

Zárójelentés

A pályázat célja olyan *in vitro* szelekciós technika kidolgozása és tesztelése volt, mely lehetővé teszi haploid szövettenyészetekből kiindulva dihaploid, fertilis paraquattal ill. egyéb oxidatív károsodást előídező stresszekkel szemben ellenálló genotípusok előállítását.

In vitro szelekció és DH₀ növények előállítása

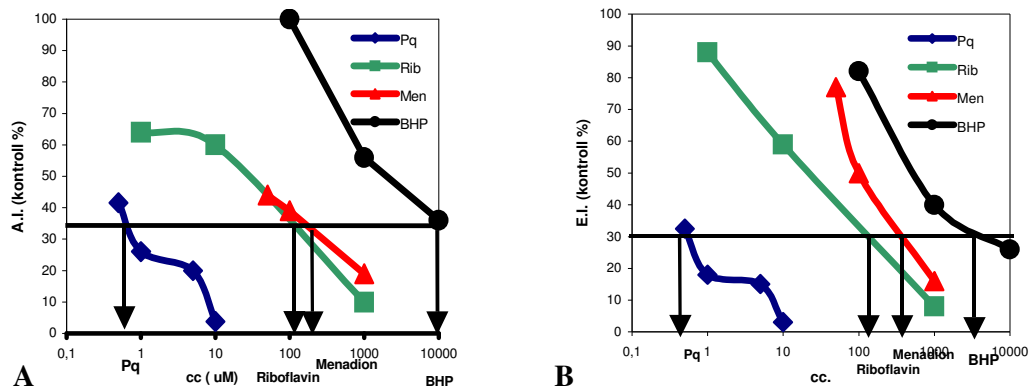
Az *in vitro* szelekció megvalósítása érdekében mintegy 60 000 db antérát helyeztünk különböző oxidatív stresszt indukáló vegyületeket (paraquat, menadion, t-BHP, metionin+riboflavin) tartalmazó indukciós táptalajra. A különböző szelekciós ágenseket többféle koncentrációban alkalmaztuk (lásd részjelentések). A szelekció hatékonyságát mutatja, hogy 17 db fertilis, DH₀ növényt sikerült előállítani paraquat tartalmú táptalajról, 14 db növényt a t-BHP, lipidperoxidot tartalmazó táptalajról, 10 db növényt metionint+riboflavint (met+rib) tartalmazó táptalajról és csupán 3 db DH₀ növényt sikerült felnevelni menadion tartalmú táptalajról (1. táblázat). (A szelekciós ágens nem tartalmazó (kontroll) táptalajról több száz növény regenerációja valósulhatott volna meg, amennyiben mindet felneveltük volna).

1. táblázat: Mikroszórak *in vitro* szelekciójával kapott eredmények.

Kezelés	Koncentráció	Lerakott antéra	Antéra indukció %	Embrió indukció %	Regenerációs %	Fertilis növény (db)
Kontroll		8000	50	124	14	28
Paraquat (Pq)	I0-R50µM*	5000	4.16	9.0	4.85	4
	I0-R100µM**	5000	3.5	9.2	3.55	6
	0.5µM	7000	20.8	40.2	10.1	2
	1.0µM	7000	13	22.3	3.45	5
t-BHP	0.1mM	5000	52.1	102	2.45	10
	1mM	3000	28	49	5.4	3
	10mM	2500	18	32	4.4	1
Metionin+riboflavin	10µM	3000	30	73	3.8	10
Menadion	100µM	2000	19.6	62	1.8	3

* a regenerációs táptalajban volt 50 µM Pq, ** a regenerációs táptalajban volt 100 µM Pq.

Az *in vitro* szelekció során részletes vizsgálatokat végeztünk a különböző szelekciós ágensek mikroszórak egyedfejlődésére gyakorolt hatásának tanulmányozására. E vizsgálatok alapján megállapítható volt, hogy az összes vegyület, bár különböző koncentrációkban (1. ábra), gátolta a mikroszórak fejlődését, ami megmutatkozott mind a mikroszóra indukciós, mind pedig a mikroszóra eredetű struktúrák (embriók és. kalluszok) regenerációs képességének csökkenésében.

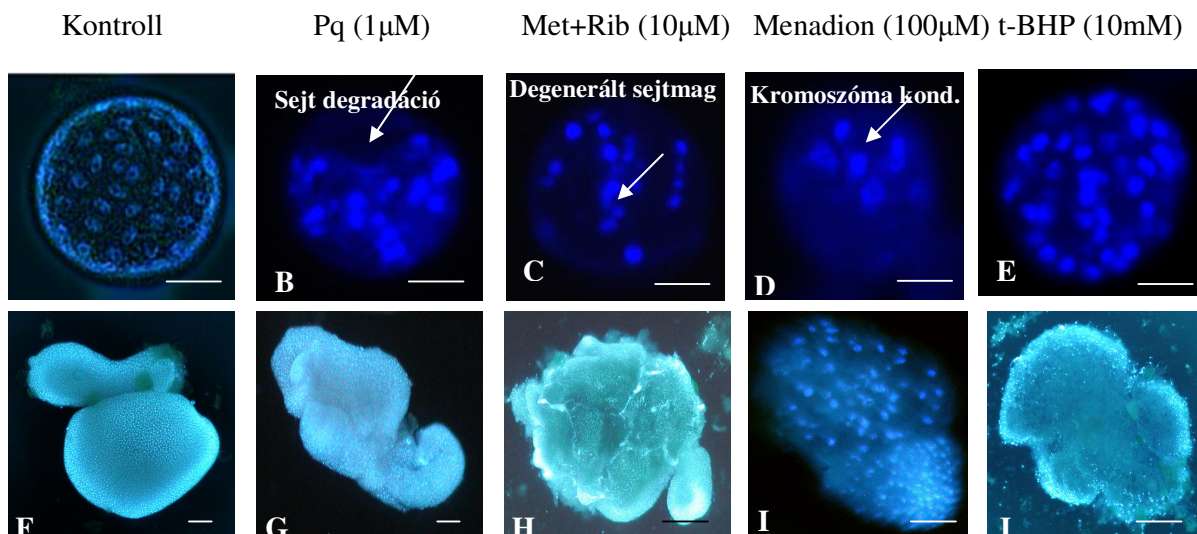


1. ábra: A különböző oxidatív stresszt indukáló vegyületek hatása az antéra (A) és az embrió (B) indukció alakulására a kontroll %-ban kifejezve.

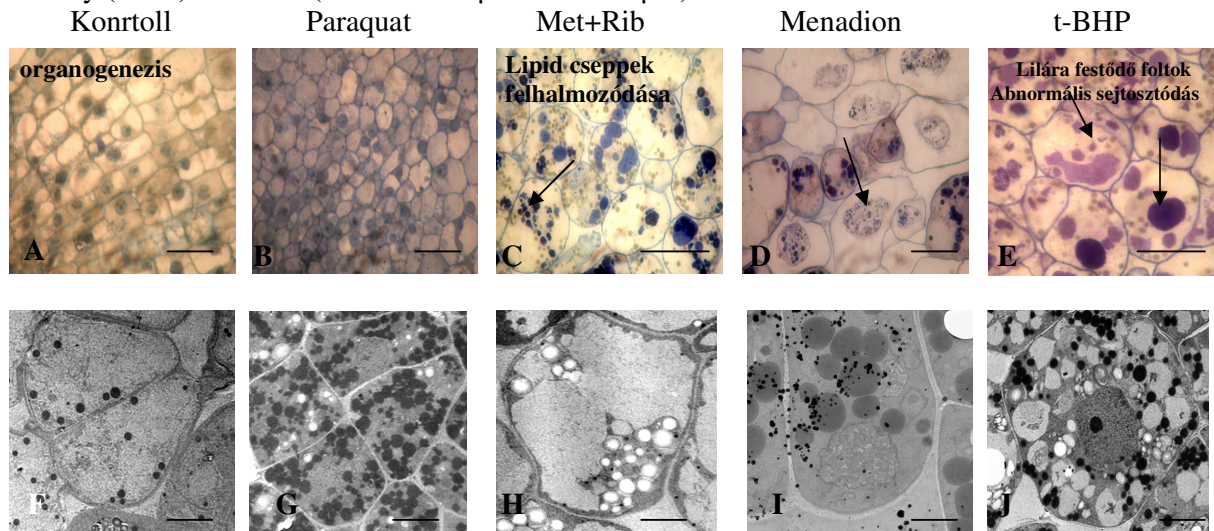
A citológiai és ultrastrukturális vizsgálatokat a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ Elektronmikroszkóp laboratóriumával közösen végeztük. Vizsgálatainkat 7 napos mikrospórákon és 30 napos mikrospóra eredetű struktúrákon végeztük. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy az egyes szelekciós ágensek számos citológiai, morfológiai és fejlődésbiológiai elváltozást idéztek elő (2. és 3. ábra).

Az egyes szelekciós ágensek számos citológiai, morfológiai és fejlődésbiológiai elváltozást idéztek elő. A citológiai vizsgálatokat 7 napos mikrospórákon és 30 napos mikrospóra eredetű struktúrákon végeztük. A paraquat, a metionin+riboflavin és a menadion erőteljes kromoszóma kondenzációkat és degenerált sejtmagokat okozott a mikrospórákban, amelyek különböző méretű sejt degradációkat idéztek elő (2. ábra B-D). A 30 napos antéra kultúrából származó mikrospóra eredetű struktúrák toluidin késsel festett fél vékony metszeteinek tanulmányozása során a metionin+riboflavin kezelés hatására lipid felhalmozódást (3. ábra C), míg a t-BHP tartalmú táptalajról regenerált kalluszosokban számos nagy kiterjedésű, toluidin késsel erősen festődő membránnal körülhatárolt sejtorganelumot figyeltünk meg (3. ábra E). A paraquat és a menadion sejtelhalásokat idéztek elő a mikrospórák fejlődése során, így gyakoribbá váltak az amorf rendellenes alakú embriók (2. ábra G és I). A menadion és a t-BHP módosította a mikrospórák *in vitro* fejlődésének lehetséges útjait. A menadion megnövelte az embriószerű formák, a t-BHP a kalluszszerű struktúrák arányát. Az ilyen jellegű vizsgálatok eredményeit számos konferencián poszter ill. előadás, valamint tudományos közlemények formájában bemutattuk (lásd részletes lista).

2. ábra: 7 és 30 napos antéra kultúrából származó mikrospórák ill. mikrospóra eredetű struktúrák DAPI festése (A-J), valamint 30 napos antéra kultúrából származó struktúrák fél vékony metszeteinek toluidin kékes festése. (Bar= A-J 25µm, F-I 100µm és J 50µm)



3. ábra: 30 napos antéra kultúrából származó struktúrák fél- (festés toluidin kékkel) ill. ultravékony (TEM) metszeti. (Bar= A-E 25µm és F-J 20 µm)

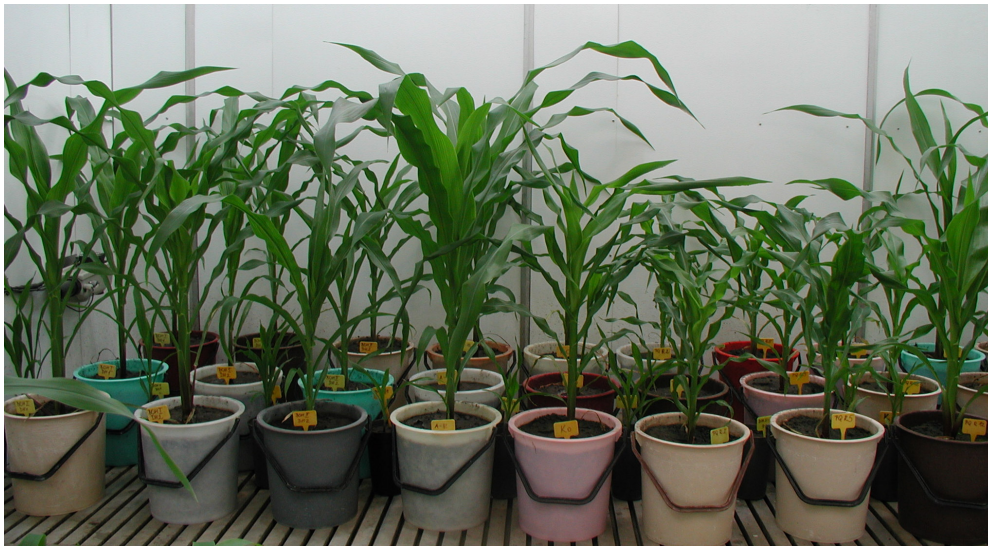


A DH növények élettani vizsgálata

A DH₀ növények előállítását követően megkezdtük a szelektált vonalak DH₁ utódainak stressz-fiziológiai jellemzését annak megállapítása érdekében, hogy ezek a növények valóban jobb oxidatív stressz toleranciával rendelkeznek-e, mint a kontroll (szelektációs nyomásnak nem kitett) növények.

A vizsgálatok során kiderült, hogy a paraquat tartalmú táptalajról regenerált növények közül csak 11, a t-BHP tartalmú táptalajról regenerált növények közül 9 és a metionin+riboflavin tartalmú táptalajról regenerált növények közül csak 5 volt csírázó képes, vagy vizsgálatra alkalmas. Ilyen szempontból a menadion esetében a szelekció nem volt eredményes.

Az élettani vizsgálatokhoz a növényeket növénynevelő kamrában (PGV-36) neveltük kb. 2 hónapig (16h fény (200 μ mol/m²s), 80% RH és 15/18 °C kezdeti hőmérsékleten, melyet hetente 2/2 °C-kal emeltük). A fiziológiai vizsgálatokat a teljesen kifejlődött, de az öregedés jeleit még nem mutató leveleken végeztük és a virágzás előtt befejeztük (4. ábra).



4. ábra: A vizsgált növényi anyag.

A megfelelő fejlettségű levelekből levélkorongokat kivágva, úsztatásos kísérletekben vizsgáltuk az egyes vonalak szelektációs ágensekkel szembeni toleranciájukat.

A fiziológiai teszteléshez a klorofill *a* fluoreszcencia indukció módszerét, klorofill (a+b) tartalom meghatározásának, valamint ionvezető-képesség mérésének módszereit használtuk. A lipidperoxid tartalmú (t-BHP) táptalajról származó egyedeket lipidperoxidáció mértékének meghatározásával is kiegészítettük. A fiziológiai vizsgálatok elvégzésének módjait, a mérési eredményekből számolt paramétereket a részjelentésekben részletesen ismertettük, így most attól eltekintve, összesített táblázatos formában mutatjuk be a vizsgált paraméterekből számolható rezisztencia faktorokat minden egyes vonal esetében (2. táblázat). A kontrollhoz képest szignifikánsan toleránsabb vonalakat piros színnel kiemeltük. Ezen vizsgálatok alapján a Pq tartalmú táptalajról regenerált vonalak közül 6, a t-BHP-ot tartalmazó táptalajról regenerált vonalak közül 5, a metionin+riboflavint tartalmazó táptalajról szelektált vonalak közül legalább 2 toleránsabbnak mutatkozott, mint a kontroll vonalak.

2. táblázat: A regenerált vonalak fiziológiai vizsgálatok alapján számolt rezisztencia faktora.

Paraquat tartalmú táptalajról szelektált vonalak

Vonal	Rf _{FV/FM}	Rf _{Chl}	Rf _{ion.v.}
A-18	1.1	0.8	1.1
Kontroll	1	1	1
R _{Pq} 1	1.71	1.97	1.1
R_{Pq}2	2.43	2.2	1.2
R _{Pq} 3	1.5	1.6	1.1
R _{Pq} 4	0.36	0.84	1.2
R_{Pq}5	7	4.15	1.8
R _{Pq} 6	0.86	0.64	1.3
R _{Pq} 7	1.71	1.2	1.0
R_{Pq}10	1.6	3.0	1.2
R_{Pq}12	2.1	2.2	2.5
R_{Pq}14	10.5	3.4	3.4
R_{Pq}17	4.87	3.1	1.8

t-BHP tartalmú táptalajról szelektált vonalak

Vonal	Rf _{EQY}	Rf _{Chl}	Rf _{lipidperox.}
A-18	1,11	0,8	2,9
Kontroll	1	1,	1
R_{BHP}1	1.65	1,67	3,5
R_{BHP}2	2.02	10,2	1,3
R _{BHP} 3	1.62	1,74	2,2
R _{BHP} 4	1,44	1,17	1,8
R_{BHP}5	1,10	2,91	2,07
R _{BHP} 6	1,12	0,4	3,36
R_{BHP}7	1,97	3,4	2,74
R _{BHP} 8	1,74	2,1	1,54
R_{BHP}9	1,35	10,8	3,23

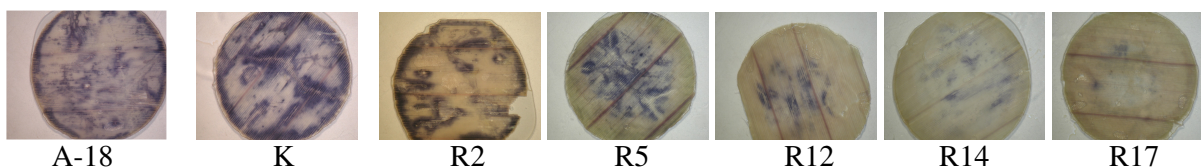
Metionint és riboflavint tartalmazó táptalajról szelektált vonalak

Vonal	Rf _{EQY}	Rf _{Chl}
A-18	1,8	1,62
Kontroll	1	1
R _R 4	0,8	3,6
R _R 5	3,06	3,9
R _R 6	1,06	8,7
R _R 8	2,38	2,6
R _R 9	3,4	3,7

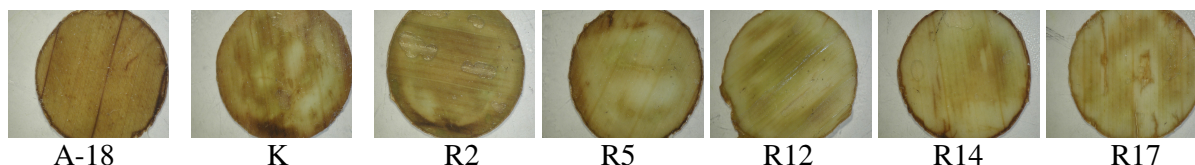
E növények körében mutatott magasabb oxidatív stressz toleranciát *in situ* festési eljárással is sikerült igazolnunk (5. ábra). Ezekhez a vizsgálatokhoz a szuperoxid gyökök *in situ* kimutatására is alkalmas NBT (nitro-blue-tetrazolium) és a hidrogén peroxid (H₂O₂) kimutatására alkalmas DAB (3'3'-diaminobenzidine) festési eljárásokat alkalmaztuk (Fryer et al. 2002, J Exp. Bot, 53, 1249-1254).

5. ábra: Szuperoxid gyökök és H₂O₂ *in situ* kimutatása.

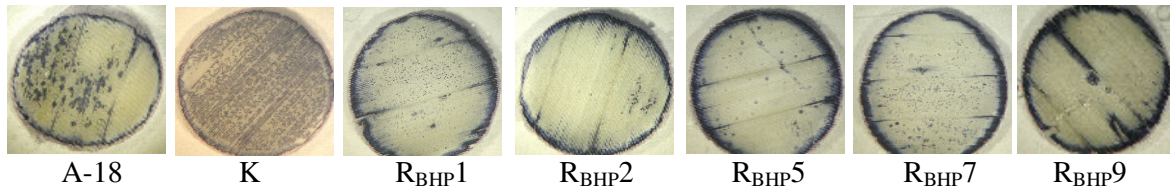
Pq kezelt NBT festett minták



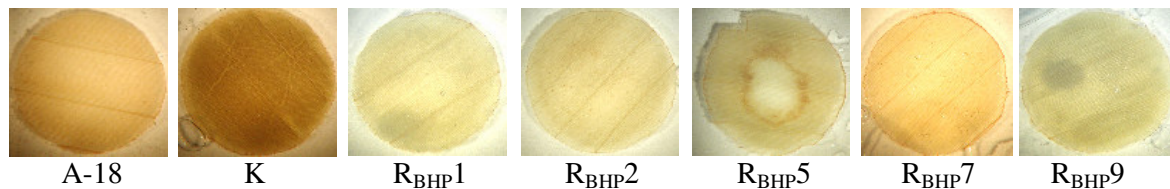
Pq kezelt DAB festett minták



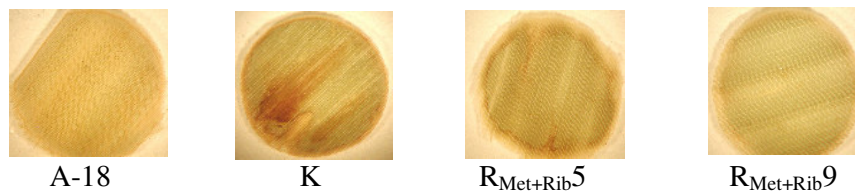
BHP kezelt NBT festett minták



BHP kezelt DAB festett minták



Met+Rib kezelt DAB festett minták



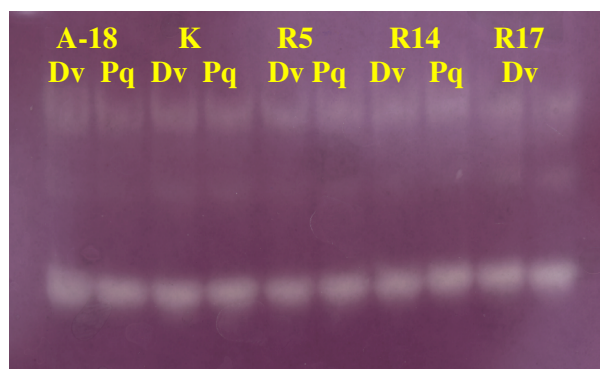
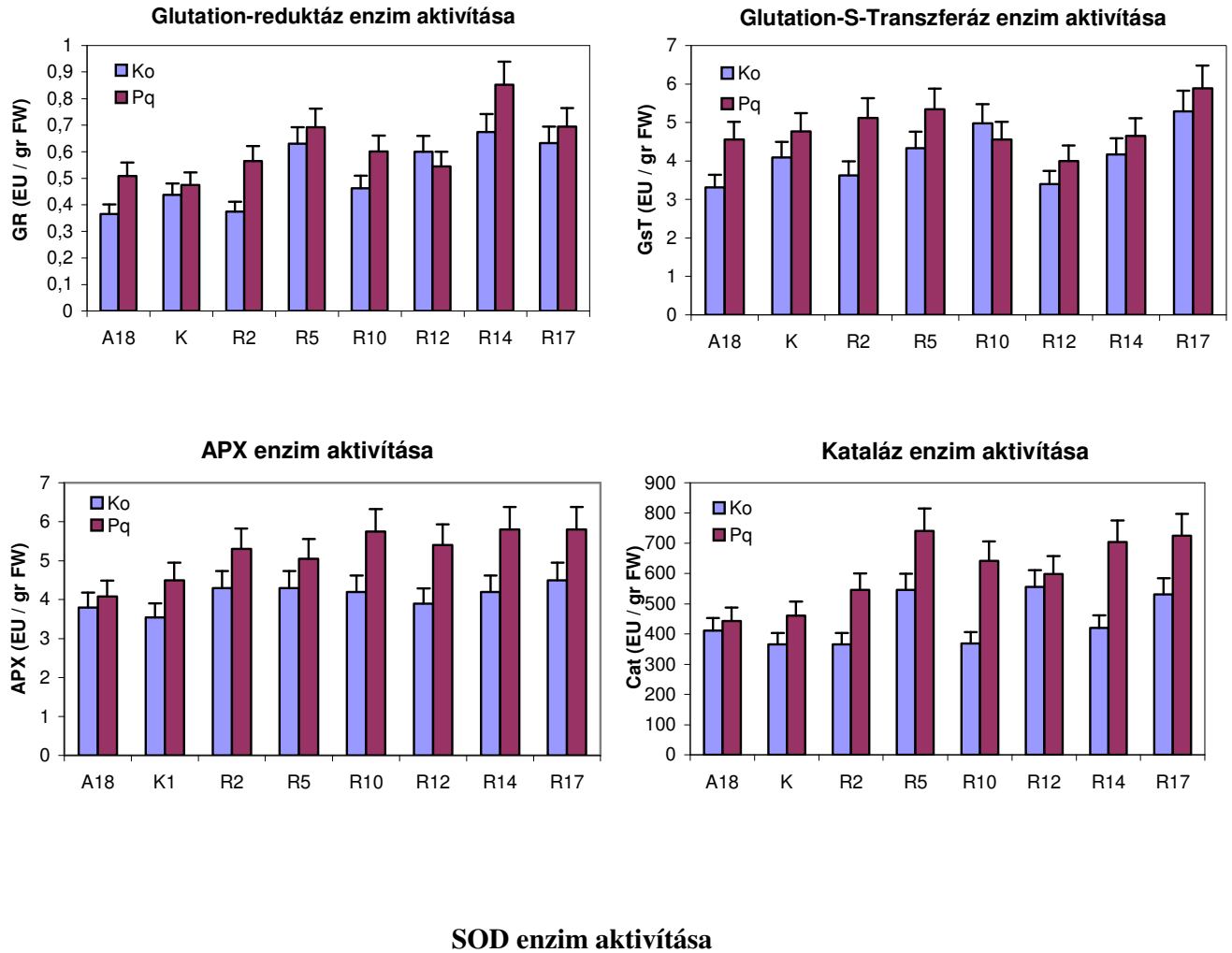
Toleráns vonalak biokémiai (antioxidáns enzimek aktivitásának) vizsgálata

A vizsgálatok 3. szakaszában (évében) a rezisztensnek tűnő vonalakat teszteltük annak megállapítása érdekében, hogy ezen vonalak jobb oxidatív stressz toleranciájának hátterében állhat-e az antioxidáns védekező rendszer fokozott aktivitása.

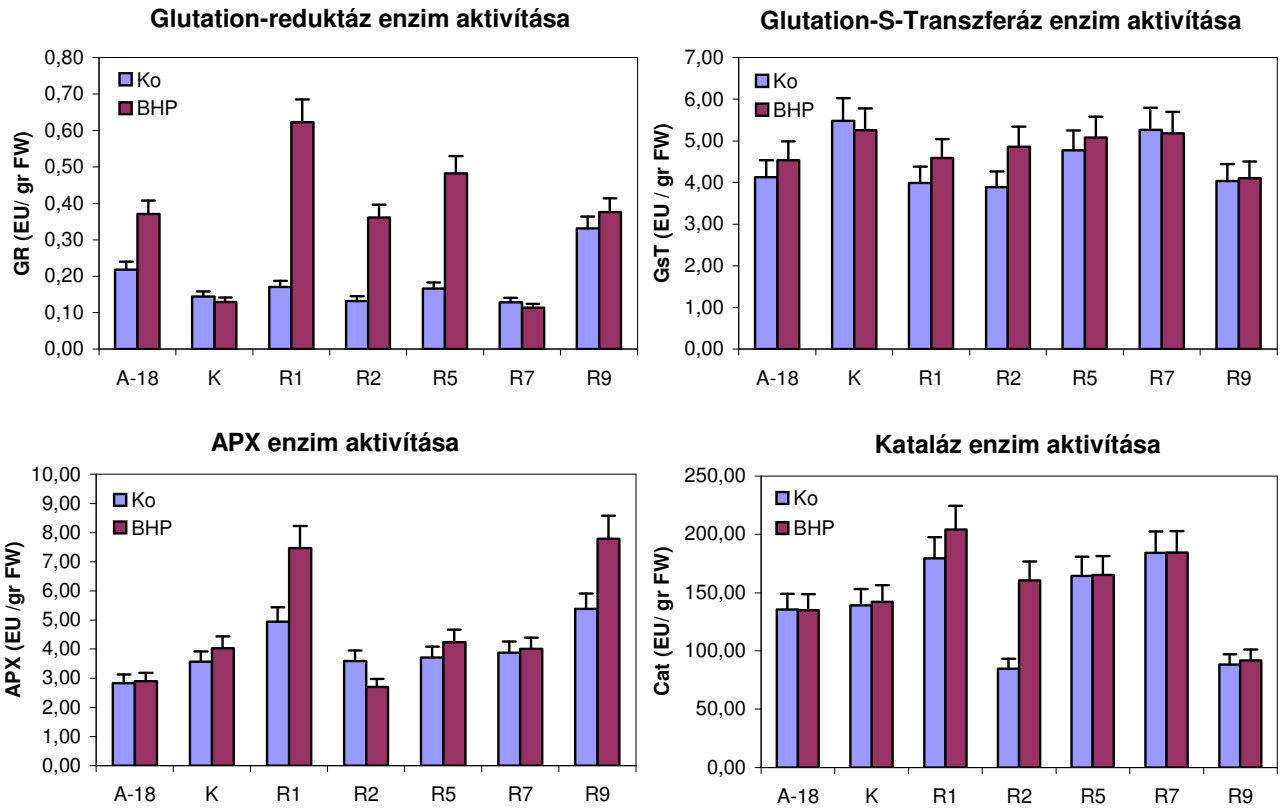
Ennek érdekében a kísérleteinket a fiziológiai vizsgálatokhoz hasonló módon végeztük. Az antioxidáns enzimek (aszcorbinsav peroxidáz (APX), glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GsT) és kataláz) aktivitásait spektrofotometriás (Darkó és mtsai. 2004, Plant Sci 166(3):583-591), ill. a SOD enzim aktivitását gélelektroforézis (Fodor és mtsai 1997, Plant Physiol 114(4):1443-1451) módszerek segítségével határoztuk meg. Az eredményeinket a 6. 7. és 8. ábrákon mutatjuk be.

Az adatok alapján a paraquat tartalmú táptalajról szelektált vonalak közül az R5, R14 és R17-s vonalak GR, GsT és kataláz enzimeinek aktivitása alap és paraquat kezelés hatására nagyobb aktivitással rendelkeznek, mint a kontroll növények (6. ábra).

6. ábra: Paraquat tartalmú táptalajról szelektált vonalak antioxidáns (aszzkorbinsav peroxidáz (APX), glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GsT) és kataláz, valamint szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimeinek aktivitásai.

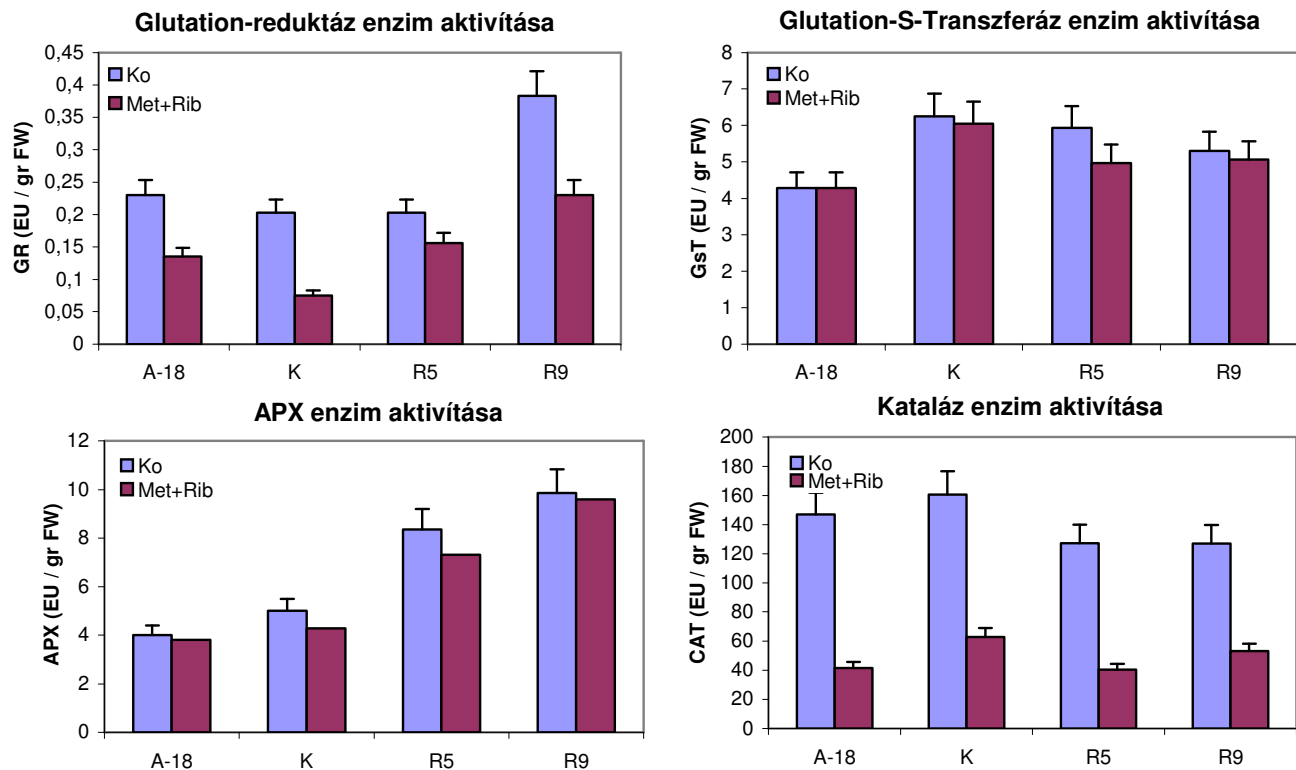


A t-BHP tartalmú táptalajról szelektált vonalak esetében a vizsgált vonalak közül az R1 vonal GR, APX és kataláz enzimek aktivitása magasabb, mint a kontroll növényeké. Megfigyelhető továbbá, hogy az R9-es vonal nagyobb APX és az R7-es vonal nagyobb kataláz aktivitással rendelkezik, mint a kontroll növények (7. ábra).



7. ábra: t-BHP tartalmú táptalajról szelektált vonalak aszkorbinsav peroxidáz (APX), glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GsT) és kataláz enzimeinek aktivitásai.

A metionin és riboflavint tartalmazó táptalajról szelektált vonalak vizsgálata során megállapítottuk, hogy az R5 vonal esetében csak az APX, az R9-es vonal esetében a GR és az APX aktivitásai voltak magasabbak, mint a kontroll növényeké (8. ábra). Sajnos a SOD enzim egyik kezelés esetében sem mutatott nagyobb aktivitást a szelektált vonalakban, mint a kontrollban.



8. ábra: Metionin és riboflavin tartalmú táptalajról szelektált vonalak antioxidáns (aszorbinsav peroxidáz (APX), glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GsT) és kataláz) enzimeinek aktivitásai.

Mindezek alapján feltételezhető, hogy az egyes szelektált vonalakban bizonyos (lásd korábban) antioxidáns enzimek nagyobb aktivitása hozzájárulhat az adott vonal oxidatív stressztoleranciájának növekedéséhez, de általános antioxidáns kapacitás növekedéséről ezen vonalak esetében sem beszélhetünk. Feltételezhetően ezen növények rendelkezhetnek egyéb általunk eddig meg nem vizsgált, bár a szakirodalom szerint előforduló, egyéb védekező mechanizmusokkal is.

Toleráns vonalak hideg- és szárazságtűrésének, valamint egyes patogénekkal szembeni érzékenységeinek vizsgálata

A vizsgálatok utolsó szakaszában (4. év) arra voltunk kíváncsiak, hogy a szelektált és a megfelelő rezisztenciával rendelkező vonalak nemcsak a szelekciós ágenssel szemben, hanem egyéb oxidatív módon károsító stresszfajtákkal szemben is nagyobb ellenállóságot mutatnak-e. Ehhez hideg- és szárazságtűrés vizsgálatokat végeztünk. A budapesti Növényvédelmi Kutatóintézet Kóréletteni

Osztályán pedig azt tesztelték, hogy szelektált és a megfelelő rezisztenciával rendelkező vonalak toleránsabbak-e egyes patogénekkal szemben.

A kukorica igen érzékeny a kelés időszakában, valamint fiatal (néhány leveles) állapotban, ezért a hidegtűrést csírázáskor, valamint fiatal, 4-6 leveles fenofázisban vizsgáltuk.

Csírázáskori hidegtűrés vizsgálata

A magokat alacsony (T_8 °C) hőmérsékleten csíráztattuk. Kontrollként T_{25} °C-t alkalmaztunk. Vizsgáltuk a csírázási %-t (a csírázott/csírázásra letett magok száma), ill. a csírázásig eltelt napok számát. Sajnos a csírázás mértéke igen változó volt az egyes vonalak között, ami az *in vitro* szelekciós technika következménye is lehet, de még így is jelentős számban találtunk olyan vonalakat (R_{Pq5} , R_{Pq14} , R_{BHP1} , R_{BHP2} , R_{BHP5} , R_R5 , R_R9) melyek csírázási %-a eléri, vagy meghaladja a kiindulási A-18-s hibridét (a kontroll DH vonalét pedig mindenképpen). E vonalak általában hamarabb is csíráztak, mint az A-18-s hibrid. Azok a vonalak, melyek hidegtűrésési faktora (csírázási % T_8 °C-n/csírázási % T_{25} °C-n) kisebb volt, mint 0.6 a fiatalkori hidegkezelés során lemaradtak a fejlődésben, a további vizsgálatokra alkalmatlanok voltak. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat: Csírázáskori hidegtűrés vizsgálat: A vizsgált vonalak csírázási %-a, ill. a csírázásig eltelt napok száma $T=25$ °C és $T=8$ °C -n.

Genotípusok	Csírázási % (T_{25} °C)	Csírázásig eltelt napok	Csírázási % (T_8 °C)	Csírázásig eltelt napok	Hidegtűrés faktor
A-18	90	3	88	11	0.97
K	75	3	55	12	0.73
R_{Pq2}	45	4	7	12	0.15
R_{Pq5}	75	3	75	11	1
R_{Pq10}	20	3	8	12	0.4
R_{Pq12}	30	3	18	12	0.6
R_{Pq14}	95	2.92	95	9.52	1
R_{Pq17}	25	3	6	12	0.24
R_{BHP1}	95	2.71	95	11	1
R_{BHP2}	85	2.83	85	10.88	1
R_{BHP5}	90	3	90	11.07	1
R_{BHP7}	75	2.61	60	11.2	0.8
R_{BHP9}	100	3	100	12.28	1
R_R5	100	4	100	10.69	1
R_R9	90	2.5	90	10.84	1

Fiatalkori hidegtűrés vizsgálata

A fotoszintetikus folyamatok igen érzékenyek az alacsony hőmérsékletre. Alacsony hőmérsékleten a toxikus oxigén formák felhalmozódása megnő. Ez károsíthatja a fotoszintetikus apparátus működését, tartós hatás esetén a klorofill (a+b) tartalom csökkenéséhez is vezethet. Mi jelen esetben ezt a két folyamatot vizsgáltuk. A növények a normál kukoricánövekedési program szerint növekedtek kb. 4-5 leveles állapot eléréséig, ekkor 4 napos 8 °C-s hidegkezelésnek vetettük alá őket. Az 5. napon történtek a mérések, ill. mintavétel a klorofill (a+b) tartalom meghatározásához. A fotoszintetikus apparátus működését a klorofill *a* fluoreszcencia indukció módszerével (lásd 2003 évi részjelentés), az Fv/Fm meghatározásán keresztül vizsgáltuk 15 perces sötétadaptálás után. Kontroll vizsgálatokhoz az azonos növekedési program szerint fejlődő és hideg kezelésnek ki

nem tett növényeket használtuk. Amint azt a 4. táblázatban bemutatjuk, hideg kezelés hatására az Fv/Fm drasztikus csökkenése figyelhető meg. Ugyanakkor számos szelektált vonalban ez a csökkenés kisebb mértékű volt, mint a DH_{kontroll} ill, A-18 hibrid esetében. Ezeket a táblázatban piros színnel tüntettük fel. Sajnos a 4 napos kezelés a klorofill (a+b) tartalom tekintetében még nem okozott drasztikus változást, csupán 10-15%-s klorofill tartalom csökkenés volt tapasztalható a hidegkezelés hatására, ami nem tekinthető szignifikánsnak a vizsgált vonalak esetében.

4. táblázat: Fv/F_m paraméter változása a hidegkezelés hatására.

	Fv/F _m	
	T _{18/20} °C	T ₈ °C
A-18	0.763	0.163
K	0.659	0.159
R _{Pq} 2	0.765	0.179
R _{Pq} 5	0.781	0.157
R_{Pq}14	0.748	0.256
R _{BHP} 1	0.788	0.173
R_{BHP}2	0.768	0.289
R _{BHP} 5	0.763	0.202
R_{BHP}7	0.757	0.227
R_{BHP}9	0.756	0.229
R_R5	0.752	0.304
R_R9	0.757	0.228

Ugyanakkor a fotoszintetikus aktivitás (és feltételezhetően egyéb biokémiai folyamatok) csökkenése jelentős mértékben gátolta a növények növekedését, mely megmutatkozott a hidegkezelés után 1 héttel mért növénymagasság csökkenésében is (5. táblázat). A szelektált vonalak közül számos esetben a fejlődés lassulása kisebb mértékű volt a kontrollhoz képest.

5. táblázat: Hidegkezelés hatása a növények növekedésére.

	Növénymagasság (cm)		
	Kontroll	Hidegkezelt	H/K
A-18	34.3	25.8	0.75
K	27.5	16.5	0.6
R _{Pq} 2	21	15.0	0.71
R_{Pq}5	17.7	16.1	0.91
R_{Pq}14	32.0	26.5	0.83
R_{BHP}1	27.0	23	0.85
R_{BHP}2	28.3	24.6	0.86
R _{BHP} 5	33.0	21.8	0.66
R_{BHP}7	23.7	19.5	0.82
R _{BHP} 9	26.0	16.4	0.63
R_R5	18.3	15.2	0.83
R_R9	26.7	22.2	0.83

Toleráns vonalak szárazságtűrésének vizsgálata

A kukorica egyedfejlődésének későbbi szakaszában igen nagy problémát okozhat a korai nyár (magas hőmérséklet ill. csapadékszegényes időszak) beköszöntése. Ezért a vizsgálataink későbbi

szakaszában a 8-10 leveles állapotú növényeket szárazságnak ill. magas hőmérsékletnek tettük ki. A hőmérsékletet a 22/24 °C-ról a kezelés első napján 27, majd ezt követően 35 °C-ra emeltük, az öntözést pedig a 3. nap végére fokozatosan megszüntettük. A 7. nap végén megmértük a növények fotoszintetikus aktivitását, az optimális kvantumhatásfok (F_v/F_m) alapján, majd a 10. nap végén lemértük a növények tömegét (hiszen a szárazság jelentős mértékű vízvesztést eredményez). Amint azt a 6. táblázatban bemutatjuk szárazság és magas hőmérséklet együttes hatásának eredményeképpen a növények fotoszintetikus aktivitása jelentősen, lecsökken. Számos szelektált vonal (a táblázatban pirossal jelzett) esetében ez nem volt olyan mértékű, mint a kontroll növényeknél.

6. táblázat: F_v/F_m paraméter változás hő-stressz és szárazság hatására.

	Fv/Fm	
	T _{18/20} °C	T ₃₅ °C
A-18	0.783	0.210
K	0.768	0.103
R _{Pq2}	0.763	0.123
R_{Pq5}	0.778	0.343
R_{Pq14}	0.756	0.360
R_{BHP1}	0.777	0.303
R _{BHP2}	0.759	0.140
R_{BHP5}	0.760	0.353
R _{BHP7}	0.765	0.223
R _{BHP9}	0.773	0.214
R_{R5}	0.768	0.315
R_{R9}	0.759	0.385

A kezelés 10. napjára a növények egy részének tömege jelentős mértékben csökkent, ami valószínűleg elsődlegesen a nagyfokú vízvesztésnek tulajdonítható. Ezt a későbbiekben vízpotenciál mérésével is igazolni kívánjuk. Ugyanakkor találtunk olyan szelektált vonalakat (R_{Pq5}, R_{Pq14}, R_{BHP1}, R_{R5}), melyek tömege alig változott (7. táblázat). Ezen növények fotoszintetikus aktivitása is magasabb volt, mint a kontrollé.

7. táblázat: A növények friss tömegének változása hő-stressz hatására.

	Növénytömeg (g)		
	Kontroll	Hőkezelt	Hő/K
A-18	50.83	37.5	0.738
K	10.75	8.13	0.756
R _{Pq2}	19.9	11.6	0.583
R_{Pq5}	13.5	12.76	0.943
R_{Pq14}	48.15	42.4	0.88
R_{BHP1}	30.25	29.778	0.98
R _{BHP2}	43.7	25.5	0.58
R _{BHP5}	50.45	27.78	0.55
R _{BHP7}	20.06	13.45	0.67
R _{BHP9}	29.6	17.4	0.59
R_{R5}	14.6	11.55	0.79
R _{R9}	27.35	18.5	0.67

Az egyes genotípusok hideg- és szárazságtűrésének vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy a szelektált vonalak között találtunk olyanokat, melyek jobban elviselték az alacsony hőmérséklet hatásait, mások a magas hőmérséklet és vízhiány okozta károsodásokat, tolerálták jobban, míg néhány genotípus mindkét stresszfélével szemben jobb paraméterrel rendelkezett, mint a kontroll növények.

Toleráns vonalak kórokozókkal szembeni ellenálló képességének vizsgálata

A budapesti Növényvédelmi Kutatóintézet Kóréletani Osztályán folyó kutatásokban kimutatták, hogy a paraquat szelekcióval előállított dohánynövény ellenálló különböző abiotikus stresszekkel és patogén fertőzésekkel szemben is. Együttműködésünk célja az volt, hogy a szelektált és a fiziológiai vizsgálatok alapján a kontroll genotípusoknál nagyobb antioxidáns kapacitással rendelkező vonalak néhány fontos kukorica kórokozóval és toxinnal szemben teszteljük.

Mivel a növényi anyagok csírázás nem volt megfelelő, ezért ezen jellegű vizsgálatainkba a kontroll vonalakon kívül csak a PQR2, PQR5 és PQR14 vonalakat vontuk be.

A genotípusok csírázása jelentősen eltért egymástól és a csíranövények vigorja jelentősen befolyásolja a nekrotróf kórokozókkal szembeni ellenálló-képességet, ezért mértük a csíranövények gyökér- és hajtáskezdeményének átlagos hosszát is a fuzáriumos fertőzési tünetek bonitálásán kívül. Az eredményekből jól látható, hogy PQR5 és PQR14 jelű genotípusok csíranövény korban ellenállóbbak voltak a többi genotípusnál, ami biztató és további munka folytatására ösztönöz (8. táblázat). Érdeemes megjegyezni, hogy a PQR14 genotípus gyökérkezdeményei erős antociánosodást is mutattak.

Hasonló tendenciájú eredményeket kaptunk a fuzarinsav toxinnal szembeni ellenállóság tesztelésekor, azonban ezek az eredmények még nehezen számszerűsíthető, ezért a genotípusok toxinrezisztenciáját vezetőképességi mérésekkel pontosítjuk, amely jelenleg folyamatban van. Elkezdtük a rezisztenciavizsgálatokat más nekrotróf kórokozóval, így a *Exerohilum* (*Helminthosporium*) *turcicum* és *rostratum* gombákkal is.

8. táblázat: Szelektált és kontroll kukorica genotípusok csírázási erélye és ellenállósága *Fusarium graminearum* fertőzéssel szemben. Az egyik esetben a levágott első és második levelet nedves Petri csészében inkubáltuk a gombatenyészetből kivágott agarkoronggal és 4 nap után mértük a képződött nekrosis átmérőjét, míg a másik módszer esetében intakt növények első és második levelét spóra szuszpenzióval fertőztük, nedves kamrában inkubáltuk és 6 nap után az elhalás, illetve a gombafedettség százalékát értékeltük.

	Gyökérhossz (mm)	Hajtáshossz (mm)	Nekrosis átmérő (mm)	Elhalás/fertőzöttség (%)
A 18	3.0±0.5	2.0±0.3	1.1±0.4	55
K	3.4±0.4	1.8±0.6	1.5±0.7	80
PQR2	1.2±0.1	0.9±0.4	1.6±0.9	90
PQR5	3.1±1.1	1.7±0.6	0.9±0.2	40
PQR14	5.2±0.7	2.3±0.3	0.9±0.5	40

Eredmények értékelése

A pályázat célja olyan *in vitro* szelekciós technika kidolgozása és tesztelése volt, mely lehetővé teszi haploid szövettenyészetekből kiindulva dihaploid, fertilis paraquattal ill. egyéb oxidatív károsodást előidéző stresszekkel szemben ellenálló genotípusok előállítását.

Célunk megvalósítása érdekében mintegy 60 000 db antérát helyeztünk különböző oxidatív stresszt indukáló vegyületeket (paraquat, menadion, t-BHP, metionin+riboflavin) tartalmazó indukciós táptalajra. A különböző szelekciós ágenseket többféle koncentrációban alkalmaztuk. A szelekció eredményeképpen 17 db fertilis, DH₀ növényt sikerült előállítani paraquat tartalmú táptalajról, 14 db növényt a t-BHP, lipidperoxidot tartalmazó táptalajról, 10 db növényt metionint és riboflavint (met+rib) tartalmazó táptalajról és 3 db DH₀ növényt sikerült felnevelni menadion tartalmú táptalajról. E növények utódainak fiziológiai vizsgálatával (klorofill *a* fluoreszcencia indukció, klorofill (a+b) tartalom, ionvezető-képesség, valamint lipidperoxidáció mértékének meghatározása) igazoltuk, hogy a szelektált vonalak közül számos valóban nagyobb oxidatív stressz toleranciával rendelkezik, mint a szelekcióban részt nem vett mikrospórákból származó vonalak utódai ill. a kiindulásként használt A-18 hibrid. Eredményeinket *in situ* festési eljárással is sikerült alátámasztanunk. Ugyanakkor az antioxidáns enzimrendszer részletes vizsgálata feltárta, hogy az egyes szelektált vonalakban bizonyos antioxidáns enzimek valóban nagyobb aktivitással rendelkeznek. Ez hozzájárulhat az adott vonal oxidatív stressz toleranciájának növekedéséhez, de általános antioxidáns kapacitás növekedéséről ezen vonalak esetében sem beszélhetünk. Feltételezhetően ezen növények rendelkeznek egyéb védekező mechanizmussal is. Az egyes genotípusok hideg- és szárazságtűrésének vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy a szelektált és megfelelő rezisztenciával rendelkező vonalak között találtunk olyan genotípusokat, melyek nemcsak a szelekciós ágenssel szemben, hanem hideg, ill. magas hőmérséklet és szárazság ellen valamint egyes patogénekkal szemben is nagyobb ellenállóságot mutattak, mint a szelekcióban részt nem vett mikrospórákból származó vonalak utódai ill. a kiindulásként használt A-18 hibrid.

Mindezen vizsgálatok alapján elmondható, hogy mikrospórák *in vitro* szelekciója sikeresen megvalósítható oxidatív stressz-t indukáló vegyületek alkalmazásával, belőlük, fertilis dihaploid növények regenerálhatók, melyek közül számos igazoltan oxidatív és egyéb oxidatív módon ható stresszfajtákkal (hideg, szárazság) szemben toleránsabbak, mint a szelekcióban részt nem vett mikrospórákból származó vonalak utódai ill. a kiindulásként használt A-18 hibrid. Eredményeink rámutatnak arra, hogy e módszer sikeresen alkalmazható lehet más, a köztermesztésben használt hibridek esetében is.

Vizsgálataink során számos alapkutatási tapasztalatokkal lettünk gazdagabbak, hiszen ez idáig nem, vagy alig volt információnk arról, hogyan hatnak a szelekció során használt vegyületek a mikrospórák *in vitro* fejlődésére.

A témában eddig megjelent tudományos közlemények

Publikációk:

Darkó É, Barnabás B és Király Z (2002) Kukorica stressztűrő képességének növelése biotechnológiai módszerekkel. In. 50 éves az Acta Agronomica Hungarica. A növénytermesztés szerepe a jövő multifunkcionális mezőgazdaságában. Z Bedő, J. Sutka, O. Veisz (eds).p. 93-99.

Darkó Éva és Barnabás Beáta (2002) Stressztűrő-képesség növelése biotechnológiai módszerekkel. Martonvásár 2002/2. 21-22.

Barnabás B, Pónya Z(s), Bakos F, Tímár I, Darkó É, Takács I, Szakács É (2002): Plant gametes as tools for molecular breeding. ACTA AGRONOMICA HUNGARICA, 50: 295-301 (2002)

Ambrus H, Darkó É, L. Szabó, F Bakos, Z. Király Z and B Barnabás(2006) *In vitro* selection in maize anther culture using oxidative stress stimulators (Protoplasma, *in press*)

H. Ambrus, É. Darkó, L. Szabó, Z. Király and B. Barnabás (2005) Effects of ROS progenitors on the androgenic development of maize microspore. Acta Biologica Szegediensis 49(1-2): 25-28 (2005).

Előadás:

Darkó É, Barnabás B és Király Z (2002) Kukorica stressztűrő-képességének növelése biotechnológiai módszerekkel. Előadás az 50 éves az Acta Agronomica Hungarica évfordulójára. 2002. november 19.

Ambrus Helga, Darkó Éva, Szabó László, Bakos Ferenc, Király Zoltán és Barnabás Beáta (2004) Oxidatív stressz toleráns DH kukorica előállítás *in vitro* mikrospóra szelekcióval. X. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2004. február 18-19. p. 34.

Barnabás, B., Bakos, F., Jäger, K., Ambrus, H. and Darkó, É. (2004) Microspore-derived doubled haploids of wheat and maize: from fundamentals to breeding. XI. International Palynology Congress. Granada, Spain, 4-9th July, 2004. In polen, ISSN 1135-8408, Vol 14, p 30.

Ambrus Helga, Darkó Éva, Szabó László, Bakos Ferenc, Király Zoltán és Barnabás Beáta (2004) Mikrospórák biotechnológiai alkalmazása oxidatív stressz-tolerancia fokozásának céljából. VEAB Biológiai Szakbizottság, Biotechnológiai és Növényélettani Munkabizottság Ülése. Veszprém, 2004. október 05.

Ambrus Helga, Darkó Éva, Szabó László, Bakos Ferenc, Király Zoltán és Barnabás Beáta (2005) Mikrospórák biotechnológiai alkalmazása oxidatív stressz-tolerancia fokozásának céljából. XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2005. március 3-4. p. 27.

Poszter:

Ambrus, H., Darkó, É., Bakos, F. and Barnabás, B. *In vitro* selection of maize microspores to improve oxidative stress tolerance in plants. Recent Advances in Plant Biotechnology, Stará Lesná, Slovak Republic, 7-13 Sept. 2003. ISBN 80-89088-15-5 p. 66.

Ambrus, H., Darkó, É., Szabo L, Bakos, F. and Barnabás, B. *In vitro* selection of maize microspores to improve oxidative stress tolerance in plants. International Palynological Congress, Granada, 4-7 July 2004. 2004. In polen, ISSN 1135-8408, Vol 14, p 321.

B. Barnabás, K. Jager, F. Bakos, É. Darkó, H. Ambrus, D. Kőszegi, I. Takács, I. Tímár, A. Fehér (2004) Micromanipulation techniques as tools in cereal breeding. 18th International Congress on Sexual Plant Reproduction. Beijing, China, 20-24 August 2004. In Congress handbook p 109.

Ambrus, H., Darkó, É., Szabo L, Z Király, Bakos, F. and Barnabás, B. Improved oxidative stress tolerance of maize developed by *in vitro* microspore selection. Cost 851, WG 3, „ Gametic cells and molecular breeding for crop improvement” Tulln, Austria, 7 september, 2004.

Ambrus Helga, Darko Éva, Király Zoltán és Barnabás Beáta (2005) Reaktív oxigén formák hatása kukorica mikropórák *in vitro* fejlődésére. VIII. Magyar Növényélettani Kongresszus és VI. Magyarországi Fotoszintézis Konferencia, Szeged, 2005 augusztus 22-25. Acta Biologica Szegediensis 49(1-2): 25-28 (2005).

H. Ambrus, E. Darko, L. Szabo, Z. Király, B. Barnabás (2005) Effects of the reactive oxygen species (ROS) progenitors on microspore development. 6th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology, From Laboratory To Business. Book of Abstracts. Ceské Budejovice, Czech Republic, 12-16 September 2005. ISBN: 80-86778-16-9 p. 108.