



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A KUKORICA OXIDATÍV STRESSZTŰRŐ KÉPESSÉGÉNEK
NÖVELÉSE MIKROSPÓRÁK *IN VITRO* SZELEKCIÓJÁVAL**

Doktori értekezés tézisei

MARGLNÉ AMBRUS HELGA MÁRTA

Martonvásár

2013

Doktori iskola: *Növénytudományi Doktori Iskola*

Vezetője: Dr. Helyes Lajos, az MTA doktora
egyetemi tanár, intézetigazgató
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Kertészeti Intézet

Témavezetők: Dr. Barnabás Beáta, az MTA rendes tagja
tudományos osztályvezető, kutatóprofesszor
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

Dr. Darkó Éva
tudományos főmunkatárs
MTA ATK Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár

.....
Dr. Barnabás Beáta
témavezető

.....
Dr. Darkó Éva
témavezető

.....
Dr. Helyes Lajos
iskolavezető

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Napjaink szélsőséges időjárási viszonyai: a korai hirtelen felmelegedés, májusi kánikula, aszályos ill. túl nedves nyarak, a túl későn beköszöntő tavasz, elhúzódó felmelegedés; valamint az egyre növekvő nyersanyag árak mellett, a növénynevelőknek arra kell törekedniük, hogy minél nagyobb ökológiai plaszticitással rendelkező, abiotikus (pl. hideg és szárazság, stb.) vagy biotikus eredetű (patogének) stresszekkel szemben ellenálló nemesítési alapanyagot ill. hibridet állítsanak elő rövid időn belül.

Korszerű növénynevelési műhelyeknek számos módszer áll rendelkezésére ahhoz, hogy nemesítési anyagaikban optimalizálják a génösszetételt és működést. Ezt szolgálják a hagyományos (a fenotípusos vagy molekuláris marker alapú szelekció) és korszerű géntechnológiai biotechnológiai nemesítési módszerek.

Mivel a konvencionális nemesítés hosszú időt vesz igénybe, ennek a problémának az orvoslása a korszerű biotechnológiai eljárásokban rejlik, amelyek hatékonyan elősegíthetik a hibridek általános adaptációs képességének javítását.

Genetikailag módosított növények előállítása alkalmas lehet a növények stressztoleranciájának célirányos megváltoztatására, ámde ezen szervezetek elismerése és elfogadása még mindig nem tisztázott az Európai Unióban.

Egy másik lehetséges mód a növények stressztoleranciájának növelésére, a szövettenyészetek *in vitro* szelekciója. Ezt számos kísérlet alátámasztja burgonya és dohány esetében. Szomatikus eredetű szövettenyészetekből oxidatív stresszt indukáló vegyület alkalmazásával szelektált növények toleránsabbnak mutatkoztak hideggel és egyes patogén fertőzésekkel szemben, mint a kontroll növények. Ez a módszer elsősorban a kétszikű növényeknél működik. Az egyszikű növényeknél nehézkes szomatikus sejtekből kiindulva fertilis növényt előállítani. A haploid indukción alapuló növényregenerációs rendszer előnye, hogy a nemesítési idő 6-8 évvel is lecsökkenthető, hiszen már az első doubled (di) haploid vagy kettős haploid (későbbiekben DH), nemzedékben homozigóta utódokat állíthatunk elő, ami igen fontos a kukorica nemesítés esetében (Heszky, 2003). A Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Központ Mezőgazdasági Intézet Növényi Sejtbiológiai Osztályán az elmúlt évek során kidolgoztak egy rutinszerűen alkalmazható protokollt, amely lehetőséget biztosít a haploid szövettenyészetek *in vitro* szelekciójára.

Mindezek tudatában a Ph.D. értekezésem **célkitűzéseit** az alábbi pontokban foglaltuk össze:

- Oxidatív stresszekkel szemben ellenálló homozigóta DH kukorica vonalak előállítása *in vitro* mikrospóra szelekcióval, melyet reaktív oxigén formákat generáló vegyületek:

paraquat (Pq), menadion (MD), metionin+riboflavin (MR), és a terc-butilhidroperoxid (*t*-BHP) segítségével idézünk elő. Az alkalmazott szelekciós ágensek mikospórák egyedfejlődésére gyakorolt hatásának vizsgálata citológiai és szövettani módszerekkel.

- Az *in vitro* szelekció során előállított növények DH₁ utódgenerációjának tesztelése annak érdekében, hogy megállapítsuk valóban nagyobb toleranciával, rendelkeznek-e oxidatív stresszel szemben, mint a kontroll növények továbbá, hogy ez a tulajdonság öröklődik-e az utódgenerációban. Ennek igazolására a szelektált növények egyes fiziológiai, biokémiai és agronómiai sajátosságainak vizsgálata.
- Sikeres szelekciós módszer kidolgozása esetén agronómiailag fontos tulajdonságokkal bíró F₁ hibridek szelekcióba vonása és azok tesztelése, valamint csírázáskori hidegtűrésének vizsgálata.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Mikrospóra eredetű növények előállítása és az *in vitro* szelekció

2.1.1. Donor növények

A kísérletek alapanyagául egy kínai eredetű, jó haploid indukciós képességgel rendelkező F₁ hibrid (A18) szolgált, melynek szülőpartnerei is portok kultúrából származó, egzotikus eredetű kukorica DH vonalak. A modellkísérletet követően, jó agronómiai tulajdonságokkal rendelkező, H1, H2 és H3 jelzésű F₁ hibrideket vontunk be a szelekciós kísérletekbe.

A donornövények magjait Conviron TCL típusú csíráztató szekrényben 26 °C-on csíráztattuk, majd a növénykéket 20 literes vödörökbe ültettük és növénynevelő kamrában (Conviron GB-48) (18/15 °C-os nappali/éjszakai hőmérséklet, 16 órás 200 μmol m⁻² s⁻¹ fotoszintetikusán aktív sugárzás (PAR), 80%-os relatív páratartalom) neveltük. A portok kultúrához szükséges címerök begyűjtése a címerhányás előtt kezdődött, a csírázástól kb. 75±4 nap elteltével. A legtöbb portok már középső stádiumú egysejtmagvas mikospórákat tartalmazott, amit kármin-ecetsavas festéssel (Alexander, 1969) ellenőriztünk. A fiatal címeröket alumínium fóliába csomagoltuk, és sötétben 7 napig 7 °C-on történő előkezelésnek vetettük alá.

2.1.2. Portok kultúra és növényregenerálás

A portok tenyésztést a Sejtbiológiai Osztályon korábban kidolgozott, Barnabás (2003) által leírt protokoll szerint végeztük. A kiválogatott címerágakat sterilizáltuk majd háromszor mostuk steril vízzel. Az felhasznált táptalajokat autoklávozással sterilizáltuk 20 percig, 121

°C-on. A portokokat aszeptikus körülmények között, módosított Yu Pei (Genovesi és Collins, 1982; Barnabás, 2003) táptalajra helyeztük, majd sötétben 29 °C-on 80%-os relatív páratartalom mellett inkubáltuk kb. 1 hónapig. Az indukálódott embrió- ill. kallusz-szerű struktúrákat megszámláltuk, és módosított N₆ regenerációs táptalajra (Chu, 1978; Barnabás, 2003) helyeztük, 26 °C-on 16 órás megvilágítás mellett 50 μmol m² s⁻¹ PAR fényintenzitáson tenyésztettük őket, mindaddig, amíg megfelelő (0,5 cm) gyökérrel és hajtással nem rendelkeztek. Ezután a növénykéket átraktuk 2% cukrot tartalmazó hormonmentes táptalajra 0,2 l üvegekbe, és addig neveltük, amíg megerősödtek, majd 5 cm átmérőjű tápkockába ültettük (Jiffy Products International AS Ltd.), és fóliával takartuk le őket. Naponta többszöri szellőztetéssel adaptáltuk a növényeket a klímakamrában lévő 70%-os relatív páratartalomhoz, ami kb. 3 hetet vett igénybe. Az adaptációs szakasz után növénynevelő kamrában neveltük fel a növényeket a kukoricaneveléshez használt „BK” növénynevelő programon (Tischner et al., 1997). Megfigyeltük a növények fejlődését, virágzását, és öntermékenyítettük őket.

2.1.3. *In vitro* szelekció

Az *in vitro* szelekció megvalósításához különböző koncentrációban alkalmaztunk reaktív oxigén formákat generáló vegyületeket mind az indukciós, mind pedig a regenerációs táptalajban (Ambrus et al., 2006).

Ezek a következők voltak:

- paraquat (methyl viologen, Sigma M-2254) 0,5, 1, 5 és 10 μM koncentrációban (Pq),
- L-metionin (Reanal) megegyező mennyiségű riboflavinnal kombinálva (Sigma R-4500) 1, 10, 50 és 100 μM koncentrációban (MR),
- menadion (Sigma M-5625) 10, 50, 100, és 1000 μM koncentrációban (MD),
- terc-butilhidroperoxid (*tert*-butyl hydroperoxid, Merck S2676045) 100, 1000, és 10000 μM koncentrációban (*t*-BHP).

Kezelésenként 5000-8000 portokot oltottunk táptalajra.

2.1.4. Citológiai és szövettani vizsgálatok

A citológiai és szövettani vizsgálatokat 7 ill. 30 napos portok kultúrából származó mikroszporákon ill. mikroszpora eredetű embrió- vagy kallusz-szerű struktúrákon (MES) végeztük.

A mikroszporák életképességét fluoreszcein diacetát (FDA, Serva 21575) festéssel (Widholm, 1972) állapítottuk meg. A sejtmagok és az embriófejlődés vizsgálatát 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) festéssel végeztük (Vergne et al., 1978).

A szövettani vizsgálatokhoz a 30 napos portok kultúrából származó struktúrákat műgyantába ágyasztuk (Spurr, 1969). A minták félvékony (1,0 μm) metszését Reichert-Jung Ultracut E ultra mikrotómmal (Leica Mikrosysteme, Bensheim, Germany) végeztük. A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a metszeteket 0,5%-os toluidin kék oldattal festettük (Sárkány és Szalai, 1957).

2.2. DH₁ utódnövények előállítás, növényfiziológiai és biokémiai tesztelése

2.2.1. DH₁ utódok felnevelése

A DH₁ növényeket a fiziológiai és biokémiai vizsgálatokhoz növénynevelő kamrában neveltük fel az előzőekben leírtak szerint. Vizsgálatainkat a már teljesen kifejlődött, de még az öregedés jeleit nem mutató leveleken végeztük, és a virágzás előtt befejeztük.

2.2.2. A növények kezelése és az oxidatív stressz toleranciájának meghatározása

A növények oxidatív stressz-toleranciáját úsztatásos kísérletekben vizsgáltuk. Ehhez a növényekből 1,3 cm átmérőjű levélkorongokat vágunk ki dugófűrővel, melyeket 50 μM Pq tartalmazó Tris-HCl (50 mM, pH 7,6) oldatokban (1 ml/levélkorong) úsztattuk. A kontroll kezelés nem tartalmazta a Pq-ot. A leveleket kontroll ill. Pq-ot tartalmazó oldattal való infiltrálás után 4 ill. 24 óráig úsztattuk 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR megvilágítás mellett (Darkó et al., 2009). Az így kezelt levélkorongokat használtuk a fiziológiai és biokémiai vizsgálatokhoz és mérésekhez.

A növények oxidatív stressz toleranciáját az alábbi vizsgálatokkal teszteltük:

- **Klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérése:** a levélkorongok négy órás úsztatásos kezelése után PAM 2000 fluoriméterrel (Walz, Effeltrich, Germany) mértük meg. A mért paramétereiből meghatároztuk a II. fotokémiai rendszer (PS II) optimális kvantum hatásfokát (F_v/F_m), ahol $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (van Kooten és Snel 1990).

- **Klorofill (a+b) tartalom meghatározása:** a levélkorongok 24 órás úsztatásos kezelése után, 646,8, 663,2 és 750,0 nm hullámhosszokon Cary-100 UV-Vis spektrofotométerrel történt. A kapott eredményekből a klorofill (a+b) tartalmat $\mu\text{g/g}$ friss tömegre vonatkoztatva határoztuk meg (Lichtenthaler, 1987).

- **Az ionkiáramlás meghatározása:** a levélkorongok 24 órán keresztül történő úsztatása után az oldat ionvezető képességének mérésével Automatic Saeed Analyser ASA610 (Agro Sciences, USA) típusú konduktométerrel történt (Darkó et al., 2009).

- **Antioxidáns enzimek aktivitásának mérése:** a levélkorongok négy órás úsztatásos kezelése után történt az enzimaktivitás mérése Cary-100 UV-Vis spektrofotométerrel (Varian,

Mulgrave, Australia). A SOD (EC 1.15.1.1.) enzim aktivitását Paoletti és Mocali (1990) módszerének módosításával mértük. A GR (EC 1.6.4.2) aktivitását Smith és mtsai., (1988) szerint határoztuk meg. A GST (EC 2.5.1.18) aktivitását Habig és mtsai., (1974) szerint határoztuk meg. Az APX (EC 1.11.1.11) meghatározása Nakano és Asada, (1987) leírása alapján történt. A CAT (EC 1.11.1.6) meghatározását Aebig, (1983) leírása alapján végeztük el.

- **Toxikus oxigén formák *in situ* kimutatása:** a levélkorongokat 24 óráig kezeltük majd a szuperoxid gyök kimutatásának érdekében nitrotetrazólium-kékkel (NBT, Sigma 6876) (Fryer et al., 2002), a H₂O₂ felhalmozódás nyomon követésének érdekében pedig 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB, Sigma D-8001) (Thordal-Christensen et al., 1997) festettük őket és detektáltuk a toxikus oxigén formák jelenlétét.

2.2.3. Rezisztencia faktorok számítása

Az adatok könnyebb értékelhetősége és a DH vonalak jobb összehasonlíthatósága érdekében a fiziológiai mérések eredményeiből rezisztencia faktort (Rf) számítottunk.

Viszonyításként a nem szelektált DH genotípust használtuk, melynek Rf értéke 1. Az ennél magasabb Rf érték azt mutatja, hogy az adott (szelektált) vonal nagyobb toleranciával rendelkezik a Pq okozta oxidatív stresszel szemben a vizsgált paraméter tekintetében, mint a nem szelektált DH genotípus. Minél nagyobb ez az érték, annál nagyobb az adott vonal oxidatív stressz-toleranciája.

Klorofill fluoreszcencia indukciós paraméter rezisztencia faktorának meghatározása az alábbi képlet alapján történt:

$$Rf_{Fv/Fm} = P_x [(Fv/Fm)_{Pq} / (Fv/Fm)_P] / DH [(Fv/Fm)_{Pq} / (Fv/Fm)_P]$$

Ahol Fv/Fm = a PS II optimális kvantumhatásfoka.

DH = nem szelektált DH vonal,

P_x = Pq -tal szelektált genotípusok (P₁₋₁₅),

P = úsztatásos kísérletben pufferben mért érték,

Pq = Pq-ot tartalmazó oldatban mért jellemző értékek.

A klorofill tartalom eredményei alapján számolt rezisztencia faktor meghatározása az alábbi képlet alapján történt:

$$Rf_{Klo} = DH(Klo_P - Klo_{Pq}) / P_x(Klo_P - Klo_{Pq}),$$

Ahol Klo = a levélkorongok klorofill (a+b) tartalma.

Az ionkiáramlás mérésének eredményei alapján számolt rezisztencia faktor meghatározása az alábbi képlet alapján történt:

$$Rf_{ionvez} = DH(ionvez_{Pq} - ionvez_P) / P_x(ionvez_{Pq} - ionvez_P),$$

Ahol ionvez. = az oldat ionvezető képessége, melybe a levélkorongokat helyeztük.

Az utóbbi két esetben a képletek további értelmezése és rövidítései az Fv/Fm leírásánál megegyezők (lásd fent).

2.2.4. Csírázáskori hidegtűrési vizsgálatok

A csírázáskori hidegtesztet (ún. 'cold-teszt') Hercegh, (1978), Marton, (1992) és Marton és Kőszegi, (1997) által leírtak szerint végeztük. A szemeket két hőmérsékleten: 22 °C-on és hidegben, 8 °C-on csíráztattuk. Megfigyeltük a csírázáshoz szükséges időt és a csírázási %-ot mindkét hőmérsékleten. A kapott eredményekből meghatároztuk a vonalak csírázási indexét (Csl) (a maximális kelési százalék és a csírázásig eltelt napok számának hányadosa) és hidegtűrési faktort számoltunk $\text{Hidegtűrési faktor} = P_x (\text{Csl}_{T8^\circ\text{C}} / \text{Csl}_{T22^\circ\text{C}}) / \text{DH} (\text{Csl}_{T8^\circ\text{C}} / \text{Csl}_{T22^\circ\text{C}})$.

2.2.5. Szántóföldi vizsgálatok

A szelektált vonalakat szántóföldön is teszteltük annak érdekében, hogy megfigyeljük, hogy a szelekció milyen hatást gyakorolt a szelektált genotípusok agronómiai jellegeire. A szántóföldi tesztelesek során felvételeztük a csírázási százalékot, a növénymagasságot, az 50%-os hím- és nővirágzást (vetéstől a virágzásig eltelt napok számával kifejezve), a termékenyülési százalékot (a tényleges és potenciális termékenyülés aránya), valamint a szemszámot.

2.2.6. Statisztikai értékelés

A legtöbb esetben az adatok kiértékelése (átlag, szórás) excel (2007) program segítségével történt. A kezelés hatását szignifikánsnak tekintettünk, amennyiben a szórások (kontroll és kezelt növény között) nem voltak átfedők. A genotípusok közötti különbségek elemzésére t-próbát alkalmaztunk (ezeket jelöltük * ill ** -gal). Ahol szükséges volt (antioxidáns enzimek hatásának elemzése), az adatok statisztikai értékeléséhez variancia analízist (Tukey post hoc test, (Statistica, 6.1. statsoft) alkalmaztunk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Szelektációs ágensek mikrospórák egyedfejlődésére gyakorolt hatása és az *in vitro* mikrospóra szelekció

Az FDA festéssel végzett életképességi vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy az összes szelektációs ágens szignifikánsan csökkentette mind a 7 mind pedig a 30 napos portoktenyészetekből származó életképes mikrospórák ill. mikrospóra eredetű struktúrák

(MES) számát a kontroll azaz a szelekciós ágenseket nem tartalmazó portoktenyészetekhez képest.

Azt tapasztaltuk, hogy az összes szelekciós ágens az alkalmazott koncentráció növekedésével egyenesen arányban szignifikánsan csökkentette, mind a portok válaszó képességét, mind pedig a mikroszóra eredetű struktúrák számát a kontrollhoz képest.

Megfigyeltük továbbá, hogy a szelekciós ágensek hatással voltak a MES megjelenési idejére is. A kontroll tenyészetekben a MES zöme az inkubáció 3. hetében a Pq, a MR és a *t*-BHP kezelés hatására a 4. héten és a MD kezelés hatására pedig a 6. héten jelentek meg.

Tapasztalataink szerint az egyes ROF vegyületek hatással voltak a képződő MES megjelenési formáinak kialakulására is. A kontroll tenyészetekben az embriószerű ill. kallusz-szerű struktúrák átlagosan ~30:70 arányban fordultak elő. Megfigyeltük, hogy *t*-BHP hatására a kallusz-szerű struktúrák aránya (82%), míg MD hatására az embrió-szerű struktúrák aránya (48%) növekedett meg szignifikánsan a kontrollhoz képest.

Citológiai és szövettani vizsgálataink során alátámasztottuk előbbi eredményeinket, miszerint a szelekciós ágensek lelassítják a MES fejlődését. DAPI festéssel a szelekciós ágensek hatására kromoszóma kondenzációkat, degenerált sejtmagokat és sejt-degradációkat tapasztaltunk 7 napos tenyészetekben, míg 30 napos tenyészetekben sejtelhalásokat, amorf rendellenes embriókat és kalluszokat figyeltünk meg. A 30 napos tenyészetekből származó struktúrák félvékony metszetein a kontrollnál már szövetdifferenciálódást míg Pq hatására heterogén sejtpopulációt, MR kezelés esetében lipidcseppek felhalmozódását, az MD kezelés hatására nagy sejtmagokat és erősen festődő foltokat, míg a *t*-BHP kezelés hatására számos nagy kiterjedésű, toluidin késsel erősen festődő membránnal körülhatárolt sejtorganelumot figyeltünk meg.

A szelekciós ágensek csökkentették a regenerációs %-ot és a fertilis növények számát a kontroll tenyészetekhez képest.

Az 1. táblázatban mutatom be, hogy melyik hibridből és milyen szelekciós ágens alkalmazásával mennyi fertilis növényt regeneráltunk.

1. táblázat: Az *in vitro* szelekció eredménye, fertilis növények száma.

Hibridek	Kontroll	Pq		MR	t-BHP	
		0.5 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
A18	28	10	5	10	8	2
H1	15	9	7	1	2	0
H2	7	4	3	4	6	0
H3	10	4	2	2	2	1

3.2. Pq tartalmú táptalajról szelektált növények DH₁ utódgenerációjának fiziológiai, biokémiai és szántóföldi vizsgálata

Klorofill *a* fluoreszcens indukciós paraméter meghatározása után az A18 hibrid esetében 9, a H1 hibrid esetében 9, a H2 hibrid esetében 2 és a H3 hibrid esetében 2 olyan Pq szelektált DH genotípust találtunk amelynél a nem szelektált DH genotípushoz képest szignifikánsan kisebb mértékben csökkent a fotoszintetikus aktivitás Pq hatására.

Klorofill (a+b) tartalom meghatározást csak az A18 hibrid esetében végeztünk és azt tapasztaltuk, hogy míg a nem szelektált DH és a hibrid esetében mintegy 25%-kal addig 8 Pq szelektált DH vonal esetében csak ~5%-kal csökkent a klorofill tartalom Pq kezelés hatására.

A Pq kezelés hatására történő ionkiáramlás meghatározása után azt tapasztaltuk, hogy az A18 hibrid esetében 6, H1 hibrid esetében 9, H2 hibrid esetében 2, H3 hibrid esetében 2 olyan Pq szelektált DH vonal volt, amelynek szignifikánsan kisebb mértékben csökkent az ionvezető képessége mint a nem szelektált DH vonalaknak valamint a kiinduló hibrideknek.

A Pq hatására történő toxikus oxigénformák felhalmozódását *in situ* festéssel is nyomon követtük az A18 hibrid esetében. Eredményeink azt mutatták, hogy a szelektált vonalakban Pq hatására a festődés nem volt olyan intenzív, ami azt jelenti, hogy ezekben a vonalakban a Pq hatására nem halmozódott fel annyi toxikus oxigén forma, mint a nem szelektált DH vonalban és a kiindulási hibridben.

Az antioxidáns enzimek aktivitását az A18 hibrid esetében vizsgáltuk. Összes vizsgált antioxidáns enzim aktivitását tekintve elmondható, hogy a szelektált vonalak közül négy vonal antioxidáns kapacitása meghaladta a nem szelektált DH és a kiindulási hibrid növény antioxidáns kapacitását, és Pq kezelés hatására is jelentősebb aktivitást mutattak az előzőekhez képest.

Rezisztencia faktorok tekintetében eredményeink azt mutatták, hogy az A18 hibrid esetében 6 vonal rendelkezett szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorról mindhárom mért tulajdonság esetében. A H1 hibrid esetében 7, H2 hibrid esetében 2, H3 hibrid esetében 2 szelektált vonal rendelkezett szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorról, mint a nem szelektált DH vonalak valamint a kiinduló hibridek mindkét mért tulajdonság esetében.

A szelektált vonalak csírázaskori hidegtűrésének vonatkozásában megállapítottuk, hogy a hideg kezelés hatására csökkent a csírázási % és megnőtt a csírázáshoz szükséges idő. A számított hidegtűrési faktort tekintve az A18 hibrid esetében 3, a H1 hibrid esetében 13, H2 hibrid esetében 5, H3 hibrid esetében 5 vonal rendelkezett szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorról mint a nem szelektált DH vonalak valamint a kiindulási hibridek.

Eredményeinket összefoglalva, összesen 13, részletesen: az A18 hibrid esetében 3, a H1 hibrid esetében 6, a H2 hibrid esetében 2, a H3 hibrid esetében 2 genotípust szelektáltunk amelyek mind a Pq okozta oxidatív stresszel mint pedig a csírázáskori hideg stresszel szemben nagyobb rezisztencia faktorral rendelkeztek mint a nem szelektált DH vonalak valamint a kiindulási hibridek.

Szántóföldi kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált agronómiai tulajdonságok tekintetében a szelekció nem rontotta a fontosabb agronómiai jellegeket, továbbá nemesítési szempontból jelentős javulást értünk el a virágzási idő tekintetében.

3.3. Új tudományos eredmények:

- Elsőként alkalmaztunk oxidatív stresszt indukáló vegyületeket *in vitro* mikroszpóra tenyészetekben, és írtuk le ezen vegyületek kukorica mikroszpórák egyedfejlődésére és a differenciálódó struktúrák finom szerkezetére gyakorolt hatását.
- Elsőként állítottunk elő oxidatív stresszt indukáló vegyületek alkalmazásával *in vitro* mikroszpóra szelekcióval fertilis DH kukorica növényeket, valamint előállítottuk azok DH₁ utódgenerációját.
- Fiziológiai és biokémiai tesztekkel kimutattuk, hogy a Pq szelektált DH növények közül számos nagyobb toleranciával rendelkezik a toxikus oxigén formákat generáló Pq-tal szemben, mint a kontroll növények.
- Bebizonyítottuk, hogy az *in vitro* mikroszpóra szelekció során kialakult oxidatív stressz-tolerancia öröklődik.

4. MEGVITATÁS (KÖVETKZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

4.1. Szelekciós ágensek mikroszpórák egyedfejlődésére és a növényregenerációra gyakorolt hatása

Megállapítottuk, hogy a kezeletlen kontrollhoz képest a tenyésztett mikroszpórákban lejátszódó osztódási folyamatokat lelassították az alkalmazott szelekciós ágensek. A legdrasztikusabb hatást a MD fejtette ki (Ambrus et al., 2005), összhangban a mások által tett megállapítással, hogy a MD befolyásolja a sejtosztódási folyamatokat (Thor et al., 1982, Prasad et al., 1994; Reichheld et al., 1999), megfigyelésünket a szövettani vizsgálatok is alátámasztották. A mikroszpórákból differenciálódó struktúrák sejtmagjainak többsége morfológiai abnormalitást (sejtmag fragmentáció, lízis) mutatott. Valamennyi kezelés esetében

nagymértékű lipidfelhalmozódás volt megfigyelhető a mikrospórákból formálódó struktúrák sejtjeiben. Az általános tapasztalatok szerint ez a sejteket ért, erős stresszhatást jelzi.

A szelektációs ágens nem tartalmazó tenyészetek (kontroll) esetében az embrió- és kalluszszerű struktúrák megjelenési aránya a szakirodalmi adatokkal összhangban volt (Kovács et al., 1999), azonban a kontrollhoz képest szignifikánsan megnövekedett az embrioidok aránya a MD kezelés hatására, míg a *t*-BHP kezelés hatására a kalluszszerű struktúrák aránya növekedett. A MD feltehetően a citoskeletonra gyakorolt hatásának eredménye képpen megnövelte a szimmetrikus osztódások számát, a szakirodalomból ismeretes, hogy az embrioidok kialakulása jellemző a szimmetrikus sejtosztódás követően.

Eddigi vizsgálatainkból kiderült, hogy az alkalmazott ágensek eddig mások által feltárt hatásai az *in vitro* tenyésztett mikrospórákból fejlődő struktúrák sejtjeiben is megnyilvánulnak (lipidfelhalmozódás, abnormális sejtmagok). Mivel a mikrospórák kloroplasztiszokat nem tartalmaznak, a fotoszintetikus apparátusra gyakorolt destruktív hatások ebben az esetben szerkezeti szinten nem voltak vizsgálhatók. Így feltételezhető, hogy a mikrospórákban is a Pq másodlagos hatása érvényesül, azaz a mitokondriális I. és II. komplex szolgál elektron donorként a szuperoxid gyök képződéséhez (Cochemé és Murphy, 2008). Ennek feltárása azonban további vizsgálatokat igényel. Feltételezhetjük, hogy az elpusztult struktúrák nem rendelkeztek megfelelő detoxikáló mechanizmussal. Mivel az ultrastruktúrális vizsgálatokkal járó nehézségek miatt nem tudtunk minden részletre kiterjedő megfigyeléseket tenni ezért ezeket a vizsgálatainkat célszerű tovább folytatni még teljesebb kép kialakítása érdekében.

A koncentrációként leoltott mintegy 5000-8000 portokból mindegyik szelektációs ágens használatával sikerült fertilis növényeket előállítani, de a MD kezelés esetében ez kis hatékonyságú volt. A fertilitásra vonatkozó eredményeinek értékelésénél azonban meg kell jegyeznünk, hogy a DH előállítás során a növényregenerálás az egyik legnehezebb feladat. Még ha sikerült is a növényeket felnevelni, sok esetben talákoztunk proterandia ill. protiginia jelenséggel, ami azt jelenti, hogy vagy a nő vagy a hím virágzás késett annyit, hogy nem tudtuk az öntermékenyítést megvalósítani. A módszer javítása érdekében javasoljuk az ilyen eredetű problémák kivédését korai kolhicin kezeléssel, ugyanis szakirodalmi adatok alátámasztják, hogy az alacsony koncentrációjú, rövid ideig tartó az indukció elején alkalmazott kolhicin kezelés hatására a virágzási problémák megszűntek (Barnabás et al., 1999; Kovács et al., 1999).

A MD kezelés esetében előállított növények alacsony száma, a várakozással ellentétes eredményt adott. Miután megállapítottuk, hogy a szelektációs ágens megnövelte az MES arányát a tenyészetekben arra számítottunk, hogy több növényt sikerül regenerálnunk. A MD

sejtciklus szabályozásra gyakorolt hatásának köszönhetően a kialakult embriók nem voltak funkció képesek, a regenerációs táptalajra való áthelyezés után nem csíráztak ki. Érdekesnek találjuk az MD szimmetrikus sejtosztódásra gyakorolt hatását és javasoljuk ennek további citológiai és molekuláris biológiai vizsgálatát kukoricán és más gabonaféléken is.

A kapott eredmények alapján azonban felmerülhet a kérdés, hogy az alkalmazott szelekciós eljárás során indukálhatók-e mutációk? A kezelésnek kitett F₂ mikroszporák számát (kb. 10 millió/kezelés) tekintve ez is elképzelhető, de leginkább a genetikai hasadásból eredő variabilitás, széles szelekciós bázis lehet az alapja az oxidatív stressztűrő képességre történt sikeres szelekciónak. Ezt az a tény is megerősíti, hogy a disszertációmban közölt kísérletek folytatása során bebizonyosodott, hogy a megemelkedett oxidatív stressztolerancia a további DH nemzedékekben (DH₁₋₅) is stabilan öröklődött.

4.12. Az *in vitro* szelektált vonalak DH₁ utódgenerációjának fiziológiai és biokémiai vizsgálatai

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a Pq szelektált vonalak DH₁ utódjai valóban nagyobb oxidatív stressztoleranciával rendelkeznek-e, mint a kontroll genotípus különböző fiziológiai és biokémiai tesztek végeztünk el.

Megállapítottuk, hogy az A18 eredetű Pq szelektált vonalak közül 6 vonal szignifikánsan nagyobb rezisztencia faktorra rendelkezett a vizsgált tulajdonságok (Fv/Fm, ionvezető képesség klorofill (a+b) tartalom) esetében, mint a kontroll genotípus, ez azt jelenti, hogy ezekben a genotípusokban a Pq okozta toxikus oxigén gyökök felhalmozódása nem volt olyan mértékű, mint a kontroll növényben, ezeket az eredményeket *in situ* festési eljárással is alátámasztottuk. A Pq szelektált levelekben kevesebb toxikus oxigén forma halmozódott fel Pq kezelés hatására ezért kevésbé festődtek a levelek.

Megállapítottuk továbbá, hogy a magasabb koncentrációjú Pq-ot tartalmazó táptalajról származó vonalak (DH₁ utódgenerációja) rendelkeztek a legmagasabb rezisztencia faktorra. Ez azt jelentheti, hogy minél nagyobb a szelekciós nyomás (letális koncentráción belül), annál nagyobb toleranciát érhetünk el.

Egyes antioxidáns enzimek vizsgálatával megállapítottuk, hogy a szelektált vonalakban számos antioxidáns enzim aktivitása magasabb volt úgy alapállapotban, mind Pq indukálta oxidatív stressz körülmények között. Ugyanakkor az egyes vonalak antioxidáns kapacitása eltérő volt, ami az egyedi gén kombinációval rendelkező mikroszporák szelekciójának következménye is lehet. Az is megállapítható volt, hogy a magas rezisztencia faktorra rendelkező genotípusokban több enzim alap illetve Pq-indukált aktivitása is magasabb volt. Ez előnyt jelenthet a különböző ROF elleni komplex védekezés során.

Meghatároztuk a szelektált vonalak csírázaskori hidegtűrési indexét. Szántóföldi körülmények között a kukorica csírázásakor gyakran előfordul hazánkban alacsony hőmérséklet: ennek hatására elhúzódik a csírázás, a kelés hiányos lesz, továbbá a kártevők és a patogén gombák könnyebben károsítják a csírákat, illetve a fiatal növényeket. A vizsgált genotípusok kontroll és hideg hőmérsékleten történő csíráztatásából kapott eredmények nem tértek el a szakirodalomban fellelhető adatoktól (Marton és Kőszegi, 1997). Megállapítottuk, hogy a nagy rezisztencia faktorral rendelkező vonalak nagy hideg tolerancia indexel rendelkeznek. Azonban volt néhány olyan genotípus is, melyik a többi vizsgálat esetében nagyobb rezisztencia faktorral rendelkezett, de a hidegtűrési faktora igen alacsony volt, illetve fordítva, míg oxidatív stressztűrése nem volt kiemelkedő, hidegtűrése meghaladta a nem szelektált DH vonalét. Hasonló eredményt kaptunk fiatalkori hidegtűrés vizsgálatánál is (Ambrus et al., 2008; Darkó et al., 2011), de mivel ezek az adatok csak az A18 hibrid esetén ismertek, dolgozatomban ezeket az eredményeket nem mutattam be. Megemlítem továbbá, hogy munkatársaimmal, más stresszfaktorok (szárazság, patogén fertőzés) vizsgálatával is igazoltuk hogy az oxidatív stressztolerancia fokozása mikrospórák *in vitro* szelekciójával keresztolerancia kialakulását eredményezheti, mely előnyt jelenthet más abiotikus stresszekkel szemben is. Ez hasznos agronómiai tulajdonság lehet akár a vetés/kelés körüli hideg, vagy a korán beköszöntő szárazság elkerülésében. Ennek igazolásához azonban a több éven keresztül történő szántóföldi tesztelés elengedhetetlen.

Mindezen vizsgálatok eredményei rámutattak arra, hogy sikeresen megvalósítható a mikrospórák *in vitro* szelekciója reaktív oxigén gyököket indukáló vegyületek felhasználásával, belőlük fertilis DH oxidatív stresszekkel szemben ellenálló növények állíthatók elő. A kidolgozott technika nemcsak modell genotípuson működik, hanem alkalmazható nemesítési szempontból jelentős genotípusok *in vitro* szelekciójára is. Ezáltal jó adaptációs képességgel rendelkező értékes nemesítési alapanyagok állíthatók elő.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- AEBIG H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, 105, 121-126.
- ALEXANDER MP. (1969): Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technology*, 44, 117-122.
- AMBRUS H., DARKÓ É., SZABÓ L., BAKOS F., KIRÁLY Z., BARNABÁS B. (2006): *In vitro* microspore selection in maize anther culture with oxidatve-stress stimulators. *Protoplasma*, 228, 87-94.
- AMBRUS H., DULAI S., KIRÁLY Z., BARNABÁS B. DARKÓ É. (2008): Paraquat and cold tolerance in doubled haploid maize. *Acta Biol. Szeged.*, 52, 147-151.
- BARNABÁS B., OBERT B., KOVÁCS G. (1999): Colchicine, an efficient genome doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep.*, 18, 858-862.

- BARNABÁS B. (2003): Anther culture of maize (*Zea mays* L.). Malusinszky, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (Szerk.) In: Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 103-108.
- CHU C.C. (1978): The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Plant Tissue Culture, Proceedings of the Beijing Symposium*, 1981, Pitman, Boston, pp. 43-50.
- COCHEMÉ H.M. AND MURPHY M.P. (2008): Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J. Biol. Chem.*, 283, 1786-1798.
- DARKÓ É., AMBRUS H., FODOR J., KIRÁLY Z. AND BARNABÁS B. (2009): Enhanced tolerance to oxidative stress with elevated antioxidant capacity in doubled haploid maize derived from microspore exposed to paraquat. *Crop Sci.*, 49, 628-636.
- DARKÓ É., FODOR J., DULAI S., AMBRUS H., SZENZENSTEIN A., KIRÁLY Z. AND BARNABÁS B. (2011): Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *J. of Agron. and Crop Sci.*, 197, 454-465.
- FRYER M.J., OXBOROUGH K., MULLINEAUX M., BAKER N.R. (2002): Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J. Exp. Bot.*, 372, 1249-1254.
- GENOVESI A.D. AND COLLINS B.G. (1982): *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.*, 22, 1137-1144.
- HABIG W., PABST M.J., JACOBY W.B. (1974): Glutathion-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.
- HERCZEGH M. (1978): A kukorica hidegtűrő képességének javítása nemesítéssel. Kandidátusi értekezés, Martonvásár, p. 139.
- HESZKY L. (2003): Az ivaros szaporodás biotechnológiája. In: Dudits, D. és Heszky L. (Szerk.) *Növényi biotechnológia és géntechnológia*, pp. 57-96. Agroinform, Budapest.
- KOVÁCS G., OBERT B., BARNABÁS B. (1999): Fertilis növények előállítására egysejtmagvasmikrospórák korai kolhicin kezelésével kukorica (*Zea mays* L.) antérakultúrában. *Növénytermelés*, Tom. 48 1, 13-23.
- LICHTENTHALER H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol.*, 148, 350-382.
- MARTON L.C.S. (1992): Kukorica beltenyésztett törzsek és hibridjeik hidegtűrése. Kandidátusi értekezés. Martonvásár, p. 132.
- MARTON CS.L. AND KŐSZEGI B. (1997): Inheritance of cold test index of maize in sterilised and normal soil. In: *Proceedings of the international symposium on cereal adaptation to low temperature stress in controlled environments*. (Szerk). Bedo Z., Sutka J., Tischner T., Veisz O. Martonvásár Phytotron 25th Anniversary celebrations, 2-4 June 1997. pp. 281-284
- NAKANO Y. AND ASADA K. (1987): Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, 28, 131-140.
- PAOLETTI F. AND MOCALI A. (1990): Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymol.*, 186, 209-220.
- PRASAD T.K., ANDERSON M.D., MARTIN B.A., STEWART C.R. (1994): Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6, 65-74.
- REICHHELD J.P., VERNOUX T., LARDON F., VAN MONTAGU M., INZÉ D. (1999): Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.*, 17, 647-656.
- SÁRKÁNY S. ÉS SZALAI I. (1957): Növénytani praktikum I. Növény szerkezeti gyakorlatok. pp. 547-548, 580. Tankönyvkiadó, Budapest.

SMITH I.K., VIERHELLER T.L. AND THURNE C.A. (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.*, 175, 408-413.

SPURR A.R. (1969): A low viscosity resin-embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.*, 26, 31-43.

TISCHNER T., KŐSZEGI B., VEISZ O. (1997): Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron. Hung.*, 45, 85-104.

THOR H., SMITH M.T., HARTZELL P., BELLOMO G., JEWELL S.A., ORRENIUS S. (1982): The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 257, 12419-12425.

THORDAL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEI Y., COLLINGE D.B. (1997): Subcellular localisation of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, 11, 1187-1194.

VAN KOOTEN O. AND SNEL J.F.H. (1990): The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.*, 25, 147-150.

VERGNE P., DELVALÉE I., DUMAS C. (1978): Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technol.*, 62, 299-304.

WIDHOLM J.M. (1972): The use of fluoresceine diacetate and phenosaphranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 47, 189-194.

6. PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk:

Nemzetközi lapokban megjelent impakt faktoral rendelkező tudományos cikkek (IF, angolul):

Ambrus, H., Darkó, É., Szabó, L., Bakos, F., Király, Z., Barnabás, B. (2006): *In vitro* selection in maize anther culture with oxidative-stress stimulators. *Protoplasma*, 228: 87-94. (IF:1,333)

Darkó, É., **Ambrus, H.,** Fodor, J., Király, Z., Barnabás, B. (2009): Enhanced tolerance to oxidative stress with elevated antioxidant capacity in doubled haploid maize derived from microspores exposed to paraquat. *Crop Science*, 49: 628-636. (IF: 1,73)

Darkó, É., Fodor, J., Dulai, S., **Ambrus, H.,** Szenzenstein, A., Király, Z. and Barnabás, B. (2011) Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197: 454-465. (IF: 2,43)

Hazai tudományos lapokban megjelent tudományos cikkek (nem IF, angolul):

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

Ambrus, H., Dulai, S., Király, Z., Barnabás, B., Darkó, É. (2008): Paraquat and cold tolerance in doubled haploid maize. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 147-151.

Darkó, É., Ambrus, H., Szenzenstein, A. and Barnabás, B. (2011): *In vitro* selection of microspores for resistance to oxidative stress caused chilling tolerance in doubled haploid maize lines. *Acta Agronomica Hungarica*, 59, 209-216.

Egyéb tudományos művek:

Tudományos könyvfejezetek (magyarul):

Barnabás, B., Jäger, K., **Ambrus, H.**, Fábrián, A., Bakos, F., Pónya, ZS., Darkó, É. és Sági, L. (2009): Szaporodásbiológiai kutatások a növénynevelés szolgálatában. 93-98. p. In: Veisz O. (Szerk) A martonvásári kutatások hatodik évtizede-Martonvásár 1949-2009, MTA MGKI 240 p. ISBN:978-963-8351-35-7.

Konferencia absztraktok/ Abstracts:

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

Ambrus, H., Darkó, É., Szabó, L., Bakos F., Király, Z., Barnabás, B. (2004): Oxidatív stressz toleráns DH kukorica genotípusok előállítás *in vitro* mikrospóra szelekcióval. **X. Növénynevelési Tudományos Napok**, Budapest, 2004. február 18-19. In: Összefoglalók, p.34.

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

Ambrus, H., Darkó, É., Szabó, L., Bakos, F., and Barnabás, B. (2004): *In vitro* selection of maize microspores to improve oxidative stress tolerance in plants. **XI. International Palynology Congress**. Granada, Spain, 4-9 July 2004. In: Polen, ISSN 1135-8408, Vol. 14, p. 321.

Ambrus, H., Darkó, É., Szabó, L., Bakos, F., Király, Z., Barnabás, B. (2005): Mikrospórák biotechnológiai alkalmazása oxidatív stressz-tolerancia fokozásának céljából. **XI. Növénynevelési Tudományos Napok**, Budapest, 2005. március 3-4. In: Összefoglalók, p. 27.

Ambrus, H., Darkó, É., Király, Z., Barnabás, B. (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**. Ceské Budejovice, Czech Republic, 12-16 September 2005. In: Book of Abstracts, p. 108. ISBN: 80-86778-16-9

Ambrus, H., Darkó, É., Király, Z., Barnabás, B. (2006): Production of DH maize lines tolerant of oxidative stress via *in vitro* microspore selection. **XIXth International Congress on Sexual Plant Reproduction**, Budapest, July 11-15. In: Book of Abstracts, pp. 88-89. ISBN 963 9483 65 6

Darkó, É., **Ambrus, H.**, Dulai, S., Barna, B., Király, Z., Barnabás, B. (2009): Környezeti stresszekkel szembeni ellenállóság fokozása mikospórák in vitro szelekciójával. In: Veisz O (szerk.). Hagyomány és haladás a növénynevelésben: **XV. Növénynevelési Tudományos Napok**, Budapest, Magyarország, 2009.03.17. Budapest: MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Bizottsága, 2009. pp. 81-85. (ISBN:978-963-508-575-0)

Darkó, É., **Ambrus, H.**, Fodor, J., Király, Z., Barnabás, B. (2009): Enhanced tolerance to oxidative stress with elevated antioxidant capacity in doubled haploid maize derived from microspores exposed to paraquat. **Plant Abiotic Stress Tolerance. International Conference**. Vienna, Austria, 8-11 February, 2009. p.158.

Darkó, É., **Ambrus, H.**, Szenzenstein A. and Barnabás B. (2011): Responses of photosynthesis to cold stress in DH maize lines tolerant of oxidative stress In: Climate changes: Challenges and opportunities in Agriculture, Ed. O Weisz, pp. 155-158.

Egyéb tudományos szempontból értékelhető teljesítmény:

Barnabás, B., Jäger, K., Darkó, É., **Ambrus, H.**, Spitkó, T., Pintér, J. (2007): Kukorica biotechnológiai kutatásaink. *Martonvásár 2007/1*:17-18.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos publikációk:

Nemzetközi lapokban megjelent impakt faktorral rendelkező tudományos cikkek (IF, angolul):

Lazaridou, T., Sistanis, I., Lithourgidis, A., **Ambrus, H.**, Roupakias, D. (2011): Response to in-vitro anther culture of F-3 families originating from high and low yielding F-2 barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Australian Journal of Crop Science* 5:(3) 262-267. (IF: 1,63)

Bakos, F., Darkó, É., Ascough, G., Gáspár, L., **Ambrus, H.**, Barnabás, B. (2008): A cytological study on aluminium-treated wheat anther cultures resulting in plants with increased Al tolerance. *Plant Breeding*, 127: 217-324 (IF: 1.092)

Darkó, É., **Ambrus, H.**, Stefanovits-Bányai, É., Fodor, J., Bakos, F., Barnabás, B. (2004): Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science*, 166: 583-591. (IF: 1,389)

Hazai tudományos lapokban megjelent tudományos cikkek (nem IF, angolul):

Földesiné, Füredi P.K., **Ambrus, H.**, Barnabás, B. (2012): Development of cultured microspores of maize in the presence of n-butanol and 2-aminoethanol. *Acta Agronomica Hungarica* 60: (3) pp. 183-189.

Földesiné, Füredi, P.K., **Ambrus, H.**, Barnabás, B. (2011): The effect of n-butanol and 2-aminoethanol on the *in vitro* androgenesis of maize. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1):77-78.

Sági, L., Rakszegi, M., Spitkó, T., Mészáros, K., Németh-Kisgyörgy, B., Soltész, A., Szira, F., **Ambrus, H.**, Mészáros, A., Galiba, G., Vágújfalvi, A., Barnabás, B., Marton, L.C. (2008): Genetic modification of cereals in the Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences. *Acta Agronomica Hungarica*, 56: 443-448.

Referált konferencia kötetek/ Proceedings:

Mészáros, K., **Ambrus, H.**, Kiss, T., Dőry, M., Földesi Füredi, P., Karsai, I., Barnabás, B., Láng, L., Bedő, Z., Sági, L. (2009): Búza és kukorica agrobaktériumos transzformációjának optimalizálása. In: Hagyomány és haladás a növénynevelésben. (Szerk: Veisz, O.) **XV. Növénynevelési Tudományos Napok**. Budapest, 2009. március 17. pp. 332-336. ISBN: 978-963-508-575-0

Darkó, É., Stefanovits-Bányai, É., **Ambrus, H.**, Bakos, F., Barnabás, B. (2003): Az alumínium fitotoxikus hatása a búza növekedésére és ásványi anyag összetételére Al-szenzitív és mikrospórákból *in vitro* szelekcióval előállított Al-toleráns vonalakban. **Proceedings of the 10th Symposium on Analytical and Environmental Problems**. Szeged, 29 September 2003. Edited by Zoltán Galbács, pp. 160-164. ISBN 9632128672

Konferencia absztraktok/ Abstracts:

Földesiné Füredi, P.K., Ambrus, H., Fábíán, A., Barnabás B. (2012): Biogén alkoholok (n-butanol és 2-aminoetanol) hatása a kukorica mikrospórák invitro androgenezésére. In: Janda Tibor (szerk). **I. ATK Tudományos Nap**, Felfedező kutatások az Agrártudományi Kutatóközpontban: Összefoglalók. p. 40. (ISBN:978-963-8351-40-1)

Földesiné Füredi, P.K., **Ambrus, H.**, Barnabás, B. (2011): Az *n-butanol* és a *2-aminoethanol* kukorica mikrospórákra gyakorolt hatása *in vitro*. **XVII. Növénynevelési Tudományos Napok** Budapest, 2011. ISBN: 978-963-08-1235-1. pp.152.

Marton, L.Cs., Sági, L., Rakszegi, M., Spitkó, T., Mészáros, K., Németh-Kisgyörgy, B., Soltész, A., Szira, F., **Ambrus, H.**, Mészáros, A., Galiba, G., Vágújfalvi, A., Barnabás, B., (2011): Application of biotechnological methods in plant breeding in ARI of HAS, Martonvasar, Hungary. In: Berenji J, Mladenovic Drinic S, Konstantinov K (szerk.) Book of Abstracts: IV Symposium of the Section of the Breeding of Organisms of the Serbian Genetic Society. Kladovo, Szerbia, 2011.10.02-2011.10.06. Novi Sad: Stamparija Feljton, p.6. (ISBN:978-86-87109-06-03)

Ambrus, H. (2010): Technical protocol for producing doubled haploid plants via isolated microspore culture of wheat. Climate change: challenge for training of applied plant scientists-Challenge for Plant Breeding and the Biotech Response. Symposium and Training Course IV. Agricultural Research Institute of the HAS, Martonvásár, 12-16 April 2010. p. 45-48.

Ambrus, H., Soós, V., Juhász, A., Light, M.E., van Staden, J., Balázs, E., Barnabás, B. (2007): Génexpressziós változások kukorica pollentömlőkben a füst aktív komponens hatására. **XIII. Növénynevelési Tudományos Napok**, Budapest, 2007. március 12. In: Összefoglalók, p. 65.

Ambrus, H., Soós, V., Juhász, A., Light, M.E., van Staden, J., Balázs, E., Barnabás, B. (2006): Effects of smoke compounds on *in vitro* germination of maize pollen. **XIXth International Congress on Sexual Plant Reproduction**, Budapest, July 11-15. In: Book of Abstracts, pp.112-113. ISBN 963 9483 65 6

Barnabás, B., Jäger, K., **Ambrus, H.**, Darkó, É., Spitkó, T., Pintér, J., Marton, L. Cs. (2006): Improvement of anther culture technique for maize breeding. History and future. **XXth International Conference of EUCARPIA Maize and Sorghum Section**, Budapest, June 20-24. In: Congress handbook, p. 51.

Barnabás, B., Jäger, K., Bakos, F., Darkó, É., **Ambrus, H.**, Kőszegi, D., Takács, I., Tímár, I., Fehér, A. (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., Stefanovits-Bányai, É., Bakos, F., Barnabás, B. (2003): Van-e kapcsolat az alumínium-toxicitás és az oxidatív stressz mechanizmusok között mikrospórákból *in vitro* szelektált szelektált búza genotípusokban. **IX. Növénynevelési Tudományos Napok**, Budapest, 2003. március 5-6. In: Összefoglalók, p. 34.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom az MTA ATK Mezőgazdasági Intézet főigazgatójának, **Dr. Bedő Zoltán** Úrnak, hogy lehetőséget nyújtott a dolgozatom elkészítéséhez. Valamint köszönettel tartozom a munkámhoz kapcsolódó pályázati forrásnak (OTKA T037391), hogy biztosította a dolgozat elkészítéséhez szükséges anyagi fedezetet.

Hálás köszönettel tartozom Témavezetőimnek, **Dr. Barnabás Beátának** aki bevezetett a pollenek csodálatos világába és a kutatói pályán tett első lépéseimtől kezdve mérhetetlen türelemmel segítette munkámat, valamint **Dr. Darkó Évának** aki bevezetett a növényfiziológia világába és számos hasznos módszerrel gazdagított, köszönöm mind a kísérletek kivitelezésében mind pedig a dolgozat elkészítése során tett hasznos tanácsaikat és építő kritikáikat. Továbbá köszönöm **Dr. Heszky László** programvezetőnek, hogy lehetőségét nyújtott a Doktori Iskola „Növénynevelés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel” programjában való részvételemhez.

Köszönetemet fejezem ki a Sejtbiológiai Osztály valamennyi munkatársának. Köszönet **Dr. Sági Lászlónak** a dolgozatommal kapcsolatos kritikáiért és hasznos tanácsaiért. Hálás köszönettel tartozom **Gondos Erikának** és **Olasz Ildikónak** akiktől megtanultam a kukorica szövettenyésztés rejtjelmeit, **Békné Kapral Emesének**, **Fehér E. Mónikának** és **Keserűné Cseh-Kiss Ilonának** a szövettenyésztési vizsgálatokhoz nyújtott segítségükért, valamint **Fodor Szilviának** és **Szalay Józsefnének** akik biztosították számomra, a tiszta eszközöket a vizsgálataimhoz.

Köszönettel tartozom **Dr. Galiba Gábornak** és **Dr. Kocsy Gábornak**, azért hogy a Növényi Molekuláris Biológiai Osztályon lévő műszereket éjszakába nyúló méréseim folyamán is használhattam, valamint **Dr. Janda Tibornak**, hogy a Növényélettani Osztály műszereit a rendelkezésemre bocsátotta, a Fitotron munkatársainak a növénynevelésben és a növénynevelő kamrák használatakor nyújtott segítségükét, **Dr. Pintér Jánosnak** és **Dr. Spitzó Tamásnak** a Kukoricanevelési Osztály kutatóinak szakmai tanácsaikért.

Köszönettel tartozom **Kószegi Ferencnének** (Bellának) az adminisztrációs feladatok elvégzésében nyújtott segítségével valamint **Harasztos Barbarának** dolgozatomhoz kapcsolódó publikációk, a dolgozat és a tézisek angol nyelvi lektorálásáért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **Szüleimnek**, **Férjemnek**, **Fiaimnak**, **Testvéreimnek** és közeli barátaimnak azt a mérhetetlen türelmet és segítséget, amit a dolgozat elkészítésekor kaptam Tőlük.