RS fajtából elsősorban zöld növények, míg az 1AL.1RS fajtából csak albinó növények regenerálódtak, azt jelentené, hogy az 1RS a regenerált növények zöld v. albinó jellegének szabályozásával lehet kapcsolatban. **Lazar et al. (1987)** szintén megfigyelték a Chinese Spring/Imperial 1R addíciós vonalánál a zöldülő kalluszok számának növekedését a kontrollhoz képest.

Az 1RS önmagában azonban nem serkentheti a zöld növényregenerációt, hiszen az Amigoból - amely szintén tartalmazza azt - egyáltalán nem regenerálódott zöld növény. Ezért kézenfekvő az a feltételezés, hogy a transzlokációban megmaradt 1AL és 1BL és/v. az 1RS által helyettesített, hiányzó

1AS és 1BS kromoszómakaroknak is szerepe lehet a növényregenerációban.

E feltételezés alapján az 1AL kromoszómakar gátolhatja és/v. az 1AS serkentheti a zöld növényregenerációt, mivel az 1AS-t nem tartalmazó Amigoból csak albinó növények regenerálódtak. Emellett az 1BL kromoszómakar a zöld növényregenerációt serkentő és/v. az 1BS gátló gént hordozhat, mivel az 1BS-t nem tartalmazó 1BL.1RS fajtákból főleg zöld növények regenerálódtak. E feltételezett gének esetleges multiplex alléljainak kölcsönhatása magyarázhatná az eddig vizsgált hexaploid búza genotípusok közti nagy eltéréseket a zöld növényregeneráció tekintetében (De Buyser és Henry 1979, Bullock et al. 1982, Ouyang et al. 1983, Shimada és Otani 1989).

A feltételezést több egymástól független kísérlet adatai is alátámasztják, amelyeket a Chinese Spring tavaszi búza ditelocentrikus vonalaival végeztek, és amelyekre eddig kevés figyelmet fordítottak.

Annak ellenére, hogy a kallusz növekedési rátája a ditelocentrikus vonalakban erősen függött attól, hogy gyökér vagy nádusz explantumot használtak, az 1AL és az 1BS mindkét rendszerben erősen gátló hatást mutatott (Baroncelli et al. 1978). Gosch-Wackerle et al. (1979) az 1AL kromoszómakar hasonló hatását figyelték meg éretlen kalászorsóból vagy embrióból indukált kalluszokon (az 1BS hatását nem vizsgálták). Egy ismét másik rendszerben, a magból indított kallusznövekedést is gátolta az 1AL kromoszómakar, ráadásul ez a hatás táptalajtól (B<sub>5</sub> v. MS) függetlennek bizonyult (Hotileva és Jermisin

1980). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az 1AL kromoszómakar a kallusznövekedést erősen gátló gént hordoz, ez pedig már kapcsolatban lehet a növény-regenerációs képességgel. Továbbá **Felsenburg et al.** (1987) - bár csak a B genomra aneuploid vonalakat vizsgáltak - azt találták, hogy a szkutellum eredetű kalluszok regenerációs képességét az 1BS jelentősen gátolja, amit legalábbis részben ellensúlyozhat az 1BL pozitív hatása.

Igaz, hogy ezek az eredmények diploid szövetekkel végzett kísérletekből származnak. Ugyanakkor az is ismert, hogy a magasabbrendű növények génállományának mintegy 60-70 százaléka átfedő készletet alkot, azaz mind diploid, mind haploid szinten működőképes (**Pedersen et al.** 1987). Ennek alapján nem lehetetlen, hogy a diploid szövetek *in vitro* reakcióját szabályozó gének közreműködjenek az *in vitro* haploidindukcióban is.

Tény, hogy a rendelkezésre álló kísérleti anyaggal nem lehetett kimutatni, és ezért kizárni sem annak a lehetőségét, hogy a genetikai háttérben levő más faktorok is lényegesen befolyásolják a növényregenerációt. Búzában pl. már több kvalitatív jellegnél kimutatták az intergenomiális gátlás szerepét (**Kerber és Green** 1980, **Galili és Feldman** 1984). Mint láttuk, citoplazmatikus eredetű tényezők szintén fontosak lehetnek (**Sági és Barnabás** 1989). Ezért további pontosítást igényel, hogy az 1-es homeológ kromoszómacsoport milyen szerepet játszik a növényregenerációban, és az, hogy ez milyen kapcsolatban lehet a Salmon módszert szabályozó, ma még ismeretlen génekkel.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban búza *in vitro* haploidok előállításának genetikai szabályozásával foglalkoztam.

Két tavaszi búzafajta genomját és különböző *Aegilops* és *Triticum* fajok citoplazmáját tartalmazó alloplazmás vonalak felhasználásával kimutatható volt, hogy a citoplazma lényegesen befolyásolja a mikrospóra embriogenezist. A már ismert genomhatás mellett ebben a kísérleti elrendezésben citoplazma-genom kölcsönhatás nem jelentkezett. A mikrospóra embriogenezist az euplazmához képest növelő ill. csökkentő citoplazmákat egyaránt lehetett találni.

A vizsgált alloplazmás vonalakban a citoplazma kevésbé befolyásolta a növényregenerációt. Feltételezhető, hogy az *in vivo* haploidindukáló citoplazmák *in vitro* is hatékonyak lehetnek, és ez elvezethet a haploidindukció genetikai szabályozásának teljesebb megértéséhez.

1BL.1RS ill. 1AL.1RS transzlokációt eltérő genetikai háttérben hordozó búzafajták vizsgálata alapján felmerült, hogy az 1-es homeológ kromoszómacsoportnak szerepe lehet a növényregenerációban. Eszerint az 1AL és az 1BS kromoszómakarok az albinó, míg az 1BL és az 1AS kromoszómakarok a zöld növényregenerációért lehetnek felelősek. A kísérleti anyaggal azonban nem lehetett kizárni más tényezők hatását sem.

*KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS*

Köszönöm szépen **Bucsi Julianna** lelkiismeretes munkáját, valamint **ifj. dr. Sági Ferencnek** a szöveg szerkesztési munkálatait.



**IRODALOMJEGYZÉK**

**AGACHE S, De BUYSER J, HENRY Y, SNAPE JW (1988)** Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat. *Plant Breed* 100:26-33

**AGACHE S, BACHELIER B, De BUYSER J, HENRY Y, SNAPE J (1989)** Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theor Appl Genet* 77:7-11

**BARONCELLI S, BUIATTI M, BENNICI A, FOROUGH-WEHR B, MIX G, GAUL H, TAGLIASACCHI AM, LOIERO M, GIORGI B (1978)** Genetic control of *in vitro* and *in vivo* growth in hexaploid wheat. I. Behaviour of ditelocentric lines. *Z Pflanzenzüchtg* 80:109-116

**BENSLIMANE A, HARTMANN C, De BUYSER J, HENRY Y, PICARD E, RODE A (1988)** Ribosomal DNA as a convenient probe to follow segregation and possible divergency from expected homozygosity after haploidization of an androgenetic process. *Theor Appl Genet* 75:389-396

**BLAKESLEE AF, BELLING J, FARNHAM ME, BERGNER AD (1922)** A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55:646-647

**BOURGIN JP, NITSCH JP (1967)** Obtention de *Nicotiana* haploïds à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann Physiol Vég* 9:377-382

**BOWMAN CM, BONNARD G, DYER TA (1983)** Chloroplast DNA variation between species of *Triticum* and *Aegilops*. Location of the variation on the chloroplast genome and its relevance to the inheritance and classification of the cytoplasm. *Theor Appl Genet* 65:247-252

**BULLOCK WP, BAENZIGER PS, SCHAEFFER GW, BOTTINO PJ** (1982) Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F<sub>1</sub>'s and their reciprocal crosses. Theor Appl Genet 62:155-159

**CERMEÑO MC, FRIEBE B, ZELLER FJ, KROLOW KD** (1987) Nucleolar competition in different (A/B)(A/B)RR and DDRR tetraploid triticales. Heredity 58:1-4

**CHARMET G, BERNARD S** (1984) Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid Triticale (*X. tritico-secale*, Wittmack). Theor Appl Genet 69:55-61

**CHARMET G, VEDEL F, BERNARD M, BERNARD S, MATHIEU C** (1985) Cytoplasmic variability in androgenetic doubled haploid lines of triticale. Agronomie 5:709-717

**CHASE SS** (1948) Monoploid frequencies in commercial double-cross hybrid maize, and its component single cross hybrids and inbred lines. Genetics 34:328-332

**CHUANG CC, OUYANG JW, CHIA H, CHOU SM, CHING CK** (1978) A set of potato media for wheat anther culture. In: Proc Symp Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, pp 51-56

**CLAPHAM D** (1971) *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z Pflanzenzüchtg 65:285-292

**CLEGG MT, BROWN AHD, WHITFIELD PR** (1984) Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: implications for genetic conservation. Genet Res 43:339-343

**De BUYSER J, HENRY Y** (1979) Androgenèse sur des blés tendres en cours de sélection. I. L'obtention des plantes *in vitro*. Z Pflanzenzücht 83:49-56

**De PAEPE R, PRAT D, HUGUET T** (1982) Heritable nuclear DNA changes in doubled haploid plants obtained by pollen culture of *Nicotiana sylvestris*. Plant Sci Lett 28:11-28

**DEATON WR, METZ SG, ARMSTRONG TA, MASCIA PN** (1987) Genetic analysis of the anther-culture response of three spring wheat crosses. Theor Appl Genet 74:334-338

**DHILLON SS, WERNSMAN EA, MIKSCH JP** (1983) Evaluation of nuclear DNA content and heterochromatin changes in anther-derived dihaploids of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv. Coker 139. Can J Genet Cytol 25:169-173

**DUNWELL JM, FRANCIS RJ, POWELL W** (1987) Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore callus production and differentiation. Theor Appl Genet 74:60-64

**ENDO TR** (1988) Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. J Hered 79:366-370

**ENGELS WR** (1983) The P family of transposable elements in *Drosophila*. Annu Rev Genet 17:315-344

**FELSENBERG T, FELDMAN M, GALUN E** (1987) Aneuploid and alloplasmic lines as tools for the study of nuclear and cytoplasmic control of culture ability and regeneration of scutellar calli from common wheat. Theor Appl Genet 74:802-810

**FOROUGHI-WEHR B, FRIEDT W** (1984) Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theor Appl Genet 67:377-382

**FOROUGH-WEHR B, FRIEDT W, WENZEL G** (1982) On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. Theor Appl Genet 62:233-239

**GALIBA G, KOVÁCS G, SUTKA J** (1986) Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. Plant Breed 97:261-263

**GALILI L, FELDMAN M** (1984) Intergenomic suppression of endosperm protein genes in common wheat. Can J Genet Cytol 26:651-656

**GOSCH-WACKERLE G, AVIVI L, GALUN K** (1979) Induction, culture and differentiation of callus from immature rachises, seeds and embryos. Z Pflanzenphysiol 91:267-278

**GRESSHOFF PM, DOY CH** (1972) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Aust J Biol Sci 25:259-264

**GUHA S, MAHESHWARI SC** (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204:497

**HAGBERG A, HAGBERG G** (1980) High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. Hereditas 93:341-343

**HARRIS R, WRIGHT M, BYRNE M, VARNUM J, BRIGHTWELL B, SCHUBERT K** (1988) Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep 8:337-340

**HENRY Y, De BUYSER J** (1985) Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep 4:307-310

**HESLOP-HARRISON J** (1980) The forgotten generation: some thoughts on the genetics and physiology of angiosperm gametophytes. In: The Plant Genome (eds Davies DR, Hopwood DA), John Innes Charity, Norwich, pp 1-14

**HIGGINS P, MATHIAS RJ** (1987) The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. Theor Appl Genet 74:439-444

**HOLWERDA BC, JANA S, CROSBY WL** (1986) Chloroplast and mitochondrial DNA variation in *Hordeum vulgare* and *Hordeum spontaneum*. Genetics 114:1271-1291

**HOTILEVA LV, JERMISIN AP** (1979) Kalluszképződés és hajtás organogenezis a Chinese Spring tavaszi búza ditelocentrikus vonalainak *in vitro* tenyésztéseiben. Dokl Akad Nauk BSZSZSZR 23:85-87 (oroszul, angol összefoglalóval)

**HOTILEVA LV, JERMISIN AP** (1980) A Chinese Spring tavaszi búza ditelocentrikus vonalainak *in vitro* tenyészetekben történő kalluszképződése a táptalaj összetételétől függően. Dokl Akad Nauk BSZSZSZR 24:186-187 (oroszul, angol összefoglalóval)

**KATAYAMA Y** (1934) Haploid formation by X-rays in *Triticum monococcum*. Cytologia 5:235-237

**KERBER ER, GREEN GJ** (1980) Suppression of stem rust resistance in the hexaploid wheat cv. Canthatch by chromosome 7 DL. Can J Bot 58:1347-1350

**KERMICLE JL** (1969) Androgenesis conditioned by a mutation in maize. Science 166:1422-1424

**KIHARA H** (1940) Formation of haploids by means of a delayed pollination in *Triticum monococcum*. Bot Mag 54:178-185

**KIHARA H** (1951) Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations. *Cytologia* 16:177-193

**KIHARA H, TSUNEWAKI K** (1962) Use of an alien cytoplasm as a new method of producing haploids. *Jpn J Genet* 37:310-313

**KOBAYASHI M, TSUNEWAKI K** (1980) Haploid induction and its genetic mechanisms in alloplasmic common wheat. *J Hered* 71:9-14

**LAZAR MD, SCHAEFFER GW, BAENZIGER PS** (1984a) Cultivar and cultivar x environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat. *Theor Appl Genet* 67:273-277

**LAZAR MD, BAENZIGER PS, SCHAEFFER GW** (1984b) Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theor Appl Genet* 68:131-134

**LAZAR MD, CHEN THH, SCOLES GJ, KARTHA KK** (1987) Immature embryo and anther culture of chromosome addition lines of rye in Chinese Spring wheat. *Plant Sci* 51:77-81

**MAAN SS** (1975) Exclusive preferential transmission of an alien chromosome in common wheat. *Crop Sci* 15:287-292

**MATHIAS RJ, FUKUI K** (1986) The effect of specific chromosome and cytoplasm substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor Appl Genet* 71:797-800

**MATHIAS RJ, FUKUI K, LAW CN** (1986) Cytoplasmic effects on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor Appl Genet* 72:70-75

MILLER TE, HUTCHINSON J, CHAPMAN V (1982) Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. Theor Appl Genet 61:27-33

NIIIZEKI H, OONO K (1968) Induction of haploid rice plants from anther culture. Proc Jpn Acad 44:554-557

OGIHARA Y, TSUNEWAKI K (1982) Molecular basis of the genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. I. Diversity of the chloroplast genome and its lineage revealed by the restriction pattern of ct-DNAs. Jpn J Genet 57:371-396

OGIHARA Y, TSUNEWAKI K (1988) Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. Theor Appl Genet 76:321-332

ORO AE, NEWTON KJ, WALBOT V (1985) Molecular analysis of the inheritance and stability of the mitochondrial genome of an inbred line of maize. Theor Appl Genet 70:287-293

OUYANG JW (1986) Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In: Haploids of Higher Plants in Vitro (eds Hu H, Yang HY), Springer - China Academic Publishers, Beijing, pp 26-41

OUYANG JW, HU H, CHUANG CC, TSENG CC (1973) Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. Sci Sinica 16:79-95

OUYANG JW, ZHOU SM, JIA SE (1983) The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. Theor Appl Genet 66:101-109

PALMER JD, STEIN DB (1986) Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. Curr Genet 10:823-833

**PANAYOTOV I** (1980) New cytoplasmic male sterility sources in common wheat: their genetical and breeding considerations. *Theor Appl Genet* 56:153-160

**PEDERSEN S, SIMONSEN V, LOESCHKE V** (1987) Overlap of gametophytic and sporophytic gene expression in barley. *Theor Appl Genet* 75:200-206

**PICARD E, De BUYSER J** (1977) High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amélior Plant* 27:483-488

**PICARD E, De BUYSER J, HENRY Y** (1978) Technique de production d'haploïdes de blé par culture d'anthères *in vitro*. *Le Sélectionneur Fr* 26:25-37

**QUETIER F, VEDEL F** (1977) Heterogeneous populations of mitochondrial DNA molecules in higher plants. *Nature* 268:365-368

**RINES HW, GENGENBACH BG, BOYLAN KL, STOREY KK** (1988) Mitochondrial DNA diversity in oat cultivars and species. *Crop Sci* 28:171-176

**RIVES M, PICARD E** (1977) A case of genetic assimilation: selection through androgenesis or parthenogenesis of haploid producing systems (an hypothesis). *Ann Amélior Plant* 27:489-491

**RODE A, HARTMANN C, DRON M, PICARD E, QUETIER F** (1985) Organelle genome stability in anther-derived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L., cv. 'Moisson'). *Theor Appl Genet* 71:320-324

**RODE A, HARTMANN C, BENSLIMANE A, PICARD E, QUETIER F** (1987) Gametoclonal variation detected in the nuclear DNA from doubled haploid lines of a spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. 'César'). *Theor Appl Genet* 74:31-37



**SHIMADA T, MAKINO T** (1975) *In vitro* culture of wheat. III. Anther culture the A genome aneuploids in common wheat. Theor Appl Genet 46:407-410

**SHIMADA T, OTANI M** (1989) Varietal differences in green plant regeneration ability of wheat pollen embryoids. Jpn J Breed 39:187-193

**SZAKÁCS É, KOVÁCS G, PAUK J, BARNABÁS B** (1988) Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep 7:127-129

**TERACHI T, OGIHARA Y, TSUNEWAKI K** (1984) The molecular basis of the genetic diversity among the cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops*. III. Chloroplast genomes of the M and modified M genome-carrying species. Genetics 108:681-695

**TERACHI T, TSUNEWAKI K** (1985) The molecular basis of genetic diversity among the cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops*. 5. Mitochondrial genome diversity among *Aegilops* species having identical chloroplast genomes. Theor Appl Genet 73:175-181

**TSUJIMOTO H, TSUNEWAKI K** (1984) Gametocidal genes in wheat and its relatives. I. Genetic analyses in common wheat of a gametocidal gene derived from *Aegilops speltoides*. Can J Genet Cytol 26:78-84

**TSUJIMOTO H, TSUNEWAKI K** (1985) Hybrid dysgenesis in common wheat caused by gametocidal genes. Jpn J Genet 60:565-578

**TSUNEWAKI K, ENDO TR, MUKAI Y** (1974) Further discovery of alien cytoplasms inducing haploids and twins in common wheat. Theor Appl Genet 45:104-109

**TSUNEWAKI K, MUKAI Y, ENDO TR, TSUJI S, MURATA M** (1976) Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. V. Classification of 23 cytoplasms into eight plasma types. Jpn J Genet 51:175-191

**TSUNEWAKI K, MUKAI Y, YAMAMORI H** (1984) The Salmon method of haploid production in common wheat. In: Proc Int Symp Genet Manip in Crops, Beijing, p 21

**WADDINGTON CH** (1961) Genetic assimilation. Adv Genet 10:257-293

**ZEVEN AC, ZEVEN-HISSINK NC** (1976) Genealogies of 14,000 wheat varieties. NGC-CIMMYT, Wageningen, 120 pp

**ZHUANG JJ, JIA X, CHEN G** (1984) Studies on induction of plant differentiation in pollen callus of wheat. Acta Genet Sin 11:374-381 (kinaiul, angol összefoglalóval)

A jelöltnek a témakörben készült publikációi:

**SZAKÁCS É, BARNABÁS B, SÁGI L** (1987) A kalluszindukció és a növényregeneráció szubsztitúciós analízise búza (*Triticum aestivum* L.) antérakultúrában. In: 1. Magyar Genetikai Kongr Összefogl, Budapest, p 88

**BARNABÁS B, SZAKÁCS É, SÁGI L, KOVÁCS G** (1988) A haploid kalluszindukció és növényregeneráció genetikai javításának lehetőségei búza (*Triticum aestivum* L.) antérakultúrákban. Növénytermelés 37:289-292

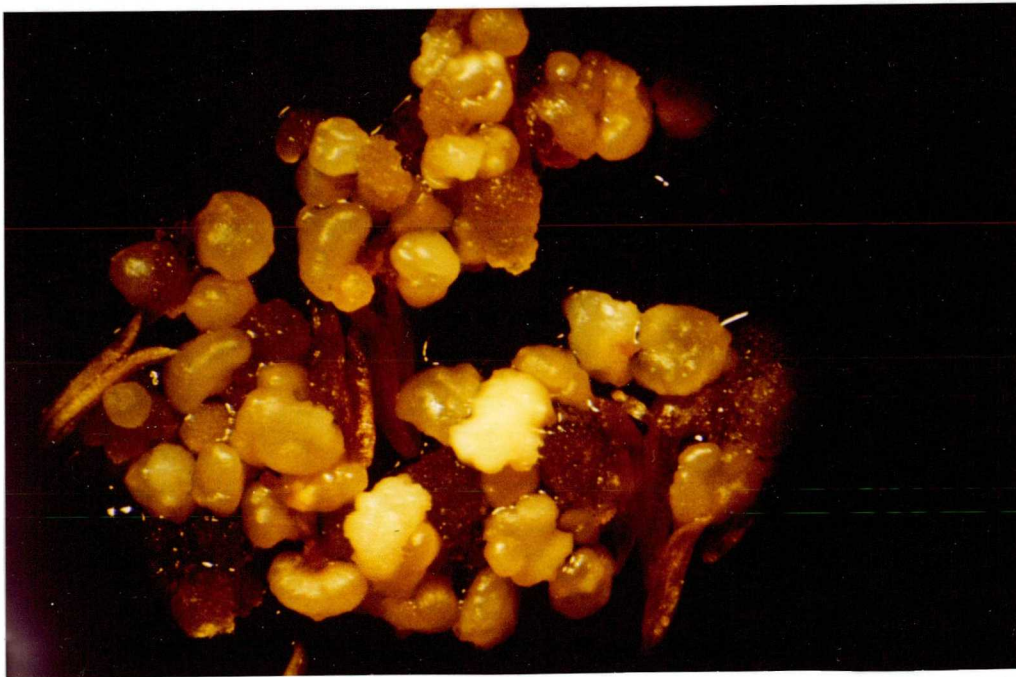
**L SÁGI, B BARNABÁS** (1989) Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 78:867-872

**LJ SÁGI, B BARNABÁS** (1989) Role of the 1AL.1RS and 1BL.1RS translocations in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). (közlésre beküldve)

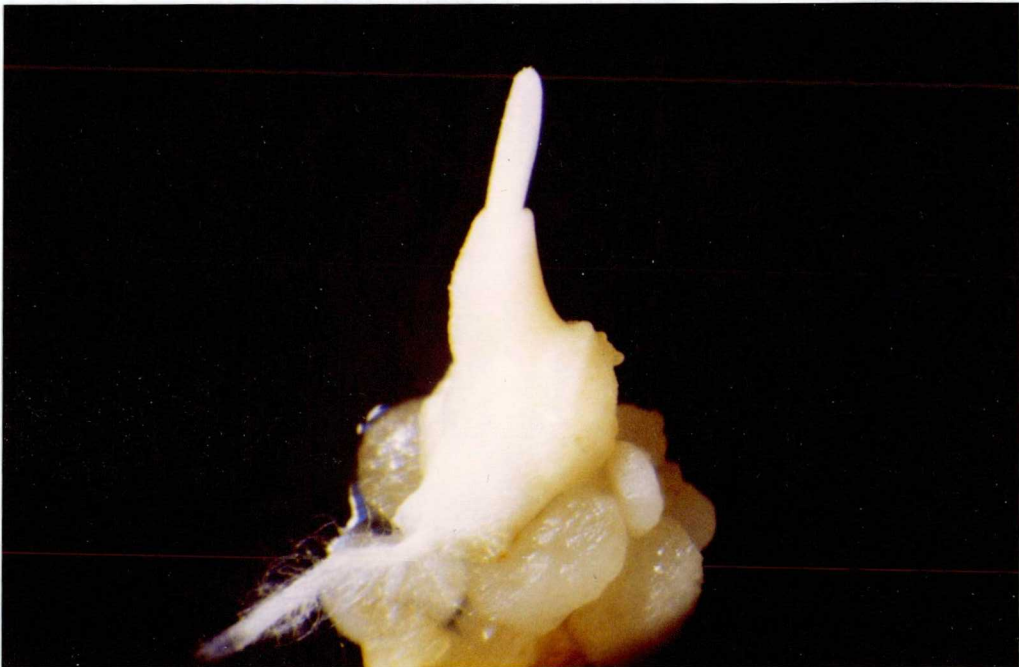
## FÜGGELÉK



Proembriók antérakultúrában,  
4 hetes tenyésztés után



Proembriók antérakultúrában,  
P-2 táptalajon, 4 hetes tenyésztés után



Proembrió csoportban csírázó embrió



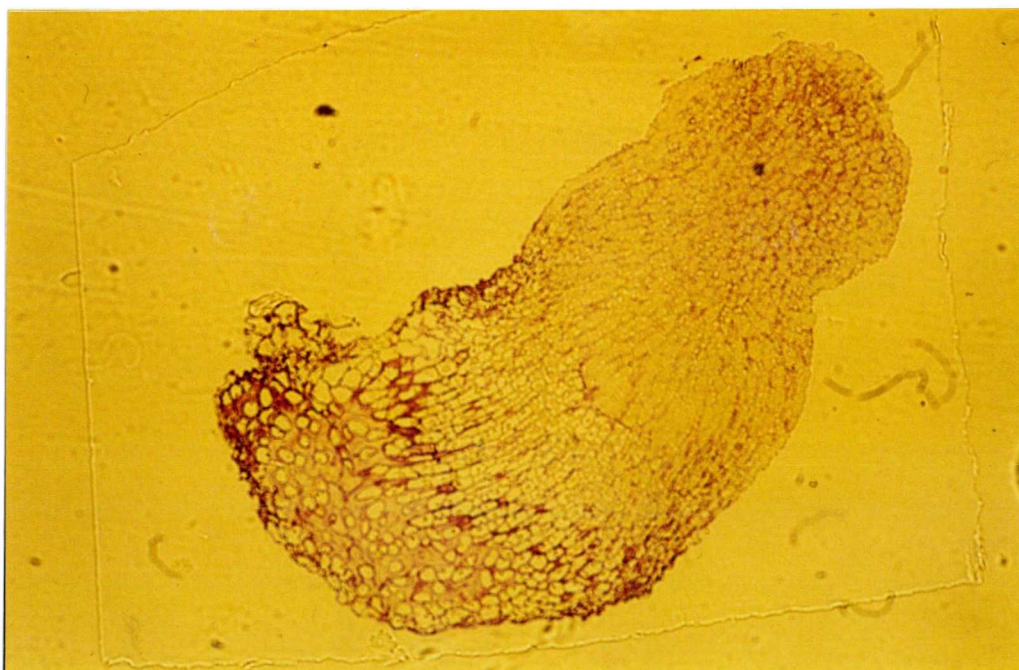
Differenciálódó hajtások  
190-2 regenerációs táptalajon, 2 hét után







Nem embriogén, vizenyős kallusz  
a proembriókból indított szubkultúrában

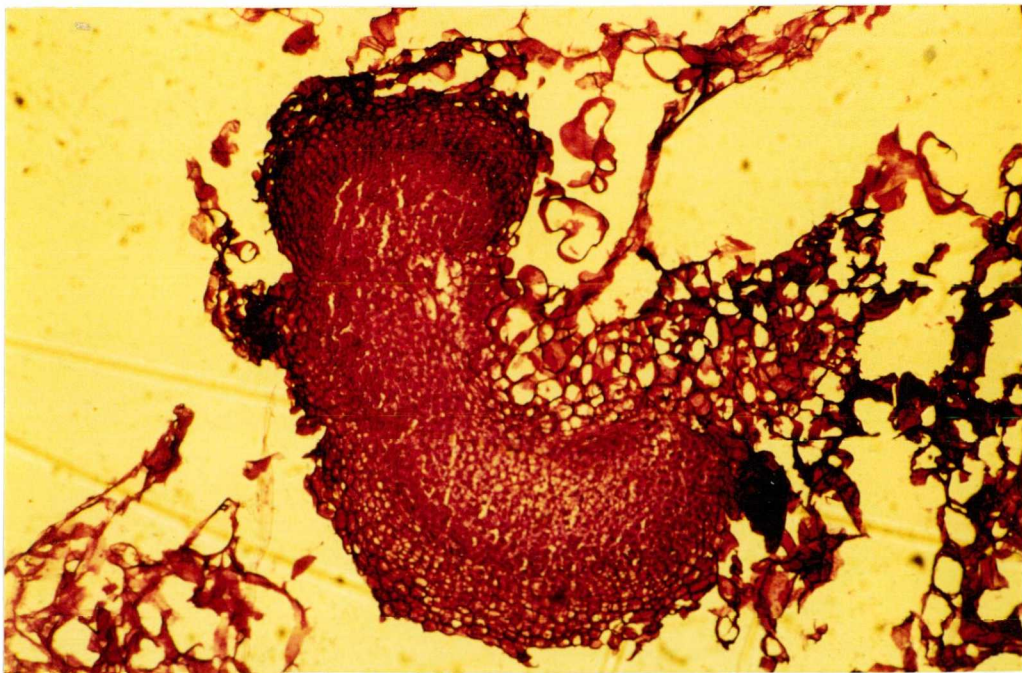


Nem embriogén kallusz szövettani metszete  
(M=60x, festés: Schiff-reagens)

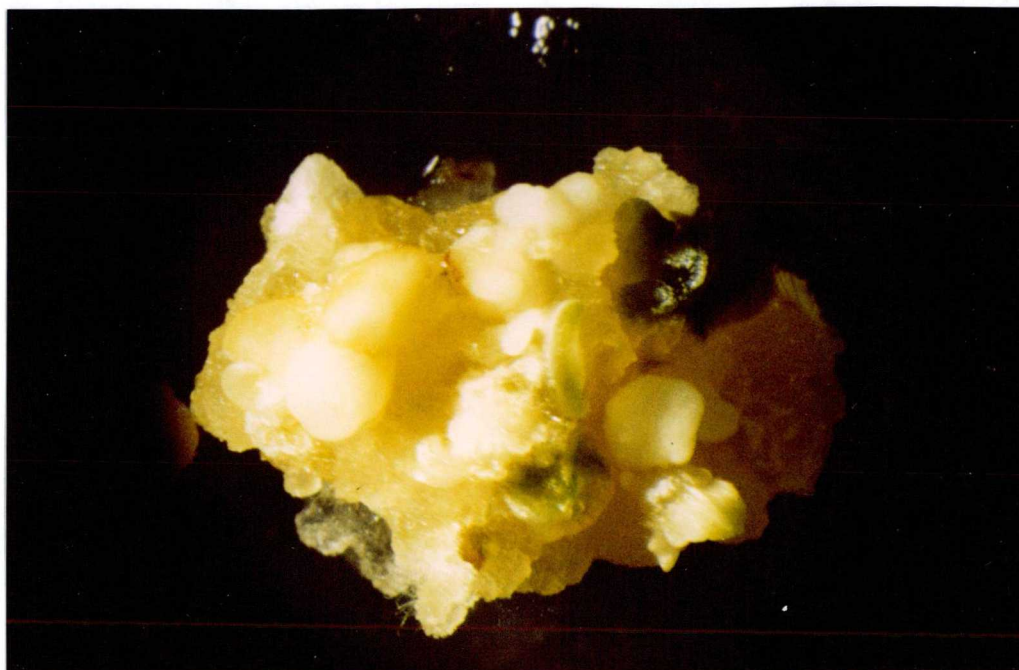




Embriogén kallusz  
a proembriókból indított szubkultúrában



Embriogén kallusz szövettani metszete  
(M=80x, festés: Schiff-reagens)



Regeneráló embriogén kallusz  
190-2 táptalajon



Tömeges hajtásdifferenciáció  
embriogén kalluszokból





Korai kalászképződés  
a regenerációs táptalajon



Törpe, steril (haploid) regeneráns,  
cserépbe ültetés után



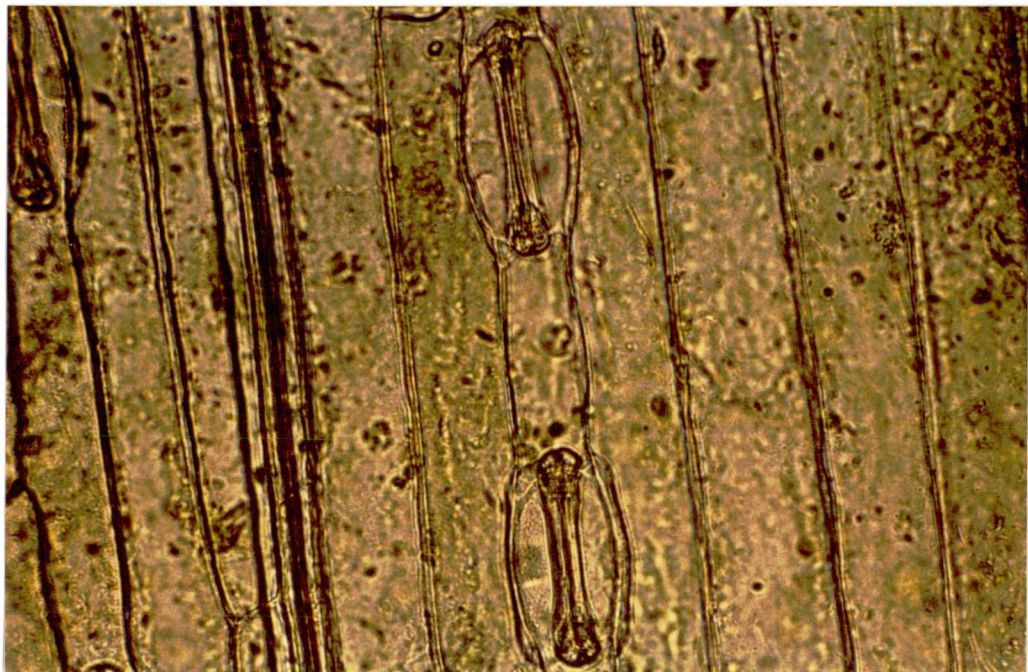
Egy száron két kalászt  
hozó regeneráns







Haploid regeneráns sztómamérete,  
alsó levélepidermiszen ( M = 312.5x )

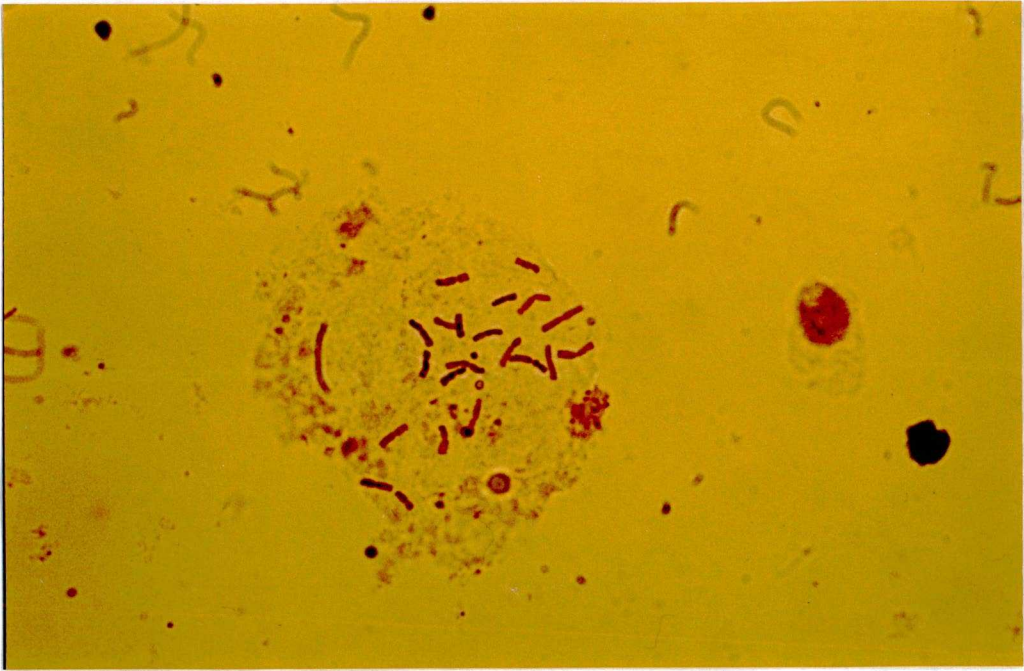


Diploid regeneráns sztómamérete  
( M = 312.5x )

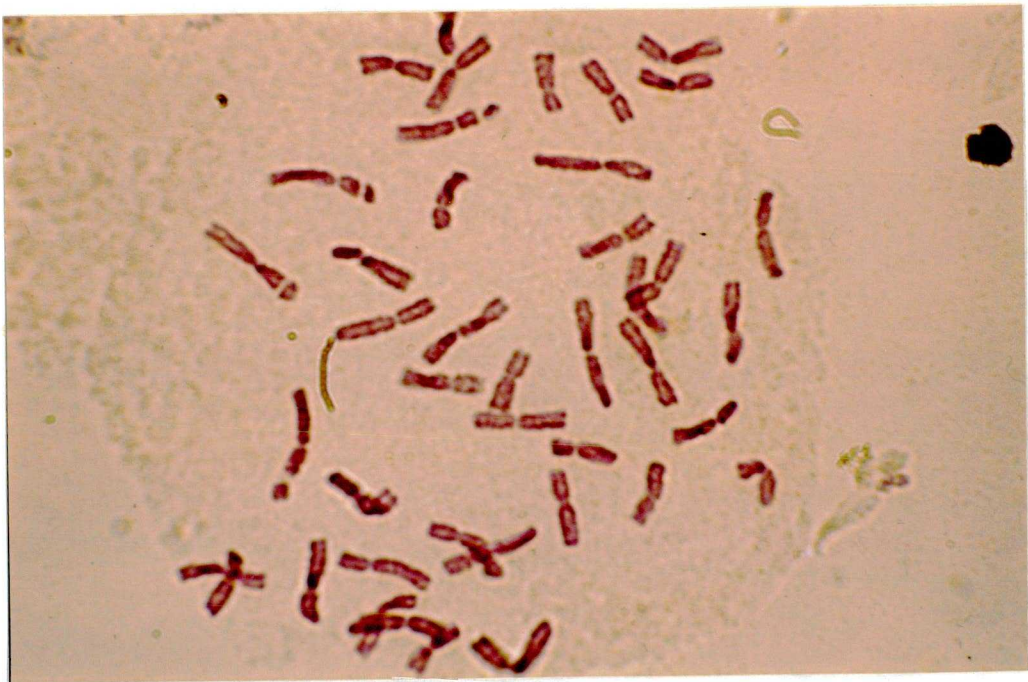


1B/1R transzlokációs fajta (H-77022, Benoist)  
mitózisa gyökércsucsban, 1 pár SAT kromoszómával  
( M = 80x)





Haploid ( $n = 21$ ) regeneráns mitózisa gyökércsucsban,  
(1 pár) SAT kromoszómával (  $M = 312.5x$  )



Diploid ( $2n = 42$ ) regeneráns mitózisa gyökércsucsban,  
2 pár SAT kromoszómával (  $M = 1250x$  )