



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**MIKROSPÓRA TENYÉSZTÉS ÉS GENETIKAI
TRANSZFORMÁCIÓS KÍSÉRLETEK ÁRPÁBAN ÉS
TRITIKÁLÉBAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

MONOSTORI TAMÁS

**GÖDÖLLŐ
2003**

- A doktori iskola:** Növénytudományi Doktori Iskola
- Tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok
- Vezetője:** Dr. Virányi Ferenc
egyetemi tanár, az MTA Doktora
Szent István Egyetem
Növényvédelemtani Tanszék
- Titkára** Dr. Gyulai Gábor
egyetemi docens, a biológiai tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem
Genetika és Növénynevelés Tanszék
- Program:** Növénynevelés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel
- Programvezető:** Dr. Heszky László
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem
Genetika és Növénynevelési Tanszék
- Témavezetők:** Dr. Pauk János
tudományos főmunkatárs, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A programvezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Két fontos takarmánygabonánk, a tritikále (x *Triticosecale* Wittmack) és az árpa (*Hordeum vulgare* L.) nemesítésében az utóbbi évtized során fokozatosan teret kaptak az *in vitro* androgenezisen alapuló haploid-indukciós eljárások. Ezek, a hagyományos nemesítési módszerek kiegészítéseként, a fajta-előállítás folyamatának lerövidítésében játszanak fontos szerepet. Árpában a portok- és a mikrospóra tenyésztés egyaránt eredményezett fajtákat. Tritikálében, ugyanakkor, a fajta-előállításban eredményesen alkalmazott portoktenyésztéssel szemben, izolált mikrospórák tenyésztéséről korábban nem számoltak be.

A mikrospóra tenyészetek szinkronizált, egysejtes rendszerek, melyek a nemesítésben való felhasználáson kívül, a genetikai transzformáció és *in vitro* szelekció számára is ideális alapanyagot jelentenek. Ezt, több fajban, köztük árpában és búzában előállított transzgenikus növények bizonyítják. A tritikále mikrospóra tenyésztés módszerének kidolgozása újabb lehetőségekkel bővítheti növényben folyó nemesítési, genetikai és biotechnológiai kutatások eszköztárát.

A gabonafélék mikrospóra tenyészeiben általános gyakorlat az indukciós tápoldat kiegészítése növényi hormonokkal. Tritikále és árpa mikrospóra tenyészetekben kapott előzetes eredményeink alapján, vizsgálni kívántuk, hogy a külső hormon-kiegészítés illetve annak elhagyása milyen hatással van az embriogenezis indukciójára, illetve a növényregenerációra. Az androgenesis hormonmentes tápoldatban való sikeres indukciója megerősítheti az előkezelés során biztosított stressznek a haploid embriogenezis indukciójában betöltött meghatározó szerepéről alkotott elméletet. A hormonmentes illetve hormonnal kiegészített tápoldatokban kapott embrioidok regenerációs kapacitásában mutatkozó különbségek, ugyanakkor, a hormonok növényregenerációra gyakorolt hatását világíthatják meg. E kísérletekben, tehát az embriogenezis és a növényregeneráció folyamatának függetlensége a hormonszükséglet szempontjából vizsgálható. A tritikále és az árpa több genotípusának bevonásával végzett kísérletek lehetőséget nyújtanak a fajok, illetve genotípusok között e szempontból tapasztalható hasonlóságok és különbségek bemutatására.

A dolgozatomban tárgyalt első témakör a **„Haploid embriogenezis indukciója tritikále és árpa mikrospóra tenyészetében, hormonmentes körülmények között”**. Fentiek alapján, az e témakörhöz kapcsolódó célkitűzéseink a következők voltak:

- A tritikále mikrospóra-izolálás és tenyésztés módszerének kidolgozása, haploid/dihaploid növények regenerálása.

- A tritikále mikroszporák *in vitro* sporofitikus fejlődésének leírása.
- A tritikále mikroszpora eredetű regeneránsok ploid-fokának meghatározása.
- Hormonmentes illetve különböző hormon-összetételű indukciós táptalajok mikroszpora embriogenezisre és növényregenerációra gyakorolt hatásának vizsgálata tritikále és árpa mikroszpora tenyésztésében.
- Egy tritikáléban eredményesen használt hormonmentes tápoldat és egy optimalizált nitrogén-összetételű indukciós tápoldat hatásának összehasonlítása árpa mikroszpora tenyésztésben.

A nemesítési célú alkalmazott kutatások mellett, az árpa fontos modellnövénye, többek között, a jazmonátok és a jazmonátok által indukált fehérjék (Jasmonate-Induced Protein, JIP) egyszikűekben játszott szerepével és hatásmechanizmusával kapcsolatos vizsgálatoknak. A jazmonátok a növényvilágban általánosan elterjedt növényi hormonok, melyek endogén szintje stressz hatására megemelkedik. A jazmonát szint megváltozása számos gén expressziójában okoz változásokat: a JIP-eket kódoló gének expresszióját serkenti, mások, így a fotoszintézissel kapcsolatos fehérjék génjeinek expresszióját gátolja.

A növényi hormonok bioszintézisében szerepet játszó enzimek génjeinek/cDNS-einek izolálása és a különböző génbeviteli módszerek lehetővé tették számos hormon endogén szintjének módosítását és működésük vizsgálatát transzgenikus növényekben. A szensz vagy antiszensz helyzetben bevitt transzgen, a kódolt enzim túltermeltetésén illetve szintézisének gátlásán keresztül, az adott hormon endogén szintjének megemelkedését vagy csökkenését eredményezi.

Az endogén jazmonát szintet a jazmonát-bioszintézis kulcs-enzime, az AOS cDNS-ével történt homológ illetve heterológ transzformációval sikerrel módosították több kétszikű fajban (*Arabidopsis*, burgonya, dohány). A jazmonátok egyszikűekben betöltött szerepéről származó ismereteink, azonban, kizárólag jazmonátokkal végzett kezeléseken illetve stressz által indukált jazmonát-szintézisen alapuló kísérletekből származnak. Az endogén hormonszint genetikai transzformáció útján történő módosítása, illetve a megváltozott hormonszint által előidézett morfológiai és élettani változások elemzése segítheti a jazmonátok árpa fejlődésében játszott szerepének jobb megértését.

Az árpában legnagyobb mennyiségben kimutatott JIP, a JIP23 fiziológiai szerepe pontosan még nem ismert, feltételezhetően a stressz elleni védelemben vesz részt. Az árpa JIP23 szintjének homológ (szensz és antiszensz) transzformációval történő módosítása segíthet a JIP23 árpa fejlődése során játszott szerepének tisztázásában.

A jazmonátok és a JIP23 endogén szintjének genetikai transzformációval történő módosítása kísérleti programunk távlati céljaként szerepelt. Az értekezésemben „**Új vektorok építése az endogén jazmonát és JIP23 szint megváltoztatására az árpa genetikai transzformációja útján**” címmel tárgyalt második témakörben e távlati program alapfeltételeit kívántuk megteremteni. Célkitűzéseink a következők voltak:

- Új plazmid vektorok készítése, melyek az árpa AOS1 illetve JIP23 cDNS-ét tartalmazzák szensz vagy antiszensz helyzetben.
- Az új vektorok működőképességének vizsgálata a fontos transzgén és a rezisztencia markergén tranziens expressziója alapján, transzformált árpa mezofillum protoplastokban.
- Egy, további stabil transzformációs kísérletek alapjául szolgáló génbeviteli rendszer kidolgozása (i) a belövési paraméterek optimalizálásával egy génpuska (particle inflow gun) számára, illetve (ii) előzetes génbelövési kísérletekkel az új vektorok, valamint a jazmonát-kísérletek modell genotípusa, a 'Salome' árpafajta bevonásával.

ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Haploid embriogenezis indukciója tritikále és árpa mikrospóra tenyésztésében, hormonmentes körülmények között.

A kísérletek növényanyagát két árpafajta (Igri őszi és Kymppi tavaszi) illetve öt hexaploid tritikále genotípus (Presto fajta, valamint Tewo x Moniko, Presto x Moniko, Presto x Novisadi és Novisadi x Moniko F₁ kombinációk) szolgáltatta. A feldolgozott kalászok legfejlettebb virágaiban a mikrospórák késői egy-sejtmagvas illetve korai két-sejtmagvas állapotában voltak.

A kalászokat 4 °C-on, 14-21 napig tartó előkezelés után laboratóriumi homogenizátorban (microblendor), 0,3M mannitol hozzáadása mellett dolgoztuk fel. A nyers mikrospóraszuszpenzió szűréssel és centrifugálással való tisztítása után, sűrűség-grádiens centrifugálással növeltük az életképes mikrospórák arányát. A tenyészetek sűrűségét az indukciós tápoldatban 0,7-1,0 x 10⁵ mikrospóra/ml-re állítottuk be. A következő indukciós tápoldatokat alkalmaztuk:

- árpában:

- N24A2,7G3 (továbbiakban N24-BA) és 190-2 (továbbiakban 190-BA), 3 mM glutamin és 1 mg/l BAP kiegészítéssel (Zhuang és Jia, 1983; Mordhorst és Lörz, 1993), valamint
- N24-0 és 190-0, a fenti tápoldatok hormonmentes változata;

- tritikálében:

- 190-2 tápoldat, 3 mM glutamin és 2,4-D + kinetin (190-D/K) vagy PAA (190-PAA) kiegészítéssel, illetve hormonmentes változatban (190-0).

A mikrospórákból az indukciós tápoldatban fejlődő embrioidokat 21-35 nap után az indukciós tápoldat szilárd változatára helyeztük át. Az árpa növényeket hormonmentes LA₃ (Mordhorst és Lörz, 1992), a tritikálét hormonmentes 190-2 táptalajon regeneráltuk.

A tritikále regeneránsok ploidiafokát a kromoszómaszám és/vagy a sztóma-zárósejtek mérete alapján határoztuk meg.

2.2. Új vektorok építése az endogén jazmonát és JIP23 szint megváltoztatására az árpa genetikai transzformációja útján.

A szkutellumok és mezofillum protoplasztok izolálásához a növényanyagot a Salome tavaszi árpafajta adta. Tranziens génexpressziós kísérletekben, emellett, BMS kukorica-szuszpenziót is felhasználtunk. A plazmidok klónozására az XL1-Blue MRF' *E. coli* törzset használtuk.

Az új plazmid vektorok készítéséhez a **pAHC20** vektorból eltávolítottuk a *bar* gént, és helyére szensz illetve antiszensz helyzetben egy többszörös klónozóhelyet (multiple cloning site, MCS) építettünk be. Ezt követően a vektorba beillesztettük a **pWD26.41** plazmid *35S promóter::pat::nos terminátor* fragmentjét. Az utolsó lépésben az MCS megfelelő hasítóhelyeinél az árpa **AOS1** (Maucher *et al.*, 2000) illetve **JIP23-3** (Hause, nem publikált) cDNS-ét építettük be a vektorokba.

Az árpa mezofillum-protoplasztokat cellulázt és pektinázt tartalmazó enzimoldatban izoláltuk, a PEG segítségével végzett génbevitel Negrutiu *et al.* (1987) alapján történt. A *pat* gén és a JIP23 cDNS tranziens expresszióját PAT-teszttel illetve Western-blottal mutattuk ki.

A transzformációs és szelekciós rendszer alapját jelentő szövettényészeteket 1,8-2,5 mm-es árpa szkutellumokkal, 2-3 mg/l 2,4-D-t tartalmazó, MS alapú táptalajon indítottuk. A növényregenerálás hormonmentes MS táptalajon történt.

A génbevitelhez génpuskát (particle inflow gun) használtunk. A DNS-sel bevont aranyrészecskéket belövéskor (i) etanolban egy fémháló felületére (Stenzel, 1998), (ii) glicerolban egy alufólia korong felületére (Koprek, 1996) vagy (iii) etanolban egy alufólia korong felületére (Pauk, személyes közlés) vittük fel. A stabil transzformációs kísérletekben belőtt szkutellumok szelekciója 3 mg/l bialaphos-t tartalmazó táptalajon történt.

A génbelövés paramétereit optimalizáló kísérletekben a belövést a **pAHC18** és a **pAHC25** plazmidokkal végeztük. A tranziens luciferáz aktivitást fehérjekivonatból luminométerrel, a β -glukuronidáz aktivitást hisztokémiai festéssel mutattuk ki.

A stabil transzformációs kísérletekben regenerált növényekben a transzgének beépülését és expresszióját PCR-rel illetve PAT-teszttel vizsgáltuk.

A kísérletekben alkalmazott molekuláris biológiai módszereket az általánosan ismert protokolloknak (Sambrook *et al.*, 1989) illetve a gyártók javaslatainak megfelelően végeztük.

EREDMÉNYEK

I. Haploid embriogenezis indukciója tritikále és árpa mikrospóra tenyészetében, hormonmentes körülmények között.

1. Árpa és búza mikrospóra tenyészetben korábban hatékonyan alkalmazott technológiai elemek felhasználásával kidolgoztuk a tritikále mikrospóra tenyésztésének módszerét. A kísérleteket öt genotípussal (Presto valamint Tewo x Moniko, Presto x Moniko, Presto x Novisadi, Novisadi x Moniko F₁) és három, különböző hormon-összetételű (hormonmentes; 2,4-D + kinetin; PAA) indukciós tápoldattal végeztük. A hideg előkezelésben részesített (4 °C, 14-21 nap) kalászek homogenizátorban történő feldolgozása hatékony eljárásnak bizonyult a mikrospórák izolálására. Az életképes mikrospórák arányát sűrűség-gradiens („maltóz párna”) centrifugálással növeltük meg. Az optimálisnak talált késői egy-sejtmagvas és korai két-sejtmagvas fejlődési állapotú mikrospórák osztódása mind hormonmentes, mind hormontartalmú tápoldatban embrioidok fejlődését eredményezte. Az embrioidok további fejlődését szilárd indukciós táptalajon biztosítottuk. A növényregenerálás hormonmentes regeneráló táptalajon történt. Összesen 126 növényt regeneráltunk és ültettünk talajba.

2. A tritikále mikrospóra tenyészetekből kapott regeneránsok 90%-a haploid volt, ami ellentétben áll az egyéb gabonafélék mikrospóra tenyészeiben kapott spontán dihaploid növények nagy arányával. A kolchicin-kezelést követően, az egyes genotípusoktól függően, a teljesen illetve részlegesen fertilis tritikále növények aránya 43% és 57% között változott, kivéve a Presto x Novisadi F₁-et, melyből nem kaptunk fertilis növényt. A felnevelt növények a hagyományos nemesítés számára megfelelő alapanyagot jelenthetnek.

3. A hormonmentes indukciós tápoldat pozitív hatással volt a Novisadi x Moniko F₁ tritikále mikrospóra tenyészetek embrioid-kihozatalára, a zöld és albinó növények regenerációját, azonban nem befolyásolta szignifikánsan. A hormonokkal (2,4-D + kinetin illetve PAA) kiegészített indukciós táptalajok sem az embrioid-indukcióra, sem az albinó és zöld növények regenerációjára nem voltak szignifikáns hatással.

Az Igrí és Kymppi árpafajták mikrospóra tenyészetében az androgenezis indukciója mind hormontartalmú, mind hormonmentes tápoldatokban lehetséges volt. A hormonmentes tápoldatban kapott embrioidok regenerációs kapacitása, azonban szignifikánsan alacsonyabb volt, függetlenül a tápoldat só- és vitamin-összetételétől. Adataink alapján, az embriogenezis és a növényregeneráció egymástól független eseményként való értékelése az eltérő

hormonszükséglettel is igazolható. A kalászkok hideg előkezelése jelenti az embriogenezis indukciójához szükséges szignált mind a tritikále, mind az árpa mikroszpóra tenyészetében. A növényregenerációban, azonban, már különbségek tapasztalhatók az egyes fajok és/vagy genotípusok hormon-szükségletét illetően.

4. A tritikáléban sikerrel alkalmazott hormonmentes indukciós tápoldatot árpa mikroszpóra tenyészetben is teszteltük. Itt, azonban, ez a tápoldat szignifikánsan alacsonyabb szintű regenerációt eredményezett, mint egy optimalizált nitrogén-összetételű tápoldat. Ez a különbség független volt a tápoldatok hormontartalmától, és feltételezhetően a tritikále-táptalaj szignifikánsan (50%) alacsonyabb szerves nitrogén-tartalmával áll összefüggésben. Az Igri fajta válaszáda szignifikánsan jobb volt a Kymppi-énél az optimalizált összetételű tápoldatban, míg a hormonmentes tápoldatban a két genotípus válaszáda hasonló szinten volt.

II. Új vektorok építése az endogén jazmonát és JIP23 szint megváltoztatására az árpa genetikai transzformációja útján.

1. A jelen dolgozathoz kapcsolódó munkák fő céljaként új plazmid vektorokat állítottunk elő. A két vektor az árpa AOS1 cDNS-ét tartalmazza szensz illetve antiszensz helyzetben, az *Ubi-1* promóter szabályozása alatt. A *pat* szelekciós markergén a *35S* promóter irányítása alatt található a vektorokban. Az AOS jazmonát-szintézisben betöltött szabályozó szerepéből adódóan, a plazmid felhasználásával előállított transzgenikus növényekben az endogén jazmonát szint megváltozása várható.

2. A JIP23 a legnagyobb mennyiségben előforduló jazmonátok által indukált fehérje árpában. Hatásmechanizmusának tanulmányozására szintén a transzformáción alapuló megoldást választottuk. A szükséges vektorok alapjául az AOS-transzformációnál is használt konstrukció szolgált, melybe az árpa JIP23 cDNS-t szensz illetve antiszensz helyzetben építettük be.

3. A vektorépítés köztes termékeként létrehoztunk egy olyan konstrukciót, mely egy többszörös klónozóhelyet (multiple cloning site, MCS) tartalmaz szensz vagy antiszensz helyzetben, az *Ubi-1* promótertől 3' irányban. A konstrukció szintén magában foglalja a *35S* promóter irányítása alatt lévő *pat* gént tartalmazó expressziós kazettát. A MCS legalább tíz restriktív endonukleáz hasítási helyét tartalmazza.

4. Az új vektorok funkcionálisan aktívnak bizonyultak a *pat* gén és a JIP23 cDNS árpa mezofillum protoplasztokban mutatott tranziens expressziója alapján.

5. Az új vektorok stabil transzformációban történő felhasználására előkísérleteket terveztünk a jazmonát-kísérletek modell genotípusa, a Salome árpafajta felhasználásával. Ezt megelőzően, az éretlen embriókból izolált scutellumokból szomatikus embriogenezis útján történő növényregenerálás rendszerét alkalmaztuk erre a genotípusra. 2,4-D-tartalmú MS táptalajon a 1,5-2,5 mm átmérőjű scutellumokat voltak legalkalmasabbak embriogén kalluszk indukciójára. A Salome fajta ebben a rendszerben igen alacsony regenerációs hányadost (10-15%) mutatott.

6. A stabil transzformációs kísérletek megkezdése előtt a génbelövés paramétereit génpuskával (particle inflow gun) belőtt kukorica szuszpenziós sejtekben és árpa szkutellumokban, a *bar* és a *luc* riportergének tranziens expressziója alapján optimalizáltuk. 5,5 bar He-nyomás valamint a célszövet és gyorsító egység közti 10-13 cm távolság eredményezte a legmagasabb szintű expressziót. A célszövet fölé helyezett drótszövet a mikrohordozókból képződött aggregátumok méretét, valamint a gáznyomás által okozott akusztikus sokkot csökkentette. A legmagasabb szintű tranziens expressziót eredményező belövési módszernél a DNS-sel bevont aranyrészecskéket egy alufólia-korong felületére etanolban vittük fel.

7. Az új vektorok stabil transzformációs programban történő első felhasználásaként, a Salome árpafajta szkutellumait lőttük be a korábban optimalizált paraméterek figyelembe vételével. A belőtt szkutellumokat 3 mg/l bialaphos-t tartalmazó táptalajon szelektáltuk. Ez a herbicid koncentráció elpusztította a nem-reagáló szkutellumokat, ugyanakkor lehetővé tette kalluszkok illetve embriogén struktúrák fejlődését a rezponzív szöveteken. A Salome fajta szkutellumainak belövés előtt és után ozmotikumokat tartalmazó táptalajon való inkubálása jelentős mértékben javította a rezponzivitást és a regenerálóképességet.

8. A stabil transzformációs előkísérletekből összesen kettő, feltételezeten transzgenikus vonalat állítottunk elő. Ezek az AOS1 illetve a JIP23 cDNS-t szensz helyzetben tartalmazó plazmidokkal történt belövésekből származtak. Az előzetesen elvégzett PCR- és PAT-analízis nem bizonyította a *pat* gén jelenlétét illetve kifejeződését a regenerált növényekben. A *pat* gén beépülését, valamint az AOS1 és a JIP23 cDNS beépülését illetve kifejeződését célzó további vizsgálatok nem képezik jelen értekezés tárgyát.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztuk a tritikále izolált mikrospóráiból történő növényregenerálás módszerét. A több genotípus bevonásával kidolgozott módszer alkalmas a növénynemesítés folyamatában történő alkalmazásra. Gyakorlati szempontból a módszer előnye, hogy az alkalmazott mikrospóra-izolálási módszerrel kiváltható a portokizolálás munkaigényes folyamata.

2. Bizonyítottuk, hogy a haploid embriogenezis indukciója nem igényel külső hormonkiegészítést sem tritikále, sem árpa izolált mikrospóra tenyészetében. Egyszikűek egysejtes rendszerében, tehát újabb, e szempontból eddig nem vizsgált fajoknál mutattuk ki, hogy a haploid embriogenezis indukciójában exogén tényezőként a hormonoknak, valószínűleg, nincs szerepük.

3. Új plazmid vektorokat építettünk, melyek az árpa AOS1 illetve JIP23 cDNS-ét tartalmazzák szensz vagy antiszensz helyzetben, az *Ubi-1* promóter szabályozása alatt. Ugyanazon alapkonstrukcióra építve, létrehoztunk két további vektort, melyek egy többszörös klónozóhelyet tartalmaznak szensz vagy antiszensz helyzetben, az *Ubi-1* promótertől 3' irányban. A klónozóhely legalább tíz restriktációs endonukleáz hasítási helyét tartalmazza. A hasítási helyek közé a megfelelő gének/cDNS-ek beépítésével, új expressziós vektorok állíthatók elő.

4. A 3. pontban felsorolt vektorok működését a *pat* rezisztanciagén és a JIP23 cDNS szensz plazmidokkal transzformált árpa mezofillum protoplasztokban mutatott tranziens expressziója alapján bizonyítottuk. Ezek alapján, tehát, az AOS és a JIP23 szensz és antiszensz vektorok alkalmasak lehetnek az endogén jazmonát illetve JIP23 szint transzgenikus úton történő módosítására árpában és egyéb kalászos fajokban. A többszörös klónozóhelyet tartalmazó plazmidok az általunk felhasználtakon kívül további gének/cDNS-ek klónozására (és kifejeztetésére) alkalmasak.

KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A mikrospóra tenyészetek a gyakorlati célú biotechnológiai és növénynemesítési kutatások optimális alapanyagát jelentik. Emellett, itt egy szinkronizált fejlődésű egysejtű rendszerben vizsgálhatók a haploid embriogenezist meghatározó tényezők, kizárva az egyéb szövetek illetve az általuk termelt anyagcseretermékek zavaró hatását.

Kísérleteinkben a tritikále és az árpa mikrospóráinak izolálására és tenyésztésére azonos protokollt alkalmaztunk. A mikrospóra-izolálás módszere, a kalászok mikroblendorban történő homogenizálása, előnyt jelent a gyakorlati alkalmazás szempontjából, mivel így kiküszöbölhető a portokizolálás munkaigényes művelete. A donor kalászok hidegben történő előkezelése biztosítja a mikrospóra embriogenezis indukciójához szükséges szignált, az embrioidok kialakulásához egyik faj esetében sincs szükség a táptalaj növényi hormonokkal történő kiegészítésére. A hatékony gyakorlati alkalmazáshoz szükséges magas szintű növényregeneráció, azonban, egyes genotípusok esetében kizárólag hormon-kiegészítés mellett érhető el. Ugyancsak különbségek tapasztalhatók az egyes genotípusok, illetve a két faj között a táptalajok optimális összetételét illetően.

Eredményeink, tehát, azt mutatják, hogy az androgenezis egyes meghatározó tényezői (pl. az indukciót kiváltó stressz) fajtól és genotípustól függetlenül általános érvényűek, míg mások (pl. a növényregeneráció hormon-igénye és a táptalajok optimális összetétele) fajra illetve genotípusra specifikusak.

Vektorépítési programunk eredményeként, működőképes plazmid vektorok állnak rendelkezésre módosított jazmonát illetve JIP23 szintet mutató transzgénikus árpa növények előállítására. Emellett, vektorok - és velük transzgénikus növények - széles köre állítható elő a többszörös klónozóhelyet tartalmazó plazmid konstrukciók felhasználásával.

A fentiek mellett, a belövési paraméterek optimalizálása megkönnyíti a kísérletekben használt génpuska alkalmazását további, szkutellumok belövésén alapuló kísérletekben. Hasonlóképpen, az új vektorokkal végzett első stabil transzformációs kísérletek eredményei hasznos információkkal szolgálhatnak további kísérletekben a donor genotípus, valamint a belövési és szelekciós módszerek megválasztásához.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖREIHEZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Lektorált tudományos közlemény

Pauk J., Hänsch, R., Schwarz, G., Nerlich, A., **Monostori T.**, Mészáros A., Jenes B., Kertész Z., Matuz J., Schulze, J., Mendel, R.R., 1998. Transzgenikus búza (*Triticum aestivum* L.) Magyarországon. Növénytermelés 47: 241-251.

Monostori T., Puolimatka, M., Pauk J., 1998. Tritikále *in vitro* androgenézis izolált mikroszpóra-tenyészetben. Növénytermelés 47: 241-251.

Pauk, J., Puolimatka, M., Lökös Tóth, K., **Monostori, T.**, 2000. *In vitro* androgenesis of triticales in isolated microspore culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 221-229.

Monostori, T., Schulze, J., Sharma, V.K., Maucher, H., Wasternack, C., Hause, B., 2003. Novel plasmid vectors for homologous transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) with JIP23 cDNA in sense and antisense orientation. Cereal Research Communications 31: 17-24.

Monostori, T., Lantos, Cs., Mihály, R., Pauk, J., 2003. Induction of microspore embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. Cereal Research Communications (elkészülés alatt)

Könyv fejezet

Pauk, J., Mihály, R., **Monostori, T.**, Puolimatka, M., 2003. Protocol of triticales (x *Triticosecale* Wittmack) microspore culture. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (Eds.): Doubled haploid Production in Crop Plants. A manual. Cost Action 851 (megjelenés alatt).

Előadás összefoglaló

Pauk, J., **Monostori, T.**, Puolimatka, M., Jenes, B., Kertész, Z., Matuz, J., 1996. *In vitro* androgenesis of crop plants and genetic manipulation. The 2nd Brazilian-Hungarian Seminar and Training Course in Plant Biotechnology, Budapest. pp.114-124.

Monostori T., Puolimatka, M., Pauk J., 1998. Az *in vitro* androgenézis vizsgálata tritikále mikroszpóra-tenyészetében. IV. Növénytermelési Tudományos Napok, Budapest, 1998. január 28-29. p. 22.

Pauk J., Mihály R., Kótai É., Kiss O., Petrecz Sz., Bánhid J., **Monostori T.**, Csősz L.-né, Beke B., Mesterházy Á., Kertész Z., Matuz J. (2002): Nemesítés és androgenézis: álom és délibáb, biotechnológiai kutatás növénytermelési céllal. VIII. Növénytermelési Tudományos Napok, Budapest, 2002. február 12-13. p. 17.

Monostori T., Schulze, J., Sharma, V.K., Maucher, H., Wasternack, C., Hause, B., 2003. Transzformációs kísérletek az endogén jazmonát szint módosítására árpában. IX. Növénytermelési Tudományos Napok. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, 2003. március 5-6. p. 35.

Poszter összefoglaló

Monostori T., Pauk J., 1995. Androgenezis indukciója izolált árpa mikrosporák *in vitro* tenyésztésében. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, Hódmezővásárhely, 1995. április 21-22. p. 365.

Monostori T., Pauk J., 1997. A tritikále mikrospora-tenyésztése. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, Karcag, 1997. június 12-13. p. 236.

Pauk, J., **Monostori, T.**, Puolimatka, M., 1998. Embryogenesis of *Triticale* in directly isolated microspore culture. Plant Biotechnology and *In Vitro* Biology in the 21st Century. IX. Int. Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Jerusalem, 1998. Abstracts. p. 98.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖREIHEZ KÖZVETVE KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Lektorált tudományos közlemény

Monostori T., Matuz J., 1995. Hibrid paradicsom előállítása biokémiai hiánymutáns felhasználásával. A Debreceni Agrártudományi Egyetem Tudományos Közleményei 31: 395-403.

Előadás összefoglaló

Barabás Z., **Monostori T.**, Felföldi K., 1993. Hibrid vetőmag előállítása biokémiai hiánymutánsokkal. Barabás Zoltán gabonanemesítési tudományos emlékülésen elhangzott előadások összefoglalói, Martonvásár. p. 40.

Poszter összefoglaló

Barabás, Z., **Monostori, T.**, Felföldi, K., 1993. Biochemical mutants as tools in hybrid seed production. Volume of Abstracts. Seventeenth International Congress of Genetics, Birmingham. p. 235.

Purnhauser, L., Schulcz, J., **Monostori, T.**, Matuz, J., 1993. Crossability of wheat with rye and use of the tissue culture method for wide hybridization. Volume of Abstracts. Seventeenth International Congress of Genetics, Birmingham. p. 118.

Barabás, Z., Matuz, J., **Monostori, T.**, 1993. Tomato hybrid seed production using auxotroph (thiamine-dependent) mutants. Agronomy Abstracts. 1993 Annual Meetings. Cincinnati, Ohio. p. 81.

Barabás Z., **Monostori T.**, Matuz J., 1993. Biokémiai hiánymutánsok a hibridelőállításban. Növénynevelési Tudományos Napok '93, Budapest, 1994. január 11-12. p. 35.

Egyéb tudományos közlemény

Barabás, Z., Felföldi, K., **Monostori, T.**, 1993. Hybrid seed production - an unconventional way. Annual Wheat Newsletter, Vol. 39. p. 158.