SZENT ISTVÁN EGYETEM

In vitro dihaploid kukoricavonalak szövettenyésztési eredményei és kombinálódó-képesség vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Spitkó Tamás

Martonvásár
2010

Doktori iskola:	Növénytudományi Doktori Iskola
Vezetője:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja egyetemi tanár SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Tudományága:	Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
Program:	Növénygenetika, növénynemesítés és növénybiotechnológia
Programvezető:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja egyetemi tanár SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Témavezetők:	Dr. Barnabás Beáta, az MTA levelező tagja tudományos igazgatóhelyettes MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet Dr. Sági László, PhD (biol.) tudományos főmunkatárs MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet

.....
Dr. Barnabás Beáta
társtémavezető

.....
Dr. Sági László
társtémavezető

.....
Dr. Heszky László
iskolavezető

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK **3**

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK **5**

1. BEVEZETÉS **7**

1.1 Problémafelvetés 8

1.2 A téma aktualitása 9

1.3 Célkitűzés 10

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **11**

2.1 Kukorica szövettenyésztési rendszerek bemutatása 11

2.1.1 Diploid, éretlen embriótenyésztés 15

2.1.2 Haploid szövettenyészetek 18

2.1.2.1 Portoktenyészetek 18

2.1.2.2 Mikrospóratenyésztés 23

2.2. A monoploid módszer 24

2.3 *In vitro* DH vonalak szántóföldi eredményei 27

2.4 Kombinálódó-képesség vizsgálatok 30

2.4.1 Faktoriális párosítási modell 33

2.4.2 Diallél módszer 34

2.5 Dihaploid eredetű gabonafélék a kereskedelemben 35

3. ANYAG ÉS MÓDSZER **39**

3.1 Vizsgált genotípusok 39

3.2 Dihaploidok előállítása 40

3.2.1 Mintagyűjtés 40

3.2.2 Az explantumok előkezelése 42

3.2.3 A táptalajok összetétele 42

3.2.4 Az *in vitro* tenyésztés 42

3.3 Szántóföldi kombinálódó-képesség vizsgálatok 44

3.3.1 A vizsgált dihaploid vonalak és tesztereik bemutatása 45

3.3.2 Tenyészkerti elrendezés és a teljesítményvizsgálatok 45

3.3.3 Morfológiai jellemzők és a betegség-ellenállóság mérése 47

3.4. Az eredmények statisztikai értékelése 47

4. EREDMÉNYEK **51**
4.1 A haploid kukoricatenyésztés eredményei 51
4.1.1 A genotípus hatása a szövettenyésztés eredményeire 51
4.1.1.1 Dihaploid vonalak és származékainak vizsgálata 52
4.1.1.2 Modell genotípusok haploid kalluszindukciója 56
4.1.2 A vetésidő hatása a szövettenyésztés eredményeire 60
4.2.3 Az évjárat hatása a szövettenyésztés eredményeire 62
4.2 Szántóföldi vizsgálatok 63
4.2.1. A szülővonalak kombinálódó-képesség vizsgálata 64
4.2.2 A DH vonalak és hibridjeik morfológiai jellemzői és betegség-ellenállósága 67
4.2.2.1 A morfológiai jellemzők vizsgálata 67
4.2.2.2 A betegség-ellenállóság vizsgálata 69
4.2.3 A hibridek teljesítménye és termésstabilitása 71

5. MEGVITATÁS **77**
5.1 A szövettenyésztés eredményei alapján tett következetések 77
5.2 A szántóföldi vizsgálatokból levont következtetések 84
5.3 Új tudományos eredmények 91

6. ÖSSZEFOGLALÁS **93**

6. SUMMARY **95**

7. IRODALOMJEGYZÉK **97**

8. MELLÉKLETEK **109**
M1 Alkalmazott tenyésztő táptalajok és módosított változataik 109
M2 A teljesítménykísérletben vizsgált hibridek terméseredményei 110
M3 A teljesítménykísérletben vizsgált hibridek betakarításkori szemnedvesség értékei 111
M4 Az értekezés témájában megjelent első- és társszerzős közlemények 112
M5 Konferencia-részvétel az értekezés témájában 113

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **115**

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK

rövidítés		angol elnevezés	magyar elnevezés
2,3,5-TIBA	-	2,3,5-triiodobenzoic acid	2,3,5-trijódbenzoesav
2,4-D	-	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
BC	-	back-cross	visszakeresztezés
DC	-	double cross	kétszeres keresztezés
DH	-	doubled haploid	dihaploid
DHTC	-	DH test cross progeny	keresztezett DH utódnemzedék
DMSO	-	dimethyl sulfoxide	dimetil-szulfoxid
EU	-	early uninucleate stage	korai egysejtmagvas állapot
GCA	-	general combining ability	általános kombinálódó-képesség
ISSS	-	Iova Stiff Stalk heterotic group	Iova Stiff Stalk heterózis csoport
LANC.	-	Lancaster heterotic group	Lancaster heterózis csoport
LU	-	late uninucleate stage	kései egysejtmagvas állapot
MAS	-	marker assisted selection	marker alapú szelekció
MSC	-	modified single cross	módosított egyszeres keresztezés
NAA	-	1-naphthaleneacetic acid	alfa-naftil-ecetsav
NR	-	non related	nem rokon
PAR	-	photosynthetically active radiation	fotoszintetikusan aktív sugárzás
SC	-	single cross	egyszeres keresztezés
SCA	-	specific combining ability	specifikus kombinálódó-képesség
SLC	-	sister line cross	testvérvonal keresztezés
SSD	-	single seed descent method	egymag-származék módszer
TC	-	three way cross	háromvonalas keresztezés

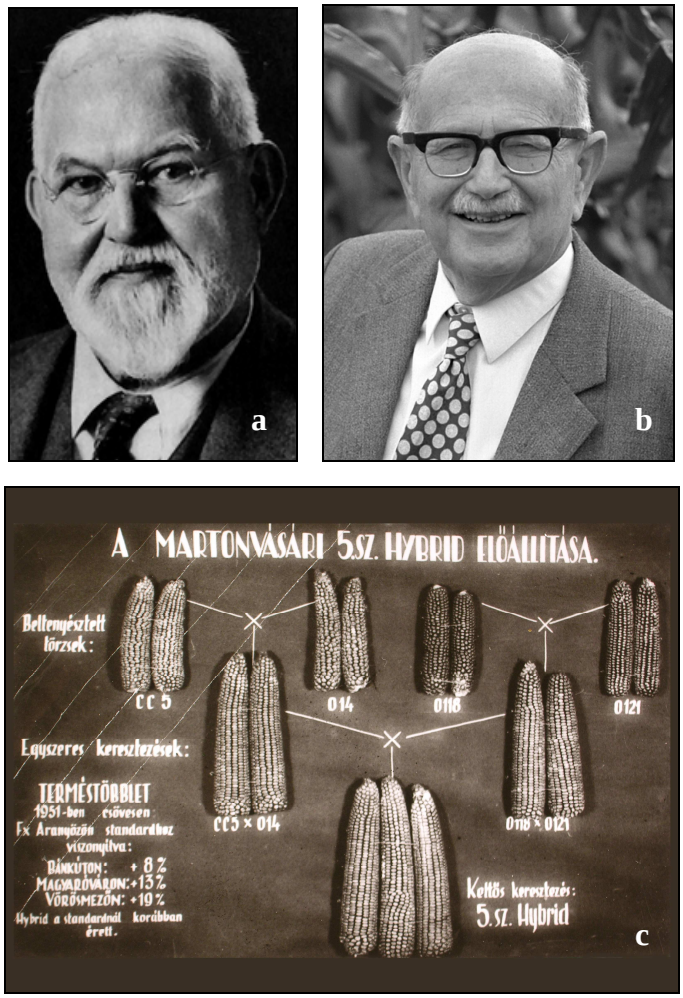
1. BEVEZETÉS

Száz éve kezdődött a hibridkukorica-nemesítés története, amikor George Harrison Shull elsőként számolt be két beltenyésztett vonal keresztezéséből származó hibridek kedvező terméseredményeiről és nagyfokú kiegyenlítettségéről (Shull, 1908). Hat évvel később bevezette a „heterózis" fogalmát, amelyre akkor a *hybrid vigor* kifejezést használta (Shull, 1914). A világon az 1930-as években terjedt el jelentősen a beltenyésztéses hibridek termesztése, felváltva ezzel a szabadon elvirágzó kukoricafajtákat. Az új nemesítési módszerrel előállított hibridkukoricák az addig használt tájfajtákat elsősorban termésben, betakarításkori szemnedvességben és egyöntetűségükben múlták fölül (ez utóbbi tulajdonság a mezőgazdaság gépesítésének elterjedésével vált különösen fontossá).

Magyarországon (Európában elsőként) Martonvásáron alkalmazták e módszert beltenyésztéses hibridek előállítására. Az ötvenes évek elején Papp Endre öntermékenyítéssel állított elő kukoricavonalakat, melyek felhasználásával jött létre az Mv 5-nek nevezett négyvonalas, beltenyésztéses hibrid, amely 1953-ban kapott állami elismerést és minden korábbi eredményt felülmúlva ért el sikereket (1. ábra).

A beltenyésztés a hagyományos kukoricanemesítés alapeszközévé vált, mellyel hosszú ideig stabilan fenntartható, más vonalaktól megkülönböztethető, de ugyanakkor egyöntetű nemesítési alapanyagokat állíthattak elő.

Az öntermékenyítés ideje 6-8 generáció, melyet közben folyamatos nemesítői szelekció kísér. A munkafolyamat utolsó fázisa a kész beltenyésztett törzsek tesztkeresztezése, mellyel a szülők hibridekben realizált értéke fejezhető ki. Amennyiben a nemesítői szándék, a vonalak külleme és ellenállósága, valamint hibridjeik teljesítménye és termésstabilitása egymásra talál, megszületik az új beltenyésztett vonal, ami értékétől függően tölthet be jelentős szerepet hosszabb-rövidebb ideig a hazai, európai, vagy akár a világ kukoricatermesztésében.



1. ábra (a) George H. Shull a *hybrid vigor* jelenségének felismerője és a kifejezés bevezetője (fotó: Development of Hybrid Maize, *s.a.*); (b) Papp Endre kukoricanemesítő, Európában és Magyarországon az első beltenyésztéses hibridkukorica előállítója (fotó: MTA MgKI); (c) Az első európai beltenyésztéses hibridkukorica, az Mv 5 előállításának ábrája (fotó: MTA MgKI).

1.1 Problémafelvetés

Az elmúlt száz esztendő nagy részében a beltenyésztéses hibridek termelésben eltöltött „életciklusa” hosszabb volt, mint napjainkban. A sokat emlegetett felgyorsuló világban az igények jelentősen megváltoztak, és új elvárásokat támasztottak a nemesítéssel szemben is. Ilyen követelmény pl. a költséghatékonyság, a változó agroökológiai és agrotechnikai feltételekhez történő gyors alkalmazkodás a korábbi értékes tapasztalatok megtartásával egyidejűleg. Az új technikák közül a növényi sejt- és szövettenyésztés, a marker szelekció (MAS), vagy napjainkban az oly sok vitát kiváltó géntechnológia alkalmazása és a hagyományos nemesítésbe való integrálása vált különösen ismertté.

A hagyományos beltenyésztéses technikával a kukoricavonalak előállításának ideje (6-8 öntermékenyített generációra számítva) 6-8 év, ami a téli generációk felhasználásával 3-4 évre

csökkenthető. Az ezt követő tesztelés további 2-3 év, amiben az egyidejű kísérleti célú vetőmag felszaporítás (ún. „pilot seed production”) is benne foglaltatik. A tesztelés időtartama - jelenlegi ismereteink szerint - nem rövidíthető tovább, a homozigóta beltenyésztett törzsek előállítási ideje viszont más módon csökkenthetővé vált a hatvanas évek közepétől.

A kukorica esetében a szántóföldi monoploid módszerrel (Chase, 1969) és mikrospóra eredetű szövettenyészetekkel (Chu *et al.*, 1975) egy éven belül lehetőség van közel 100%-ban homozigóta vonalak előállítására a beltenyésztés korábban említett hosszadalmas ciklusainak kiváltásával, és a szelekció utólagos alkalmazásával. Az utódteszt itt is szükséges, amelyet az előállított nagyszámú haploid (genomduplikáció után dihaploid) eredetű vonal - nemesítői igényeknek megfelelő - kiválogatása előz meg.

E módszereknek a megítélése az elmúlt három évtizedben sokat változott, a kereskedelmi hibridek piaci életciklusa eközben jelentősen lerövidült, amely magával hozta az új technikák integrációjának szükségességét. E módszerek alkalmazása lehetővé teszi a gyors reagálást a piaci igények változásaira, ugyanakkor esetenként akár költséghatékonyabbak is lehetnek a hagyományos beltenyésztéses technikákkal szemben.

1.2 A téma aktualitása

Ha az elmúlt évszázad közepétől a citogenetika és a biotechnológia eszközei rendelkezésünkre állnak, akkor felmerül a kérdés, hogy ezeket az új módszereket miért, vagy miért nem integrálta napjainkig a kukoricanemesítés? Esetenként pedig még az sem tisztázott, hogy ezek az eljárások - legyen az a monoploid módszer, vagy sejt- és szövettenyésztés - felhasználhatók-e új vonalak előállítására.

A témára a XX. század végére a piaci igények átrendeződésével, a versenyhelyzet fokozódásával (pl. Európai Uniós csatlakozás) és a költségek leszorításának most is meglévő igényével újra felfigyeltek mind a hazai, mind pedig a külföldi nemesítő-kutató állomásokon és cégeknél. Az új módszerek alkalmazása nem a korábban működő technológiák felváltására, hanem sokkal inkább azok kiegészítésére, vagy gazdagítására irányul.

A monoploid technikát mindezek ellenére egyes nemesítő telepek kizárólagosan használják, míg a portoktenyésztéssel előállított dihaploid (DH) kukoricatörzsek napjainkig nem jelentek meg széles körben a nemesítésben, a kereskedelmi hibridek szülőkomponenseiként. Dolgozatunkban részben ez utóbbi jelenség okait vizsgáltuk meg, arra a kérdésre is keresve a választ, hogy milyen jövőbeli perspektívái lehetnek az *in vitro* előállított kukoricavonalak nemesítési hasznosításának.

1.3 Célkitűzés

A kísérletek elvégzése során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen kalluszindukciós és növényregenerációs hatékonysággal működik az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének Sejtbiológiai Osztályán optimalizált, portoktenyésztésen alapuló szövettenyésztési módszer a kifejezetten erre a technikára szelektált, vagy ezzel előállított genotípusokon?
- Milyen kalluszindukciós és növényregenerációs hatékonysággal működik a módszer az éretlen embrió eredetű szövettenyésztésben használt, ún. „modell" genotípusokon?
- Lehetséges-e a szűk időintervallumban, szezonálisan jelentkező portoktenyésztési munka időbeli széthúzása frakcionált vetéssel, illetve okoz-e ez az eredményekben pozitív vagy negatív változást?
- Mekkora a DH vonalak előállításának gyakorisága a leoltott antéraszámra és az összes kallusz számra vonatkoztatva?

- Milyen a szövettenyésztéssel előállított DH vonalak hibridjeinek szántóföldi teljesítménye?
- Hogyan alakul az utódteszt alapján a szülővonalak kombinálódó-képessége, van-e a hibridben realizálódó, javító hatása az ezzel a módszerrel előállított DH törzseknek?
- Az *in vitro* technikával létrehozott vonalak eltérnek-e morfológiailag, vagy betegség-ellenálló képességüket tekintve a hagyományos beltenyésztett törzsektől?
- Hogyan alakul a DH szülővonalak hibridkombinációinak termésstabilitása különböző termőterületeken, különböző évjáratokban?
- A DH szülőkomponensű hibridek elérik-e a kereskedelemben lévő hibridek (standardok) termésátlagát úgy, hogy közben a betakarításkori szemnedvességük az elvárható értékek közelében marad?
- Melyek a jövőbeli perspektívái a portok eredetű szövettenyésztési technikának a hibridnemesítésben?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

E fejezet először röviden áttekinti a kukorica szövettenyésztés történetének fontosabb állomásait, majd részletesebben ismerteti a diploid és haploid szövettenyészetek módszereit. Röviden kitér az *in vivo* DH előállítás módszereire, bemutatva azok előnyeit és nehézségeit.

A kísérletekben a vonalak használati értékét több más értékmérő tulajdonság mellett az általános (GCA) és specifikus kombinálódó-képesség (SCA) meghatározásával lehet kifejezni. A fejezet a mérőszámok kiszámításának és használatának lehetőségeit is bemutatja, kiegészítve alkalmazásuk történetével. Végül áttekinti a DH kukoricavonalak és más, e technikával előállított gabonafélék felhasználásának lehetőségét a kereskedelemben használt hibridek és fajták előállításában, valamint a módszer jövőbeli szerepét a nemesítésben.

2.1 Kukorica szövettenyésztési rendszerek bemutatása

Mint minden más növényfaj esetében, az *in vitro* ontogenezis a kukoricánál is a tenyésztett növényi sejtekből, szövetekből kiinduló növényregenerálást jelenti. A folyamat elején a differenciálatlan szomatikus, vagy gametofitikus sejt áll, amelyből a tenyésztés végére embriogenezisen, vagy kallogenezisen keresztül differenciált hajtás, gyökér, vagy teljes növény keletkezik. Ebben a folyamatban a tenyésztett sejtek determináltságuk révén egy bizonyos fejlődési útra (differenciálódási folyamatsorra) programozódtak be. A differenciálódás során az eltérő gének működésének következtében a sejtek között különbségek alakulnak ki, majd szövetekbe és szervekbe rendeződnek (morfogenezis). A differenciálódott sejtekben a teljes genetikai információ egy része működik, attól függően, hogy az adott sejt milyen feladatra specializálódott.

Amikor szövettenyészetet létesítünk, olyan növényi explantumot érdemes választani, amely tartalmaz osztódó, még nem differenciálódott merisztéma szöveteket (nagy számban fordulnak elő kambiális szövetekben, valamint fejlődő proembriókban). Abban az esetben, ha olyan szövetet izolálunk táptalajra, amelyben a sejtek differenciáltak, akkor elsőként azok sejtosztódáson keresztüli dedifferenciálódását kell mesterségesen indukálni. Erre a célra elterjedten használt vegyület a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D). A dedifferenciálódás folyamatának eredménye egy differenciálatlan, osztódó sejttömeg (kallusz). A kalluszosodás folyamata természetes és szintetikus auxinokkal és citokininekkel indukálható. A szilárd táptalajon fejlődő elsődleges kallusz többszöri átoltással folyamatosan fenntartható, mennyisége növelhető. Folyékony tenyészetekben folyamatos rázatással a kalluszról sejtek választhatók le, így lehetővé válik sejtszuszpenzió létrehozása.

A redifferenciálódás során a kalluszsejtek differenciálódását váltjuk ki *in vitro* körülmények között, melynek eredménye a növényregeneráció (az ontogenezist kívánjuk indukálni). Az ontogenezis az *in vitro* növényi rendszerben két fő utat követhet, ezek:

- *a szomatikus embriogenezis* (elvileg egyetlen sejtből indul ki, morfológiailag eltér a zigotikus embriogenezistől)
- és az *organogenezis* (lehet merisztéma -, vagy szervdifferenciálódás).

A *szomatikus embriogenezis* indukálásakor a kalluszban merisztematikus központok alakulnak ki, és a szomatikus embriók ezeknek a merisztemoidoknak a felszíni sejtjeiből keletkeznek. Az embrionálissá vált sejtek kétsejtes proembriót hoznak létre egy transzverzális osztódással, amit az apikális sejt longitudinális osztódása követ, így hozva létre a T-alakú háromsejtes proembriót. Ezután többszöri osztódást követően a fejlődő embrió fokozatosan szerveződik, kialakul a soksejtes gömb alak, majd a szív- és torpedóstádium figyelhető meg. Ezalatt válik az embrió bipolárossá, megkezdődik a gyökércsúcs és a sziklevelek differenciálódása az ellentétes oldalon. Később a radikula- és a hipokotilkezdemények megnyúlása eredményezi a torpedóstádiumú embriókat, majd a sziklevelek fejlődésének megállása után az embrió szöveti differenciálódása kezdődik meg. Az egyszikű növényeknél a szomatikus embriogenezist követően előfordulhat, hogy az embrió egyik pólusának fejlődése gátolt, ami általában a táptalajok összetételének módosításával megszüntethető, ezzel a pólus fejlődése könnyen kiváltható.

Gabonafélék szövettenyészetében is kialakulhatnak szomatikus embriók. A fiatal levelek alsó régiói, a fiatal hajtások tenyészőcsúcsa, vagy a kalászorsó megfelelő kiindulási anyagnak bizonyult embriogén tenyészetek létrehozásához. Egyszikű növények esetében is igaz, hogy a szintetikus auxin (pl.: 2,4-D) nélkülözhetetlen az embriogén tenyészetek létrehozásánál. A 2,4-D a differenciált sejtek dedifferenciálódásához szükséges, de fajtól és tenyészettől függően az embrió végső kifejlődését gátolhatja, ezért szükséges a további lépések során használt táptalajokban a mennyiségét csökkenteni, vagy teljesen megvonni.

Az *organogenezis* kétféle utat követhet, attól függően, hogy miből indulunk ki. A merisztéma differenciálódás (organogenezis I.) egyszerre több kalluszsejt egyidejű differenciálódásának az eredménye (tracheida, merisztéma). Az auxinok és citokininek arányának változtatásával szabályozható a hajtás, vagy gyökérmerisztéma determinációja.

A szervdifferenciálódás (organogenezis II.) általában nem közvetlenül a kalluszsejtek, hanem már differenciálódott merisztéma-, szár-, gyökérsejtek további morfogenezisének az eredménye (Dudits és Heszky, 2003).

Triploid, kukorica endospermiumból készített és hosszabb ideig fenntartható szövettenyészetekről 1949-ben jelent meg az első közlemény (La Rue, 1949). A használt genotípus a Black Mexican Sweet volt, és kisebb arányban más csemegekukoricákat (pl. Suprise Sweet, Yellow Sugary) is alkalmasnak találtak a szövettenyésztésre (Straus, 1958). Shannon és Batey (1973) összesen 23 kukoricatörzset vizsgálva - melyek között voltak endospermium mutánsok is (*amilóz-extender, sugary-1 és shrunken-2*) - a dent típusú A 636 és R 168 beltenyésztett vonalakból állított elő endospermium-tenyészetet. A tenyészetek több mint két éven keresztül voltak fenntarthatók. Már ekkor felhívták a figyelmet arra, hogy amennyiben szövettenyésztési rendszert létesítünk, akkor széles származási spektrumból válogatott genotípusokon érdemes a tenyésztési rendszert tesztelni.

Az első szomatikus tenyészetekből indított sikeres növényregenerációról Green és Phillips publikált (1975), azt követően, hogy az általuk módosított, 2 mg 2,4-D tartalmú MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajon az A 188 beltenyésztett vonalnak és egy hibridjének (A 188*R-nj R-nj) éretlen embrióit leoltva indítottak és tartottak fenn tenyészetet. A szövettenyészet sejtjei diploid csírapajzs eredetűek voltak. A fejlődő kalluszok nem széteső konzisztenciát mutattak, amit később Armstrong és Green (1985) *I típusú* kalluszként vezetett a köztudatba. Megállapításuk szerint az embrió 18 nappal a megporzás után volt optimális fejlettségi állapotban a totipotens tenyészet indításához. A tenyészeteik hosszú időn át (több hónapig) fenntarthatók maradtak a nélkül, hogy elvesztették volna regenerációs képességüket. Az eljárás napjainkig - kisebb változtatásokkal - rutin módszer maradt a kukorica szövettenyésztésében és a használt genotípus, az A 188 így válhatott világszerte „modell genotípussá”.

A fent említettekkel egy időben, Kínában elkezdődtek a kísérletek a kukorica portoktenyészetekkel és 2,4 D -vel kiegészített, megemelt szacharóz tartalmú táptalajokon sikeres kalluszindukciót hoztak létre. A Chu *et al.* (1975) által kifejlesztett, rizs portoktenyésztésre használt táptalaj (N_6 táptalaj) átütő sikert hozott a kukorica esetében is, utat nyitva ezzel a haploid tenyészetek kialakulásához.

Kísérletsorozat indult több gabonafajjal és különböző összetételű táptalajokkal. Kezdetben csíranövények hajtáscsúcsait használták, majd a későbbiek során a következő szomatikus szervből hoztak létre totipotens tenyészeteket:

- éretlen címer merisztémájából (Linsmaier-Bednar és Bednar, 1972),
- érett embriókból (Green *et al.*, 1974),
- csíranövények szár részeiből (Sheridan, 1975),

- mezokotilból (Torne *et al.*, 1980),
- torzsavirágzatból (Molnar *et al.*, 1980),
- pelyvalevélből (Suprasanna *et al.*, 1986).

A legfontosabb kérdés viszont annak a tisztázása volt, hogy milyen genotípus kör alkalmas leginkább a kísérletekhez, mert bebizonyosodott, hogy az alkalmazott tenyésztési feltételek kisebb szerepet játszanak a szövettenyésztés sikerességében, és sokkal inkább a genotípusnak van döntő szerepe. Az itt felsorolt, és más szertők által felhasznált genotípusok (többek között) a következők voltak (Phillips *et al.*, 1988):

- A 632, SI 104 (mezokotil eredetű tenyészetek),
- A 545, P 39, B 9A (csíranövény hajtás eredetű tenyészetek),
- Alexho, Oh 40, Wf 9 (éretlen embrió eredetű tenyészetek),
- Black Mexican Sweet, Longfellow Flint, Ohio Yellow Pop (szár merisztéma eredetű tenyészetek),
- P 14, W 64A, Mo 17 (csíranövény eredetű tenyészetek),
- F 7, F 115, RC 109, RB 420 (érett embrió eredetű tenyészetek).

1975-ben Sheridan munkájában nemcsak agarral szilárdított, hanem *folyékony közegben* nevelt szuszpenziós-tenyészetről is beszámol, amelyet a W 23 és M 24 beltenyésztett törzsek keresztezéséből származó csíranövényeinek szár részeiből indítottak. Az eljárás hátránya az volt, hogy a genotípus függőség mellett a szövettenyészet nem mutatott morfogén választ. Hasonló tenyészeteket hoztak létre továbbá - protoplaszt izolálás céljából - a B 73 (Potrykus *et al.*, 1979) és az F 71 (Bartkowiak, 1981) vonalakból is.

A kukorica *ovárium-tenyészeteiről* többen beszámoltak a szakirodalomban, elsőként Ao *et al.* állított elő intakt növényt, kukorica még nem termékenyült magházaiból (In: Genovesi, 1990). Troung-Andre és Demarly (1983) sterilezés nélkül inokulált ováriumtenyészetben tapasztalt osztódást ellenlábas sejtekből és néhány petesejtből, citológiai vizsgálatokkal megállapították, hogy a regenerált növények mixoploidok (x-2x-3x). Hat genetikai marker elektroforetikus vizsgálatával megállapították, hogy az utódnövények közül kettő homozigóta volt.

Az ováriumtenyészetek elterjedésének legfőbb akadálya az volt, hogy a nővirág kevés számú gamétát hordoz, amelyek nehezen hozzáférhetők és a haploid kalluszindukció, vagy a

partenogenezis ebben az esetben is nehezen váltható ki. A figyelem középpontja ezért érthető módon az akár 25 millió pollenszemet hordozó és könnyen „elérhető” hímvirágzatra és portok ill. mikrospóra tenyészetekre irányult.

Széles körben alkalmazott eljárássá tehát az éretlen embriókból indított embriogén tenyészetek és az ivarsejtből - többnyire portokokból, később mikrospórából is - indított szövettenyészetek váltak. Ezek a rendszerek sem voltak azonban könnyen reprodukálhatóak, mert a szövettenyésztés indukciója, és ami talán fontosabb, a sejtekből történő növényregeneráció a kukorica esetében igen jelentős nehézségekbe ütközött. A módszerek ugyan elkészültek, azonban az eredmények ismételhetősége laboratóriumonként eltért és mindig szükséges volt az adott rendszer adaptációja nemcsak a felhasznált genotípusokra, hanem az adott laboratórium tenyésztési körülményeire is.

A következő fejezet a kukorica szövettenyésztési eljárásai közül legelterjedtebben használt két technikát, az éretlen embrió eredetű (diploid) és a portok (haploid) tenyészeteket, továbbá a mikrospóra (haploid) kultúra létesítésének módszereit tekinti át részletesebben, külön fejezetekben.

2.1.1 Diploid, éretlen embriótenyésztés

Az embriótenyésztés a (zigotikus) embriogenezis különböző stádiumaiban lévő embrió kipreparálását, ontogenezisének fenntartását és befolyásolását jelenti táptalajon, steril, klimatizált feltételek között. Célja, hogy az embriók növekedéséhez és fejlődéséhez szükséges feltételek mesterséges biztosításával kifejlett „csírázóképes” embriókat kapjunk, mely feltétel esetén számos gyakorlati cél elérése válhat lehetővé (Dudits és Heszky, 2000).

Az *in vivo* körülmények között fejlődő embriók az ováriumon belül a magkezdeményben steril körülmények között alakulnak ki. Az embrió izolálásakor el kell dönteni, hogy a proembriót milyen fejlődési stádiumban kívánjuk a magkezdeményből eltávolítani (az embrió mérete a megtermékenyüléstől eltelt napok számától és a fajtól függ). Ez napokban kifejezve 3-30 nap között változhat. Amennyiben a proembriókat az embriogenezis korai szakaszában kívánjuk izolálni, akkor azokat a még folyékony endospermiumból, illetve az ovulumnedvből kell kiemelnünk legtöbbször fénymikroszkóp alatt. Ez az eljárás lelassítja a műveletet, mivel a fejlődő zigotikus embrió szabad szemmel nehezen vehető észre és a még áttetsző embrió gyakran elveszhet a szövetnedvekben. A korai proembrió eredetű tenyészetek hatékonyságát tovább rontja az a tény, hogy a túlélési arány igen alacsony (0-40%). Amennyiben az ilyen embriókat a szuszpenzorral (egysejtsoros csírafüggesztővel) együtt helyezzük a táptalajra, akkor a túlélési százalék javulhat, mivel az a tápanyagok felvételében jelentős szerepet játszik és segíti a fejlődő embriót. A későbbi stádiumában kipreparált embriók estében a tápközegre helyezés után a már fejlődő sziklevél is segít a tápanyagok

felvételében (méretük ekkor az 1-2 mm között van). Az izolálást segíti, hogy az embriók ebben a stádiumban kompaktabbak, nem áttetszők, könnyebben megkülönböztethetők és elválaszthatók az ekkorra már szintén struktúrába szerveződött endospermiumtól, illetve a magkezdemény többi részétől. Túlélésük preparálás után, *in vitro* körülmények között elérheti a 80-100%-ot is (Dudits és Heszky, 2003).

Kukorica éretlen embrió eredetű szomatikus szövettenyészeteinek indításakor a cél, nagy mennyiségű, differenciálatlan osztódó sejt (kallusz) létrehozása, majd ebben merisztematikus központok létrehozása. A szomatikus embriók ezeknek az osztódószövet régióknak a felületi sejtjeiből keletkeznek és a későbbiek során, a kapott szomatikus embriókból a teljes növények előállítása növényregenerációval lehetséges.

Az eljárás során keletkező kallusz, pajzsocska/szkutellum (sziklevél) eredetű. Green és Phillips (1975) feltételezte, hogy ez akkor megy végbe, ha az izolált éretlen embriókat szkutellummal felfelé és az embrió-oldallal lefelé helyezik a tápközegre. Ezt később több szerző is alátámasztotta az A 188 vonallal végzett vizsgálatai alapján, így többek között Fransz és Schel (1991) kétféle embriogén kalluszra vonatkoztatva is igazolta a feltételezés helyességét. Beszámolójukban kitértek a tenyészetek fenntartására is. Megállapításuk szerint a morzsalékos konzisztenciájú kallusz hosszú időn át fenntartható volt, amennyiben a kalluszokat kéthetente friss táptalajra helyezték.

A szakirodalomban éretlen embrió eredetű tenyészetek esetében több genotípusról is közöltek megfelelő regenerációs képességről szóló adatot (Alexho, Wf 9, Oh 43, Hull-less Pop, Parker Flint) (Phillips *et al.*, 1988). A keletkező kalluszok konzisztenciája két alapvető típusra oszlott.

Először Gengenbach (1982) számolt be egy, a korábbi kompakttól eltérő, morzsálódó embriogén kalluszformáról. Laboratóriumában az A 188 vonal kalluszait vizsgálták, amelyeken megfigyelhető volt a véletlenül létrejött, laza szerkezetű szövetrészek kialakulása. Ez az embriogénnek mutatkozó kallusztípus nagy mennyiségben tartalmazott szomatikus proembrioidot. Lu *et al.* (1982) 12 szabad levirágzású fajta vizsgálatakor beszámoltak egy fehér és tömör, barázdált felszínű szkutellum eredetű kalluszról, melynek felszínén nagy mennyiségű embrioidot figyeltek meg. Lowe *et al.*, 1985-ben a B 73 vonal ugyanezeket a tulajdonságokat magukon viselő (kompakt és fehér) kalluszából egy év után véletlenül keletkező embriogén tenyészetet sikerült izolálniuk, amely morzsálódó konzisztenciát mutatott és folyékony tápközegbe helyezve szétesett. A tenyészetek két éves fenntartás után is megőrizték regenerálódó képességüket.

1983-ban Green *et al.*, 1985-ben Armstrong és Green írta le az A 188 N_6 táptalajon indukált morzsálódó embriogén kalluszokra épített szövettenyésztési rendszerét. A tenyészetek több mint egy évig voltak fenntarthatók anélkül, hogy elvesztették volna embriogén képességüket. A

növényregenerációt kifejezetten könnyűnek minősítették, összesen 111 növényt regeneráltak mindössze 3 embriogén sejtvonalból. A felnevelt növények 77%-ról fogtak sikeresen magot.

Végül Armstrong és Green (1985), majd Armstrong (1994) csoportosította a regenerációra alkalmas szövettenyészeteket a sejtek közötti összetartó erő, a regeneráció módja (embrio- ill. organogenezis) és a differenciáltság foka szerint, és két alapvető típusba sorolták őket:

- I-es típusú (type I) szövettenyészet és
- II-es típusú (type II) szövettenyészet.

Az *I-es típusra* jellemző, hogy a sejtek összetartók, folyékony közegben nem szétesők, tehát a szétszedést csak szikével, illetve csipesszel lehet elvégezni. A regeneráció embriogenezissel és organogenezissel is lehetséges. A tenyészetre jellemző, hogy azok egy része nagymértékben differenciált, gyakran tartalmaz levélszerű struktúrákat és fejlett stádiumú szomatikus embriókat.

A *II-es típusú* szövettenyészet jellemzője, hogy folyékony tápközegben széteső, morzsálódó konzisztenciájú, szétválasztása könnyen lehetséges. Növények szomatikus embriogenezissel regenerálhatók belőle. A sejtek homogén elrendeződést mutatnak a tenyészetben, a felszínen számos embrió van jelen, de ezek nem fejlődtek tovább a táptalajon.

Armstrong értékelésében a II-es típust tartja előnyösebbnek, mivel differenciáltsága kisebb mértékű és könnyebben szuszpendálható, laza sejtközösséget alkot, megállapítja továbbá, hogy a kétféle típus között számos átmeneti forma is létezik.

Az éretlen embrió eredetű szövettenyészeteket napjainkban elterjedten használják genetikai transzformációs kísérletekhez (Armstrong, 1999), ami azt igazolja, hogy a módszer megbízható, az eredmények jól reprodukálhatók, a tenyészetek - kallusztípustól függően - fenntarthatók és belőlük a növényregeneráció is rutin műveletnek tekinthető. A sejtszuszpenziós tenyészetek korábban alkalmasnak bizonyultak protoplasztok előállítására is (Chourey és Zurawski, 1981). Mórocz *et al.* 1990-ben elsőként alakított ki egy jól regeneráló kukorica protoplaszt-növény rendszert a szintetikus HE/89 genotípusra (Mórocz, 1993), amely európai szabadalmat kapott, és évekig az egyetlen protoplasztból működő regenerációs rendszer volt a világon (Dudits és Heszky, 2000).

2.1.2 Haploid szövettenyészetek

2.1.2.1 Portoktenyészetek

Haploid növények regenerációja kétféle módon lehetséges *in vitro* portoktenyészetben. *Direkt embriogenezissel* a mikrospórákból közvetlenül differenciálhatók embrioidok, valamint indirekt módon, *organogenezissel* a mikrospóra eredetű haploid kalluszindukció után, legtöbbször az auxinok megvonásával. A direkt mikrospóra embriogenezis esetében a keletkező embrioidok egy sejt eredetűek, így lehetőség van haploid (spontán, vagy indukált genomduplikációval dihaploid) növények regenerációjára. Az indirekt módszer esetében a kalluszok felszínén több sejtből összeálló merisztématikus központok alakulnak ki, és innen indul el a szervek (gyökér, hajtás) differenciálódása. Így a regenerált növény szövetei akár mixoploidok is lehetnek, bennük haploid, dihaploid, vagy más ploidszintű sejtek is előfordulhatnak. A kalluszok felszínén lehetséges továbbá járulékos embriogenezis, amely szintén egy (vagy néhány) sejt eredetű növények fejlődését teszi lehetővé a fent említett egyedi haploid ploidszinttel.

A ploidszintek egyöntetűsége és a genotípusok tisztasága szempontjából a direkt és a járulékos embriogenezissel létrehozott DH vonalak a megfelelőek. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy ezek a folyamatok a laboratóriumi tenyésztés folyamán általában keverten játszódnak le, a fejlődési utakat teljesen az egyik, vagy másik irányba nehéz eltolni.

A portoktenyésztés a kukorica *in vitro* szövettenyésztésének történetében az ovárium eredetű tenyészetek indításánál nagyobb jelentőséggel bírt, mert a hímvirágzatban a termőshöz viszonyítva nagyobb mennyiségű gaméta van. A portokok táptalajra helyezése munkaigényes folyamat ugyan, de az így elérhető inokulált mikrospórák mennyisége akár több százezerre, vagy millióra tehető. A portoktenyészetek indításának kezdete 1975-re vezethető vissza, amikor egy kínai kutatócsoport pollen eredetű kalluszt hozott létre, majd abból regulátoranyagok segítségével haploid növényeket regeneráltak és kromoszóma vizsgálattal sikerült azok pollen-eredetét is bizonyítaniuk (Dudits és Heszky, 2000).

Portoktenyészetben kezdetben MS *táptalajt* használtak (Murashige és Skoog, 1962), amit később auxinokkal (elsősorban 2,4-D-vel) egészítettek ki. Igazi áttörést a Chu *et al.* (1975) által létrehozott N_6 táptalaj jelentette, amit különböző módosítással elterjedten használtak. Chu *et al.* eredetileg rizs portoktenyésztésének céljából alakították ki ezt a nitrogénforrások hatásának tanulmányozására kifejlesztett táptalajt. A későbbiekben az összetételét általánosan is használták a kukorica szövettenyésztés során. Egészen a hetvenes évek végéig ezt a technikát csak a távol keleti országban alkalmazták, mert a mikrospóra eredetű kalluszindukció és a növényregeneráció csak itt volt sikeres (Genovesi, 1990).

A tápközeg szilárdítása kezdetben agarral, később agarózzal, majd a szintetikus Gelrite®-tal történt, és a táptalajhoz gyakran aktív szénport is kevertek, amelynek szerepe az explantumokból felszabaduló, legtöbbször mérgező bomlástermékek megkötése volt amellett, hogy jelenléte jelentősen megnövelte az embriogenezis gyakoriságát a portoktenyészetekben (Genovesi és Collins, 1982; Johansson, 1983).

Büter *et al.* (1993) megerősítették, hogy a táptalajba adagolt, autoklávozással sterilizált aktív szén (5 $g \cdot l^{-1}$) háromszorosára növelte a szövettenyésztés hatékonyságát. Nagyobb mennyiségben általában nagyobb hatékonyságot váltott ki, és a steril szűrés elkerülése a táptalaj elkészítését is megkönnyítette.

Ting *et al.* (1981) a Dan-San 91, a King Hwang 13 hibridekkel és a Stock 6 vonallal végzett portokkísérleteikben azt találták, hogy a Dan-San 91 kimagasló 17% körüli antéraválasz mellett, a kapott embrioidok aránya is megfelelően magas volt. A kísérleteik során azt tapasztalták, hogy amennyiben az embrioidokból kezdetben erős a gyökérképződés intenzitása, akkor a későbbiek során hajtás már nem fog kialakulni. Munkájuk során összesen 6 kallusz vonalat különítettek el és a tenyészetek több mint 6 hónapig maradtak fenntarthatóak

1981-ben Brettel *et al.* közölt adatokat kínai, magyar és más genotípusokkal végzett kísérleteikről. Ezek között volt az A 188, az A 659, az Mv 201, a Black Mexican Sweet és a Seneca 60. Tapasztalatuk szerint a fent említett genotípusok általában nem reagáltak a portoktenyészetben. A táptalajra helyezett átlagosan 500-900 portokból nem volt válaszadó. Gyenge reakciót az Mv 201, megfelelőt a Seneca 60 esetében tapasztaltak és ez utóbbi esetében a növényregeneráció is sikeres volt.

1982-ben Genovesi és Collins több mint 100 ezer portok leoltása alapján kapott eredményeit közölte. A vizsgált genotípusok kínai és amerikai eredetűek voltak. Megállapították, hogy a 14 napos hideg előkezelés és a táptalajba adagolt aktív szén jelentősen növelte az antéraválasz gyakoriságát (18,3%). Az általuk használt - nem kínai eredetű - genotípusok nagy része csekély regenerációs választ adott (A 188, W 22, Alexho, Black Mexican Sweet, B 73*Mo 17), viszont a heterozigóta genotípusú alapanyagok általában nagyobb regenerációs választ adtak.

Barloy *et al.* (1989) 8 francia, kínai és amerikai eredetű DH kukoricavonal összehasonlítását végezte el a portoktenyésztésre való alkalmasság alapján. Ezeket a vonalakat spontán DH vonalakként írja le, melyek előállításában nem használtak szintetikus anyagot a genomduplikációhoz. Kísérletében a portok eredetű embriogén tenyészetek aránya 0 és 31,2% között volt.

Az haploid kalluszindukció hatékonyságát jelentősen befolyásolják a donor növény felnevelésének körülményei is. Az üvegházban, vagy fitotronban nevelt növények általában gyengébben reagáltak, mint a szántóföldön nevelt növények explantumjai (Lazar *et al.*, 1984).

Dieu és Beckert (1986) a felnevelés körülményeinek és az évjáratnak a hatását vizsgálták a haploidindukciós válaszra. Eredményeik alapján a szántóföldön felnevelt donor növények nagyobb indukciós gyakoriságot mutattak, mint az üvegházban neveltek. A kísérletben július és augusztus folyamán 2-2, szeptember folyamán 1 alkalommal izoláltak tenyésztésre alkalmas címert. Eredményeik alapján július 14-től (1,1 embrió/1000 portok) folyamatosan javult az indukciós képesség és szeptember 14-én érte el a maximumot (30,5 embrió/1000 portok). A július közepi-végi gyenge teljesítményt az ilyenkor előforduló 41°C hőmérsékletnek és az aszálynak tulajdonították. Kísérletük végén összesen 36 db növényt regeneráltak, melyből 8 db volt spontán DH, 27 db volt haploid, és 1 triploid. A növények többségénél virágzási problémák léptek föl, így összesen 5 db DH növénynél volt eredményes a megporzás.

A vetésidő hatásának meghatározó szerepéről Genovesi (1990) is beszámolt. Munkájában a hőmérséklet napi ingadozásának tulajdonította az eltérő vetésidőkben mutatkozó különbségeket, amelynek hatása volt az inokulált portokok minőségére.

A *mesterséges genom rediploidizációval* kapcsolatos kutatások 1974-től indultak. A kísérletekben a kolhicin bizonyult legalkalmasabbnak a haploid kromoszómakészlet mesterséges megduplázására (Jensen, 1974). Wan *et al.* (1989) portok eredetű, felaprított kalluszokat folyékony, 0,025% és 0,05% kolhicint tartalmazó D táptalajba (Duncan *et al.*, 1985) helyezett szűrőpapíron, 24, 48 és 72 órás inkubációra. A haploid kalluszoknál a 72 órás, 0,025% és 0,05%-os kolhicines kezelés közel 100%-os, a 24 órás kezelés mindössze 50%-os reduplikációt okozott.

Ugyanakkor kukorica portoktenyészetben a spontán DH sejtek előfordulása is lehetséges, szerzők ebben a témakörben 22%-os (Dieu és Beckert, 1986), illetve 43%-os spontán rediploidizációról is beszámoltak (Jäger *et al.*, 2005 a, b). Ez utóbbi publikációkban a portokok inokulálását követően különböző morfológiai jellemzők és ploidszint alapján is elkülönítették a kallusz típusokat. A *fehér* és *sárga áttetsző* struktúrák (haploid és spontán DH sejtek mellett) mixo- és aneuploid, a *fehér kompakt* di- és mixoploid, *sárga kompakt* kalluszok pedig nagyobb részt aneuploid szintű sejteket tartalmaztak. A különböző típusok eltérő szövettani szerkezetük mellett különböző regenerációs képességgel is rendelkeztek. A fehér kompakt struktúrák esetében tapasztalták a legtöbb regeneráns növényt, melyek közül a legnagyobb volt - a már említett 43% - a spontán DH növények aránya (ugyanez 13% a sárga áttetsző és 20% a sárga kompakt kalluszok esetében).

A kolhicines genomduplikáció tulajdonképpen a magorsók kialakulásának gátlásán alapszik, melynek hatására a kromoszómák magi pólusokra vándorlása nem következik be, a sejtosztódás egyidejű leállásával. Mindez a mitózis metafázisában történik (Levan, 1938).

A kilencvenes évek közepétől számos hazai publikáció is beszámolt a kolhicin kezelés hatásának eredményeiről. Barnabás *et al.* (1999) kínai és az indukcióra nem reagáló (A 632 és F 58) vonalak keresztezéséből származó hibridek portoktenyészeteit 0,02% és 0,03%-os kolhicinnel kezelték a mikrospóra-indukció előtt három nappal. Úgy találták, hogy a kezelésnek nem volt káros hatása az antéraválaszra, a későbbi morfogenezisre és a növényregenerációra, sőt akár 10%-al meg is növelte az embriogenezis gyakoriságát (kukorica esetében a táptalajra helyezett portokokon döntően kalluszok fejlődnek). A kedvező mellékhatás azzal volt magyarázható, hogy a kolhicin az osztódási szimmetriát változtatta meg, vagyis megnőtt az egyenlő osztódások gyakorisága, ami kapcsolatban volt az embriógyakorisággal. Tapasztalatuk szerint, ha 0,03%-os koncentrációt használták, a felnevelt intakt növények nagyobb számban voltak fertilisek. Kovács *et al.* (1999) hasonló vizsgálatokban szintén azt a következtetést vonta le, hogy a kolhicin kezelés a vizsgált hibrid antéraválaszát nem befolyásolta negatívan, viszont lehetőséget adott fertilis növények regenerációjára. Megállapítása szerint a módszer alkalmas lehet közvetlen nemesítési felhasználásra. Az alkalmazott 0,02-0,03%-os kolhicin kezelés nem befolyásolta a regenerációs képességet, ami megegyezett mások tapasztalatával is (Barcelo *et al*., 1994).

Barnabás *et al.* (1991) megállapította, hogy a korai mikrospóra fejlettségi stádiumban alkalmazott kolhicin kezelés pozitív mellékhatásaként csökkenti az albinó növények előfordulásának gyakoriságát. Ez azért volt lehetséges, mert a táptalajba adagolt kolhicin szelektíven hatott az albínó növényeket létrehozó mikrospórákra.

A portoktenyészetek alkalmazásakor a szerzők az indukciós képesség javítására gyakran különböző *előkezeléseket* iktattak be a mintázás és a tenyésztés közé. Gabonafélék esetében a *hidegkezelést* használták legelterjedtebben. Ez a címerek begyűjtése után alkalmazott (+4 és +7 fokon történő) hidegkezelést jelentette, ami a későbbi tapasztalatok szerint nem csak az indukciós gyakoriságot, hanem a zöld növény regenerációjának arányát is megnövelte. A megfelelő előkezelés alkalmazásával megközelítőleg a kalluszok 60%-ból regenerálódott növény (Huang és Sunderland, 1982). Pauk (1985) számolt be éretlen kukoricaportokok folyékony N_6 táptalajjal 8ºC-on, sötétben történt 14 napos előkezelésének kedvező hatásáról a szövettenyészetek kalluszindukciós- és embriógyakoriságára. Később, 1993-ban szintén jelent meg beszámoló arról, hogy a szövettenyésztést megelőző 7 napos hidegkezelés növelte a portok eredetű embriogenezis gyakoriságát (Vergne *et al.*, 1993). A szerzők egybehangzó véleménye szerint az előkezelések

során alkalmazott stressznek jelentős javító hatása van a kalluszindukció és az embriogenezis gyakoriságára.

Az antéraválasz szempontjából kritikus kérdés a portokban lévő *mikrospórák fejlettségi állapota* az explantumok táptalajra helyezésekor. Kukorica esetében Barnabás *et al.* (1987) szerint erre a célra legmegfelelőbb a korai egysejtmagvas állapot. A pollen fejlettsége meghatározó a portoktenyészetek indításakor. Amennyiben a portokok állapota nem megfelelő és a benne lévő mikrospórák falába a keményítőszemcsék berakódása megtörtént nem indukálható a továbbiakban embriogenezis (Wenzel és Foroughi-Wehr, 1984).

A mikrospórák (portokok) haploidindukcióra való hajlama rendkívüli módon genotípus függő. Ugyanakkor jól öröklődő tulajdonság (Wenzel és Uhrig, 1981) és átvitele különböző genotípusokba keresztezéssel egyszerűen megoldható. A (di)haploid növények regenerációja szempontjából a különböző forrásokból származó kedvező indukciós és regenerációs tulajdonságok ezáltal egyszerűen ötvözhetők egy genotípusba (Barnabás *et al.*, 1988). Megállapítják továbbá, hogy a genotípusnak lényeges szerepe van a kalluszindukció és a zöld növény regeneráció tekintetében, valamint azt is, hogy e két tulajdonság egymástól függetlenül öröklődik. Azonos nemesítési anyagon belül van lehetőség a genotípusok szelekciójára, így magasabb antéraválasz érhető el (Dieu és Beckert, 1986).

Balroy *et al.* (1989) nyolc, androgén képességet hordozó DH vonallal és két, szövettenyészetben nem reagáló beltenyésztett törzs (F 244, MBS 847) hibridjeivel végzett kísérleteiben heterózishatást mutattak ki a haploidindukció tekintetében. Következtetésük szerint a tulajdonság kialakításában csak kevés számú gén vesz részt. Dunwell *et al.* (1987) árpán végzett kísérleteiben úgy találta, hogy a tulajdonság poligénes és nem észleltek azt meghatározó extrakromoszomális hatást. Hasonló eredményre jutott Tomes és Smith (1985) a B 73 vonal és hibridjeinek vizsgálatakor. Egy reciprok (diallél) keresztezési kísérleteiben azonban, beszámoltak a haploidindukciós képességet befolyásoló szignifikánsan negatív, anyai (citoplazmás) hatásokról is.

Az *in vitro* androgenezis genetikai szabályozását vizsgálva additív genetikai kölcsönhatásról számoltak be búzán (Bullock és Baenzinger, 1982; Deaton *et al.*, 1987), és kukoricán is (Petolino és Thomson, 1987). A tulajdonság kialakulásában azonban még jelentős hatása van a környezeti és additív genetikai varianciának is (Wan *et al.* 1991). A tulajdonság döntően additív jellege miatt viszonylag egyszerűvé teszi a haploidindukciós képesség bevitelét szövettenyészetben nem reagáló genotípusokba a hagyományos és *in vitro* technikák alkalmazásával egyaránt. A képesség visszakeresztezésekkel könnyen és gyorsan átvihető egyik genotípusból a másikba (Obert *et al.*, 1998).

Az öröklés folyamatainak teljes tisztázása még várat magára, ezt igazolják azok a közlemények, amelyek domináns (Picard és De Buyser, 1977; Agache *et al.*, 1988), intermedier (részleges dominancia) öröklésmenetet (Dieu és Beckert, 1986; Pace *et al.*, 1987) és episztatikus hatást is feltételeznek a tulajdonság kialakításában.

2.1.2.2 Mikrospóratenyésztés

A technika a kukorica esetében számos előnye ellenére napjainkig még kevésbé terjedt el, mint a portoktenyésztés. Ennek oka, hogy az explantumok előkészítése, a portokok roncsolásával és a kiszabaduló éretlen pollenszemek centrifugálásával és elválasztásával nagymértékben megnehezíti, hosszadalmassá teszi a mikrospórák előkészítését, ezáltal az eljárást munkaigényes folyamattá téve.

Kukorica mikrospóra tenyésztésről a nyolcvanas évek végén számolt be Coumans, aki munkatársaival (1989) kései egymagvas állapotban lévő éretlen pollenszemeket, korábban repcére kialakított módszer alapján (Swanson *et al.*, 1987) tenyésztette 10 napig 32°C-on, majd 25°C-on. A kapott embriogén tenyészetekből 3% szacharózt tartalmazó B5 táptalajon sikeresen hajtott végre növényregenerációt. A donor növény a Seneca 60 volt és az inokulálás előtt 14 napos hideg előkezelést is alkalmaztak.

A módszerek napjainkban kidolgozottnak tekinthetők, de azok adaptálása és kísérleti körülmények közé történő optimalizálása is időigényes folyamat. A mikrospórák indukciója genotípusfüggő, világszerte mindössze öt vonalról számoltak be, melyek izolált mikrospóráiból az androgenezis indukálható volt és szövettenyészeteikből növényeket tudtak előállítani (Pescitelli *et al.*, 1994).

A tenyésztés ebben az esetben is igényel előkezelést és/vagy *előtenyésztést*. Pescitelli *et al*. 1990-ben kísérleteket végzett mikrospóra-tenyészetekkel és azt tapasztalta, hogy a kezdetben alkalmazott alacsony hőmérséklet (4 nap, 15°C-on) a mikrospóra tenyészetekben a kétszeresére növelte a kapott embrioidok arányát. A 8,0-9,5%-os cukorkoncentráció alkalmazása is növelte az embriogén választ. Ezen eljárások a tenyésztés hatékonyságát javították és a több lépcsős előállítás miatt azt *közvetett mikrospóra tenyésztési módszernek* nevezték el.

Kutatók azt feltételezik, hogy a portokok olyan (szabályozó) anyagokat termelnek, amelyek a sikeres haploidindukcióhoz elengedhetetlenek. Árpa mikrospóra-tenyészetekben esetenként ezért egészítik ki a táptalajokat portokkivonattal (Sunderland *et al.*, 1982). Galliard *et al.* (1991) beszámolójukban a DH 5*DH 7 haploidindukciós képességet hordozó hibrid vizsgálatakor a mikrospórák tenyésztéséhez dajkakultúrát is alkalmaztak. A munka során 7-21 nap hideg előkezelést is alkalmaztak 7°C-on

A *közvetlen izolálási módszer* esetében nem történik előtenyésztés (a címerek hidegkezelése ebben az esetben is elengedhetetlen a kellő mértékű haploidindukcióhoz és az embrioidok számának növeléséhez), a mikrospórák feltárásához darálást, szűrést, 2 ml-es ISO oldatban történő szuszpendálást, majd kétfázisú Percoll gradiens oldatra történő rétegzést alkalmaznak. Ennek ismétlésével állítják elő a tenyésztésre szánt izolált mikrospórákat. A tápközeg lehet szilárd, vagy folyékony N_6 alapú médium (módosított N_6M, Mórocz *et al.*, 1990).

A válaszadó mikrospórákból egy lépésben haploid embrioidok (Pescitelli *et al.*, 1989; Galliard *et al.*, 1991), vagy fenntartható haploid kalluszok nyerhetők, amelyekről később nagyszámú növény regenerálható (Szarka *et al.*, 1999).

Termékeny növényeket e módszerrel először Coumans *et al.* (1989), valamint Galliard *et al.* (1991) állítottak elő, majd Magyarországon Szarka *et al.* (1999) értek el hasonló eredményeket.

A regeneráció a portoktenyésztéshez hasonlóan történik. A módszer legnagyobb előnye, hogy izolált egysejtes a rendszer, így az embriók (és a növények) bizonyítottan egyetlen haploid sejtből származnak (Dudits és Heszky, 2003). A tenyészetből kikerülő haploid, vagy DH növények (diploid) portok eredetének kizárása a továbbiakban nem szükséges.

2.2. A monoploid módszer

Napjainkban a kukorica esetében a DH vonalak előállításának leggyakrabban használt mószere a monoploid technika (*in vivo* anyai, vagy apai eredetű haploidok). Az első esetben tulajdonképpen gynogenezissel előállított haploidokról, a második esetben androgenezissel létrehozott, csak az apai gaméták kromoszómáit hordozó növényekről beszélhetünk.

Az első igazoltan haploid kukoricanövényt Stadler és Randolph (Randolph, 1932) találta 1929-ben. Chase (1947) számolt be először spontán haploidok jelenlétéről (0,1%-os gyakorisággal) és megfogalmazta, hogy a haploid növények felhasználhatók lehetnek a hibridnemesítésben. A haploidok azonosításához egy dominánsan öröklődő antocián markergént (*R1-nj*) használtak (Stock 6 nevű vonalban volt jelen, Coe, 1959), amelyre egy párosítási rendszert alkottak (Nanda és Chase, 1966; Chase, 1969). A gén antociános pigmentációt okozott az embrión és az endospermiumon, amely vizuális úton lehetővé tette a haploid és diploid szemek elkülönítését. Amennyiben a szem korona része pigmentált volt, de az embrió nem, akkor a kettős megtermékenyítés nem történt meg, a táplálószövet triploid, az embrió haploid volt. Az eljárás genotípusok széles körén alkalmazható volt, ezt igazolták Tyrnov és Zavalishina (1984), Zabirova *et al.* (1996).

A kettős megtermékenyítés hiányának okát többen is vizsgálták és többféle elmélet született, ezek helyességéről azonban megoszlanak a vélemények. A bizonytalanság oka az, hogy az *in vivo* indukció mechanizmusa napjainkig nem tisztázott teljesen. A legvalószínűbb elmélet szerint a két

hímivarsejt közül az egyiknél funkcionális zavarok lépnek fel, amely egyesül ugyan a petesejttel, de a sejtosztódások során egy kromoszóma-degenerációs folyamat indul el, amely során az apai kromoszómák töredezetté válnak, és végül eltűnnek a zigóta első osztódásai során létrejött kiindulási sejtekből. A másik hímivarsejt egyesül a központi sejttel, létrehozva a triploid endospermiumot, normál méretű, megfelelően funkcionáló (életképes) magot erdményezve ezáltal (Geiger, 2009). Gernand *et al.* (2004) interspecifikus (*Triticum aestivum* x *Hordeum bulbosum*) keresztezések vizsgálatakor azt a megállapítást tették, hogy a kettős megtermékenyítés sikeres, de pár nap múlva az árpa kromoszómái eliminálódnak, és ez eredményezte a haploid embrió létrejöttét. A mechanizmus működésének feltárására további elméletek is születtek, amelyekre dolgozatunkban nem térünk ki részletesebben.

A technika története során több inducer vonalat is használtak haploid szemek előállítására.

Ezek a következők voltak:

- Stock 6 (Coe, 1959), indukciós képessége: 2,3%
- ZMS (Tyrnov és Zavalishina, 1984), indukciós képessége: 0,6-3,4%
- WS 14 (Lashermes és Beckert, 1988), indukciós képessége: 2,0-5,0%
- ACR/AC'R (Sarkar *et al.*, 1994), indukciós képessége: 5,5-8,3%
- KEMS (Shatskaya *et al.*, 1994), indukciós képessége: 6,3%
- MHI (Chalyk, 1999), indukciós képessége: 4,4%
- RWS (Röber *et al.*, 2005), indukciós képessége: 8,3%

A technika előnye, hogy a haploid szemek kiválasztása vizuális úton, gyorsan és könnyen lehetséges, a módszer a legtöbb (donor) genotípus esetében felhasználható, mert a nemesítésben használt flint és dent anyagok szemei nem pigmentáltak, továbbá a markergén dominánsan öröklődik. A válogatást olyan gének is segítik (pl. a *PI1* gén), amelyek a csíranövények koleoptiljában, és/vagy az elsődleges gyökerében kifejeződve antociános színelváltozással lehetővé teszik a nem haploid növények azonosítását (Geiger, 2006).

Hátránya, hogy léteznek inhibitor gének (pl. a *C1-I* gén, Coe és Sarkar, 1964), amelyek csökkenthetik az *R1-nj* gén expresszióját, ami megtévesztő lehet a szelekció során (Geiger, 2006).

A haploid szemek kiválasztását követően a kromoszóma-duplikációt mesterséges úton, kolhicin kezeléssel indukálják, de létezik spontán genomduplikáció is 0-10%-os gyakorisággal (Chase, 1969). A vegyszeres kezelésnek két módszerét dolgozták ki:

(1) A haploid szemeket 26ºC-on négy napig csíráztatják, majd a legalább 1 cm hosszú koleoptilok csúcsát levágják és a csíranövényt 0,06%-os kolhicin oldatba helyezik 12 órára (Gayen *et al.*, 1994). Ekkor a haploidok 49,4%-ból állítottak elő fertilis DH növényeket és 27,3%-ról sikerült a magfogás (Eder és Chalyk, 2002).

(2) A csíranövényeket 3-4 leveles stádiumig hagyják megnőni, majd a hajtáscsúcsba injektálnak 0,125%-os kolhicin oldatot (Zabirova *et al.*, 1996). Ezzel az eljárással a haploidok kb. 16,1%-a fejlődött fertilis DH növénnyé és 8,1%-ról sikerült magot fogni (Eder és Chalyk, 2002).

A szerzők 2005-től kezdődően foglalkoztak az *in vivo* módszerrel előállított DH vonalak kukorica hibridnemesítési programokban történő alkalmazásával is. Ezekre a publikációkra nem térünk ki részletesebben, a nemesítési elvekre pár szóban utalunk.

Röber *et al.* (2005) így foglalják össze a DH vonal alapú hibridnemesítés lépéseit: (1) szelektált vonalak keresztezésével új, variábilis populációk létrehozása, (2) *in vivo* haploidindukció az F_1 generációban, (3) kromoszóma kettőzés és a DH növények öntermékenyítése (D_0), (4) a D_1 vonalak értékelése egysoros obszervációs parcellákban és ezzel egyidejű felszaporításuk, (5) tesztkeresztezések és a hibridek két lépcsős, több termőhelyes teljesítményvizsgálata, (6) kísérleti hibridek előállítása.

Longin *et al.* (2006) meghatározták a tesztkeresztezések teljesítmény-vizsgálatainak optimális körülményeit. Különbséget tettek egy- és kétlépcsős tesztelés között. Az első esetben a DH vonalak hibridjeit egy évig, több termőhelyen vizsgálták szántóföldi teljesítmény-kísérletekben. A kétlépcsős módszer esetében az első évben nagyszámú DH vonalat vizsgáltak kevés termőhelyen, a második évben pedig a szelektált vonalak kombinációit vizsgálták több termőhelyen. Megállapításuk szerint a megfelelő módszer kiválasztása nemesítői feladat, amelyet befolyásol a költséghatékonyság is.

Longin *et al.* (2007a) ugyanezen kísérleteinek kiegészítéseként meghatározták a használt teszterek típusát is. Kísérleteinek eredményei szerint a két lépcsős tesztelés esetében az első évben egyszeres (SC) és kétszeres (DC) - testvérvonal keresztezésekkel létrehozott - teszterek alkalmazása ajánlott, a második évben pedig már nem kombinációkat, hanem kizárólag beltenyésztett vonalakat érdemes használni a nemesítési érték meghatározására.

Longin *et al.* (2007b) három hibridnemesítési sémát állítottak fel a DH vonalak szántóföldi tesztelésére és szelekciójára (DHTC, S_1TC-DHTC és S_1TC-DHTC$_{fast}$ néven elnevezve az egyes módszereket). A DHTC eljárás lényege, hogy a kiindulási populáció egyedeit keresztezték az inducer vonallal, majd az előállított D_0 generációt nyári (D_1) és téli (D_2) generációban önporozták, amit egyidejű *per se* értékelés kísért. Az első tesztelést a D_3 generáció teszterekkel történt keresztezése előzte meg, majd a szántóföldi teljesítményvizsgálat következett több termőhelyen. Az utódteljesítmények alapján szelektálták a vonalakat, majd a következő évben ismét a

tesztkeresztezésekből származó hibridjeik teljesítménye alapján értékeltek, kiválasztva a legjobb vonalakat. Ezeket a DH vonalakat használták ezután a hibridkombinációk létrehozásában. A nemesítési ciklus ideje - téli generáció alkalmazásával - összesen 4 évet vett igénybe.

A S_1TC-DHTC és S_1TC-DHTC$_{fast}$ módszerek ennek tovább fejlesztett változatai, azzal a különbséggel, hogy az első tesztelést még a kiindulási populációval végezték el és ennek alapján válogatták ki azt a genotípus kört, amelyen a haploidindukciót végrehajtották. A második tesztelés ugyanúgy történt, mint a DHTC módszernél. A S_1TC-DHTC$_{fast}$ egy gyorsított módszer, ahol az első teszt (a kiindulási populációval) és a haploidindukció egy időben történt, ezzel is időt nyerve a nemesítés számára. Téli generáció alkalmazásával ebben az esetben a nemesítési ciklus összesen 3 évre volt lerövidíthető.

2.3 *In vitro* DH vonalak szántóföldi eredményei

Az *in vitro* portoktenyésztés technikáját korábban a 2.1.2.1 fejezetben részletesen ismertettük. Az így előállított DH kukoricavonalak hibridjeinek szántóföldi teljesítményvizsgálatáról - jelenlegi ismereteink szerint - csak nagyon kevés tudományos publikáció jelent meg. Voltak azonban a haploid kalluszindukciós gyakoriságról és a fertilis növények arányáról közölt eredmények, továbbá az így előállított növényeket *per se* szelektálták, és a vizsgálatokat ismertették.

A fent felsorolt eredmények vonatkoznak a Martonvásáron előállított genotípus körre is, ezért ebben a fejezetben ezeket az eredményeket tekintjük át, figyelembe véve, hogy a dolgozatban szereplő DH vonalak közvetlen rokonai és forrásai is szerepeltek a vizsgálatokban.

A haploid szövettenyészetből létrehozott zöld növény regenerációs gyakoriság - ami egyaránt jelent haploid és DH növényeket - megfelel a monoploid módszernél kifejezett haploidindukciós képességgel, azt feltételezve, hogy az *in vivo* előállított haploid szemek mindegyike csíraképes. Barnabás *et al.* (2005) a DH 105 és martonvásári, a szövettenyésztésre nem reagáló vonalak keresztezéséből származó F_1 hibridek haploid szövettenyészeteinek vizsgálatakor a következő eredményeket kapta: a növényregeneráció tekintetében 100, táptalajra helyezett portokra számítva a felnevelt zöld növény gyakoriság 0,3 és 17,8% között változott, 10 hibrid átlagában 3,69% volt. Az összes felnevelt növényből a fertilis növények aránya 22,0 és 52,0% között alakult, a 10 vizsgált genotípus átlagában ez az érték 38,6% volt. A zöld növény regenerációs gyakorisághoz viszonyítva a növények 11,1-45,5%-áról volt sikeres magfogás (átlagosan: 26,6%).

A fent említett 10 db F_1 hibridet vizsgálták továbbá a virágzásig eltelt napok száma alapján, valamint *per se* értékelték morfológiai és agronómiai tulajdonságaikat. Megállapításuk szerint a vetéstől az 50%-os hímvirágzásig eltelt napok száma átlagosan 87,9 nap volt, összehasonlítva az

50%-ban kínai genotípust hordozó DH 105-el ez 5 nappal jelentett korábbi, összevetve a martonvásári elit vonalakkal átlagosan 7 nappal jelentett későbbi virágzást.

A morfológiai és agronómiai tulajdonságaikat tekintve a hibridek megfeleltek az értékelés kritériumainak, megjelenésüket 1 (kedvezőtlen) - 3 (átlagos) - 5 (kedvező) skálán osztályozva átlagosan 4 - 4,5 pontot kaptak.

Orosz és Barnabás (1997, 2000) 8 kínai eredetű DH vonalat keresztezett 5 martonvásári elit beltenyésztett vonallal. Céljuk az androgén tulajdonság öröklésmenetének vizsgálata mellett a DH vonalak, elit beltenyésztett törzsek és hibridjeik agronómiai karaktereinek vizsgálata volt kétéves szántóföldi kísérletben. A vegetációs idő alatt és után felvételezett tulajdonságok a következők voltak: szemek alakja, betegség rezisztencia és virágzási idő alakulása. A hibridek és szülővonalaik termését és betakarításkori szemnedvességét nem vizsgálták. Megállapításuk szerint a DH vonalakra jellemző volt a többcsövűség, amit utódjaik jól örököltek, a kései virágzás és érés, valamint fogékonyság jelentkezett golyvásüszögre (*Ustilago maydis*). Az elit szülők hatására a hibridek korábban virágoztak a DH szüleiknél. A beltenyésztett törzsek átlagosan a vetéstől számított 77-78. napon virágoztak. Ugyanez az érték a DH vonalak esetében 86-88 nap, a hibridjeik esetében 78-79 volt.

Szundy *et al.* (1995), Barnabás és Szundy (1998) 1995-ben két kínai eredetű DH vonal származékait keresztezte martonvásári elit beltenyésztett törzsekkel (mint teszterekkel) és kisparcellás szántóföldi kísérletekben tanulmányozták azok hibridkombinációit. A tesztelt DH vonalak a DH 109 (Chi 592) és a DH 105 (Chi 592*A_2) vonalakból származtak. A teszterek a BSSS rokonsági körbe tartozó HMv 5409, a Mo17 (Lancaster) és a HMv 5502, mely rokonsági körét tekintve az előzőktől különböző, nem pontosan meghatározott csoportba tartozott. A tesztkeresztezésekben a következő koraisági, vagy koraisággal összefüggő morfológiai tulajdonságokat tanulmányozták: növény- és csőmagasság, az 50%-os hím- és nővirágzásig eltelt napok száma. Ezek mellett a következő terméselemeket mérték meg: csőhosszúság, szemsorszám, ezerszemtömeg. Eredményeik alapján a kombinációk virágzási ideje átlagosan 67-84 nap között volt, a növénymagasság 202-277 cm, a csőeredés 75-146 cm, a csőhossz 17,4-20,0 cm, szemsorszám 13-16 db és az ezerszemtömeg 291-399 g között alakult. Megállapításuk szerint a vizsgált anyagok között találtak betegségellenálló, jó szárszilárdsággal rendelkező, (feltételezhetően) jó kombinálódó-képességgel rendelkező DH vonalakat is, ezért arra a következtetésre jutottak, hogy az anyagok egy része a jövőben ígéretes nemesítési források lehetnek.

Portoktenyésztésből nevelt növények szántóföldi vizsgálatainak eredményeiről több külföldi szerző is beszámolt (pl. tritikálé esetén Thiemt és Oettler, 2008; kukorica esetében Murigneux *et al.*, 1993 a, b; Gallais és Bordes, 2007). Ezekben az agronómiai kísérletekben a DH növények

szántóföldi tulajdonságait hasonló, hagyományos úton - egymag-származék (SSD) módszerrel - előállított genotípusokkal hasonlították össze.

Tritikálé esetében a vizsgált tulajdonságok - többek között - a szemtermés, ezerszemtömeg, kalászonkénti szemszám, hektolitertömeg, növénymagasság volt. A három termőhelyes, kétismétléses vizsgálatok során az esetek többségében statisztikailag igazolható különbségeket találtak. Következtetésük szerint az SSD módszerrel előállított vonalaknak jelentősen nagyobb volt a szemtermése, ezerszemtömege és magasabbak voltak a növények a DH technikával előállított vonalakhoz képest (Thiemt és Oettler, 2008).

Murigneux *et al*. (1993 a) portok eredetű szövettenyésztéssel előállított DH kukoricavonalak homogenitásának szántóföldi értékelésekor és molekuláris marker vizsgálatakor arra a megállapításra jutott, hogy az *in vitro* technikával előállított vonalak homogenitása nagyfokú, a heterozigozitás mindössze 1%-ban fordult elő a hagyományos úton előállított, beltenyésztéses vonalakhoz képest (8,5%). A váratlanul fellépő kisszámú heterozigótaság okát - véleményük szerint - nem az androgenezis során bekövetkező folyamatok (pl. gametoklonális variabilitás) okozták, mivel direkt embriogenezissel regenerálták növényeiket, így a tenyésztési idő igen rövid volt.

A DH növényeket továbbá szántóföldi kísérletekben vizsgálták hagyományos módon előállított vonalakkal összevetve és megállapították, hogy a növények magasságban, csőeredési magasságban, és címer oldalágak számában nem, míg levélszámban jelentősen eltértek egymástól. Morfológiai jegyek alapján nagyfokú homogenitásról számoltak be a DH vonalak esetében. Murigneux *et al*. (1993 b) összesen hét tulajdonságot vizsgált meg szántóföldi összehasonlító kísérleteiben. Ezek a következők voltak: növénymagasság, csőeredés, címeroldalágak hossza, a fő címerágon található kalászkaszám, címer oldalágszám, levélszám és a cső magasságában található levél területe. A DH vonalakat a beltenyésztéses törzsekhez hasonlította és megállapította, hogy három tulajdonságban (növénymagasság, címeroldalágak hossza és a fő címerágon található kalászkaszám) nem találtak számottevő különbséget. A csőeredési magasságban és a címer oldalágszámban kisebb, míg a levélszámban és a cső magasságában található levél területét tekintve nagyobb különbségeket találtak.

Gallais és Bordes (2007) monoploid módszerrel előállított DH kukoricavonalakat vizsgáltak agronómiai tulajdonságaik alapján. Eredményeik - DH vonalak tesztkeresztezéssel előállított hibridjeinek vizsgálatakor - azt igazolták, hogy olyan fontos agronómiai tulajdonság esetében, mint a szemtermés, az *in vivo* DH technikával előállított vonalak között hasonló mértékű genetikai variancia van, mint a hagyományos úton létrehozott, beltenyésztéses vonalak között.

2.4 Kombinálódó-képesség vizsgálatok

A beltenyésztett vonalak értékelése sokféleképpen lehetséges: külső megjelenésük, morfológiai adottságaik, beltartalmi értékük, abiotikus és biotikus stressztűrő képességük, tenyészidejük, származásuk, stb. alapján. Az elsőbbséget élvező tulajdonságok kiválasztása nagyrészt a nemesítő döntése alapján történik, amelyek fontos szerepet játszanak az adott beltenyésztett törzs megítélésében. A használati érték kifejezésekor azonban szükség van olyan mérésekre is, amelyek a vonalak utódjaiban realizált értékét adják meg. A számított értékek megmutatják, hogy a nemesítés eredményeként létrejött beltenyésztett vonalak milyen átlagos javító eredménnyel vesznek részt az utódjaik (hibridjeik) teljesítményében.

Az utódbírálatot az 1960-as években a következőképpen határozták meg: Olyan teszt, amely meghatározott keresztezési modell alapján létrehozott utódok teljesítményéből állapítja meg az adott genotípus értékét (Allard, 1960). Utódtesztet elsőként Hopkins alkalmazott kukoricán az olaj- és fehérjetartalom növelésének céljából 1896-ban (Hallauer és Miranda, 1981). Az általa alkalmazott szelekciós módszer ún. csőről-sor (ear-to-row) eljárásként vált ismertté.

Az utódteszt egy másik formája az ún. top-cross már lehetővé tette a beltenyésztett vonalak kombinálódó-képességének becslését (Davis, 1927). Miután a módszer hatékonyságát többen is megerősítették, széles körben terjedt el a kukoricanemesítési programokban.

A beltenyésztett törzsek kombinálódó-képessége olyan tényező, amely meghatározza a vonalak felhasználási lehetőségét a hibridkombinációkban, ugyanakkor a vonal értéke kifejezhetővé válik a keresztezési kombinációinak teljesítménye által (Hallauer és Miranda, 1981).

Az általános és specifikus kombinálódó-képesség fogalmát Sprague és Tatum (1942) vezette be elsőként. Eredeti értelmezésben úgy határozták meg a fogalmak jelentését, hogy amennyiben széles genetikai bázison (heterogén populáción) alapuló tesztereket alkalmazunk, akkor a vizsgált beltenyésztett vonalak *általános kombinálódó-képességét (GCA)* határozhatjuk meg. Ha a teszter származása szűk genetikai spektrumot foglal magába (beltenyésztett vonal, vagy SC), akkor a tesztkeresztezések közötti különbségek a *specifikus kombinálódó-képességben (SCA)* meglévő eltéréseket mutatják meg. Meghatározásuk szerint az általános kombinálódó-képesség a szülővonalak átlagos teljesítményét fejezi ki a hibridkombinációkban, a specifikus kombinálódó-képesség pedig az egyes kombinációk értékét jelenti a szülőkomponensek átlagos teljesítményének függvényében. Felhívták a figyelmet arra, hogy a GCA és SCA eredmények mindig relatív értékek és nagymértékben függenek a kombinációk kialakításába bevont beltenyésztett vonalak összteljesítményétől. Megállapították továbbá, hogy a GCA értéke inkább az additív, míg az SCA értéke a domináns és episztatikus génhatásokat fejezi ki.

A kombinálódó-képesség vizsgálat alapfeltétele a jól kiválasztott teszterek alkalmazása. Hull (1945) szerint a tesztkeresztezésekben használt ideális teszternek elméletileg homozigóta recesszívnek kellene lennie minden lókuszra nézve. Rawlings és Thompson (1962) definíciója szerint a jó teszter határozottan különbséget tesz a vizsgált vonalak teljesítménye között. Allison és Curnow (1966) szerint a teszterek feladata, hogy a vizsgált genotípusokból, azok képességeinek megfelelően, a maximális termésátlagot hozzák ki a tesztkeresztezésekben. Hallauer (1975) meghatározása szerint a kombinálódó-képesség vizsgálatokban alkalmazott tesztereknek a következő feltételeknek kell megfelelniük: egyszerű használat, és olyan széleskörű információ szolgáltatása, amely alapján megfelelően osztályozható a vizsgált vonalak relatív értéke.

A keresztezésekben felhasznált teszterek kiválasztását meghatározza azok saját teljesítménye is. A kérdés az, hogy a tesztelt vonalak átlagos kombinálódó-képesség értékét milyen típusú teszterekkel lehet a legpontosabban megbecsülni. E kérdésben két változat látott napvilágot: (a) tesztelés alacsony termőképességű, szárdőlésre hajlamos, illetve (b) nagy termőképességű, szárdőlésre rezisztens teszterekkel. A későbbiek során nem sikerült eldönteni melyik módszer határozza meg pontosabban a vonalak átlagos kombinálódó-képességét, arra azonban Green (1948) felhívta a figyelmet, hogy az átlagos teljesítményű teszterek, vagy mindkét típus egyidejű alkalmazása pontosabb eredményt ad, mint ha csak az egyik, vagy másik tesztert alkalmaznánk.

Amennyiben a teszterek kiválasztása megtörtént, további kérdésként merült fel, hogy a beltenyésztéses vonal-előállítás folyamata során mikor történjen a tesztkeresztezés. A módszerek leírásai alapján két fő irányzat alakult ki ebben a kérdésben is. A *korai tesztelés* (early testing) lehetőségét ajánlotta Jenkins (1935) és Sprague (1939, 1946). A tesztelés ebben az esetben korai S_0 vagy S_1 generációban történik, és eredménye meghatározza a beltenyésztés további irányát. Az eljárás során figyelembe veszik az indított vonalak általános megjelenését és ezt is felhasználják a szelekciós döntések meghozatalakor. A módszer előnye hogy a populáció ilyen kezdeti stádiumban variábilis, így nagyobb lehetőség van a vonalak közti válogatásra. A vonalak kombinálódó-képessége stabil tulajdonság, így a beltenyésztés során jellemző marad a származékokra a későbbi generációkban is (Loeffel, 1964, 1971). Sprague (1946) három, S_3 állapotban lévő szelektált vonal tesztkeresztezését végezte el, kontrollként pedig öt standard vonal hasonló kombinációit állította elő. Kísérleteinek eredményei azt mutatták, hogy a termés és a szárdőlés tekintetében a három szelektált vonal eredményei fölülmúlták a standard vonalakét. Ebből arra következtetett, hogy a korai tesztelés használható eszköz lehet a nemesítési programokban. Eredményei megerősítették Jenkins (1935), Johnson és Hayes (1940) megállapításait, miszerint a kombinálódó-képesség jól öröklődő tulajdonság.

A *késői tesztelés* (late testing) a fentiekkel ellentétben már stabilizálódott, S_5-S_6 generációban elvégzett tesztkeresztezésekből származó hibridek értékelését jelenti. Előnye, hogy kevesebb a

többszörös szelekción átesett, előrehaladott állapotban lévő anyag, így a nemesítés folyamatának legköltségesebb műveletében, a hibridek teljesítményvizsgálatában már csak kevés számú vonal vesz részt. A korábbi generációkban elvégezhető a vizuális, *per se* szelekció és stabilizálódott, genetikailag egyöntetű anyagokkal hajtható végre a tesztkeresztezés.

Felvetődött a kérdés, hogy a vonalak teljesítménye, valamint egyéb értékmérő tulajdonságaik, milyen kapcsolatban állnak hibridjeik hasonló értékeivel. Jenkins (1929), beltenyésztett vonalak és hibridjeik 19 tulajdonságát hasonlította össze és meghatározta a korrelációt közöttük. Megállapítása szerint többnyire pozitív, de gyenge volt a kapcsolat (-0,10 - 0,24) e tulajdonságok között (termés, csőhossz, csőátmérő, szemsorszám, növénymagasság, másodcső gyakorisága, stb.). A fenti megállapításokból az a következtetés vonható le, hogy az itt felsorolt fontos tulajdonságokra érdemes szelektálni a jelölt vonalak között, de végső értéküket a hibridjeikben más (genetikai) tényezők is befolyásolják. Hayes (1936) szerint a beltenyésztett vonalak termése nem korrelált szignifikánsan a top-cross hibridekben kiszámított kombinálódó-képességgel.

Általánosan elfogadott elv szerint a keresztezésekben használt beltenyésztett vonalak genetikai sokfélesége (diverzitása) kulcsfontosságú. Nem rokon genotípusok keresztezése legtöbbször nagyobb termést (heterózist) eredményezett. Több szerző mellett Johnson és Hayes (1940), Cowan (1943) és Griffing (1953) is végzett kutatásokat ebben a témakörben, és megállapították, hogy minden esetben, amikor rokonságban lévő beltenyésztett vonalakat használtak hibridek előállítására, azok terméseredményei kisebbek voltak, mint azoké, amelyeknek nem volt közös őse. Kevés kivételtől eltekintve a különböző eredetű (táj)fajtákból létrehozott vonalak kombinációi voltak a legnagyobb termőképességűek. Az amerikai Corn Belt övezetben például, a „Reid Yellow Dent” eredetű vonalakat keresztezve a „Lancaster Sure Crop” rokonsági körből származókkal állították elő a legnagyobb termőképességű hibrideket.

Richey és Mayer (1925) kísérleteinek értékelésekor megállapította, hogy a szülőkomponensek beltenyésztettségi fokának csak kis mértékben van hatása a keresztezésekből származó hibridek termőképességére. Három és öt generáción keresztül beltenyésztett vonalak analóg keresztezéseiből származó hibridek vizsgálataiban megállapította, hogy a többszörösen beltenyésztett vonalak kombinációi nem rendelkeznek kifejezett előnnyel az S_3 vonalakkal szemben.

Bár a fent említett megállapítások napjainkban már nyilvánvaló tények, és a hibridkukorica-nemesítés alaptételeinek tekinthetők, a jelenségek felismerését nagyon lényegesnek értékelte az utókor, ezért a dolgozatban való megemlítésüket és első közlésük bemutatását mi is fontosnak tekintettük.

A következő fejezetekben két elterjedten használt, a beltenyésztett vonalak specifikus és általános kombinálódó-képességének kifejezésére alkalmas párosítási modellt mutatunk be röviden.

2.4.1 Faktoriális párosítási modell

A faktoriális párosítási modellben a keresztezések összeállításánál két szülői csoportot különítünk el. Kétivarú növények esetében a két csoportba kerülő egyedek, vagy vonalak csak apaként, illetve csak anyaként szerepelnek a kombinációkban. A párosítási modell szerint minden hímivarú egyedet minden nőivarú egyeddel párosítunk. Így minden hím x nő párosítási kombináció előfordul. Minden párosításból annyi utód szükséges, hogy jusson a több ismétléses kísérletbe elegendő számú utód. Ez a genetikai kísérleti elrendezés *Comstock és Robinson II kísérlet* elnevezésként vált ismertté (1952). Hasonló a diallél kísérlethez (lásd később) azzal a különbséggel, hogy nem minden vonal lesz minden másik vonallal keresztezve. A faktoriális elrendezésben az azonos ivarú szülőt adó vonalak egymással nem párosíthatók. Az apák és anyák száma tetszőleges, válogatásukkor érdemes akkora egyedszámot meghatározni, ami a kísérlet igazolása szempontjából racionális, de figyelembe kell venni, hogy a statisztikai analízis megbízhatósága miatt több (2-3) ismétlés ajánlott, ami megsokszorozza a kísérletben felhasznált parcellákat. Például 5 apa és 10 anya vonal esetében a kombinációk száma összesen 50, tehát három ismétlésben összesen 150 parcellát igényel majd a kísérlet.

A faktoriális párosítási modell kéttényezős, több ismétléses, véletlen blokk elrendezésnek felel meg. A kísérletben szereplő, közös apától vagy anyától származó egyedek féltestvérek (Sváb, 1971). A párosítási modell alaptáblázatát az 1. számú táblázat mutatja be.

1. táblázat Faktoriális párosítási modell sémája (S a hím, D a nőivarú egyed vagy vonal)

♂ \ ♀	D_1	D_2	…	D_n
S_1	S_1 x D_1	S_1 x D_2		
S_2	S_2 x D_1	S_2 x D_2		
…				
S_n				S_n x D_n

A táblázat oszlopainak és sorainak metszéspontjaiban a kombinációk több ismétlésben elért eredményének átlaga szerepel. A kísérlet főátlagának (M) és az egyes vonalakhoz tartozó n darab kombináció átlagának különbsége adja meg az adott szülő általános tenyészértékét.

Az alaptáblázat átlagadataiból az egy apához (S) tartozó utódok átlaga az apa átlagos hatása, az egy anyához (D) tartozó utódok átlaga az anya átlagos hatása, egy meghatározott apa x anya kombináció pedig az apa és az anya kölcsönhatása. Mindezt a főátlaghoz viszonyítva:

Az apa átlagos hatása: átlagX_S - M

Az anya átlagos hatása: átlagX_D- M

Apa x anya kölcsönhatás: átlagX_{SD}-M-(átlagX_S -M)-(átlagX_D -M)

A fenti átlagos hatások a varianciaanalízis főhatásainak, a kölcsönhatás a varianciaanalízis kölcsönhatásának felel meg (Sváb, 1971).

Sváb által használt elnevezés *az általános és különleges tenyészérték*, amelyről a következő megjegyzést teszi:

„… Az általános és speciális kombinálódó-képesség kifejezéseket a diallél keresztezésekből kapott átlagos- és kölcsönhatásokra tartják fenn, jóllehet szakmailag aligha van lényeges különbség az általános kombinálódó-képesség és az átlagos hatás, másrészről a speciális kombinálódó-képesség és a kölcsönhatás között a diallél párosítási és a faktoriális párosítási modellben.”

2.4.2 Diallél módszer

A szakirodalom diallél keresztezés alatt általában beltenyésztett vonalak egymás közötti keresztezését érti. Amennyiben a kísérletben n számú vonal van, akkor ezeket önmagukkal és egymással párosítjuk a 2. számú táblázat szerint így összesen n^2 párosításból kapunk utódokat (Sváb, 1971).

Ezek három csoportból állnak:

1. az n vonal önmagával párosítva (táblázat főátlója), itt az utódok továbbra is beltenyésztettek (táblázatban: 11, 22, … nn)
2. a nő x hímvonal párosításából származó F_1 hibrid utódnemzedék (1n)
3. az előbbi reciprokai, F_1 hibrid utódnemzedék (n1)

2. táblázat A diallél keresztezés párosítási sémája

♂ \ ♀	a_1	a_2	…	a_n
a_1	11	12		1n
a_2	21	22		2n
…				
a_n	n1	n2		nn

Griffing (1956) az utódpopuláció vizsgálatának az alábbi négy esetére adta meg az értékelési módszert. A kísérletben részt vesz

1. az n^2 számú összes párosítás utódgenerációja,
2. az n eredeti vonal és az egyik F_1 utódnemzedék, a reciprok kivételével,
3. a két reciprok F_1 utódnemzedék, az eredeti vonalak nélkül,
4. az egyik F_1 utódnemzedék, reciprok és az eredeti vonalak nélkül.

A diallél keresztezés értékelése ebben az esetben is varianciaanalízissel történik, amelynek több modellje van attól függően, hogy milyen kombinációk szerepelnek és milyen a kísérlet elrendezése.

A módszert a dolgozatban nem használtuk fel, rövid ismertetését csak a teljesebb kép kedvéért iktattuk ide, mivel a kísérletek beállításakor, mint lehetőséget figyelembe kellett venni, továbbá azért, mert a kukoricanemesítési programok kombinálódó-képesség vizsgálataiban az egyik leggyakrabban használt párosítási modellnek tekinthető.

2.5 Dihaploid eredetű gabonafélék a kereskedelemben

Portoktenyészetekből előállított és kereskedelmi forgalomba került gabonafajtákról több külföldi (De Buyser *et al.*, 1978; Hu *et al.*, 1986) és hazai szerző is beszámolt. Hazánk nemesítői a világelsők közé tartoztak a DH fajták előállítását illetően. Szegeden már 1984-től ötvözték a hagyományos nemesítési módszereket az *in vitro* androgenetikus DH előállítási technikával (Lantos, 2006). A szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht.-ben Kertész, Pauk, és Barabás által nemesített GK Délibáb 1992-ben, Európában a második, a világon a negyedik minősített búzafajta volt, melyet portoktenyésztés alkalmazásával állítottak elő (Pauk *et al.*, 1995).

Ezt további DH fajták követték mind a szegedi intézetben (GK Szindbád 1996-ban és GK Tündér 2001-ben; Pauk, 2003), mind az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetében: az Mv Szigma (1994) és az Mv Madrigál (1996) kapott állami elismerést (Láng, 1999; Barnabás, 2000).

Heszky és Simonné 1992-ben a Szarvasi Öntözési Kutatóintézetben állította elő az első magyar *in vitro* haploidindukcióval létrehozott rizsfajtát, amelyet az Országos Fajtaminősítő Tanács 1992 májusában Dáma néven minősített (Heszky és Simonné, 1992). Ezt további, hasonló módon előállított fajták követték, 2002-ben Janka és Bioryza-H néven.

Kukoricánál az első - standard átlagot meghaladó - *in vitro* úton előállított, DH vonal eredetű hibridekről, kínai kutatók számoltak be a 80-es évek közepén. Az androgén képesség e faj esetében is genotípus függőnek bizonyult és a tulajdonságot elsősorban kínai vonalak hordozták, amelyeket a távolkeleti termesztési feltételekhez és klimatikus viszonyokhoz adaptáltak. Az ilyen eredetű DH vonalak éppen ezért felhasználhatók voltak Kínában a kereskedelmi hibridek előállításához. A

kombinációk a Qunhua 1, Dansan 91, Guihua 1, Guisan 1 elnevezést kapták és a két utóbbi nagy és stabil termésével, jó adaptációs képességével meghaladták az új fajták összehasonlító vizsgálatában a széles körben elterjedt hibridek teljesítményét (Kuo *et al.*, 1994). Kínán kívül, haploid szövettenyészetekben előállított DH kukoricavonalakat - jelenlegi tudomásunk szerint - kereskedelmi hibridek előállítása céljából napjainkig még nem használták a nemesítési programokban.

Más a helyzet az *in vivo*, monoploid technikával előállított DH kukoricavonalak esetében. A kukoricanemesítésben az ezredforduló előtt a markergénes technológián alapuló partenogenetikus monoploid előállítási módszer nem vált széles körben elterjedt eljárássá, mert hatékonyságát igen alacsonynak (1% alatt) találták (Barnabás és Szundy, 1998).

Az elmúlt 6-8 évben (2000 után) azonban jelentős változás következett be, és a monoploid módszerrel előállított DH vonalakat intenzíven kezdték használni a kukoricakutatásban és a nemesítésben (Röber, 2005). Az előállítás műveleteit és hatékonyságát korábban már részleteztük, itt csak az előállítás eredményeire, és a kereskedelembe került hibridekre térünk ki röviden.

A nemesítő cégek közül egyesek részben (Monsanto-Dekalb), vagy egészben (KWS SAAT AG - RAGT) állították át nemesítési programjukat e technikára. A monoploid módszerben használt ún. haploid indukáló vonalakat (pl.: Stock 6, KEMS, WS 14, RWS) német, francia, illetve dél-amerikai nemesítő állomásokon (téli generációkban) használják a haploidok, majd kolhicin kezelés után a DH vonalak előállítására. A nemesítő cégek csak a heterogén alappopulációkat (hasadó nemzedékeket) hozzák létre, majd szerződéses alapon állíttatják elő a DH vonalakat külföldi partnereik tenyészkertjében és laboratóriumaiban. A visszaérkező DH vonalakat ezután *per se* szelektálják, és szántóföldi teljesítményvizsgálatokban (egy, majd két teszterrel) tesztelik több éven keresztül. A kiválasztott, legjobb DH vonalak csak ezután kerülnek szülőpartnerként a hibrid előállítási programokba, ahol a cél a kereskedelmi értékkel bíró hibridkombinációk előállítása (Nagypál és Könczöl, személyes közlés; Nagypál, 2006).

A KWS SAAT AG csoport nemesítési technológiáját 100%-ban a DH technológiára alapozta. Az első DH szülőkomponensű kukorica hibridjeiket 2002-ben jelentették be Magyarországon, KWS 2376 (DC) és Amandha (TC) néven. Az első Magyarországon szelektált és a hazai klímához adaptált DH vonalaikból előállított hibridjüket 2006-ban jelentették be. A DC és TC kombinációk esetében a hibridekben mindkét, illetve mindhárom vonal monoploid módszerrel előállított DH szülő volt (Nagypál, 2006).

A monoploid technika alkalmazásának gyors terjedése a nemesítésben jól mutatja az igényt, amely a közel 100%-ban homozigóta vonalak iránt támadt. Egy amerikai nemesítő cég (AgReliant Genetics LLC, Doubled-Haploid Breeding Technology, *s. a.*) beszámolója szerint a technikára hat év alatt álltak át, és az így létrehozott DH vonalak száma ez idő alatt a következőkképpen alakult:

2000 - az első haploidok indukciója

2001 - több mint 2 500 DH vonal előállítása

2002 - több mint 13 000 DH vonal előállítása

2002 - az első DH vonalak tesztkeresztezése és teljesítmény vizsgálata

2003 - több mint 40 000 DH vonal előállítása

2004 - több mint 56 000 DH vonal előállítása

2005-2006 - Az első DH szülőkomponensű kukoricahibridek piacra vezetése.

Az eljárásnak - gyakorlati alkalmazása előtt - azonban meg kell még felelnie a következő technikai és genetikai kritériumoknak (Beckert, 1994):

- Költséghatékonyságra van szükség a nagyszámú DH növények előállításakor.
- A felmerülő genetikai inkompatibilitásokat le kell küzdeni.
- A felnevelt DH növények nagyobb arányú fertilitása szükséges.
- A DH növényeknek molekulárisan, citológiailag és fenotípusosan stabilnak kell lenniük.
- A technika alkalmazásakor nem kerülhet kedvezőtlen tulajdonság a nemesítési anyagokba.
- Az eljárás legyen gyors, vagy egységnyi idő alatt nyújtson kedvezőbb genetikai előrehaladást.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A dolgozat elkészítéséhez szükséges adatokhoz laboratóriumi és szántóföldi mérésekkel jutottunk. A vizsgálatok jellegéből adódóan a módszerek bemutatását négy fő részre osztottuk.

A fejezet először a kísérletben szereplő genotípusokat mutatja be, a második részben a laboratóriumi szövettenyésztés módszerét tekinti át, majd a kombinálódó-képesség vizsgálatokat és az ezzel kapcsolatos egyéb szántóföldi adatfelvételezéseket ismerteti, végül a kiértékeléshez használt statisztikai módszereket mutatja be.

3.1 Vizsgált genotípusok

A haploid szövettenyésztés alapja egy kutatói együttműködés keretében felhasznált, kínai eredetű egzotikus vonal volt (Chi 592), amelynek származása és rokonsági hovatartozása számunkra jelenleg ismeretlen. A kiváló antéraválasszal rendelkező anyag közvetlen DH leszármazottja egy többszörös *per se* szelekcióval kiválasztott, az eredményes szövettenyésztésért felelős géneket hordozó, Martonvásáron, a kutatóintézet Sejtbiológiai Osztályán kialakított, DH 109 jelű genotípus. Egy másik közeli rokon vonal a DH 105, melynek eredete a DH 109 és az SR 88 szulfonilurea rezisztens vonal keresztezéséből származó hibridre vezethető vissza. Ennek előállítása szintén haploid szövettenyésztési technikával történt, amit szelekció követett.

A kísérletben szerepelt egy martonvásári elit, szövettenyésztésre nem jól reagáló vonal (HMv 5405), amely több, kereskedelmi forgalomban lévő hibrid szülőkomponense. E vonal eredete ismert, egyik kimagasló értékű martonvásári Iodent rokonsági körhöz tartozó anyag, melyet a 90-es évek derekán állítottak elő. Nemesítési értékét mi sem bizonyítja jobban, hogy napjainkban is használják számos kereskedelmi értékű hibrid előállításában.

A fent említett vonalakból (DH 109 és DH 105) a HMv 5405-el végzett egyszeres, reciprok és visszakeresztezéssel előállított szisztematikus sorozat képezte a kísérlet alapját. A keresztezésekből nevelt növények antérájából származó DH vonalak egyedi genotípust képviselnek, ezért az így kapott vonalakat előkísérletekben bonitáltuk, és agronómiai tulajdonságaik alapján válogattuk. A kutatóintézetben így kialakított vonalak a DH 136, DH 143, DH 31, DH 141 (DH 109 rokon), illetve a DH 57, DH 64, DH 56 (DH 105 rokon) elnevezést kapták. A jelölésüket a DH eredet feltüntetésével a tenyészkertben felnevelt DH_1 generáció parcellaszámáról kapták. A számozás ennek alapján véletlenszerű és nem utal a vonalak minősítésbeli sorrendjére. Éppen ezért eredményközléskor, az elnevezésüknél jóval informatívabb genetikai hátteret a DH vonalak nevei után mindig feltüntettük.

A kísérlet részeként vizsgáltunk még három, szomatikus (éretlen embrió eredetű) szövettenyésztésre elterjedten használt, de portoktenyésztésben általunk korábban nem tesztelt genotípus haploidindukciós képességét is. Ezek az A 188, B 73, Oh 43 vonalak voltak. Továbbá használtuk még a 4C1 négyvonalas (Mórocz *et al.*, 1990) és három martonvásári csemegekukorica hibridet (Mv Aranyos, Mv Julius, Mv Honey) melyek korábbi kísérletekben mutattak morfogén választ éretlen embrió eredetű szövettenyészetekben (Spitkó *et al.*, 2001).

Előkísérleteink alapján a DH 109 haploidindukciós forrás és a martonvásári elit vonal F1 és reciprok hibridkombinációi mutatták a legmagasabb indukciós képességet és a kísérletek eredményeinek megbízhatósága, valamint a tulajdonság stabilitása is messze a legjobbnak bizonyult. A vetésidő hatását vizsgáló kísérletekben ezért a DH 109*HMv 5405 és a HMv 5405*DH 109 reciprok hibridkombinációk szerepeltek. A növényeket azonos időközönként (virágzás előtt, alatt és után, hetenként) és azonos vízmennyiséggel (30-40 mm) öntöztük meg, hogy az aszályból és tápanyaghiányból eredő esetleges stresszhatásokat kiküszöböljük.

3.2 Dihaploidok előállítása

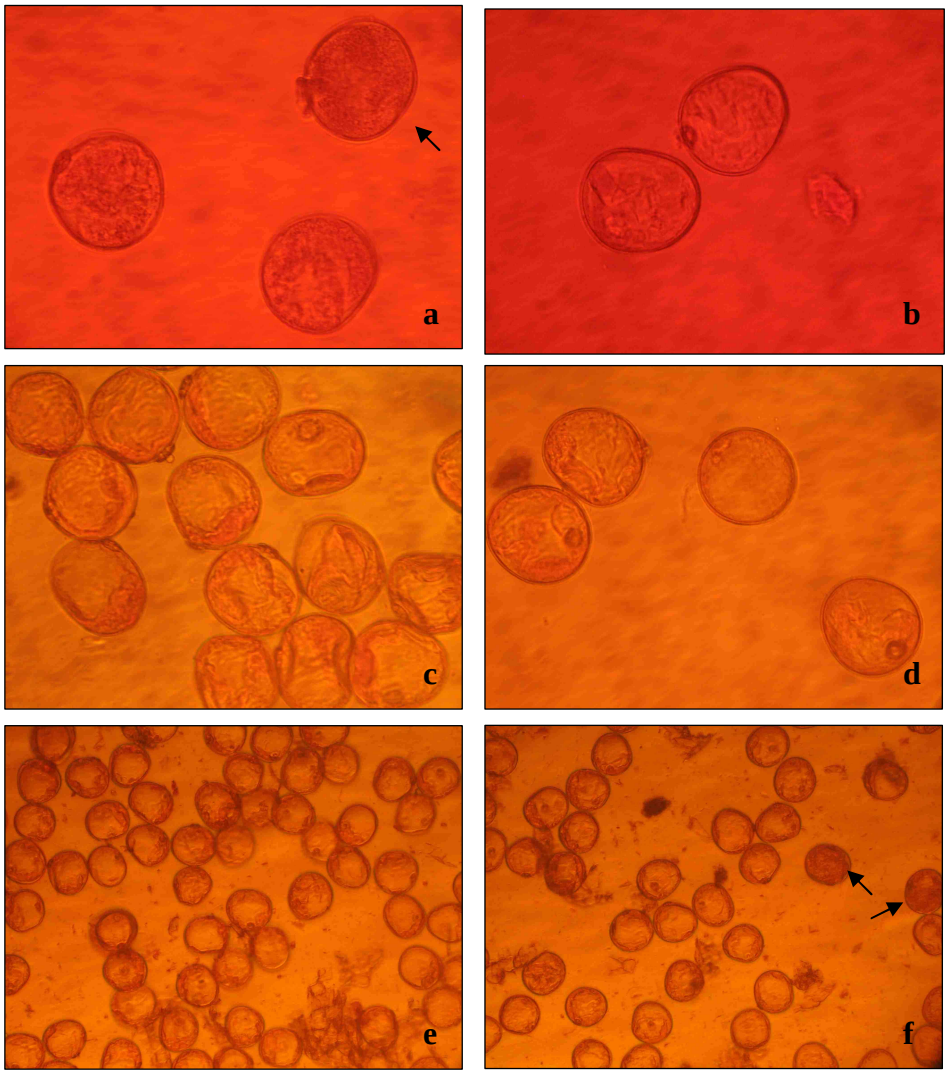
A kukorica szövettenyésztési szempontból sem haploid, sem diploid szinten nem tartozik a jól reagáló növények közé, ezért a hatékonyan működő és rutinszerűen alkalmazható módszerek kialakítása hosszú és időigényes folyamat. Martonvásáron a jó haploid kalluszindukciós és megfelelő regenerálódó képességű kínai genotípusra hatékony portoktenyésztési és DH előállítási módszer épült (Barnabás *et al.*, 1999). Munkánk szempontjából meghatározó volt, hogy e rendszer optimalizálása korábban megtörtént, így megbízhatóan tudtunk a különböző genotípusokon és azok kombinációin összehasonlító szövettenyésztési vizsgálatokat folytatni.

3.2.1 Mintagyűjtés

Munkánk során kizárólag szántóföldön nevelt növények címerhányás előtt izolált virágzataiból származó portokokat használtunk explantumként. A növények címere a mintavételkor a felső levelek által burkoltan, de már jól kitapintható állapotban volt, és ekkor a portokok még éretlenek, a címerágak etioláltak voltak. A címer fejlettségi állapotát és ezáltal a mintavétel idejét nehéz volt pontosan meghatározni: a vetéstől a mintavételezésig eltelt napok száma évenként - az időjárás függvényében - változó volt, így annak értékét napokban meghatározni nem volt érdemes.

A szántóföldről a laboratóriumba vitt antérákat kárminecetsavas festéssel vizsgáltuk. A címerből kipreparált antérát tárgylemezen kissé szétnyomtuk, majd tömény ecetsavban oldott kárminfestéket cseppentettünk hozzá és fénymikroszkóp alatt határoztuk meg a mikrospórák

állapotát. Amennyiben a korai egysejtmagvas (EU) állapot nagy mennyiségben volt jelen a mikrospórák között, akkor alkalmasnak találtuk a mintát az előkezelésre és a tenyésztésre. Ha a mikrospórák citoplazmájába a keményítőszemcsék berakódása már megkezdődött a mintát kizártuk a további munkákból (2. ábra).



2. ábra Mikrospórák vizsgálata kárminecetsavas festéssel, különböző nagyításban (a,b,c,d 63x; e,f 10x), az éretlen címerek izolálása után (megjegyzés: amennyiben megkezdődött a keményítőszemcsék berakódása a citoplazmába (nyilak) és ennek gyakorisága nagy volt, akkor a címereket nem használtuk a kísérleteinkben).

A vetésidő hatásának vizsgálatakor a négy kísérleti évben a legjobb kalluszindukciós képességgel rendelkező F_1 hibrideket mindig ugyanazokon a napokon (május 2., 9., 16. és 23.) vetettük el és a mintavételt a fent elmondottak alapján végeztük. A vetés idejét úgy állítottuk be, hogy kettő még a szokásos vetési időszak végére essen, míg kettő kifejezetten kései időpontban legyen.

A vizsgált genotípusokat a tenyészkertben optimális termesztési körülmények között (76,2 cm sortáv, 18-20 cm tőtáv, 6-7 növény/m^2), megfelelő tápanyag-ellátottsági szinten, többszöri

öntözéssel kondicionáltuk, és az évek közötti egyébként jelentős időjárási körülmények ellenére igyekeztünk kedvező fiziológiai állapotban tartani. A talajművelési (mélyszántás, kombinátorozás, hengerezés), növényápolási (öntözés, talajlazítás) és növényvédelmi (gyomirtás, inszekticides kezelés) munkák a tenyészkerti kísérletek és nemesítési programok részletes előírásai szerint történtek.

A kísérletben szereplő növények elsősorban a virágzás előtt bekövetkezett hőség és az ezt kísérő légköri aszály miatt stressznek voltak kitéve, melynek kiküszöbölése nem volt lehetséges. A láthatóan fejlődési, morfológiai vagy fiziológiai károkat szenvedett növényeket a további kísérletekből kizártuk.

3.2.2 Az explantumok előkezelése

Az előkezelés során az éretlen portokokat tartalmazó címert a burkoló levelekből kibontottuk, majd alumínium fóliába csomagolva 10 napos előkezelést végeztünk 7ºC-on a címerizolálás és a leoltás között (Kovács *et al.*, 1992). A kísérlet során csak a megfelelő fejlettségi stádiumban lévő címerág részeket használtuk fel, azaz a tenyészeteket - a hidegkezelés során továbbfejlődő - kései egysejtmagvas (LU) állapotú mikrospórákat tartalmazó antérákból indítottuk. A felszíni sterilizálás 70%-os etanollal 2 percig, majd 20%-os hypos oldattal - detergens (Tween 20) hozzáadásával - 20 percig történt, amit háromszor megismételt steril desztillált vizes öblítés követett.

3.2.3 A táptalajok összetétele

A haploidindukciót ún. *F táptalajon* (500 $mg \cdot l^{-1}$ kazein hidrolizátum, 120 $g \cdot l^{-1}$ szaharóz, 0,1 $mg \cdot l^{-1}$ 2,3,5-TIBA, 5 $g \cdot l^{-1}$ aktív szén és 2,5 $g \cdot l^{-1}$ Gelrite hozzáadásával módosított Yu-Pei táptalaj, Genovesi és Collins, 1982) vizsgáltuk. A növényregeneráció N_6 alapú (Chu *et al.*, 1975) táptalajon történt 1 $mg \cdot l^{-1}$ kinetin és 0,5 $mg \cdot l^{-1}$ alfa-naftil-ecetsav kiegészítéssel. Ezt a táptalajt a kisebb növények felneveléséhez használtuk, majd csökkentett cukortartalmú (20 $g \cdot l^{-1}$ szaharóz), hormonmentes N_6O_1 táptalajon neveltük a növénykéket a megfelelő mennyiségű gyökér és szár differenciációjáig. A táptalajok részletes leírását a dolgozat mellékletében közöljük (*M1 melléklet*).

3.2.4 Az *in vitro* tenyésztés

Egy genotípus vizsgálatakor három növény címerét használtuk három ismétlésként, minden címerből 300-300 antérát izolálva és leoltva 2-2 Petri csészébe. A tenyészeteket a leoltás után 28 napig 28ºC-on, sötétben inkubáltuk, majd a képződött struktúrákat megszámoltuk, és

növényregenerációs táptalajra helyeztük. Egy Petri csészébe 20-30 kalluszt helyeztünk, majd 26ºC-on 16 órás megvilágítás (50 $mmol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ PAR fényintenzitás) mellett növénynevelő kamrában tartottuk a tenyészeteket.

A fejlődő kalluszok között nem tettünk különbséget a morfotípusok alapján, valamint a redifferenciálódás során az embrio-, illetve organogenezist nem határoztuk meg. A differenciálódó struktúrákat ezért egységesen morfogén válasznak tekintettük.

A növekedett hajtáskezdemények fél centiméteres nagyság elérése után kerültek sterilizált befőttesüvegbe, hormonmentes N_6O_1 táptalajra. Az 5-7 cm-t elért gyökeres növényeket ezután tápkockába ültettük (AS Jiffy Products Ltd.). Az akklimatizációt követően a növényeket növénynevelő kamrában neveltük 18ºC-os nappali és 15ºC-os éjszakai hőmérsékleten (16 órás megvilágítással).

Munkánk során kolhicines kezelést nem alkalmaztunk, a felnevelt fertilis növényeket spontán rediploidizálódott növényeknek tekintettük.

A növények felnevelése után feljegyeztük a hím- és nővirágzat megjelenésének idejét és a magfogást követően a növényekről begyűjtött szemszám alapján pontosan meghatároztuk a fertilitást (a 10 szemnél több magot nevelő növényt fertilisnek tekintettük). A DH_0 növényeket - amennyiben ez lehetséges volt - önporoztuk, DH_1 utódnemzedékeit pedig szántóföldön felszaporítottuk. A dolgozatban szereplő DH vonalak ploidszintjét áramlás-citometriás vizsgálattal korábban már ellenőriztük.

Az indukciós és regenerációs válaszok jellemzéséhez az alábbi mutatókat számoltuk ki:

- *Antéraválasz* (%): A kalluszt produkáló antérák száma elosztva az összes tenyésztett antéraszámmal.
- *Abszolút kalluszindukciós képesség* (%): Az összes kalluszok száma elosztva az összes tenyésztett antéraszámmal.
- *Relatív kalluszindukciós képesség* (%) (= egy antéráról származó összes kalluszok száma): Az összes kalluszok száma elosztva az összes válaszadó antéraszámmal.
- *Morfogén válasz* (%): Az embriogén v. organogén reakciót mutató kalluszok száma elosztva az összes tenyésztett antéraszámmal.
- *Zöld növény gyakoriság* (%): Az összes leveles-gyökeres növények száma elosztva az összes kallusz számával.
- *Fertilitás* (%): A legalább 10 szemet adó növények száma elosztva az összes regenerált növényszámmal.

3.3 Szántóföldi kombinálódó-képesség vizsgálatok

Vizsgálatainkat a szántóföldön folytattuk a korábban előállított és többszöri szelekció alapján legjobbnak minősített DH vonalak hibridjeinek teljesítményvizsgálatával. Az eredményekből kiszámítottuk a vonalak általános és specifikus kombinálódó-képességét is. Ezután a kísérletbe vont genotípusok néhány morfológiai jellemzőinek felvételezését és betegség ellenállóságának értékelését végeztük el (3. ábra).

3. ábra A szántóföldi tenyészkert és a kombinálódóképesség vizsgálatok. (a) martonvásári tenyészkert; (b) DH vonalak felszaporítása a tenyészkertben (soron belül homogén, sorok között megkülönböztethető); (c) teszterekkel történt keresztezések a tenyészkertben; (d) a DH vonalak szántóföldön öntermékenyített csövei; (e) hibridkísérlet a DH vonalak kombinációival; (f) DH szülőkomponensű hibridek csövei a betakarítás előtt; (g) Kétsoros, kisparcellás betakarítógép; (h) egy DH vonal eredetű hibrid csöve.

3.3.1 A vizsgált dihaploid vonalak és tesztereik bemutatása

Martonvásáron, három egymást követő évben (2005-2007), tizenkét DH kukoricavonalat és egy elit, de *in vitro* reakciót tekintve korábban nem reagáló martonvásári vonalat (HMv 5405) használtunk szülőkomponensként keresztezéses kísérleteinkben. A DH vonalakat a jó haploidindukciós képességet hordozó kínai eredetű vonal, valamint kereskedelmi hibridekben szereplő martonvásári beltenyésztett vonalak kombinációiból hoztuk létre. Ez utóbbiak elsősorban a korábban említett Iodent (10 db DH vonal), továbbá Mindszentpusztai sárga rokonsági körökből származtak (DH 53 és DH 63). A DH kukoricavonalakat F_1 és BC_1 kombinációkban állítottuk elő azért, hogy azokban az elit vonal különböző arányban legyen jelen.

A teszterek martonvásári, testvérvonal keresztezéssel létrehozott Lancaster (Lanc. SLC) és Iowa Stiff Stalk Synthetic (ISSS SLC) apák voltak, valamint egy harmadik, a fent említettek egyikébe sem tartozó, nem rokon SLC tesztert használtunk (NR SLC). Ezek a teszterek napjainkban is forgalmazott, kereskedelmi értékkel rendelkező hibridkombinációknak a szülőkomponensei.

A kísérletben hazánkban működő cégek által nemesített, 2005-2006-ban OMMI (később MgSzH) kísérletekben is használt, az éréscsoportnak megfelelő, FAO 390 és FAO 450 standardokkal vetettük össze a vizsgált hibridek teljesítményét.

3.3.2 Tenyészkerti elrendezés és a teljesítményvizsgálatok

A több termőhelyes teljesítmény-vizsgálatokat Szarvason, Mezőkövesden, valamint az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének martonvásári kísérleti terén három évben (2006-2008), három ismétlésben, véletlen blokk elrendezésben hajtottuk végre. A terméseredményeket ($t \cdot ha^{-1}$) 15% szemnedvességre átszámolva adtuk meg. A szemnedvesség értékeket betakarításkor a kombájnba szerelt, elektromos vezetőképesség elvén működő szemnedvesség mérő műszerrel által detektált értékek képezték.

A hibridkísérletekben a sortávolság 76 cm a tőtávolság 20 cm volt, a duplasoros parcella hossza pedig 5,60 m volt. Ennek alapján az egy ismétlésben felnevelt növényszám összesen 56 darab volt. Ez egy hektárra vetített 65 000 $tő \cdot ha^{-1}$ állománysűrűségnek felel meg. A tenyészkertben az egysoros parcellák mérete 2 m volt ahol összesen 10-10 növényt neveltünk fel.

A martonvásári vizsgálatokat a faktoriális párosítási modellnek megfelelően állítottuk be, így a 12 DH, illetve a kontroll HMv 5405 vonalat apaként használva kereszteztük a 3 teszter anyát (3. táblázat). Az így kapott hibridek száma összesen 39 volt, továbbá elvetésre kerültek a FAO 390 és FAO 450 standardok is, így kísérletünkben minden évben összesen 41 hibridet vetettünk el teljesítménykísérletben.

A martonvásári eredményekből számítottuk ki a DH vonalak, a HMv 5405 és tesztereik általános és specifikus kombinálódó-képességét, míg a több termőhelyes teljesítménykísérletek eredményeit a szarvasi és mezőkövesdi értékekkel kiegészítve adtuk meg. Ez utóbbi esetben a vetőmag alapanyagok nem minden hibrid esetében álltak elegendő mennyiségben rendelkezésünkre, valamint a kísérlet mérete is korlátozott volt, így nem állítottuk kísérletbe mind a 39 hibridkombinációt. Ezekben a kísérletekben 14 hibrid és 2 standard (FAO 390 és FAO 450) szerepelt három ismétléses, három termőhelyes vizsgálatban.

A párosítási modellnek megfelelő keresztezési táblázat a fentiek alapján a következőképpen alakult:

3. táblázat A faktoriális párosítási modell alapján készített keresztezések megoszlása

GENOTÍPUSOK	LANC. SLC	ISSS SLC	NR SLC
DH 109	X	X	X
DH 384	X	XX	X
DH 136	XX	X	XX
DH 143	X	XX	XX
DH 31	XX	X	X
DH 141	XX	X	XX
DH 105	X	X	X
DH 57	X	X	XX
DH 64	X	XX	XX
DH 56	X	X	XX
DH 53	X	XX	XX
DH 63	X	X	X
HMv 5405	X	X	X

X - csak a martonvásári kombinálódó-képesség vizsgálatban szereplő hibridek (39)

XX - a több termőhelyes vizsgálatokban is szereplő hibridek (14)

3.3.3 Morfológiai jellemzők és a betegség-ellenállóság mérése

A vizsgált 12 DH vonal és a HMv 5405, valamint a 3 teszter a keresztezések során a martonvásári tenyészkertben mindhárom kísérleti évben, több parcellán került elvetésre, ezáltal rögzíthettük a következő morfológiai jegyeket: növénymagasság, csőeredési magasság, cső fölötti és cső alatti levélszám, címer-oldalágak száma, címerhossz. Ezek a tulajdonságok elsősorban az összehasonlítás végett kerültek felvételezésre: az adott vonalak minőségét, értékét nem, vagy csak részben befolyásolják.

Más a helyzet a betegség-ellenállóság esetében, ahol félkvantitatív 1-5 skálán, négy ismétlésben értékeltük a vonalak kezdeti fejlődését (1 - gyenge; 3 - átlagos; 5 - jól fejlett), golyvás üszög és (cső)fuzáriumos fertőzöttségét (1 - erősen; 3 - közepesen; 5 - nem fertőzött), valamint részben ez utóbbival összefüggésben (szárfuzáriózis) a szár szilárdságát (1 - gyenge; 3 - átlagos; 5 - erős szár). Ezek a tulajdonságok nincsenek szorosan kapcsolatban a dolgozat fő témájával, de a vonalak szélesebb körű megítélésében szerepet játszanak.

3.4. Az eredmények statisztikai értékelése

A szövettenyésztés alapadatait varianciaanalízisnek vetettük alá. A kezelés a vonalak összehasonlításakor a genotípus, frakcionált vetés esetében az eltérő vetésidő és évjárat volt. A statisztikai vizsgálatot az „Agrobase 99® for Microsoft Windows®" nevű számítógépes szoftverrel (Agronomix Inc.) végeztük el, majd Sváb (1981) útmutatása alapján értelmeztük. A rendelkezésre álló adatokat az „MS Excel for Microsoft Windows®" adatkezelő programmal rendeztük a statisztikai analízishez szükséges és a program által értelmezhető formába.

A szántóföldi eredmények értékelésekor két- és többtényezős varianciaanalízist alkalmaztunk. Ebben az esetben a kezelések a következők voltak: genotípus, évjárat, hely, illetve ezek kölcsönhatásai. A szignifikáns differencia értékének kiszámítása a következő képlet alapján történt:

$$SzD_{P\%} = t_{P\%}\sqrt{\frac{2\ \text{Hiba}\ MQ}{r}}$$

Ahol:

$SzD_{P\%}$ - a számított szignifikáns differencia értéke,

$t_{P\%}$ - a *Student* féle t-táblázatban a Hiba MQ szabadságfokára (szabadon választható *P%*-ra) megadott t-érték,

Hiba MQ - a kísérlet pontosságát mérő hibaszórás négyzete (s^2)

r - ismétlések száma.

A vonalak általános kombinálódó-képességét (GCA) Sváb (1981) értelmezése szerint, faktoriális párosítási modell alapján számítottuk ki.

$$GCA = \frac{\sum^{n}(\text{DH vonal x teszter) teljesítménye}}{n} - \text{a kísérlet főátlaga}$$

Ahol:

GCA - általános kombinálódó-képesség

n - mintaszám (DH vonalak esetében értéke 3, a teszterek esetében 13)

a kísérlet főátlaga - az összes minta átlaga

Az apa átlagos hatása:	$átlagX_S$- M
Az anya átlagos hatása:	$átlagX_D$- M

Ahol:

$átlagX_S$ - egy apához tartozó hibridek átlaga,

$átlagX_D$ - egy anyához tartozó hibridek átlaga,

M - a kísérlet főátlaga,

(bővebben ld.: 33. oldal).

Specifikus kombinálódó-képesség (anya x apa kölcsönhatás):

$$SCA = \text{vizsgált hibridkombináció teljesítménye} - \text{a kísérlet főátlaga} - GCA_{apa} - GCA_{anya}$$

Ahol:

SCA -specifikus (speciális) kombinálódó-képesség

GCA_{apa} - az apa általános kombinálódó-képessége

GCA_{anya} - az anya általános kombinálódó-képessége

a kísérlet főátlaga - az összes minta átlaga

Apa x anya kölcsönhatás: $átlagX_{SD}$-M-($átlagX_S$ -M)-($átlagX_D$ -M)

Ahol:

$átlagX_{SD}$ - a kísérlet vizsgált hibridkombinációjának értéke

$átlagX_S$ - egy apához tartozó hibridek átlaga,

$átlagX_D$ - egy anyához tartozó hibridek átlaga,

M - a kísérlet főátlaga,

(bővebben ld.: 33. oldal)

4. EREDMÉNYEK

4.1 A haploid kukoricatenyésztés eredményei

A beállított kísérletek során megvizsgáltuk a genotípusok hatását az antéraválaszra, a kalluszindukciós képességre és a kalluszokból történt organogén és embriogén (ezek egyidejű jelenléte esetében: morfogén) válaszra, valamint a zöld növények kifejlődésének gyakoriságára és a virágzáskori fertilitásra. A vizsgálatot először az kalluszindukcióért felelős géneket hordozó kínai genotípus közvetlen - de a nemesítői igényeknek megfelelően adaptált - utódain (DH 109 és DH 105 vonalak) és azok származékain vizsgáltuk (4.1.1.1), majd a kísérleteket a szomatikus (éretlen embrió eredetű) szövettenyészetekben használatos ún. „modell” genotípusokkal is elvégeztük (4.1.1.2).

Az antéraválasz szempontjából legjobbnak ítélt F_1 hibridekkel vetésidő kísérletet végeztünk (4.1.2). Mivel a vetés idejének hatását négy évben vizsgáltuk, így a különböző évjáratok alakulását is lehetőségünk nyílt elemezni (4.1.3)

A második rész bemutatja a vonalak és tesztereik általános és specifikus kombinálódó-képességét (4.2.1), kiegészítve a genotípusok morfológiai jellemzésével és betegség ellenállóságuk alakulásával (4.2.2). A fejezet végül ismerteti a DH vonalakból származó hibridek szántóföldi eredményeit és a kombinációk termésstabilitását (4.2.3).

4.1.1 A genotípus hatása a szövettenyésztés eredményeire

A szakirodalomban korábban leírtakból ismert, hogy a szövettenyésztés sikere - kukorica esetében - nagymértékben függ a genotípustól (Brettel *et al.*, 1981; Phillips *et al.*, 1988). Az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének Sejtbiológiai Osztályán megbízhatóan működő és jó regenerációs eredményt mutató, antéra alapú szövettenyésztési rendszert fejlesztettek ki (Barnabás *et al.*, 1999). A kísérletek kezdetén elsőként azokat a genotípusokat vizsgáltuk meg, amelyekre a szövettenyésztési technikát optimalizálták, majd olyan vonalakat vontunk be, amelyek ismereteink szerint elsősorban más típusú (diploid) szövettenyészetekben reagálnak jól (éretlen, vagy érett embrió, illetve merisztéma tenyészetekben).

4.1.1.1 Dihaploid vonalak és származékainak vizsgálata

Kísérleteinkben elsőként a kiindulási kínai vonal közvetlen származékainak (DH 109 és DH 105), valamint a későbbiekben ezekből előállított genotípusok különböző tenyésztési fázisokban adott reakcióit vizsgáltuk meg. Az egyes lépésekben kapott indukciós értékeket az 4-7. számú táblázatok mutatják be. A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten). A táblázatok első és második oszlopában a vizsgált genotípusokat, illetve azok elnevezésénél informatívabb genetikai hátterét tüntettük fel. A táblázatok utolsó három oszlopa tartalmazza a két kísérleti év (2004-2005) és a három ismétlés átlagából számított értékeket.

4. táblázat A DH 109 és származékainak antéraválasza és kalluszindukciója

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	TENYÉSZTETT ANTÉRASZÁM (DB)	ANTÉRA-VÁLASZ (%)	ABSZOLÚT KALLUSZ-INDUKCIÓ (%)	RELATÍV KALLUSZ-INDUKCIÓ (%)
DH 109	Chi 592	900	13,11 e	47,55 d	365,33 a
HMv 5405	HMv 5405	900	1,33 f	1,78 f	139,00 d
DH 109 * HMv5405	F_1 kombináció	900	39,94 a	87,00 b	220,33 c
HMv 5405 * DH109	F_1 kombináció	900	34,55 b	76,39 bc	232,33 c
DH 136	DH 109 * HMv 5405	900	25,27 c	73,83 c	290,50 b
DH 143	(DH 109 * HMv 5405) * HMv 5405	900	13,33 e	26,22 e	196,33 c
DH 31	HMv 5405 * DH109	900	32,66 b	105,66 a	328,00 ab
DH 141	(HMv 5405 * DH 109) *HMv 5405	900	18,83 d	55,66 d	300,83 b
$SzD_{5\%}$			4,83	11,11	43,39

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A DH 109 eredetű vonalak egymáshoz viszonyítva, valamint a HMv 5405 vonalhoz képest is statisztikailag igazolható különbségeket mutattak az antéraválasz tekintetében (4. táblázat). Az F_1 hibridek a tulajdonságra nézve heterózis- és reciprokhatást mutattak. A DH 109 genotípus 13,11% -os eredménye statisztikailag igazolhatóan elmarad egyes back-cross kombinációból létrehozott DH vonalak értékeitől (pl.: DH 141) valamint az F_1 hibridek közvetlen származékaitól (DH 136 és DH

31). A HMv 5405 esetében kis mértékű antéraválaszt tapasztaltunk. A DH vonalak között általában az egyszeres keresztezésből származó vonalak magasabb indukciós képességűek voltak (a donor vonal genomját 50%-ban hordozzák), mint a back-cross kombinációkból származók (csak 25%-ban DH 109 eredetűek).

Abban az esetben, ha az antéránkénti átlagos kallusszám egynél több volt (relatív kalluszindukció), akkor az megnövelte a 900 db lerakott portokra vonatkoztatott összes kalluszszám értékét is (abszolút kalluszindukció). Ennek következtében a DH 31 genotípus a kellően magas antéraválaszával (32,66%) és a portokonkénti 3-4 db kallusz fejlődésével érte el a legmagasabb kalluszprodukciót (105%, azaz 900 lerakott antérából pontosan 951 db kallusz fejlődött). Hasonlóan magas - de statisztikailag nem azonos - értéket értek el az F_1 hibridek és a DH 136 is. A hibridek között volt reciprokhatás. A DH 109 esetében volt a legmagasabb a relatív kalluszindukció (365,33%), ami a kisebb antéraválasz miatt nem eredményezett nagy abszolút kalluszindukciót (47,55%). A HMv 5405 esetében az egy antérán fejlődő kalluszok száma átlagosan 1,4 db volt (12 db válaszadó portokot és 16 db összes fejlődött kalluszt jelentett).

A 5. számú táblázat harmadik oszlopában a kiindulási 900 antérából származó összes - vizsgálatra alkalmas - kallusszámot tüntettük fel. Az utolsó három oszlop adatai mutatják be a kalluszokon megjelenő morfogén változások százalékos alakulását, valamint a regenerálható intakt növények arányát és azok felnevelése után a fertilitást.

5. táblázat A DH 109 és származékainak növényregenerációja

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	VIZSGÁLT KALLUSZOK SZÁMA (DB)	MORFOGÉN VÁLASZ (%)	ZÖLD NÖVÉNY GYAKORISÁG (%)	FERTILITÁS (%)
DH 109	Chi 592	426	4,00 d	0,47 d	100,00 a
HMv 5405	HMv 5405	16	0,00 e	-	-
DH109*HMv5405	F_1 kombináció	783	11,16 b	3,19 b	81,21 b
HMv5405*DH109	F_1 kombináció	687	11,11 b	3,41 b	79,85 b
DH 136	DH 109 * HMv 5405	665	8,66 c	1,50 c	63,53 c
DH 143	(DH 109 * HMv5405) * HMv 5405	237	7,11 c	0,00 e	-
DH 31	HMv 5405 * DH 109	951	15,22 a	1,10 c	78,20 b
DH 141	(HMv5405 * DH 109) * HMv 5405	501	8,50 c	7,78 a	44,11 d
$SzD_{5\%}$			1,97	0,51	13,51

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A morfogén válasz esetében a hibridek előnye jelentős volt a DH vonalakhoz képest, kivétel ez alól a DH 31, melynél a 951 továbbtenyésztett kalluszból 137 db mutatott morfogén aktivitást (a 900 lerakott antérához viszonyítva ez 15,22%-ot jelent). A martonvásári vonal esetében a 16 db kallusz egyike sem adott morfogén választ. Az egyszeres keresztezésekből származó DH vonalak e tulajdonságban is jobbak a back-cross kombinációkból kialakított vonalaknál.

A DH 141 esetében átlagosan 39 db intakt növényt tudtunk felnevelni. A hibridekből származó regenerált növények száma 23 és 25 db volt. A DH vonalakból kísérletenként csak 10-10 növényt sikerült fenntartani.

A klímakamrás felnevelés után azokat a növényeket felvételeztük, amelyek csövein 10 szemnél több egészséges és jól termékenyült szemet találtunk. Ennek alapján a felnevelt növények kb. 60-80%-ban termékenyültek a kívánt mértékben. Kivétel ez alól a DH 141, ahol a növények több mint fele nem hozott szemtermést kellő mennyiségben. Ezt feltételezésünk szerint a kisebb spontán kromoszóma reduplikációs képesség okozhatta, de vizsgálatot a későbbiekben e témában nem folytattunk. A 6. és 7. táblázatok a korábban leírtaknak megfelelően ismerteti a DH 105 és a HMv 5405 származékainak szövettenyésztésben kapott értékeit.

6. táblázat A DH 105 és származékainak antéraválasza és kalluszindukciója

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	TENYÉSZTETT ANTÉRASZÁM (DB)	ANTÉRA-VÁLASZ (%)	ABSZOLÚT KALLUSZ-INDUKCIÓ (%)	RELATÍV KALLUSZ-INDUKCIÓ (%)
DH 105	SR 88 * Chi 592	900	8,06 d	11,67 bc	144,53 ab
HMv 5405	HMv 5405	900	1,33 e	1,78 c	139,00 ab
DH 105 * HMv5405	F_1 kombináció	900	27,33 a	34,11 a	125,36 b
HMv 5405 * DH105	F_1 kombináció	900	25,83 a	43,83 a	169,11 a
DH 57	DH 105 * HMv 5405	900	15,44 bc	17,28 b	111,72 b
DH 64	DH 105 * HMv 5405	900	17,06 b	19,22 b	112,69 b
DH 56	(DH 105 * HMv 5405) * HMv 5405	900	10,67 cd	15,44 b	144,41 ab
$SzD_{5\%}$			4,83	11,11	43,39

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A DH 105 és HMv 5405-el végzett keresztezési kísérletből származó DH genotípusok a korábbi kísérletekhez hasonlóan szerepeltek, a vonalakkal alkotott F_1 hibridek a tulajdonságra nézve heterózishatást mutattak és 25-27%-os antéraválasszal reagáltak a tenyésztésre. Reciprokhatást e

tulajdonságra nézve nem tapasztaltunk. A relatív kalluszindukció értékei a korábbiak alapján várt értékeknél alacsonyabbnak bizonyultak. A DH 57 és a DH 64 vonalak azonos hibridkombinációból származó, genetikailag rokon, de eltérő, gametoklón variációk.

A szövettenyésztés során a DH 105 és rokonsági köre a legtöbb vizsgált tulajdonságban azonos módon reagáltak, mint a DH 109 esetében, statisztikailag nem jelentős eltérésekkel (kivétel a felnevelt növények fertilitásában volt). A visszakeresztezésből származó DH vonal (DH 56) nem, vagy csak egyes esetekben adott szignifikánsan alacsonyabb értékeket a hibridek közvetlen DH származékaihoz képest. Az F_1 hibridek és a kombinációikból korábban előállított vonalak között a legtöbb tulajdonságra nézve jelentős különbségeket találtunk, általában kisebb értékeket értek el a DH vonalak, míg a zöld növény gyakoriság tekintetében felülmúlták a hibrideket.

7. táblázat A DH 105 és származékainak növényregenerációja.

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	VIZSGÁLT KALLUSZOK SZÁMA (DB)	MORFOGÉN VÁLASZ (%)	ZÖLD NÖVÉNY GYAKORISÁG (%)	FERTILITÁS (%)
DH 105	SR 88 * Chi 592	105	9,05 b	3,33 a	57,14 a
HMv 5405	HMv 5405	16	0,00 d	-	-
DH 105 * HMv5405	F_1 kombináció	307	12,05 a	1,63 b	60,00 a
HMv 5405 * DH105	F_1 kombináció	395	9,00 b	1,65 b	38,46 b
DH 57	DH 105 * HMv 5405	156	5,79 c	3,54 a	27,27 b
DH 64	DH 105 * HMv 5405	173	5,20 c	3,18 a	63,64 a
DH 56	(DH 105 * HMv5405) * HMv 5405	139	5,04 c	3,24 a	33,33 b
$SzD_{5\%}$			1,97	0,51	13,51

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A morfogén válasz esetében mind heterózishatás, mind reciprokhatás megfigyelhető volt a hibrideknél (ellentétben a DH 109 hibridjeinek vizsgálatakor tapasztaltakkal). A keletkezett összes kallusz mennyisége jóval alacsonyabb volt a korábbiakhoz képest, az antérák összes számához viszonyítva az egy portokra eső átlagos kallusz szám csak mintegy fele - harmada volt. A kevesebb tenyésztésre alkalmas kallusz és az alacsonyabb zöld növény gyakoriság következtében a genotípusonként felnevelt átlagos növényszám is jóval alatta maradt a korábban tapasztalt értékeknek (átlagosan 3 és 5 db között), és a kevesebb regenerált intakt növény átlagosan 30-60%-a rendelkezett az általunk várt szintnek megfelelő fertilitással.

4.1.1.2 Modell genotípusok haploid kalluszindukciója

A haploid kalluszindukción alapuló szövettenyésztési rendszert olyan genotípusokon is vizsgáltuk, amelyeket más szövettenyésztési eljárásokban nagy megbízhatósággal működnek. Ezeknek a genotípusoknak az eredményeit mutatják be az 8. és a 9. számú táblázatok.

A tenyésztés körülményei a fentiekhez hasonlóak voltak és nem változtattunk a táptalajok összetételén, vagy az inkubálás körülményein sem. A statisztikai elemzést a relatív kalluszindukció kiszámításáig végeztünk, mert a növényregeneráció során nem keletkezett az elemzésekhez szükséges mennyiségű, értékelhető adat.

8. táblázat Az éretlen embrió tenyésztésben használt genotípusok antéraválasza és kalluszindukciója

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	TENYÉSZTETT ANTÉRASZÁM (DB)	ANTÉRA VÁLASZ (%)	ABSZOLÚT KALLUSZ INDUKCIÓ (%)	RELATÍV KALLUSZ INDUKCIÓ (%)
A 188	4-29(SK)* 46 (N.W.D.)4^4	900	0,11 c	0,00 c	100,00 d
B 73	ISSS C5	900	0,00 c	-	-
4C1	(Chi 31* GK 3)* (A 188 * W 64 A)	900	0,44 bc	0,89 b	200,00 b
Mv Aranyos	F_1	900	0,00 c	-	-
Mv Julius	F_1	900	0,78 b	1,11 b	142,86 c
Mv Honey	F_1	900	0,44 bc	1,00 b	225,00 b
Oh 43	Oh 40 B * W 8	900	2,22 a	6,88 a	320,00 a
$SzD_{5\%}$			0,48	0,54	40,62

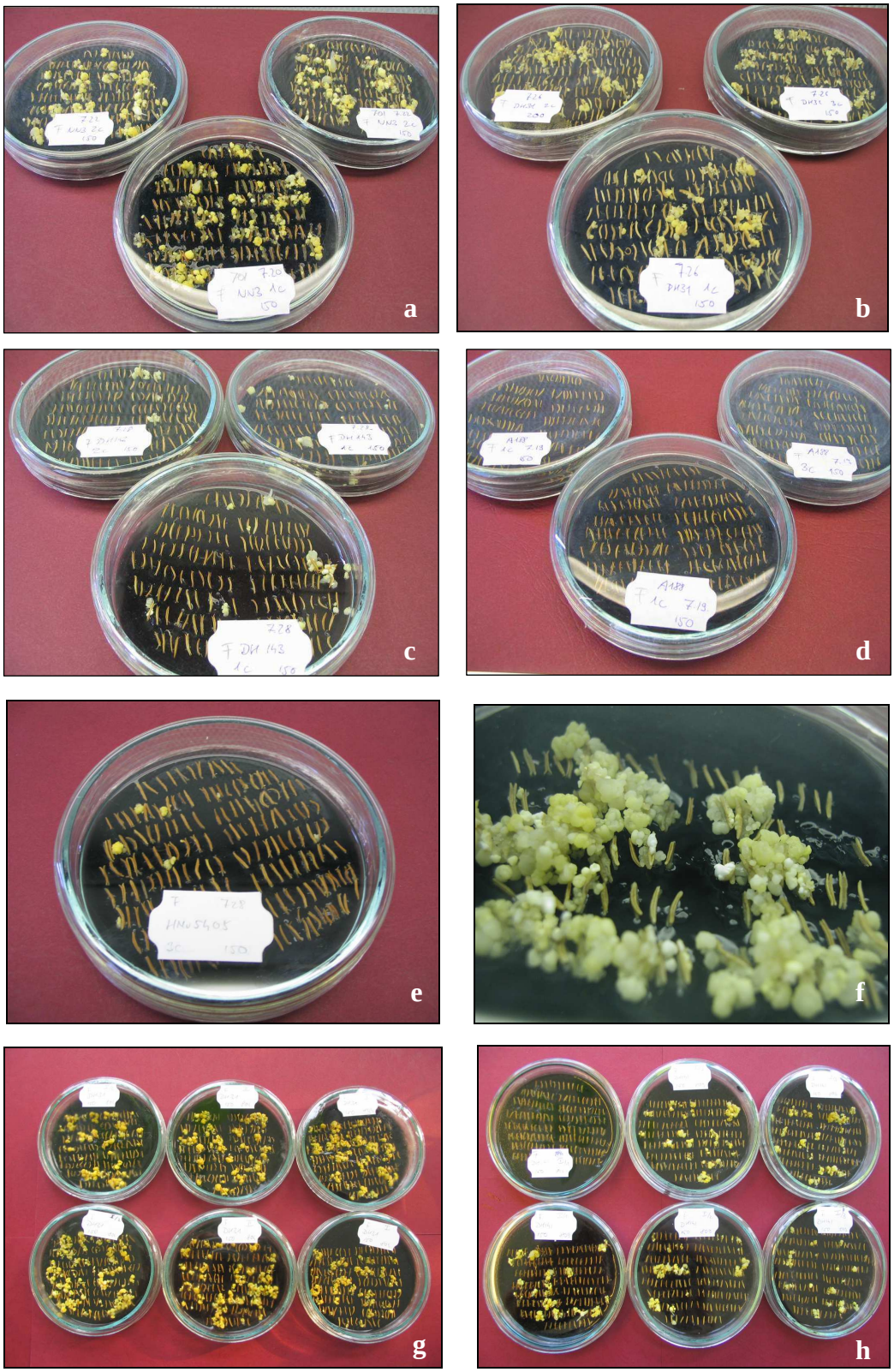
A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

9. táblázat Az éretlen embrió tenyésztésben használt genotípusok növényregenerációja (az adatokkal statisztikai elemzés nem történt)

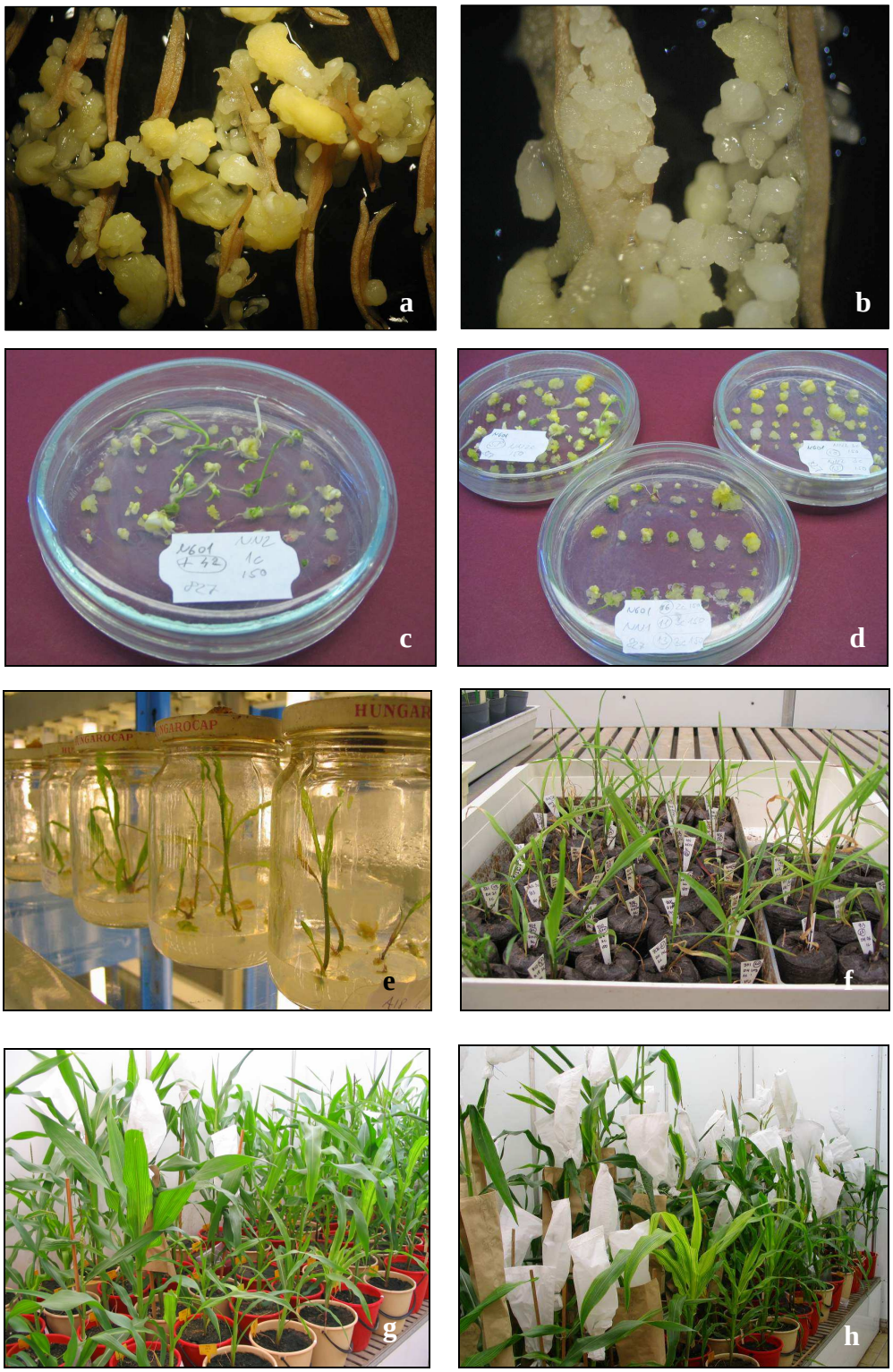
GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	VIZSGÁLT KALLUSZOK SZÁMA (DB)	MORFOGÉN VÁLASZ (%)	ZÖLD NÖVÉNY GYAKORISÁG (%)	FERTILITÁS (%)
A 188	4-29(SK)* 46 (N.W.D.)4^4	0	-	-	-
B 73	ISSS C5	0	-	-	-
4C1	(Chi 31* GK 3)* (A 188*W 64 A)	8	12,50	0,00	-
Mv Aranyos	F_1	0	-	-	-
Mv Julius	F_1	10	40,00	0,00	-
Mv Honey	F_1	9	0,00	-	-
Oh 43	Oh 40 B * W 8	62	0,00	-	-
$SzD_{5\%}$			-	-	-

A genotípusonként három ismétlésben leoltott, összesen 900-900 antérából az Oh 43 vonal esetében fejlődött a legnagyobb mennyiségben kallusz (62 db). Ezek azonban felszínükön nem mutattak organogén, vagy embriogén változást. A 4C1 hibrid, valamint az Mv Julius csemegekukorica kevés számú kalluszt produkált és bár találtunk morfogén változást a szövetek felszínén, azokból az intakt növények regenerációja nem sikerült.

Az előző fejezetekben ismertetett genotípusok antéraválaszát és kalluszindukciós képességét a 4. ábra, a növényregenerációs eredményeket a 5. ábra mutatja be.



4. ábra A vizsgált genotípusok antéraválaszainak és kalluszindukciós képességének szemléltetése. (a) DH 109*HMv 5405; (b, f, g) DH 31; (c) DH 143; (d) A 188; (e) HMv 5405, (h) DH 141 genotípusok



5. ábra Antéraválasz (a, b), növényregeneráció (c, d,e), a fejlődött növények felnevelésének lépései (f, g) és a fitotroni megporzás a DH_0 generációban (h)

4.1.2 A vetésidő hatása a szövettenyésztés eredményeire

A vetésidő hatásának vizsgálatára a legjobban reagáló, DH 109 és a HMv 5405 keresztezéséből származó hibridet, illetve ennek reciprokát használtuk. Az adatokat négy évben, négy különböző időpontban vetett növények antérájából származó szövettenyészetekből felvételeztük. A 10. táblázatban csak az antéraválaszt és a kalluszindukciós értékeket tüntettük fel, mert a tenyésztést a kalluszok számának meghatározásáig folytattuk és a későbbiekben nem történt növényregeneráció.

Az egyes vetési időpontokban kapott értékek a táblázat utolsó előtti négy oszlopában vannak feltüntetve. Az adatok alkalmasak voltak a különböző vetési időpontok, valamint a hibridek közötti reciprokhatás kimutatására is.

10. táblázat A vetésidő hatása a DH 109 és a HMv 5405 vonalak reciprok F_1 hibridjeinek antéraválaszára és a kalluszindukciós képességére (2005-2008)

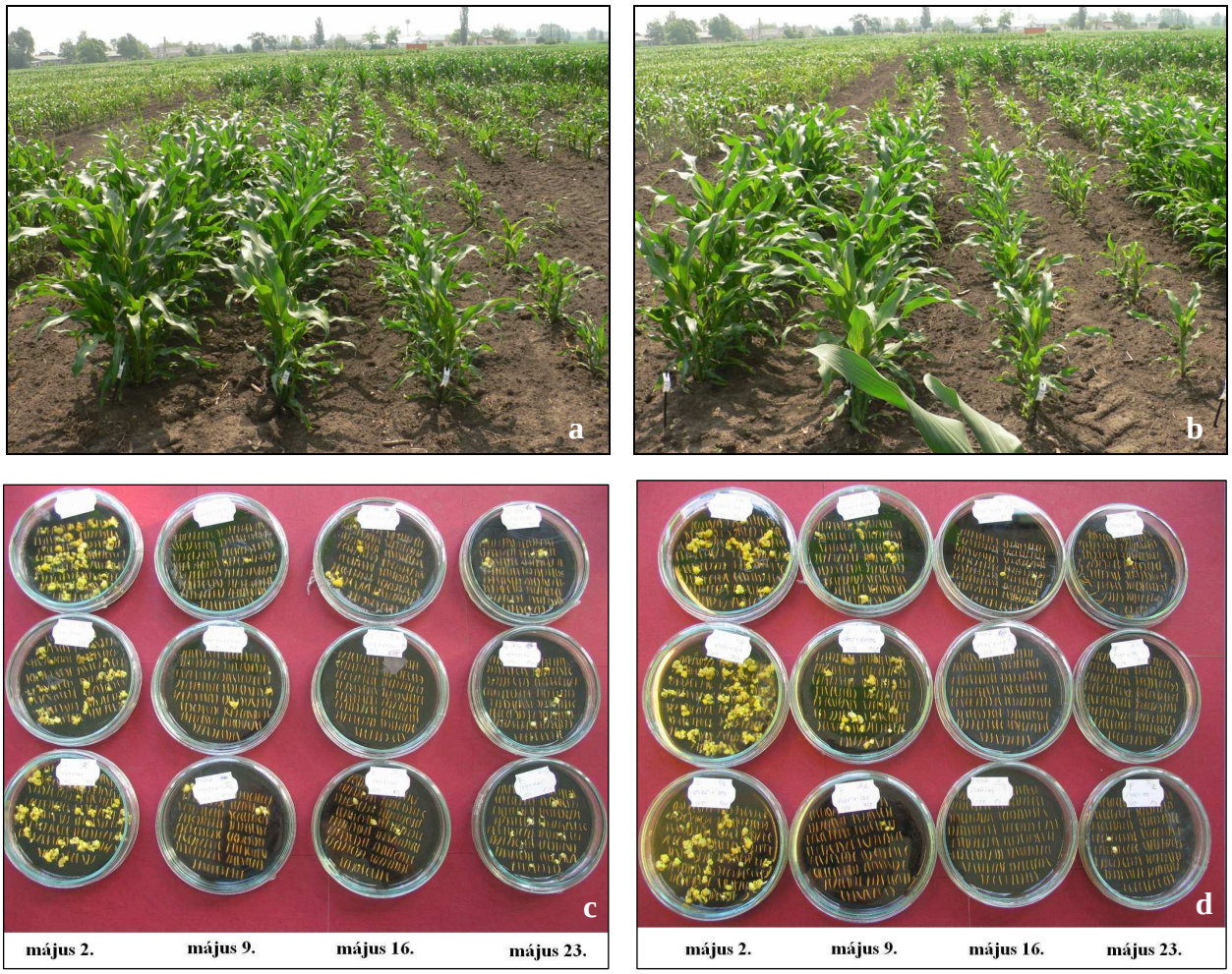
GENOTÍPUS	SZÖVETTENYÉSZTÉSI FÁZIS	Vetés: május 2.	Vetés: május 9.	Vetés: május 16.	Vetés: május 23.	$SzD_{5\%}$
DH 109 * HMv 5405	antéraválasz (%)	22,36 a	2,19 c	5,11 b	6,67 b	2,69
	abszolút kalluszindukció (%)	47,89 a	3,36 c	7,64 bc	10,89 b	7,22
	relatív kalluszindukció (%)	207,14 a	161,91 b	157,90 b	146,64 b	34,41
HMv 5405 * DH 109	antéraválasz (%)	27,94 a	5,33 c	8,61 b	5,22 c	2,69
	abszolút kalluszindukció (%)	58,94 a	8,53 b	8,96 b	7,33 b	7,22
	relatív kalluszindukció (%)	226,69 a	174,49 b	183,91 b	156,42 b	34,41

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó oszlopában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A négy vetésidő közül az első (a május 2-i) esetben tapasztaltuk a legintenzívebb kalluszképződést. Az antéraválasz és abszolút kalluszindukciós értékek esetében 15%, illetve 25% - al alacsonyabbak voltak, mint a korábbi, a DH 109 és HMv 5405 hibridjével elvégzett genotípus vizsgálatban. Ennek oka részben az lehet, hogy az eredmények négy év átlagából származnak. A május 2.-a után vetett hibridek minden évben mindkét hibrid esetében statisztikailag is igazolhatóan kevesebb kalluszt fejlesztettek, és a leoltott antéraszámra vonatkoztatott összes kallusz mennyisége is jelentősen alacsonyabb volt. A május 9., 16. és 23.-i vetések között kisebb - esetenként szignifikáns - eltérésekkel találkoztunk, amelyek azonban nem közelítették meg a legkorábbi vetés eredményeit. A táblázat adataiból kitűnik, hogy a legkorábbi vetésidő (Magyarországon a

szemeskukorica termesztőknek ajánlott kukoricavetés szempontjából a vetésidő utolsó dekádjának eleje) kedvező hatással volt a kalluszindukciós képességre (6. ábra).

A hibridek között az első három vetésidőben statisztikailag igazolható reciprokhatásokat találtunk, ami az antéraválasz esetében megfelel a genotípusok vizsgálatakor korábban leírtakkal. Az abszolút és relatív kalluszindukció esetében ez a megállapítás nem minden esetben igazolt.



6. ábra A vetésidő kísérletben vizsgált reciprok hibridek haploid kalluszindukciós eredményei. (a) HMv 5405*DH 109 hibrid heti késleltetéssel vetett, négy vetésidejének fejlettségbeli különbségei és (c) a frakciók kalluszindukciós eredményei. (b) DH 109*HMv 5405 hibrid heti késleltetéssel vetett, négy vetésidejének fejlettségbeli különbségei és (d) a frakciók kalluszindukciós eredményei. Vetésidők: május 2.; május 9.; május 16. és május 23.

4.2.3 Az évjárat hatása a szövettenyésztés eredményeire

Az évenkénti antéraválasz, abszolút és relatív kalluszindukciós értékeket a 11. táblázat mutatja be. Az utolsó előtti négy oszlop az évenként mért adatok százalékban megadott értékeit tartalmazza.

11. táblázat Az évjárat hatása a DH 109 és a HMv 5405 vonalak reciprok F_1 hibridjeinek antéraválaszára és a kalluszindukciós képességére (2005-2008)

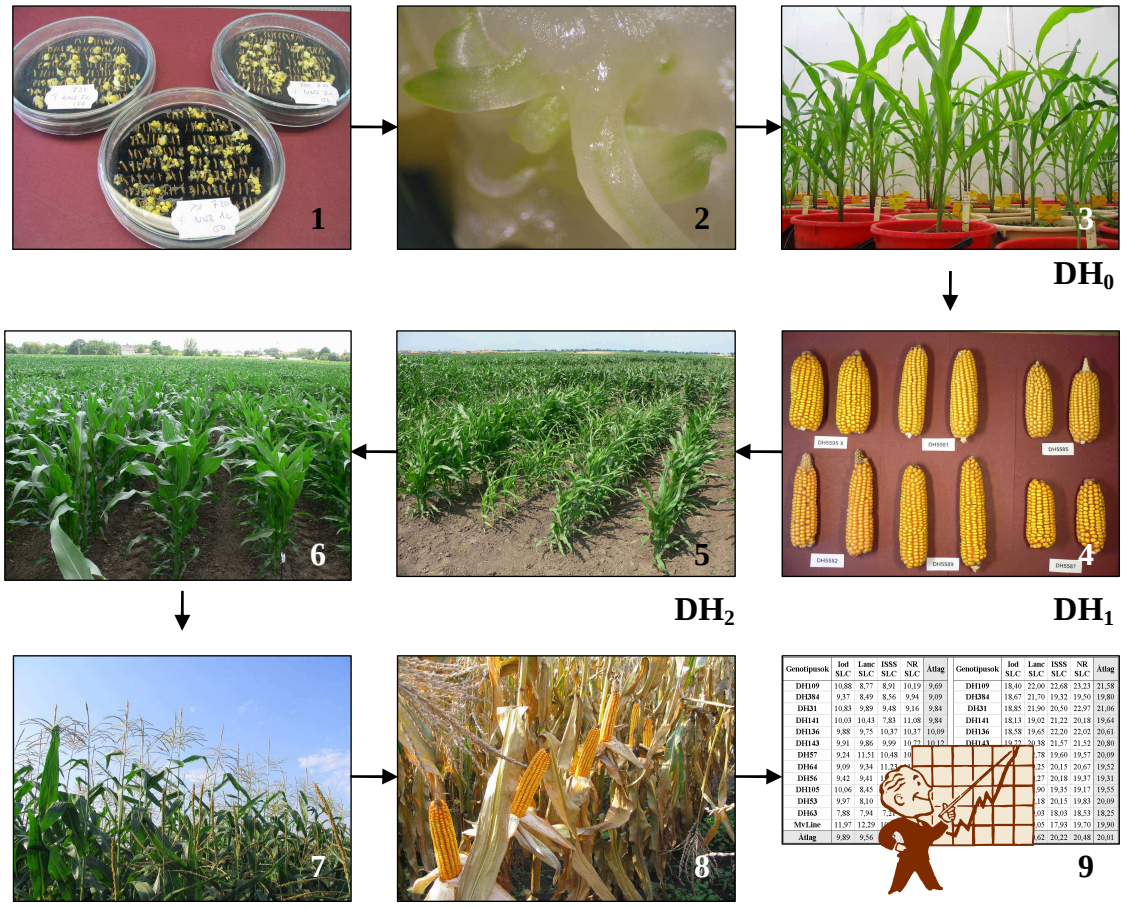
GENOTÍPUS	SZÖVETTENYÉSZTÉSI FÁZIS	2005	2006	2007	2008	$SzD_{5\%}$
DH 109 * HMv 5405	antéraválasz (%)	14,72 a	6,11 bc	5,00* c	10,48 ab	5,37
	abszolút kalluszindukció (%)	28,44 a	11,78 b	8,36* b	21,19 ab	14,44
	relatív kalluszindukció (%)	149,67 b	197,50 a	152,00 b	177,18 ab	33,32
HMv 5405 * DH 109	antéraválasz (%)	13,92 a	7,89 b	14,52 a	10,71 ab	5,37
	abszolút kalluszindukció (%)	24,78 a	16,17 a	29,58 a	22,64 a	14,44
	relatív kalluszindukció (%)	142,17 c	192,42 ab	225,67 a	183,40 b	33,32

* a kísérlet eredménye hibával terhelt
A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó oszlopában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A négy évben megismételt kísérletben észrevehetően voltak kisebb változások a kallusz produktivitásban. Az antéraválaszok értékei alapján a 2005., a 2007. és 2008. évek statisztikailag igazolhatóan nagyobb kalluszképződést mutattak 2006.-hoz képest (a táblázatban a 2007. évi csillaggal jelölt adatok a várt értékeknél jóval alacsonyabbak, amit kísérleti hiba - a táptalajok befertőződése - okozott). Az évek sorában 2005 és 2007 volt a legjobb13-14% körüli antéraválasz és 24-29% körüli abszolút kalluszindukciós átlaggal. 2008 ezektől kissé 2006 pedig határozattan gyengébben alakult. A relatív kalluszindukció a négy vetésidő átlagában 2 db portokonkénti kallusz alatt maradt, amit az utolsó három vetésidőből származó kisebb (200% alatti) kalluszprodukció okozott.

4.2 Szántóföldi vizsgálatok

A DH vonalakat és a HMv 5405 (kontroll) vonalat a martonvásári SLC teszterekkel kereszteztük, majd az így létrehozott MSC hibrideket szántóföldi teljesítmény-vizsgálatban értékeltük (7. ábra). A hibridek egy részét szarvasi és mezőkövesdi kísérleti területeinken is elvetettük, hogy kisebb mintán tanulmányozhassuk a DH szülőkomponensű hibridek különböző termőhely és évjárat reakcióját.



Genotípusok	Iod SLC	Lanc SLC	ISSS SLC	NR SLC	Átlag
DH109	10,88	8,77	8,91	10,19	9,69
DH384	9,37	8,49	8,56	9,94	9,09
DH31	10,83	9,89	9,48	9,16	9,84
DH141	10,03	10,43	7,83	11,08	9,84
DH136	9,88	9,75	10,37	10,37	10,09
DH143	9,91	9,86	9,99	10,72	10,12
DH57	9,24	11,51	10,48	10	
DH64	9,09	9,34	11,33		
DH56	9,42	9,41			
DH105	10,06	8,45			
DH53	9,97	8,10			
DH63	7,88	7,94	7,24		
MvLine	11,97	12,29			
Átlag	9,89	9,56			

Genotípusok	Iod SLC	Lanc SLC	ISSS SLC	NR SLC	Átlag
DH109	18,40	22,00	22,68	23,23	21,58
DH384	18,67	21,70	19,32	19,50	19,80
DH31	18,85	21,90	20,50	22,97	21,06
DH141	18,13	19,02	21,22	20,18	19,64
DH136	18,58	19,65	22,20	22,02	20,61
DH143	19,72	20,38	21,57	21,52	20,80
DH57		78	19,60	19,57	20,09
DH64		25	20,15	20,67	19,52
DH56		27	20,18	19,37	19,31
DH105		90	19,35	19,17	19,55
DH53		18	20,15	19,83	20,09
DH63		03	18,03	18,53	18,25
MvLine		05	17,93	19,70	19,90
Átlag		62	20,22	20,48	20,01

7. ábra A DH vonalak előállításának, felszaporításának, tesztkeresztezéseinek és utódjaik szántóföldi teljesítmény-vizsgálatának folyamatábrája a szövettenyészettől a kombinálódó-képesség vizsgálatokig. (1) kalluszindukció; (2) növényregeneráció; (3) DH_0 generáció felnevelése és öntermékenyítése; (4) a DH_1 generációban, szántóföldön öntermékenyített növények csövei; (5) DH_2 generáció a szántóföldön, öntermékenyítés és tesztkeresztezés; (6) DH szülőkomponensű hibridek a teljesítménykísérletben; hibridkísérlet (7) virágzáskor és (8) terméséréskor; (9) a hibridek teljesítményének kiértékelése és a szülővonalak GCA és SCA értékeinek kiszámítása.

Az általunk elvégzett szántóföldi teljesítményvizsgálatok utódbírálatként is felfoghatók, amelyből vissza lehet következtetni a szülővonalak nemesítési értékére. A kapott adatokból kiszámolhatóvá vált a DH vonalak általános és specifikus kombinálódó-képessége is.

A tenyészkertben elvetett szülővonalak, illetve a teljesítmény vizsgálatokba állított hibridek morfológiai tulajdonságait felvételeztük, megvizsgáltuk továbbá azok betegség ellenállóságát is. A továbbiakban ezeket az adatokat részletesen ismertetjük, a hibridek esetében azonban (nagy számuk miatt) csak intervallumokon belül közöljük a kombinációk tulajdonságainak alakulását.

4.2.1. A szülővonalak kombinálódó-képesség vizsgálata

A faktoriális párosítási modell alapján kísérletbe állított hibridek teljesítményét két fő komponensre osztottuk, majd ezeket mértük meg a betakarításkor. Az egyik a parcellánkénti termés mennyisége, míg a másik a betakarításkori szemnedvesség értéke volt (12. és 13. táblázatok). A táblázatok első oszlopa ismerteti a DH vonalak nevét, a második azok genetikai hátterét. A táblázatok utolsó oszlopa mutatja meg a vonalak általános kombinálódó-képességét (GCA), amit a három hibridjének termésátlagából és a kísérleti főátlag különbségéből számoltunk ki.

A táblázatok fejlécében a teszterek származás szerint meghatározott nevei szerepelnek. A hozzájuk tartozó hibridek eredményei az alattuk lévő oszlopokban vannak (összesen 13- 13), az utolsó sorban pedig azok teljesítményéből számított GCA értéket tüntettük fel. Ez az általános kombinálódó-képesség tehát a tesztereké és azoknak a kísérletre vonatkoztatott értékét mutatja meg.

Az oszlopok és sorok metszéspontjaiban a szülővonalak adott hibridkombinációban realizált specifikus kombinálódó-képességét (SCA) tüntettük fel.

A táblázatokban a standardok átlaga és a főátlag nem szerepelnek, értékeiket a 8. ábrán tüntettük föl. A kapott GCA és SCA eredmények pozitív, illetve negatív számok, amik a szemtermés esetében a szülővonalak termésnövelő és terméscsökkentő, a szemnedvesség esetében a szemek víztartalmát növelő és csökkentő hatását mutatják.

12. táblázat A 12 DH és a HMv 5405 vonalak szemtermésre vonatkozó általános és specifikus kombinálódó-képesség vizsgálata. (2005-2007).

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	LANC. SLC	ISSS SLC	NR SLC	GCA
			SCA		
DH 109	Chi 592	0,10	-0,31	0,21	-0,83
DH 384	Chi 592 * A2	-0,09	-0,29	0,38	-0,61
DH 136	DH 109 * HMv 5405	0,05	0,54	-0,59	**0,44**
DH 143	(DH 109 * HMv 5405) * HMv 5405	0,03	-0,15	**0,12**	**0,26**
DH 31	HMv 5405 * DH 109	0,54	0,52	-1,06	-0,41
DH 141	(HMv 5405 * DH 109) * HMv 5405	1,14	-1,28	0,14	-0,12
DH 105	SR 88 * Chi 592	-0,24	-0,18	0,42	-0,18
DH 57	DH 105 * HMv 5405	0,65	0,05	-0,70	**0,52**
DH 64	DH 105 * HMv 5405	-0,84	0,89	-0,05	**0,22**
DH 56	(DH 105 * HMv 5405) * HMv 5405	-1,27	0,80	**0,47**	**0,70**
DH 53	HMv 651-4-ET3 * DH 105	-0,76	0,54	0,22	-0,08
DH 63	DH 104 * (HMv 5302 * HMv 124-2)	0,23	-0,30	0,07	-1,50
HMv 5405	HMv 5405	0,44	-0,82	**0,38**	**1,60**
GCA		-0,27	-0,23	**0,50**	

A számított értékek mértékegysége $t \cdot ha^{-1}$. A hibridek terméseredményeit a dolgozat mellékletében tüntettük fel (*M2 melléklet*).

A kiszámított GCA értékek alapján elmondható, hogy a vizsgált 12 DH vonal közül öt járult hozzá terméstöbblettel a hibridjeik teljesítményéhez (DH 56: 0,70 $t \cdot ha^{-1}$; DH 57: 0,52 $t \cdot ha^{-1}$, DH 136: 0,44 $t \cdot ha^{-1}$; DH 143: 0,26 $t \cdot ha^{-1}$, DH 64: 0,22 $t \cdot ha^{-1}$). Kimagasló termésjavító értékkel rendelkezett a kontroll (HMv 5405), amely átlagosan 1,60 $t \cdot ha^{-1}$ eredménynövekedést okozott a vele alkotott hibridekben. A teszterek közül a két fő rokonsági körtől különböző, harmadik teszter kombinálódó-képessége volt kedvező a hibridek teljesítményének kialakításában (0,50 $t \cdot ha^{-1}$).

Az SCA értékek nehezebben értelmezhetőek, mert eredményeik a szülők GCA értékeitől (javító hatásától) is függenek. A táblázat SCA adatai közül ezért azokat a pozitív értékeket emeljük ki, amelyeknél a szülők is javítottak a termésátlagon és a specifikus kombináció további terméstöbblettel járult a hibrid értékéhez. Ezek alapján a DH 56*NR SLC (0,47 $t \cdot ha^{-1}$); a HMv 5405*NR SLC (0,38 $t \cdot ha^{-1}$) és a DH 143*NR SLC (0,12 $t \cdot ha^{-1}$) hibridek válaszoltak a szülővonalak javító hatásán kívül további termésnövekedéssel.

Tizennégy olyan kombináció is szerepelt az adatok között, amelyek nagyobb, pozitív SCA érték mellett legalább az egyik szülője javító hatást mutatott. Ezek közül a legnagyobb értéket a DH 64*ISSS SLC (0,89 $t \cdot ha^{-1}$), a DH 56*ISSS SLC (0,80 $t \cdot ha^{-1}$); a DH 57*Lanc SLC (0,65 $t \cdot ha^{-1}$), a DH 136*ISSS SLC (0,54 $t \cdot ha^{-1}$) és a HMv 5405*Lanc SLC (0,44 $t \cdot ha^{-1}$) kombinációkban kaptuk.

A hibridek szemnedvesség értékeiből számított vonalankénti GCA és SCA értékek a 13. táblázatban vannak feltüntetve. Ebben az esetben a negatív értékeket keressük, mert a betakarításkor az alacsonyabb szemnedvesség érték elérése a kívánatos. A GCA és SCA értékek mértékegysége százalék, mivel azokat százalékos értékekből számítottuk ki.

13. táblázat A 12 DH és a HMv 5405 vonalak szemnedvességre vonatkozó általános és specifikus kombinálódó-képesség vizsgálata. (2005-2007)

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	LANC. SLC	ISSS SLC	NR SLC	GCA
			SCA		
DH 109	Chi 592	-0,46	0,08	0,39	2,34
DH 384	Chi 592 * A2	0,33	0,07	-0,40	**-0,62**
DH 136	DH 109 * HMv 5405	-1,18	0,67	0,52	1,14
DH 143	(DH 109 * HMv 5405) * HMv 5405	-0,99	0,45	0,54	0,25
DH 31	HMv 5405 * DH 109	0,82	-1,18	0,35	2,35
DH 141	(HMv 5405 * DH109) * HMv 5405	-1,28	1,39	-0,11	**-0,11**
DH 105	SR 88 * Chi 592	1,43	-0,99	-0,44	0,25
DH 57	DH 105 * HMv 5405	1,40	-0,74	-0,65	0,42
DH 64	DH 105 * HMv 5405	-0,49	0,43	0,06	**-0,52**
DH 56	(DH 105 * HMv 5405) * HMv 5405	-0,17	0,06	0,10	**-1,00**
DH 53	HMv 651-4-ET3 * DH 105	0,75	**-0,08**	-0,67	**-0,05**
DH 63	DH 104 * (HMv5302 * HMv 124-2)	-0,09	0,19	-0,10	**-3,09**
HMv 5405	HMv 5405	-0,05	**-0,36**	0,42	**-1,41**
GCA		0,22	**-0,51**	0,29	

A számított értékek mértékegysége százalék. A hibridek szemnedvesség eredményeit a dolgozat mellékletében tüntettük fel (*M3 melléklet*).

Hat DH vonal GCA értékei bizonyultak a tulajdonságot tekintve kedvezőnek, ezek 0,05 - 3,09%-kal javították hibridjeik betakarításkori szemnedvességét. A DH 63 jelentős javító értéket mutatott (a legkorábbi vonal volt a vizsgált növényanyagban).

A teszterek közül az ISSS SLC (-0,51%) vonal javította a hibridek szemnedvesség értékeit, a másik két teszter kis mértékben rontott, bár e tulajdonság összefügg azzal, hogy a Lanc SLC és az

NR SLC apák később virágoztak társaiknál. A HMv 5405 kontroll vonal szintén javított a kombinációk szemnedvesség értékein (-1,41%).

A hibridek közül két kombináció javított a szemnedvesség értéken a szülők javító hatásán kívül, azaz ezekben az esetekben negatív volt az SCA érték úgy, hogy a szülők GCA értékei is kisebb szemnedvesség elérését tették lehetővé a betakarításkor (negatív GCA). A legnagyobb javító SCA értéket a kontroll HMv 5405*ISSS SLC kombináció érte el további 0,36%-kal javítva a hibrid betakarításkori szemnedvesség értékét.

4.2.2 A DH vonalak és hibridjeik morfológiai jellemzői és betegség-ellenállósága

4.2.2.1 A morfológiai jellemzők vizsgálata

A következőkben a DH vonalak, a kontroll és a teszterek néhány morfológiai tulajdonságát ismertetjük (14. táblázat). A bemutatott tulajdonságok közül a növénymagasság, a csövek eredési magassága, a cső fölötti és alatti levélszám a növények általános külleméről nyújt ismertetőt, míg a címer-oldalágak száma részben utal az egzotikus rokontól való távolságra és az adaptáltság mértékére.

14. táblázat A 12 DH és a HMv 5405 vonalak, valamint tesztereik morfológiai jellemzői (Martonvásár, 2006-2007)

Genotípus	növény-magasság	csőeredési magasság	cső fölötti levélszám	cső alatti levélszám	címer oldalágak száma
DH 109	163,26 h	69,09 d	4,63 f	4,90 d	**14,26 b**
DH 384	137,18 k	39,11 j	3,53 g	4,89 d	8,29 f
DH 136	158,93 i	50,55 i	5,85 c	6,94 a	**12,50 d**
DH 143	164,04 h	64,90 ef	5,71 c	6,98 a	6,28 g
DH 31	149,20 j	66,25 ef	4,89 e	7,01 a	**13,50 c**
DH 141	167,00 gh	63,88 fg	5,35 d	6,03 bc	8,09 f
DH 105	199,04 de	81,01 b	5,40 d	6,94 a	9,18 e
DH 57	182,64 f	60,71 h	5,88 c	6,96 a	5,33 h
DH 64	168,63 g	51,63 i	5,80 c	6,11 b	6,20 g
DH 56	196,88 e	75,89 c	6,38 b	6,99 a	4,00 i
DH 53	**219,95 c**	**90,46 a**	5,00 e	6,05 bc	**15,19 a**
DH 63	**137,20 k**	**34,88 k**	4,55 f	4,90 d	4,69 hi
DH vonalak átlaga	*170,33*	*62,36*	*5,25*	*6,23*	*8,96*
HMv 5405	186,40 f	61,99 gh	5,70 c	5,99 bc	4,06 i
Lanc. SLC	182,86 f	69,08 d	5,83 c	6,03 bc	6,31 h
ISSS SLC	254,21 b	94,03 a	6,64 a	6,00 bc	9,55 e
NR SLC	281,90 a	92,25 a	6,84 a	6,98 a	1,19 j
$SzD_{5\%}$	3,88	2,63	0,23	0,16	0,70

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a táblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A vonalak küllemének alakulásából következtetni lehet a hibridjeik megjelenésére, azonban az egyes tulajdonságok meghatározása nem lehet döntő a vonal értékének megítélésében. A magasság, csőeredés illetve levélszám meghatározása arra alkalmas, hogy a vonalak között felbukkanó esetleges morfológiai anomáliák kiszűrhetők legyenek. A vizsgált DH vonalak növénymagassága 137 és 220 cm között volt, ami megfelel a beltenyésztett vonalak átlagos értékeinek (a HMv 5405 esetében például 186 cm). A csövek eredési magassága szintén hasonló volt a klasszikus nemesítéssel létrehozott beltenyésztett törzsek hasonló értékeihez (34 és 90 cm között; a HMv 5405 esetében 62 cm), a nagyobb növénymagassággal nagyobb csőeredési magasság párosult. A teszterek - SLC vonalak lévén - mutattak heterózishatást a tulajdonságokra nézve, mind növény-,

mind csőeredési magasságuk nagyobb volt a DH vonalakhoz képest (182-281 cm között, magasabb csőeredéssel: 67-94 cm között).

A cső fölötti és alatti levélszámban kisebb - néha statisztikailag is igazolható - eltéréseket tapasztaltunk a vonalak között, értékük 3,5 - 6,0 db, illetve 4,9 - 7,0 db között mozgott. Összes levélszámuk átlagosan 11,48 db volt (a HMv 5405 esetében 11,69 db, a teszterek esetében 12,5 db).

A címer-oldalágak számában jelentős különbségek voltak, az eredeti egzotikus vonalhoz közvetlen rokonságban lévő DH 109 még utal a származására (sok, átlagosan 14,26 db címerág). A DH 31, DH 136, DH 53 kivételével a vonalak többsége a hazai beltenyésztett vonalakhoz hasonló, az egzotikus tulajdonságokat nem hordozó címeralakulással rendelkezett (átlagosan 8,96 db elágazás).

Összességében elmondható, hogy a DH vonalak a fent említett morfológiai tulajdonságaikban esetenként statisztikailag eltértek a beltenyésztett törzs megfelelő adataitól, de lényegi különbségek a DH vonalak küllemében nem volt tapasztalható.

Az 52 hibrid morfológiai tulajdonságainak értékeit részletesen nem közöljük. A méréseket két évben (2005-2006) és négy ismétlésben végeztük el. A hibrid növények magasságának átlagos értéke 271 cm volt. A legalacsonyabb a DH 63*NR SLC kombináció volt 213 cm-es értékkel, míg a legmagasabb a DH 109*ISSS SLC 320,5 cm-es növénymagassággal. A standardok átlagos értéke 266,6 cm volt.

A kísérletben a csövek eredési magasságának főátlaga 114,4 cm volt. A legalacsonyabb 74,17 cm (DH 63*NR SLC), a legmagasabb 138,67 cm magasságban volt a növényen (DH 105*Lanc SLC). A standard átlag 107,59 cm volt.

Az átlagos cső fölötti és cső alatti levélszám 6,37 db (max. 5,5; min. 7,5) és 6,45 db (max. 4,7; min. 7,2) volt. A címer-oldalágak számát a hibridek esetében nem felvételeztük.

4.2.2.2 A betegség-ellenállóság vizsgálata

A DH vonalak, a kontroll és a teszterek betegségekkel szembeni ellenállóságát a 15. táblázatban foglaltuk össze. A *per se* értékelést négy ismétlésben végeztük el és az adatokat átlagoltuk. Az értékelés a korábban leírtaknak megfelelően félkvantitatív 1-5 skálán történt ahol az 5 a legkedvezőbb, az 1 a legrosszabb érték. Statisztikai elemzést az így felvett adatokkal nem végeztünk, a genotípusokra jellemző értékek csak tájékoztatásként szolgálnak

15. táblázat A 12 DH és a HMv 5405 vonalak, valamint tesztereik kezdeti fejlődése, szárszilárdsága és betegség-ellenállósága (Martonvásár, 2006)

Genotipus	kezdeti fejlődés	golyvásüszög	cső fuzárium	szárszilárdság
DH 109	3,63	4,25	4,63	4,08
DH 384	4,63	4,88	4,75	2,73
DH 136	3,38	4,75	4,00	4,70
DH 143	3,88	4,25	4,25	4,68
DH 31	3,38	4,75	4,13	4,31
DH 141	4,38	4,50	3,75	4,53
DH 105	4,00	4,75	4,75	4,13
DH 57	4,25	3,50	4,25	4,30
DH 64	4,38	4,00	4,00	3,39
DH 56	3,63	5,00	4,88	4,64
DH 53	4,38	4,75	4,13	3,00
DH 63	3,63	4,25	4,38	2,50
DH vonalak átlaga	*3,96*	*4,47*	*4,33*	*3,92*
HMv 5405	4,50	4,75	3,38	4,55
Lanc. SLC	4,88	4,75	4,13	4,59
ISSS SLC	5,00	4,75	4,88	4,66
NR SLC	5,00	4,75	4,00	4,70

Az adatok több ismétlés átlagai, melyekkel statisztikai elemzést nem végeztünk (a *per se* értékek: kezdeti fejlődés esetén (1 - gyenge; 3 - átlagos; 5 - jól fejlett), golyvás üszög és (cső) fuzáriumos fertőzöttség esetén (1 - erősen; 3 - közepesen; 5 - nem fertőzött), a szárszilárdság esetében (1 - gyenge; 3 - átlagos; 5 - erős szár).

A kezdeti fejlődés az SLC apáknál volt a legjobb, majd a DH 384 és a kontroll HMv 5405 következett. A DH vonalak többségének kelése és kezdeti fejlődése összességében megfelelő volt, komolyabb kelési hibát, vagy fiatalkori pusztulást - részben a kedvező tavaszi időjárási körülményeknek köszönhetően - nem tapasztaltunk. A vetéskor a szemek fuzáriumos fertőzöttsége nem volt jellemző.

Golyvásüszög (*Ustilago maydis*) fertőzöttség kis számban jelen volt ugyan a tenyészkertben, de ennek mértéke igen csekélynek bizonyult. A DH 57 kivételével a betegség megjelenése elhanyagolható volt.

Más a helyzet a csőpenész esetében, ahol a csövek egy részén *Fusarium ssp*. jelenléte észlelhető volt. A genotípusok közül a kontroll és a DH 141 esetében tapasztaltuk a kórokozó gyakoribb

előfordulását, de ezekben az esetekben sem volt a cső felszínének fertőzöttsége 10%-nál kiterjedtebb.

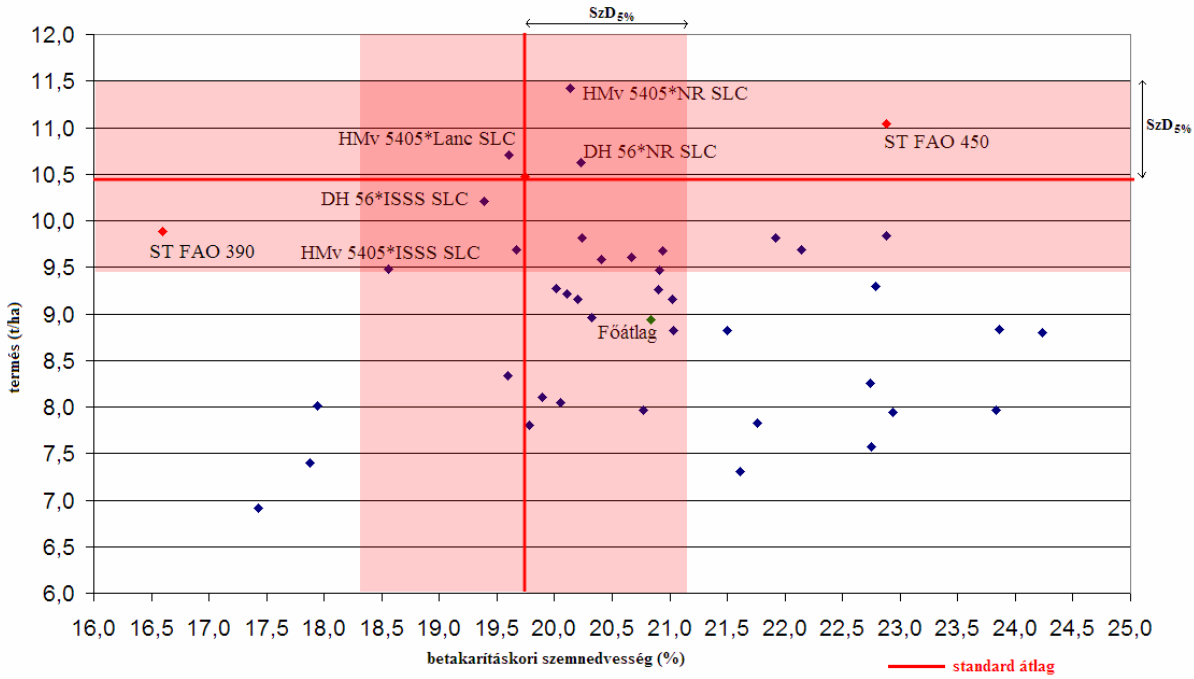
A szárszilárdsági érték két genotípus esetében volt az elvárt szintnél kisebb. Kísérleteinkben a leggyengébb szára a DH 384 és a DH 63 vonalaknak volt (2,73 és 2,50). A vizsgált vonalak, a kontroll és az SLC teszterek esetében fuzáriumos betegség, vagy mechanikai behatás (szél és eső) következtében keletkezett tömeges szárdőlést nem tapasztaltunk.

A vonalak keresztezéséből származó hibridek betegség ellenállóságát is felvételeztük, adatait azonban nem közöljük táblázatos formában. A kombinációk kezdeti fejlődésében nagyobb problémákat nem tapasztaltunk. A kelés és a fiatal növények fejlődése zavartalan volt. A kezdeti fejlődés értékei 3,75 - 5,00 között voltak. A kísérleti években számottevő golyvásüszög fertőzöttséget nem tapasztaltunk (4,5-5,0), valamint a szárszilárdsági értékek is 3,75 fölött alakultak. A korábban gyengébb szárúnak ítélt DH 384 és a DH 63 vonalakkal alkotott kombinációk esetében sem tapasztaltunk szárdőlést, a szárszilárdsági hiba utódokban kifejezett öröklődését nem tapasztaltuk.

Fuzáriumos csőfertőzöttség eseteként előfordult, de a fertőzöttség mértéke a csöveken 10-15% között maradt, ezért az értékek 3,75-5,0 között mozogtak. Összességében elmondható, hogy a standardok értékeitől nem tértek el jelentősen, azaz a csőpenész megjelenése nem volt jelentős és komolyabb terméskiesést nem okozott.

4.2.3 A hibridek teljesítménye és termésstabilitása

A 8. ábrán, diagramon ábrázoltuk a martonvásári kísérletben vizsgált 39 DH szülőkomponensű hibrid kombinált szemtermés és betakarításkori szemnedvesség értékeit. Az ábrán feltüntettük továbbá a standardok eredményeit, az átlagukat, a szignifikáns differencia értékeket és a főátlagot is.



8. ábra Termés és betakarításkori szemnedvesség diagram (Martonvásár, 2005-2007). A statisztikai analízis számított SzD értékeit P=5%-os hiba valószínűségi szinten mutatjuk be.

A vizsgált hibridek többsége (25 db) a standard átlaghoz viszonyítva statisztikailag igazolhatóan kevesebbet termett. Voltak azonban olyan DH vonal eredetű kombinációk (7 db) amelyek elérték, illetve egy esetben meghaladták a standard hibridek átlagát (DH 56*NR SLC). A vizsgált hibridek között a kontroll vonal egyik kombinációja elérte (HMv 5405*ISSS SLC), másik két esetben meghaladta (HMv 5405*Lanc SLC és HMv 5405*NR SLC) a standardok átlagát.

A vizsgált hibridek betakarításkori szemnedvesség értékeinek több mint fele a standardok által elért eredmények közelében alakult. A megfelelő szemnedvességgel azonban csak kevés esetben párosult magas termésérték, ezért a továbbiakban csak a négy legnagyobb szemtermésű kombináció értékeit elemeztük részletesebben. Ezek egyike sem haladta meg statisztikailag jelentősen a standardok eredményeit.

A kísérlet főátlaga 8,94 $t \cdot ha^{-1}$ volt, ami statisztikailag igazolhatóan kisebb ($SzD_{5\%}$: 1,02 $t \cdot ha^{-1}$), mint a standard átlag (10,46 $t \cdot ha^{-1}$). A legnagyobb szemtermést a HMv 5405*NR SLC hibrid adta 11,42 $t \cdot ha^{-1}$-os eredménnyel, felülmúlva ezzel a standardok eredményeit. A 36 DH vonal kombinációi közül összesen két hibrid termett 10 $t \cdot ha^{-1}$ felett (DH 56*NR SLC: 10,62 $t \cdot ha^{-1}$ és a DH 56*ISSS SLC: 10,21 $t \cdot ha^{-1}$). Hasonlóan kedvező eredményt ért még el a HMv 5405*Lanc SLC: 10,71 $t \cdot ha^{-1}$ kontroll kombináció is.

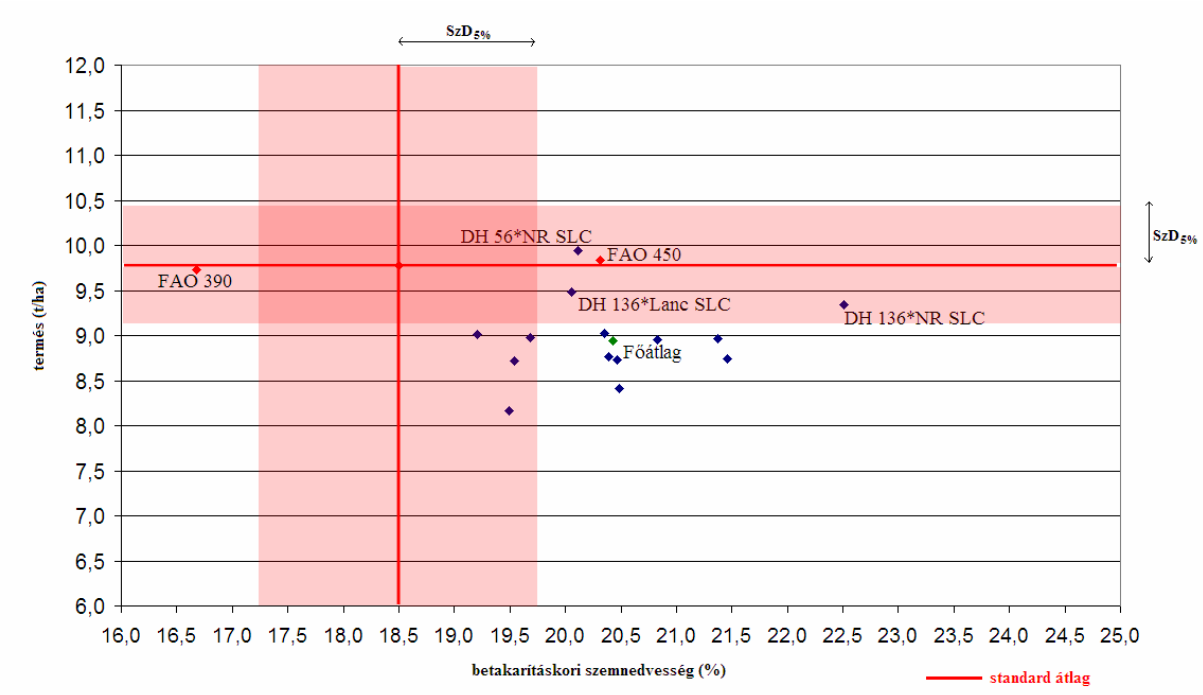
A betakarításkori szemnedvesség értékek tekintetében a kísérlet főátlaga 20,78%, a standard átlag 19,74% volt ($SzD_{5\%}$: 1,40%), azaz az eltérés nem volt jelentős közöttük. A hibridek közül 23 kombináció nem tért el statisztikailag igazolhatóan a standard hibridek átlagától, másik 13 jelentősen nagyobb, a maradék 3 pedig szignifikánsan kisebb szemnedvességet ért el betakarítás

idején. A standard átlagnál statisztikailag jelentősen kisebb szemnedvességgel nem járt nagy szemtermés.

A szemtermés és szemnedvesség értékek a hibridek eredményeinek átlagában normál eloszlást mutattak mindkét tulajdonságra nézve. A legtöbb hibrid szemtermése 8 és 10 t·ha^{-1} között, míg betakarításkori szemnedvesség értékeik 19 és 21% között alakult.

Martonvásári teljesítmény-vizsgálatoktól független, több termőhelyes kísérletekben is vizsgáltuk a DH eredetű kombinációkat és a különböző termőterületen mértük a termést és a betakarításkori szemnedvességet. A kísérletekben a hibridek termésstabilitására voltunk kíváncsiak a különböző agroökológiai viszonyok között. A három évben és három termőhelyen szerzett adatok alkalmasak voltak a termőhely és az évjárat hatásának vizsgálatára is.

A 9. ábrában tüntettük fel az egyes genotípusokhoz tartozó szemtermés- és betakarításkori szemnedvesség-értékeket.



9. ábra Termés és betakarításkori szemnedvesség diagram (Martonvásár-Szarvas-Mezőkövesd; 2006-2008). A statisztikai analízis számított SzD értékeit P=5%-os hiba valószínűségi szinten mutatjuk be.

Ha a több termőhelyről származó szemtermés adatokat összevetjük a csak Martonvásáron kapott értékekkel, észrevehető, hogy a standardok átlaga csökkent (10,46 t·ha^{-1}-ról 9,78 t·ha^{-1}-ra), míg a kísérlet főátlaga ugyanakkora volt a teljesítmény vizsgálatokban elért adatokhoz viszonyítva (8,94 t·ha^{-1} mindkét kísérletben).

A DH eredetű hybridek közül a DH 56*NR SLC hibrid (9,94 t·ha^{-1}) meghaladta a standard átlagot (9,78 t·ha^{-1}, $SzD_{5\%}$: 0,63 t·ha^{-1}), és a nagyobb termőképességű FAO 450 standard eredménye sem volt szignifikánsan magasabb (9,83 t·ha^{-1}). A DH 136*Lanc SLC és a DH 136*NR SLC

kombinációk 9,48 t·ha^{-1}; illetve 9,34 t·ha^{-1} eredményekkel elérték a standard hibridek átlagát. A további 11 darab DH szülőkomponensű kombináció nem felelt meg a kiindulási követelményeknek, 8,5-9,0 t·ha^{-1} körüli terméseredményeik több év és több termőhely átlagában is elmaradtak a várt értéktől.

A betakarításkori szemnedvesség értékek esetében a hibridek közül nem voltak a standard átlag alatt végzett, így jobbnak minősíthető kombinációk. Négy hibrid kivételével a hibridek statisztikailag jelentősen nagyobb szemnedvesség értéket értek el betakarításkor. A DH 56*NR SLC, a DH 136*Lanc SLC és a DH 136*NR SLC hibridek is a standard szemnedvesség átlagtól eltérő, szignifikánsabb nagyobb értékeket értek el. A kísérlet főátlagát tekintve a hibridek többsége 20,5% körül teljesített, ami még kedvezőnek minősül a betakarítás szempontjából, de statisztikailag kedvezőtlen eredmény a standardokhoz viszonyítva (standard átlag: 18,5%).

A 16. táblázat ugyanezen adatsorok három év és három termőhely szerint rendezett átlagait mutatja a szignifikáns differencia értékkel P=5%-os hibavalószínűségi szinten.

16. táblázat Átlagos termés és betakarításkori szemnedvesség értékek három termőhelyen és három évben (2006-2008)

Szemtermés (t·ha^{-1})		**Szemnedvesség (%)**	
2006	10,52 a	**2006**	20,46 a
2007	6,71 c	**2007**	19,30 b
2008	9,92 b	**2008**	20,79 a
SzD$_{5\%}$	0,27	**SzD$_{5\%}$**	0,53
Martonvásár	8,92 b	**Martonvásár**	21,07 a
Szarvas	9,17 a	**Szarvas**	19,30 b
Mezőkövesd	5,82*	**Mezőkövesd**	18,98*
SzD$_{5\%}$	0,22	**SzD$_{5\%}$**	0,44

* egy éves adatsor alapján
A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a résztáblázatok utolsó sorában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

A 2007. év termése statisztikailag igazolhatóan, lényegesen kisebb volt a másik két év eredményeihez képest (6,71 t·ha^{-1}). A szárazabb év következtében viszont a betakarításkori szemnedvesség értéke szignifikánsan kisebb volt (19,30%). A hibridek termésingadozása mindhárom évet tekintve jelentős volt (3,8 t·ha^{-1} legnagyobb különbséggel), esetenként statisztikailag igazolhatóan elérő szemnedvesség mellett.

A mezőkövesdi területet igen alacsony terméseredménye miatt (5,82 t·ha^{-1}) az elkövetkezendő években kizártuk a termőhelyek közül, ezért ennek adatai csak egy év, három ismétlésének átlagát mutatják meg. A martonvásári és szarvasi terméseredmények kísérletünkben szignifikánsan eltérnek

egymástól. A szemnedvesség értékek a mezőkövesdi és szarvasi területeken alacsonyabbak, a martonvásári területen magasabbak voltak.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az éveknek és a különböző termőhelyeknek szignifikáns hatása volt a termésre és betakarításkori szemnedvesség értékekre. A hibridek termésingadozása a tényezők változására bizonyos kombinációkban jelentősnek bizonyult. Ugyanakkor elmondható, hogy a standardok esetében is hasonló mértékű termés és betakarításkori szemnedvesség ingadozásokat tapasztaltunk (17. táblázat). A szemtermés alakulását az eltérő évjáratok nagyobb, a különböző termőhelyek kisebb mértékben befolyásolták. A betakarításkori szemnedvesség esetében inkább a termőhelyeknek volt jelentősebb hatása.

17. táblázat A standardok és a legjobban szereplő DH szülőkomponensű hibrid termés és betakarításkori szemnedvesség értékei, három termőhelyen és három évben (2006-2008)

		FAO 390	FAO 450	DH 56*NR SLC	SzD5%
szemtermés (t/ha)	2006	10,94 a	12,05 a	11,13 a	0,53
	2007	8,07 c	7,09 c	7,77 b	
	2008	10,16 b	9,53 b	10,91 a	
	Martonvásár	9,05 b	9,98 a	10,08 a	0,43
	Szarvas	9,94 a	9,67 a	9,79 a	
	Mezőkövesd	8,98 b	6,59 b	7,05 b	
betakarításkori szemnedvesség (%)	2006	14,86 b	21,5 a	20,05 ab	0,89
	2007	15,19 b	20,87 a	19,35 b	
	2008	19,98 a	18,55 b	20,93 a	
	Martonvásár	17,75 a	21,91 a	21,05 a	0,73
	Szarvas	15,61 b	18,70 c	19,17 b	
	Mezőkövesd	14,48 c	19,93 b	18,33 c	

A varianciaanalízis alapján szignifikánsan eltérő értékeket a különböző betűjelek (a, b, c, stb.) mutatják. A statisztikai analízis számított SzD értékei a résztáblázatok utolsó oszlopában vannak feltüntetve (P=5%-os hiba valószínűségi szinten).

5. MEGVITATÁS
(KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

5.1 A szövettenyésztés eredményei alapján tett következetések

A szövettenyésztés során használt genotípusokat - a kínai (hazánkban egzotikus küllemű, de a haploid kalluszindukcióért felelős géneket hordozó) és a martonvásári elit beltenyésztéses törzs keresztezéséből származó DH vonalakat - két csoportra bontottuk. A DH 109 és a DH 105 vonalak a kínai vonal közvetlen (DH 109), vagy közvetett (DH 105) leszármazottjai, amelyeket a hazai nemesítési igények szerint válogattak ki. E két DH vonallal előállított származási csoport szövettenyésztési reakcióját vizsgáltuk kísérleteinkben.

Megállapítható, hogy a DH 109 szülőkomponensű F_1 hibridek *antéraválasza* 34-40% között, míg DH utódainak ugyanezen értéke 13-32% között alakult. Ez utóbbi széles intervallum oka az, hogy a genetikai háttértől függően, az elit és kínai egyszeresekből származó DH vonalaknál nagyobb, míg az elittel visszakeresztezett BC_1 hibridekből származó vonalak esetében kisebb antéraválaszt tapasztaltunk. Ennek alapján az eredeti kínai szülőtől genetikailag távolabb eső DH származékok antéraválasza csökken. Ugyanakkor a képesség megbízhatóan öröklődik, és a tulajdonság a hibridekben heterózishatást mutat (Wenzel és Uhrig, 1981; Dieu és Beckert, 1986; Barnabás *et al.*, 1988; Balroy *et al.*, 1989), valamint keresztezéssel könnyen átvihető tulajdonság (Obert *et al.*, 1998). A reciprok kombinációk között - nem minden esetben - kifejezett anyai hatás is tapasztalható (Tomes és Smith, 1985).

A DH 105 vonal F_1 hibridjein és DH származékain végzett kísérletek a fenti megállapításainkat megerősítették. A hibridek 25-27% között, a DH vonalak - a DH 105-től való távolság függvényében - 10 és 17% között mutattak antéraválaszt. A gyakoriságok tehát azonos tendenciát mutattak a genotípusok között, de az értékek kisebbek voltak a DH 109-nél tapasztaltaktól. Ugyanakkor a két - indukciós tulajdonságra nézve - donor genotípus közül a DH 109 13,11%-os, a DH 105 pedig kisebb, 8,06%-os antéraválaszt mutatott.

A fenti eredmények alapján elmondható, hogy a 100%-ban kínai hátterű DH 109 vonallal végzett kísérletek antéraválasza és kalluszindukciós értékei nagyobbak voltak, így a további portoktenyésztési munkákban ennek a genotípusnak a használatát ajánljuk felhasználásra.

Genetikailag közel azonos származékok esetében (DH 57 és DH 64) - a fertilitás kivételével - nem tapasztaltunk statisztikailag igazolható különbségeket a tenyésztés legtöbb eredményére nézve.

A kísérletben az általunk használt martonvásári elit vonal is reagált a szövettenyésztésben. A HMv 5405 portokjaiból összesen 16 db kalluszt sikerült indukálni (1,78%). Ez arra enged következtetni, hogy egyes elit genotípusok között is lehetséges az indukció kis mértékű kiváltása

(4/e ábra). Hasonló eredményre jutott Brettel *et al.* (1981), aki az Mv 201 és a Seneca 60, Petolino és Jones (1986) a H 99, FR 16, Pa 91 vonalak keresztezésével, illetve Genovesi és Collins (1982) az A 188, W 22, B 73*Mo 17 és Alexho szintetikus, valamint a Black Mexican Sweet csemegekukoricával értek el gyenge indukciós eredményt.

Az *abszlút és relatív kalluszindukciót* tekintve a heterózis- és a reciprokhatás nem minden esetben kifejezett, és a vonalak-hibridek közötti különbségek is eltérőek. Az egy portokon fejlődő kalluszok összes mennyisége genotípusfüggő, de nem következetesen az antéraválasszal együtt változó eredmény (Barnabás *et al.*, 1988). A kevesebb indukálódó portok száma természetesen befolyásolja az összes képződő kallusz számot, de a válaszoló portokokon megjelenő mennyiség változó lehet, és nem mutat egyértelműen kimutatható összefüggést a genotípusok genetikai hovatartozásával. A vizsgált anyagok között vannak különbségek (főleg a DH 105 származékai esetében jelentkezik heterózishatás és a kínai vonaltól való genetikai távolság hatása), de ezek nem alkalmasak kellőképpen alátámasztható következtetések levonására. Például a DH 31 vonal minden más vizsgált anyagnál nagyobb abszolút kalluszindukciós eredményt mutatott (105,66%), ezért igen jól alkalmazható e technikában, de kitűnő - a hibridek értékét is felülmúló - eredményének magyarázatát nem vezethetjük vissza egyértelműen a genetikai hátterére. A DH 31 kedvező reakcióját részben a nagy indukciós gyakoriság (32,66%), részben a 328%-os relatív kalluszindukció okozta (4/f-g ábra).

Általánosságban elmondható, hogy amennyiben egy genotípus antéraválasza és relatív kalluszindukciós képessége megfelelő, akkor kellő mennyiségű kallusz keletkezik, amely megalapozhatja a további növényregenerációs munkák sikerét. A szövettenyésztésre való alkalmasság egyik alapfeltétele ugyanis az, hogy kellő számú kallusz keletkezzen az indukció során, ezáltal legyen mivel dolgozni a későbbi regenerációs műveletek folyamán (többszöri ismétlési lehetőséggel).

Megfelelő mennyiségű kallusz fejlődött a DH 109 származékain végzett vizsgálatokban: a DH 31, DH 136 vonalakon, valamint a F_1 és a reciprok kombinációkon (900 portokon összesen 951; 665; 783; illetve 687 db kallusz). A DH 105 rokonságán végzett kísérletek eredményei ettől elmaradtak, a legtöbb kalluszt az F_1 hibridek portokjairól sikerült izolálni (395 és 307 db). Ez értelemszerűen kisebb antéraválaszt és relatív kalluszindukciós eredményt (125-169%) is jelentett. A kalluszindukciós adatok alapján ismét megerősíthetjük, hogy a DH 109 genotípus kör tűnik alkalmasabbnak a szövettenyésztési munkákra (ld.: 4. és 6. táblázatok).

A tenyésztési körülmények és a tápközeg megváltoztatásának következményeként a kalluszok felszínén *embriogén és organogén* (ezek együttes jelenléte esetén *morfogén*) *válasz*t tapasztaltunk (5./c-d ábra). Az F_1 kombinációk e tulajdonságra nézve általában jobban teljesítettek, de a hibrid fölény és a reciprokhatás nem volt minden esetben egyértelmű. A kalluszok a DH 109 hibridjeinél

11%-ban, a DH 105 esetében 9-12% között adtak morfogén választ. A vizsgált vonalak közül a DH 136, DH 31 és a DH 105 genotípusok válasza volt kedvező. Ezek az eredmények a három ismétlésben kisebb változatosságot mutattak, de évenként megismételhetőnek bizonyultak. A HMv 5405 elit vonal esetében az összes indukált kallusz egyikén sem tapasztaltunk organogén, vagy embriogén aktivitást, a sejtek a növényregenerációs táptalajon nem differenciálódtak, lassan megbarnultak, amit többszöri átoltással sem tudtunk megállítani. A kísérletek alapján nem dönthető el, hogy ennél az általunk használt elit vonalnál jelentkező kismértékű kalluszindukció megismételhető-e más - a gyakorlat számára fontos - genotípusokon. Felvetjük azonban annak lehetőségét, hogy a keresés eredményes lehet, ha az széles genetikai bázison alapszik.

Amíg a morfogén válasz a kalluszok felszínén lejátszódó legkisebb differenciálódási reakciót mutatja meg, addig a *zöld növény gyakoriság* már konkrétabban, az összes kallusz számra vetített teljes (leveles, száras, gyökeres) növény regenerációját fejezi ki. E tekintetben tehát informatívabb, mert kifejezi a valódi növényregeneráció hatékonyságát. A DH 109 szülőkomponensű F_1 hibridek 3-3,5%-os, míg DH származékaik 0,5-1,5%-os növényregenerációs hatékonyságot mutattak. Kivétel ez alól a DH 141 volt, ahol a kalluszok 7,78%-a regenerált teljes növényt. A genotípusok között a DH 136 és a DH 31 a vártnál alacsonyabb regenerációs hatékonysággal rendelkezett. A DH 143 esetében viszont a 2 év során sikertelen volt a növényregeneráció. A hibrid fölény és az anyai hatás nem volt következetesen megállapítható. A DH 105 származékai esetében például a DH vonalak rendszerint fölülmúlták az F_1 hibridek eredményeit. A zöld növény gyakoriság azonban ebben az esetben kisebb, 1,5-3,5% között alakult.

A felnevelt intakt növények 60-80%-a termett 10 szemnél többet, ezért ezeket az egyedeket *fertilisnek* tekintettük, kivétel ez alól a - DH 109 származási csoportjából - a DH 141 volt (45%). A DH 105 és utódjainak esetében ez az arány rosszabb, 30-60% között alakult (ld.: 5. és 7. táblázatok).

Összességében elmondható, hogy a két genotípus csoport közül a DH 109, hibridjei és DH vonal származékai szerepeltek jobban a szövettenyésztés összes lépésében, így ezt a vonalat ajánljuk a további kísérletekben az indukciós képesség donorjaként használni. Származékai közül hasonló célra felhasználható még a DH 31 kitűnő abszolút és relatív kalluszindukciós képessége miatt, valamint a DH 141 megfelelő indukciós és kedvező növényregenerációs paraméterei alapján. A DH 109 szülőkomponensű F_1 hibridek a portoktenyésztés feltételeinek optimalizálásához is felhasználhatók, mert megbízhatóan reagálnak a tenyésztési körülmények megváltozására, ugyanakkor nagy indukciós hatékonysággal rendelkeznek optimális nevelési feltételek között.

Kísérleteink lehetőséget nyújtanak a DH vonal kihozatali képesség elméleti összehasonlítására az *in vitro* és *in vivo* (monoploid) módszerek között. Ez utóbbi módszer esetében szakirodalmi adatokat használunk, és ezeket a szövettenyésztésben tapasztalt eredményekkel vetjük össze.

Fontos, hogy az összehasonlítás célja nem a módszerek „versenyeztetése”, illetve annak eldöntése, hogy melyik a jobb, vagy rosszabb. Célunk annak feltárása, hogy a - kereskedelmi vonal előállítás számára megfelelő - monoploid módszerrel történő DH előállítási gyakoriság elérhető-e az *in vitro* módszerrel is?

A monoploid módszer eddig publikált leghatékonyabb módszere az RWS indukáló vonallal végzett keresztezési kísérletből származott. Ennek maximális haploidindukciós gyakorisága 8,3% volt (Röber *et al.*, 2005). Az előállított haploid vonalakat kolhicinnel kezelték, majd megállapították, hogy ezzel az eljárással a haploidok kb. 49,4%-a fejlődött DH növénnyé és 27,3%-ról sikerült magot fogni (Eder és Chalyk, 2002).

Számokban kifejezve ez 1000 termékenyült szemből 83 db haploid szemet jelent, amelyet csíráztatás után kolhicinnel kezeltek és az életben maradt, fertilis DH növények száma ekkor - átlagosan 49,4% túlélési aránnyal számolva - összesen 41 db fertilis DH növény volt. A 83 db növény 27,3%-a eredményezett megfelelő, stabilan fenntartható DH vonalat (23 db).

Az *in vitro* módszerrel az izolált portokszámra vonatkoztatva, az általunk tapasztalt legnagyobb zöld növény regenerációs hatékonyság 4,3% volt (1000 portokból összesen 43 db növény (szakirodalmi adatok szerint ez akár 17,8%, azaz 178 db regeneráns növény is lehet; Barnabás *et al.*, 2005).

Dieu és Beckert (1986) kísérletében arról számol be, hogy *in vitro* portoktenyészetből származó regeneráns növényeik 22,2%-a volt spontán DH. Ha ezt az arányt tekintjük, akkor a 178 növényből 38 db DH növényt és 21 db fenntartható, fertilis DH egyedet regenerálhatunk (11,8%-os fertilitás esetén, Barnabás *et al.*, 2005). Saját kísérletünkben, a DH 141 esetében a regeneránsok 44,1% volt fertilis (termett 10 szemnél többet), ezért összesen 19 származékot tudtunk tenyészkertünkben felszaporítani és fenntartani.

A kísérletben nem végeztünk kolhicinnel történő rediploidizációt. A fent említett számítások tehát csak elméletiek, de talán jól érzékeltetik azt, hogy a két technika fertilis DH növény regenerációjának maximális hatékonysága napjainkban többé-kevésbé hasonló (18. táblázat).

18. táblázat A DH vonal előállítás két technikájának haploid és DH növény kihozatali aránya szakirodalmi és saját adatok alapján

dihaploid vonalak előállítása							
monoploid módszerrel	szakirodalmi adatok		szakirodalmi adatok		saját adatok		*in vitro* módszerrel
	%	db	%	db	%	db	
termékenyült szem	100,0	1000	100,0	1000	100,0	1000	inokulált portok
haploid szem	8,3 [1.]	83	17,8 [3.]	178	4,3	43	regenerált zöld növény
spontán DH növény	-	-	22,2 [4.]	38	-	-	spontán DH növény
rediploidizált DH növény	49,4 [2.]	41	-	-	-	-	rediploidizált DH növény
fenntartható DH vonal	27,3 [2.]	23	11,8 [3.]	21	44,1	19	fenntartható DH vonal

[1.] Röber *et al*., 2005
[2.] Eder és Chalyk, 2002
[3.] Barnabás *et al.*, 2005
[4.] Dieu és Beckert, 1986

Nem hagyható ugyanakkor figyelmen kívül az a tény, hogy az *in vitro* tenyésztés lényegesen munkaerő igényesebb feladat, valamint speciális laboratóriumi eszközöket és szakértelmet igényel, míg a monoploid módszer esetében - a rediploidizálás kivételével - csak szántóföldi megporzás, csíráztatás és a túlélő növények kipalántázása történik.

Az éretlen embrió tenyésztésben sikeresen és gyakran *alkalmazott*, ún. „modell” *genotípusok* (A 188, B 73, 4C1, Oh 43; Green és Phillips, 1975; Gengenbach, 1982; Armstrong és Green, 1985; Phillips *et al.*, 1988), valamint egyéb, reagáló martonvásári csemegekukoricák (Mv Aranyos, Mv Július, Mv Honey; Spitkó *et al.*, 2001) kalluszindukciós képességét is vizsgáltuk a DH módszerünkkel. Célunk annak kiderítése volt, hogy az eltérő szövettenyésztési rendszerben jól reagáló genotípusok univerzálisnak tekinthetők-e egy más genotípus körre optimalizált portoktenyésztési rendszerben? A kedvező tulajdonság a növény minden szövetére kiterjedő általános jelenség, vagy csak az adott táptalajra beállított tenyésztési feltételek között működő szövet-, vagy szervspecifikus jellemző?

Kísérleteink eredménye, hogy a fent felsorolt genotípusok többsége, még az 1%-os indukciós gyakoriságot sem érte el, kivétel ez alól az Oh 43 volt (2,22%). A relatív kalluszindukció a gyengén reagáló genotípusok esetében 100-225% között volt, azaz az összes kallusz mennyisége 900 leoltott mennyiségből maximum 62 db, ami 6,88%-ot jelentett az Oh 43 esetében. Kísérleteinkben a gyenge morfogén válasz miatt a zöld növény regeneráció sem sikerült (ld.: 8. és 9. táblázatok).

Megállapítható, hogy a felsorolt genotípusok egyike sem alkalmas az általunk használt táptalajokon és optimalizált tenyésztési feltételek között a portoktenyészetben való használatra (4/d ábra), ami megerősíti Brettel *et al.* (1981) és Genovesi és Collins (1982) korábban, más genotípusok és feltételek között kapott megállapításait. A szövettenyésztésre való alkalmasság tehát nem minden növényi szervre, szövetre kiterjedő kedvező tulajdonság, kiegészítve ezt azzal a megjegyzéssel, hogy azért nem zárható ki teljesen annak lehetősége a tenyésztési körülmények további optimalizálásával.

A portoktenyésztés a szántóföldön nevelt növények esetében nagyobb indukciós hatékonyságú, mint az üvegházban nevelteké (Lazar *et al.*, 1984; Dieu és Beckert, 1986), ugyanakkor a szabadföldi mintagyűjtés munkacsúcsot okoz, amikor a június végi, július eleji címerhányás előtt nagy mennyiségű explantum kerül a laboratóriumba tenyésztés céljából. Ezért felmerült a kérdés, hogy elnyújtató-e a többletmunka ugyanazon *genotípusok frakcionált vetésével* anélkül, hogy az károsan befolyásolná a kalluszindukciós képességet. Kísérleteinkben a korábbi tapasztalatok alapján megbízhatóan és nagy hatékonysággal működő DH 109 eredetű F_1 hibridet és annak reciprokát használtuk fel.

Összesen négy vetésidőben, négy év átlagában vizsgálva megállapítottuk, hogy a késleltetett vetés egyértelműen kedvezőtlenül befolyásolja mind az antéraválaszt, mind az abszolút és relatív kalluszindukciós képességet. A május 9., 16. és 23.-i vetések között kisebb - statisztikailag nem minden esetben szignifikáns - különbségek vehetők észre, de a legkorábbi május 2-i vetéshez képest mindhárom vetésidő jelentősen kisebb antéraválaszt és kalluszindukciós értékeket eredményezett. Ennek okát annak tulajdoníthatjuk, hogy a későbbi vetés miatt a növény vegetációs időszaka mind jobban belecsúszott a hőstressz és légköri aszály által sújtott július eleji időszakba, így a növények fokozottabb stressznek voltak kitéve, ami kedvezőtlenül hatott a mikrospórák életképességére. Igy a fent említett kedvezőtlen meteorológiai jelenségeknek tulajdonítjuk a gyengébb reakciót, mivel egyébként többszöri öntözéssel és tápanyag utánpótlással igyekeztünk a növényeket jó fiziológiai állapotban tartani. A következtetésünk egybeesik Nitsch *et al.* (1982), valamint Dieu és Beckert, 1986-ban tett megállapításával. A vetésidő hatásának meghatározó szerepéről Genovesi (1990) is beszámolt. Munkájában a hőmérséklet napi ingadozásának tulajdonította az eltérő vetésidőkben mutatkozó különbségeket, amelynek hatása volt a tenyésztett portokok minőségére.

Hazánkban a május eleji vetés a kukorica szempontjából későinek mondható, ami már az általános vetésidő utolsó dekádjába eső időszak. A kísérletünkben mégis ez volt a legkorábbi vetési időpont, aminek technikai okai voltak. Az eredmény ezért nyilvánvalóan nem zárja ki azt, hogy a még korábban vetett kukorica hasonlóan kedvező, vagy akár nagyobb indukciós arányt eredményez, azonban ennek feltárására a kísérletek során nem volt módunk. Ennek alapján következtetésünket

azzal a megjegyzéssel egészíthetjük ki, hogy a hasonló - frakcionált vetésű - kísérleteknél a vetést legkésőbb május első napjaiban be kell fejezni, mert a késés az antéraválasz és az indukciós eredmények jelentős csökkenését eredményezheti (6. ábra és 10. táblázat)

A vetésidő kísérletben kapott antéraválaszok és kalluszindukciós eredmények - már az első vetés esetében is - kisebbek a korábbi genotípusok összehasonlításakor mért értékektől. Ennek oka részben az lehet, hogy az eredményeket négy év átlagai alapján kaptuk. A hibridek között az első három vetésidőben statisztiakilag is igazolható reciprokhatást tapasztaltunk. Az ellentmondás, ami szerint a hatás iránya ellentétes a korábban tapasztaltaktól nehezen magyarázható. Oka talán abban van, hogy az anyai hatás nem következetes, esetenként elmarad, így nem zárható ki, hogy a reciprokhatás gyenge, vagy következetlensége miatt a kísérletek eredményei szempontjából nem minősíthető számottevőnek (Tomes és Smith, 1985).

A négy évben megismételt kísérletsorozat lehetőséget adott az *évjárat hatásának elemzésére*. A négy vetésidő átlagában kifejezett értékek alapján megállapítottuk, hogy az évek alakulása jelentősen befolyásolta az antéraválaszt. Vizsgálataink során a 2005., 2007. és a 2008. évek nagyobb, míg a 2006. év statisztikailag igazolhatóan kisebb értékeket eredményezett. Az abszolút kalluszindukciós képességben a reciprok hibridek és az évek között nem tapasztaltunk eltéréseket. A relatív kalluszindukciós képesség a négy vetésidő átlagában 200% alatt maradt, amit elsősorban az utolsó három vetésidőből származó kisebb antéránkénti kalluszprodukció idézett elő (ld.: 11. táblázat).

A kísérletek elvégzésekor a vizsgálati években és a vetésidők során a helyi automata meteorológiai állomásról származó éves adatsorok rendelkezésünkre álltak. Munkánk során számos diagramot elemeztünk az adatok és szövettenyésztési eredmények összefüggésének mélyebb megértésére. Ezeknek érdemi eredménye nem lett, így a meteorológiai adatok dolgozatunkban nem kerültek ismertetésre. Megállapításunk azt erősítette, hogy az antéraválaszban talált különbségeket nem műszerrel mérhető meteorológiai jelenségek okozták, hanem a növény különböző fenofázisában (pl. légköri aszályra, vagy extrém hőstresszre) fellépő fiziológiai válasza.

5.2 A szántóföldi vizsgálatokból levont következtetések

A szövettenyésztési technikában vizsgált 9 DH vonalat kiegészítve további hárommal (DH 384, DH 53 és DH 63) tenyészkerti, keresztezési programba állítottuk. Ez utóbbi genotípusok azért nem kerültek korábbi vizsgálatainkba, mert genetikai hátterük alapján nem voltak a rendszerbe illeszthetőek. Összesen 12 DH és az elit vonalat három, eltérő rokonsági körbe tartozó martonvásári SLC teszterrel kereszteztük, majd hibridjeiket teljesítmény-vizsgálatokba állítottuk (7. ábra). Munkánk célja a vonalak általános és specifikus kombinálódó-képességének (GCA, illetve SCA) kiszámítása volt, amely segítségül szolgál a genotípusok nemesítési értékének meghatározásához.

A GCA értékek alapján a vizsgált 12 DH vonal közül 5 vonal rendelkezett javító értékkel. Közülük a DH 56 átlagosan 0,70 $t \cdot ha^{-1}$ terméstöbbletet realizált hibridjeiben. A másik négy vonal (DH 136, DH 143, DH 57 és a DH 64) ettől kevesebb, de szintén termésjavító hatással bírt. A DH szülővonalak átlagos, hibridkombinációkban kifejezett teljesítménye a többi 7 DH vonal esetében nem felelt meg a várakozásainknak. A kontrollként vizsgált HMv 5405 GCA értéke felülmúlta a DH vonalak értékét (1,60 $t \cdot ha^{-1}$), és ezzel a legjobban kombinálódó vonalnak értékeltük.

A három teszter közül kettő ebben a párosítási rendszerben a kombinációik termésének átlagai alapján általában rontott, a NR SLC 0,50 $t \cdot ha^{-1}$ -ral javított a hibridek termésátlagán. Értékelésükkor figyelembe kell azonban venni, hogy a GCA és SCA eredmények mindig relatív értékek, és nagymértékben függnek a kombinációk kialakításába bevont (beltenyésztett) vonalak összteljesítményétől (Sprague és Tatum, 1942). A vizsgált DH vonalak a teszterek közül a NR SLC teszterrel alkották a legkedvezőbb kombinációkat, míg a Lancester és ISSS SLC apák nem realizáltak megfelelő teljesítményt hibridkombinációikban.

A specifikus kombinálódó-képesség az egyes kombinációk értékét jelenti a szülőkomponensek átlagos teljesítményének függvényében. Az SCA értékek kiszámításakor - a számítási képletből adódóan - a szülők rontó hatása (negatív GCA) javítja az SCA értékét, ezért az adatok önmagukban nem értelmezhetők. Másként fogalmazva az SCA az adott hibridkombináció többlet teljesítményét mutatja meg a szülővonalak GCA értéke alapján. Tehát az SCA értékeket csak a szülők GCA értékeivel együtt érdemes értelmezni.

A fent leírtak alapján a táblázatban azokhoz a kombinációkhoz tartozó javító SCA értékeket kerestük, amelyeknél mindkét szülő (GCA) javított a hibridek értékén.

A kísérletben legjobbnak minősített kombináció a HMv 5405*NR SLC hibrid volt, amelynek mindkét szülője (GCA: 1,60; illetve 0,50 $t \cdot ha^{-1}$) javított (additív genetikai hatás; Sprague és Tatum, 1942) a hibrid értékén, valamint a kombináció maga is terméstöbbletet eredményezett (SCA: 0,38 $t \cdot ha^{-1}$; domináns és episztatikus hatások; Sprague és Tatum, 1942).

A DH vonalak utódjai közül a DH 56*NR SLC (GCA: 0,70 és 0,50 $t \cdot ha^{-1}$, SCA: 0,47 $t \cdot ha^{-1}$), valamint a DH 143*NR SLC (GCA: 0,26 és 0,50 $t \cdot ha^{-1}$, SCA: 0,12 $t \cdot ha^{-1}$) kombinációk értek el egyidejűleg javító GCA és SCA értékeket.

Azokat a kombinációkat nem soroljuk fel, amelyek esetében csak az egyik szülő javított a hibridek teljesítményén (ld.: 12. táblázat). Megállapíthatjuk, hogy ilyen kevés számú DH vonal esetében is találhatunk olyan genotípusokat, amelyek javítják utódaik teljesítményét, de ez a javító hatás még nem érte el a kontroll, elit vonal értékét.

A betakarításkori szemnedvesség értékekből számított GCA és SCA értékek alapján hat DH vonal (és a kontrol HMv 5405) GCA eredménye felelt meg a várakozásoknak. A vonalak között ismét szerepelt a DH 56 1%-os, és a DH 64 0,52%-os javító hatással, míg a teszterek közül az ISSS SLC szülő 0,5%-kal javított hibridjei értékén. Az SCA összesen két hibrid esetében javította a szemnedvesség értéket a szülők kedvező hatásán felül (ld.: 13. táblázat). A további szemtermés értékeket javító DH 136, DH 143, DH 57 vonalak a betakarításkori szemnedvesség alakulását rontották. A szülővonalak közül a DH 56 és a DH 64 genotípusokat találtuk megfelelőnek a két tulajdonságot tekintve.

A DH vonalak kombinálódó-képessége mellet nagyon fontos, hogy megfelelő agronómiai-morfológiai tulajdonságokat örökítsenek. A küllemi bírálat utal az adott vonal hazai termesztési körülmények közé történt adaptáltságára is. A legszemléletesebb, ha a vizsgált DH vonalakat hazai, beltenyésztéssel előállított kukoricatörzsekhez hasonlítjuk (keresve köztük a különbségeket, vagy azonosságokat). Bár a vonalak megjelenése nem feltétlenül utal azok nemesítési értékére, mégis fontos a *per se* értékelés során annak megítélése, hogy megfelelnek-e a nemesítés által támasztott követelményeknek.

A morfológiai jellemzők alapján elmondható, hogy a DH vonalak a kontroll (HMv 5405) vonal megfelelő tulajdonságaitól általában statisztikailag igazolhatóan eltértek.

A növénymagasságuk kisebb, a cső fölötti levélszámuk kevesebb, a cső alatti levélszámuk több, a csőeredési magasságuk statisztikailag azonos volt. Az eltéréseknek azonban - különösen a levélszám tekintetében - nincs gyakorlati jelentősége. A DH vonalak átlagos magassága 219 cm és 137 cm között változott, ami megfelel a Martonvásáron beltenyésztéssel előállított vonalak értékeinek (Győrffy *et al.*, 1965; Hegyi, 2003). Az SLC apák a mérsékelt heterózishatás miatt meghaladták a vonalak hasonló értékeit. Ami lényeges, hogy a DH vonalak között törpülést, vagy aránytalan megnyúlást nem tapasztaltunk. A csőeredésben nem tapasztaltunk anomáliákat, nem jelentkezett a szár alján, vagy túlságosan magasan tűzött csőkezdemény (csőeredés 35 és 90 cm között volt; a HMv 5405 esetében ez kb. 60 cm). A növénymagasság és a főcső magassága között szoros pozitív (0,822) korreláció van (Gyenes-Hegyi 2002; Hegyi 2006). A cső elhelyezkedése a száron tehát összefügg a növénymagassággal (internódiumok hosszával és számával), magasabb

növények esetében magasabban helyezkedett el (például: 219 cm-es növényen 90 cm magasan, 137 cm növénymagasság mellett 34 cm magasan). Ez a beltenyésztéssel előállított törzsek és hibridjeik esetében is általános jelenség (Győrffy *et al.*, 1965).

A címer alakulása általában utal az egzotikus szülővel való rokonságra (Fischer *et al.*, 1987). A megfelelően adaptált, hazai körülmények között nemesített vonalak címer-oldalágainak száma 4-10 db (pl.: HMv 5405 esetében 4,06 db, az SLC teszterek esetében 1-9 db között). Az egzotikus anyagokhoz közel álló genotípusok és tájfajták esetében ez 4-50 darab is lehet (Kuleshov, 1955). A DH vonalak címer-oldalág számának átlaga 8,96 db volt, ami statisztikailag igazolhatóan nagyobb, mint a kontroll értéke. Az oldalágak száma azonban nem szoros értelemben vett értékmérő tulajdonság, a vonal teljesítményét nem befolyásolja közvetlenül (a pollenadó képesség kivételével). Ugyanakkor szakirodalmi vizsgálatok adatai arra utalnak, hogy a nagyon sok - „trópusi”, vagy „egzotikus” típusú - címerág negatív korrelációban van a termőképességgel (Bódi *et al.*, 2008).

Összességében elmondható hogy a vizsgált tulajdonságok tekintetében a DH vonalak küllemük alapján kissé eltérőek voltak, de a hagyományos technikával előállított beltenyésztett vonalakhoz képest lényegi különbségeket nem mutattak (ld.: 14. táblázat).

A kezdeti fejlődés és a betegség-ellenállóság vizsgálata fontos, a nemesítés számára értékes információkat nyújt. Dolgozatunk témája nem foglalkozik szorosan e témakörrel, de tájékoztató jelleggel felvételeztük a DH vonalak kezdeti fejlődését, a szárak golyvásüszög és a csővek fuzárumos fertőzöttségét, valamint a szárszilárdságot, ami részben utal a szár fuzáriumos fertőzöttségére is. Az eredményeket statisztikailag nem elemeztük, mert (véleményünk szerint) a félkvantitatív 1-5 skála értékeire történő varianciaanalízis számítása nem eredményez megfelelően értelmezhető szignifikáns differencia értékeket (a variációs koefficiens értékek az elemzéskor túl nagyok).

A DH vonalak kezdeti fejlődése általában gyengébb volt, mint az elit és SLC vonalaké. A teszterek a kismértékű heterózishatás miatt e tulajdonságban a várakozásunknak megfelelően jobbnak bizonyultak a kontroll értékénél. A golyvásüszög fertőzöttség tekintetében - kisebb eltérések kivételével - alig találtunk különbségeket a vizsgálati évek során (15. táblázat).

A csövek fuzáriumos fertőzöttségében viszont voltak eltérések, a DH vonalak az általunk használt kontrollnál általában jobb, az SLC teszterekkel pedig közel azonos ellenállóságot mutattak. A szárszilárdság esetében a helyzet fordított volt, a DH vonalak több esetben közepes, vagy rosszabb értékelést kaptak. A DH 384 és DH 63 szárának gyengeségét tapasztalatunk szerint nem betegségből adódó szárelhalás, hanem a kisebb szárátmérő okozta (átlag 137 cm-es növénymagasság, rövid és vékony internódiumok).

A kezdeti fejlődésben és a betegség-ellenállóságban a DH vonalak gyakorlatilag nem tértek el a hagyományos nemesítéssel előállított beltenyésztett törzsek értékeitől, így küllemük és betegség-ellenállóságuk tekintetében megfelelnek a hagyományos nemesítésben elvárt követelményeknek. Eltérések mindig előfordulnak, de az itt felsorolt kedvező tulajdonságok önmagukban nem határozzák meg a vonalak értékét, mért eredményeik csak a korábban, nemesítők által végzett szelekciós munka eredményességét és a genotípusok hazai körülmények közé adaptáltságát igazolják. A DH vonalak nemesítése során a következetes szelekció eredménye, hogy a betegségekkel szemben kialakított ellenállóságuk, illetve hibridjeik általános megítélése nem tér el a hagyományos úton előállított társaikétól. A teljesítmény-kísérletekben komolyabb szárdőléssel, gyakran jelentkező betegségekkel nem találkoztunk. Utódaik fenotípusos megjelenésükben is kedvező képet mutattak.

A DH szülőkomponensű hibridek teljesítményét a termésük és betakarításkori szemnedvesség értékeik alapján lehet szemléletesen jellemezni. A teljesebb kép érdekében ezért a továbbiakban a vonalak GCA és SCA értékeinek vizsgálatát az utódaik teljesítményének érékelésével egészítjük ki.

A 12 DH vonal, 1 elit beltenyésztett törzs és 3 teszter keresztezéséből származó kombinációkkal, valamint a 2 standard hibriddel összesen 41 genotípusos teljesítménykísérletet állítottunk be egy termőhelyes, négy ismétléses szántóföldi kísérletben. A kombinált termés és betakarításkori szemnedvesség diagramon (8. ábra) a hibridek teljesítménye mindkét tulajdonságra nézve a vártnak megfelelően normál eloszlást mutatott. A szemtermés tekintetében a DH szülőkomponensű hibridek többsége a standardok átlagától kisebb termést adott (25 kombináció). 11 DH eredetű hibrid viszont elérte a kívánt termésszintet és egy (DH 56*NR SLC) - statisztikailag nem jelentősen - meg is haladta azt. Hasonlóan kedvező eredményt ért el továbbá a 2 kontroll kombináció is (HMv 5405*NR SLC és HMv 5405*Lanc SLC).

A kísérlet főátlaga 8,94 $t \cdot ha^{-1}$ statisztikailag igazolhatóan kisebb volt a standard átlagnál (10,46 $t \cdot ha^{-1}$). A szemtermés önmagában azonban nem elegendő a hibrid értékének megítéléséhez ezért még össze kellett vetnünk a betakarításkori szemnedvesség eredményekkel is.

A standardokhoz viszonyítva a 39 hibrid közül összesen 3 kombinációnak volt jelentősen kisebb a szemnedvessége, ugyanakkor ez alacsony szemterméssel is párosult. További 10 hibrid 21% feletti nedvességtartalommal - és szintén jelentősen kisebb terméssel - nem felelt meg az általunk felállított kritériumoknak. 23 db kombináció szemnedvessége nem tért el a standard hibridek átlagától, de ebből 12 szemtermése kevesebb volt 9,44 $t \cdot ha^{-1}$ - nál, azaz szignifikánsan kevesebbet termett a standardok átlagától.

Összesen tehát 8 DH eredetű hibrid felelt meg az elvárásainknak és mindkét tulajdonságra nézve elérte, egy esetben pedig termésében meg is haladta a standard átlagot. A 8 DH

szülőkomponensű hibridet kísérletünkben, az állami elismerésben részesített kombinációkkal azonos termésűnek minősítettünk, azonos betakarításkori szemnedvesség értékek mellett.

A DH 56 vonalat hibridekben realizált teljesítménye alapján ismét a legjobban kombinálódó vonalnak minősítettük. Genetikai háttere (DH 105*HMv 5405)*HMv 5405, tehát hozzávetőleg 87,5% martonvásári és 12,5%-ban egzotikus génarányokat hordoz (a DH 105 eleve 50%-os elit génarányú volt!). A szövettenyésztésben 10,67% antéraválaszt adott, 15,44% abszolút kalluszindukcióval és 3,24% zöld növény gyakorisággal. Korábbi tapasztalataink alapján ez a vonal alkalmas regeneráns növények előállítására úgy, hogy közben kedvező kombinálódó képességet örökít (a GCA és SCA jól öröklődő tulajdonságok; Jenkins, 1935; Johnson és Hayes, 1940).

A vizsgálatok értékelése során figyelembe kell vennünk azt, hogy szűk genetikai bázison, gyakorlatilag egy beltenyésztett Iodent származású vonal és egy, hazánkban egzotikus megjelenésű beltenyésztett törzs keresztezési kombinációiból származó genetikai anyagokat értékeltünk úgy, hogy a 12 DH vonal kevés mintaszámú kísérlet elvégzésére adott lehetőséget. Véleményünk szerint a vizsgálatok kiterjesztésével, szélesebb genetikai bázison előállított DH vonalakkal és nagyobb számú tesztkeresztezéssel a jövőben lehetséges lesz a standard átlagot meghaladó, állami elismerésben részesíthető kukoricahibridek előállítása.

A hibridek termésbiztonságát az évenkénti és termőhelyenkénti termésingadozással lehet becsülni (Szél, 1998). A termésstabilitás vizsgálatához a DH szülőkomponensű hibridek egy kisebb csoportjával 3 termőhelyes, háromismétléses, szántóföldi teljesítménykísérletet állítottunk be 3 éven keresztül (2006-2008). A 14 DH eredetű hibrid és 2 standard az ország eltérő éghajlati- és talajadottságokkal rendelkező területein, Martonvásáron, Szarvason és Mezőkövesden került elvetésre. A hibridek kiválasztása nem csupán a korábban kapott eredményeik alapján történt, mert nem minden kombinációból volt elegendő mennyiségű vetőmagunk. A válogatáskor igyekeztünk az általunk jobbnak ítélt hibrideket besorolni vidéki kísérleteinkbe, amennyiben kellő mennyiségű vetőmag állt rendelkezésre.

A korábban leírtakhoz hasonló módon, a kombinált termés és betakarításkori szemnedvesség diagramon ábrázolva (9. ábra) a következő megállapításokat tehettük. A hibridek többsége (11 kombináció) nem érte el a standard átlagot. 3 kombináció (DH 56*NR SLC, DH 136*Lanc SLC és DH 136*NR SLC) statisztikailag igazolhatóan azonos termést ért el, mint a standard hibridek. A standardok több termőhelyes kísérletekben elért terméseredményei (standard átlag: 9,78 $t \cdot ha^{-1}$) kisebb volt, mint a martonvásári teljes hibridsorral végzett kísérletünkben (standard átlag: 10,46 $t \cdot ha^{-1}$). A DH hibridek eredményeinek főátlaga a két teljesítménykísérletben azonos volt (8,94 $t \cdot ha^{-1}$).

A vizsgált hibridek közül 10 magasabb és 4 statisztikailag igazolhatóan ugyanakkora szemnedvességgel rendelkezett, mint a standard átlag. A fenti tulajdonságot tekintve alkalmasnak

ítélt 4 hibrid egyike sem érte azonban el termésben a standard hibridek átlagát. A vizsgált kombinációk között nem találtunk az általunk kitűzött célnak megfelelő genotípust, kivéve egyet, a DH 56*NR SLC hibridet, amely magasabb szemnedvességgel ugyan, de - statisztikailag nem jelentősen - meghaladta a standardok teméseredményeit.

Több évben, több termőhelyen vizsgált 14 hibridünk átlagát tekintve megállapíthatjuk, hogy a kombinációk eltérő szemnedvesség mellett változó szemterméssel reagáltak a különböző évekre és környezeti hatásokra. A statisztikai elemzésünk is igazolta, hogy az eltérő évjáratok jelentősen befolyásolják mindkét tulajdonságot. A szemtermés a kukoricatermesztés szempontjából kedvezőtlen 2007. évben kisebb volt, valamint ezzel összefüggésben a betakarításkori szemnedvesség is 19,30% körüli maradt. A másik két év nagyobb termést és a szemek magasabb víztartalmát eredményezte.

A termőhelyek - adott agro-ökológiai sajátságaik miatt - szintén jelentősen befolyásolták a DH eredetű hibridek eredményeinek alakulását. Mezőkövesden kifejezetten alacsony, Szarvason viszont nagy teméseredményeket mértünk, magasabb szemnedvességgel (ld.: 16. táblázat).

Az évjáratok termésre kifejtett hatását jelentősebbnek ítéltük, mint a különbségeket a termőhelyek között. Az eltérő évjárat közel 4 $t \cdot ha^{-1}$, a különböző környezet legnagyobb 3 $t \cdot ha^{-1}$ termésben jelentkező ingadozást okozott (megjegyzés: ha a mezőkövesdi, igen gyenge termesztési eredményt nem tekintjük az ingadozás mindössze 0,25 $t \cdot ha^{-1}$). Az eredmények alapján tehát megállapíthatjuk, hogy a hibridek termésingadozása a vizsgált években és termőhelyeken számottevőnek bizonyult. A fenti megállapítás azonban a standardként használt hibridekre is ugyanúgy igaz volt (ld.: 17. táblázat). A termőhely és évjárat megváltozása legnagyobb 4 $t \cdot ha^{-1}$ teméseredménybeli változást és 4-5%-os szemnedvesség eltéréseket okozott betakarításkor. A vizsgált paraméterek esetében tehát mind a DH szülőkomponensű hibridek, mind a standardok jelentősen reagáltak a környezet és az évjárat megváltozására. Az eredmények értékelésekor meg kell jegyeznünk, hogy a termésben jelentkező évenkénti és termőhelyenkénti ingadozás általánosnak tekinthető jelenség a hazai nagyüzemi kukoricatermesztésben is (19. táblázat).

19. táblázat A Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (MgSzH) által közzétett évenkénti és régiónkénti (2009) kukorica termésingadozások Magyarországon (Csapó, 2010)

Évek	MgSZH kísérleti átlag	Országos átlag
	t/ha	t/ha
2002	11,12	5,14
2003	8,54	4,00
2004	12,01	7,12
2005	12,39	7,69
2006	11,89	7,03
2007	6,61	3,60
2008	11,09	7,60
2009	11,75	6,45
Legnagyobb különbség	5,78	4,09

Régió	Betakarított termőterület	Termés átlag	Összes termés
	ha	t/ha	t
Dunántúl	549 033	7,30	4 009 104
Alföld	546 325	5,70	3 113 543
Észak Magyarország	46 462	5,18	240 475
Magyarország összesen	1 141 820	6,45	7 363 122
		2,12	

5.3 Új tudományos eredmények

Kísérleteink során kukorica portoktenyésztésével és a regenerált (homozigóta) DH vonalak értékelésével foglalkoztunk. A munka során meghatároztuk a genotípusok haploid kalluszindukciós és növényregenerációs képességét, majd a módszert más szövettenyésztési rendszerben használt vonalakon és hibrideken is alkalmaztuk. Vizsgáltuk a frakcionált vetés hatását az indukciós képességre, valamint az eltérő évjáratok által okozott különbségeket tártuk fel.

Szántóföldi kísérletekben jellemeztük a DH szülőkomponensű hibridek teljesítményét, vizsgáltuk továbbá az eltérő évek és termőterületek hatását azok termésstabilitására. Az adatokat a szakigazgatási hivatal (MgSzH) által kijelölt, (az éréscsoportnak megfelelő) standardok eredményeinek figyelembe vételével értékeltük. Az utódbírálat alapján kiszámítottuk a vonalak általános és specifikus kombinálódó-képességét, kiegészítve azt morfológiai adatokkal. Az így kapott laboratóriumi és szántóföldi adatok lehetőséget nyújtottak az *in vitro* módszerrel előállított DH vonalak az eddiginél átfogóbb értékelésére.

Kísérleteink során az alábbi új és újszerű eredményeket értük el:

1. Munkánk során elsőként alkalmaztunk kombinált laboratóriumi és szántóföldi értékelési rendszert portoktenyészetből előállított DH kukoricavonalakon.

2. A kísérleteinkben vizsgált DH vonalak laboratóriumi és szántóföldi jellemzése alapján meghatároztuk azokat a genotípusokat, amelyek azon kívül, hogy megfelelő mértékben hordozzák a haploid kalluszindukciós képességet, a nemesítés számára is hasznos agronómiai tulajdonságokkal rendelkeznek, és elfogadható terméstöbbletet realizálnak utódaik teljesítményében.

3. A szántóföldön felnevelt növényekből történő portokizolálás a július eleji időszakban, közel egyszerre virágzó genotípusok esetében munkacsúcsot okoz. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az egy időben jelentkező munkatöbblet nem oldható meg frakcionált vetéssel, mert a késleltetett vetés jelentős mértékben csökkenti a haploid kalluszindukciós gyakoriságot, így rontva a szövettenyésztés eredményességét.

4. Megállapítottuk, hogy az évjáratnak jelentős befolyásoló hatása van az antéraválaszra és - kisebb mértékben - az abszolút és relatív kalluszindukciós képességre.

5. Kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy az éretlen embriótenyésztésben sikeresen használt, ún. „modell” genotípusok (vonalak, hibridek) nem használhatók fel a portoktenyészetben. A szövettenyésztésre való alkalmasság nem jelent feltétlenül a növény minden részére vonatkozó, általánosan jellemző, kedvező tulajdonságot. E megállapításunk azonban csak a dolgozatban bemutatott eljárásra igaz, és nem jelenti azt, hogy az *in vitro* DH technika - adott genotípusra történő - további optimalizálásával ne lehetne kedvezőbb szövettenyésztési eredményt elérni.

6. A DH vonalakkal tesztkeresztezéseinkben létrehozott hibridek teljesítményvizsgálata alapján megállapítható, hogy lehetséges olyan kombinációk előállítása, amelyek termése és betakarításkori szemnedvesség értéke azonos a standardként használt hibridek átlagával. A kísérletben vizsgált kombinációk többsége ugyan nem érte el a kívánt szintet, de ennek oka véleményünk szerint az volt, hogy a DH vonalak előállítása szűk genetikai bázison (gyakorlatilag két homozigóta vonal különböző arányú kombinációján) alapult, ami nem zárja ki annak lehetőségét, hogy nagyobb genetikai variabilitással rendelkező alappopulációk bevonásával lehetséges a gyakorlatban is versenyképes hibridek előállítása.

7. A vizsgált DH vonalak utódtesztjeiből számított általános kombinálódó-képesség értékek igazolták azon feltevésünket, hogy már kisszámú vonal vizsgálatakor is lehet javító hatású genotípusokat találni az *in vitro* technikával előállított növényanyagok között. A javító hatással egyidejűleg kedvező agronómiai tulajdonságok társulhatnak, valamint küllemükben sem maradnak alatta a hagyományos úton előállított beltenyésztett vonalaknak.

8. Portoktenyésztési munkákban a DH 109 F_1 hibridjeinek és DH származékainak (DH 31, DH 136, DH 141) használatát javasoljuk. Szántóföldi kombinálódó-képesség vizsgálatokban a DH 56 és DH 64 vonalak javítottak egyaránt hibridjeik terméseredményein és betakarításkori szemnedvesség értékein. Ez utóbbi vonalak megfelelő - de nem kimagasló - mértékben egyaránt hordozzák a haploid kalluszindukciós és növényregenerációs képességeket is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben *in vitro*, szövettenyésztési módszerrel előállított dihaploid (DH) kukoricavonalak, valamint teszterekkel alkotott hibridkombinációik laboratóriumi és szántóföldi vizsgálatát végeztük el. A munka során jó haploidindukciós képességet hordozó kínai egzotikus és egy martonvásári, a módszerre nem reagáló elit vonal keresztezéséből származó genotípusok szövettenyésztési reakcióját és növényregenerációs képességét határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy az indukciós gyakoriság genotípusfüggő és heterózishatást, valamint esetenként reciprokhatást mutat. Az előállított DH genotípusok öröklik e tulajdonságot, és az egzotikus szülőhöz viszonyított távolságtól függően használható szövettenyésztési és növényregenerációs képességet mutatnak. A tenyésztésre legalkalmasabbak a donor - az egzotikus vonallal közvetlenül rokon - szülővel alkotott hibridek és a DH 31, DH 136, DH 141 vonalak voltak.

A szövettenyésztés kifejezetten élőmunka igényes tevékenység, és a szántóföldi növényfelnevelés egy időben jelentkező munkacsúcsot okoz. Kísérletünkben erre a problémára kerestük a megoldást, amikor frakcionált vetéssel, időben késleltetve vetettünk ugyanazokból a hibridekből annak tisztázására, hogy elnyújtható-e a szövettenyésztési munka anélkül, hogy ez károsan hatna a haploidindukciós képességre. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a későbbi vetés jelentősen csökkenti az indukciós hatékonyságot, ami a később vetett donor növények vegetációja során fokozott mértékben elszenvedett környezeti stressznek tulajdonítható (elsősorban a virágzás idején fellépő hőstressznek és légköri aszálynak), ami hatott az inokulált pollenek minőségére. A négy éven át végzett kísérletekből az is nyilvánvalóvá vált, hogy az eltérő évjáratnak jelentős befolyásoló hatása van az adott évi antéraválaszra és ezzel összefüggésben a kalluszprodukcióra.

A megbízhatóan működő, haploid szövettenyésztési technikát alkalmaztuk éretlen embrió eredetű sejttenyészetben elterjedten használt genotípusokon is. A kísérletben azt vizsgáltuk, hogy hogyan reagálnak ezek a vonalak és hibridek egy más genotípus körre optimalizált, más explantumból kiinduló szövettenyészetben. Azt a válasz kaptuk, hogy ezek a genotípusok az általunk használt rendszerben nem, vagy csak igen kis mértékben reagálnak. A szövettenyésztésre való alkalmasság tehát nem általánosan a növény minden szervére, szövetére jellemző tulajdonság. Ugyanakkor megállapításunk nem zárja ki azt, hogy ezeket a genotípusokat is lehet módosított haploidindukciós módszer birtokában sikerrel tenyészteni.

A kísérletek további részében korábban előállított DH vonalakat martonvásári teszterekkel kereszteztünk, majd hibridjeiket szántóföldi teljesítménykísérletekbe állítottuk. Az utódok szemtermését és betakarításkori szemnedvességét állami elismerésben részesített, kereskedelmi forgalomban lévő, a szakigazgatási hivatal (MgSzH) által hivatalos standardnak minősített

kukoricahibridekkel hasonlítottuk össze. A vizsgált 36 db DH szülőkomponensű hibridkombináció közül találtunk nyolcat, amelyek eredményei statisztikailag igazolhatóan azonosak voltak az összehasonlításban, ugyanakkor a standard átlagot nem haladták meg jelentősen. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy szélesebb genetikai bázison előállított DH vonalakkal ez utóbbi eredmény elérése is lehetséges.

Több éves, több termőhelyes kísérletben vizsgáltuk a hibridek termésstabilitását is, ami alapján megállapítottuk, hogy a kombinációk termése - beleértve a standardokét is - statisztikailag igazolható mértékben változott a különböző évjárat és az eltérő környezeti tényezők hatására. A termésben jelentkező évenkénti és termőhelyenkénti számottevő ingadozás azonban a hazai kukoricatermesztésben sajnos általánosnak tekinthető jelenség.

Az utódok teljesítménye alapján kiszámítható volt a DH szülővonalak általános és specifikus kombinálódó-képessége is. A vizsgált 12 DH vonal közül 5 genotípusnak (DH 56, DH 57, DH 136, DH 143 és DH 64) volt javító hatása a hibridjeinek terméseredményére. A DH 56 emellett 1%-kal, a DH 64 pedig 0,5%-kal csökkentette a vele alkotott kombinációk betakarításkori szemnedvesség értékét is.

A javító hatás mellett nagyon fontos, hogy a szülővonalak megfelelő agronómiai, morfológiai tulajdonságokat és kellő mértékű betegség-ellenállóságot adjanak át utódaiknak. E tekintetben végzett előzetes vizsgálataink alapján elmondható, hogy az *in vitro* technikával előállított, szelektált DH vonalak küllemükben, agronómiai tulajdonságaikban és betegség-ellenállóságukban nem térnek el lényegesen a beltenyésztett elit vonalak hasonló tulajdonságaitól.

6. SUMMARY

Present work included laboratory analyses on doubled haploid (DH) maize lines produced using an *in vitro* tissue culture method and field experiments on hybrid combinations of these lines with testers. The tissue culture response and plant regeneration ability were determined for genotypes originated from a cross between exotic Chinese genotypes with good haploid induction ability and an elite Martonvásár line that did not respond to the tissue culture method. The induction frequency was found to be genotype-dependent and exhibited heterosis and occasionally reciprocal effects. The DH genotypes inherited this trait and also possessed useful tissue culture and plant regeneration ability, depending on their distance from the exotic parent. The most suitable genotypes for culturing were hybrids developed using donor - exotic related - parents and the DH 31, DH 136 and DH 141 lines.

Tissue culture is an extremely labour-intensive technique, while field experiments involve labour peaks at certain times. The current experiments aimed to find a solution to this problem by employing fractionated, delayed sowing of each hybrid to determine whether tissue culturing could be protracted without causing deterioration in haploid induction ability. It was concluded that later sowing led to a substantial reduction in induction efficiency. This could be attributed to the greater environmental stress suffered by late-sown donor plants during the vegetation period (especially heat stress and atmospheric drought during flowering), which influenced the quality of inoculated pollen grains. It also became clear from the 4-year experiment that the year had a considerable influence on anther response, and consequently on callus production.

The established haploid tissue culture technique was also tested on genotypes regularly used for cell culture from immature embryos to investigate how these lines and hybrids responded to a different type of tissue culture. It was found that these genotypes responded poorly, if at all, to the system tested in the present work, indicating that suitability for tissue culture is specific to a given organ or tissue. However, this does not exclude the possibility that these genotypes could be successfully cultured using a modified haploid induction method.

In the next step, previously developed DH lines were crossed with Martonvásár testers and the hybrids were sown in field performance trials. The grain yield and grain moisture at harvest were compared with those of state registered maize hybrids, available on the market and classified as official standards. Eight of the 36 hybrid combinations with DH parental components gave results statistically on par with those of the standards, though they did not significantly exceed the standard mean. The results suggest that genotypes significantly surpassing the standards might be found if DH lines were produced using a broader genetic base.

When the yield stability of the hybrids was studied at multiple locations in several years the yield of the combinations, including that of the standards, was found to be significantly influenced by both the year and the environment. The considerable fluctuation in the yield in terms of year and location is unfortunately a general characteristic of maize production in Hungary.

Based on the performance of the progeny the general and specific combining ability of the DH parental lines were calculated. Five of the 12 DH lines (DH 56, DH 57, DH 136, DH 143 és DH 64) improved the yield of the hybrids. In addition, DH 56 and DH 64 led to a reduction of 1% and 0.5%, respectively, in the grain moisture at harvest of the given combinations.

In addition to the yield-improving effect, it is also important for the parental lines to pass on satisfactory agronomic and morphological traits to their hybrids, together with an adequate level of disease resistance. Preliminary experiments indicated that the selected DH lines developed using the *in vitro* technique did not differ substantially from the elite inbred lines in terms of appearance, agronomic traits or disease resistance.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Agache S., DeBuyser J., Henry Y., Snape J.W. (1988): Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat; Plant Breeding 100: 26-33
2. AgReliant Genetics LLC, Doubled-Haploid Breeding Technology (*s.a.*) http:// www.greatlakeshybrids.com/performance/research-information/doubled-haploid-breeding-technology/ (letöltési idő: 2010. 06. 10.)
3. Allard R.W. (1960): Principles of Plant Breeding; Wiley, New York. cit. Hallauer A.R., Miranda J.B. (1981): Testers and combining ability; In: Quantitative Genetics in Maize Breeding, Iowa State Univ. Press, Ames, pp. 267-298
4. Allison J.C.S., Curnow R.W. (1966): On the choice of tester parent for the breeding of synthetic varieties of maize (*Zea mays L.*); Crop Sci. 6: 541-544
5. Ao G.M., Zhao S.X., Li G.H. (1982): *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of corn (*Zea mays L.*); cit. Genovesi A.D. (1990): II. 3 Maize (*Zea mays L.*): In vitro production of haploids; In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 12, Springer Verlag, Heidelberg, pp. 176-203
6. Armstrong C.L. (1994): Regeneration of plants from somatic cell cultures: applications for *in vitro* genetic manipulation; In: Freeling M. (ed.) The Maize Handbook, Springer-Verlag, pp. 663-669
7. Armstrong C.L. (1999): The first decade of maize transformation: A review and future perspective; Maydica 44: 101-109
8. Armstrong C.L., Green C.E. (1985): Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164:207-214
9. Barcelo P., Cabrera A., Hagle C., Lörz H. (1994): Production of doubled haploid plants from tritordeum anther culture; Theor. Appl. Genet. 87: 741-745
10. Barloy D., Denis L., Beckert M. (1989): Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. Maydica 34:303-308
11. Barnabás B. (2005): Nemesítési értékű dihaploid (DH) növények előállítása; In: Nagy J. (ed.) Kukoricahibridek adaptációs képessége és termésbiztonsága; Kukoricakonzorcium c. kiadvány, Debrecen 2005, pp. 54-74
12. Barnabás B., Fransz P.F., Schel J.N.H. (1987): Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays*); Plant Cell Rep. 6: 212-215

13. Barnabás B., Szakács É., Sági L., Kovács G. (1988): A haploid kalluszindukció és növényregeneráció genetikai javításának lehetőségei búza antérakultúrában; Növénytermelés 37: 289-292
14. Barnabás B., Pfahler P.L., Kovács G. (1991): Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat; Theor. Appl. Genet. 81: 675-678
15. Barnabás B., Szundy T. (1998): Dihaploid vonalak előállításának perspektívái és felhasználásuk a kukoricanemesítésben; Martonvásár 98/1: 16-17
16. 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
17. Barnabás, B., Szakács, É., Karsai, I., Bedő, Z. (2000): *In vitro* androgenesis of wheat from fundamentals to practical application. In: Bedő Z., Láng L. (eds.) Wheat in a Global Environment: Proceedings of the 6th International Wheat Conference. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston, pp. 517-525.
18. Barnabás B., Spitkó T., Jäger K., Pintér J., Marton L.C. (2005): Strategy for improvement of doubled haploid production in maize; Acta Agron. Hung. 53: 177-182
19. Bartkowiak E. (1981): Tissue culture of maize: Selection of friable callus lines; Plant Cell Rep. 1: 52-55
20. Beckert M. (1994) Advantages and disadvantages of the use of *in vitro/in situ* produced DH maize plants; In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 25, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, p. 201
21. Bódi Z., Pepó P., Kovács A. (2008): Morphology of tassel components and their relationship to some quantitative features in maize; Cereal Res. Commun. 36: 353-360
22. Brettel R.I.S., Thomas E., Wernicke W. (1981): Production of haploid maize plants by anther culture; Maydica 26: 101-111
23. Bullock W.P., Baenzinger P.S., Schaeffer G.W., Bottino P.J. (1982): Anther culture of wheat F1's and their reciprocal crosses; Theor. Appl. Genet. 62: 155-159
24. Büter B., Pesticelli S. M., Berger K., Schmid J.E., Stamp P. (1993): Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal; Plant Cell Rep. 13: 79-82
25. Chalyk S.T. (1999): Creating new haploid-inducing lines of maize; Maize Genet. Coop. Newslett. 73: 53-54
26. Chase S.S. (1947): Techniques for isolating monoploid maize plants; J. Bot. 34: 582
27. Chase S.S. (1969): Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.); Bot. Rev. 35: 117-167

28. Chourey, P.S., Zurawski, D.B. (1981): Callus formation from protoplasts of a maize cell culture; Theor. Appl. Genet. 59: 341-344
29. Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S.; Hsü C., Yin K.C., Chu C.Y., Bi F.Y. (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources; Sci. Sinica 18: 659-668
30. 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, Pitman, Boston, pp. 43-50
31. Coe E.H. (1959): A line of maize with high haploid frequency; Am. Nat. 93: 381-382
32. Coe E.H., Sarkar K.R. (1964): The detection of haploids in maize; J. Hered. 55: 231-233
33. Comstock R.E., Robinson H.F. (1952): Estimation of average dominance of genes; In: Gowen J.W. (ed.) Heterosis. Iowa State College Press, Ames, pp. 494-516
34. Coumans M.P., Sohota S., Swanson E.B. (1989): Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L.; Plant Cell Rep. 7: 618-621
35. Cowan J.R. (1943): The value of double cross hybrids involving inbreds of similar and diverse genetic origin; Sci. Agric. 23: 287-296
36. Csapó J. (2010): Az MgSzH kukoricatermesztési koordinációs értekezlete; 2010. február 4.; Tordas
37. Davis R.L. (1927): Report of the plant breeder; Rep. Puerto Rico Agric. Exp. Stn. pp. 14-15
38. Deaton W.R., Metz S.G., Armstrong T.A., Mascia P.N. (1987): Genetic analysis of the anther culture response of three spring wheat crosses; Theor. Appl. Genet. 74: 334-338
39. DeBuyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R., Hespel A. (1978): ‚Florin’: A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method; Plant Breeding 98: 53-56
40. Development of Hybrid Maize (*s.a.*) http://www.weedtowonder.org/hybrid/ (letöltési idő: 2010. 06. 10.)
41. Dieu P., Beckert M. (1986): Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from *in vitro* cultured anthers in maize; Maydica 31: 245-259
42. Dudits D., Heszky L. (2000): Növényi biotechnológia és géntechnológia; Agroinform Kiadó, Budapest, 1. kiad.
43. Dudits D., Heszky L. (2003): Növényi biotechnológia és géntechnológia; Agroinform Kiadó, Budapest, 2. kiad.
44. Duncan D.R., Williams M.E., Zehr M.E., Widholm J.M. (1985): The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes; Planta 165: 322-332

45. Dunwell J.M., Francis R.J., Powell W. (1987): Anther culture of *Hordeum vulgare*: A genetic study of microspore callus production and differentiation; Theor. Appl. Genet. 74: 60-64
46. Eder J., Chalyk S. (2002): *In vivo* haploid induction in maize; Theor. Appl. Genet. 104: 703-708
47. Fischer K.S., Edmeades G.O., Johnson E.C. (1987): Recurrent selection for reduced tassel branch number and reduced leaf area density above the ear in tropical maize populations; Crop Sci. 27: 1150-1156
48. Fransz P.F., Schel H.N. (1991): Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*); Can. J. Bot. 69: 26-33
49. Gaillard A., Vergne P., Beckert M. (1991): Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration; Plant Cell Rep. 10: 55-58
50. Gallais A., Bordes J. (2007): The use of doubled haploids in recurrent selection and hybrid development in maize; Crop Sci. 47 (S3): 190-201
51. Gayen P., Madan J.K., Kumar R., Sarkar K.R. (1994): Chromosome doubling in haploids through colchicine; Maize Genet. Coop. Newslett. 68: 65
52. Geiger H.H. (2006): Haploid induction by inducer line technology in maize; In: Proc. The International Conference "Haploids in Higher Plants III", Vienna, Austria, February 12-15 2006, Abstract book: 19
53. Geiger H.H. (2009): Doubled haploids; In: Bennetzen J.L., Hake S. (eds.) Handbook of Maize, Genetics and Genomics. Springer Science & Business Media, LLC, pp. 641-659
54. Gengenbach B.G. (1982): unpublished results; cit. Phillips R.L., Somers D.A., Hibberd K.A. (1988): Cell/Tissue cultures of maize. In: Sprague G.F., Dudley J. (eds.) Corn and Corn Improvement. ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp. 345-387
55. Genovesi A.D. (1990): Maize: *In vitro* production of haploids; In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 12. Haploids in Crop Improvement I. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 176-203
56. Genovesi A.D., Collins G.B. (1982): *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture; Crop Sci. 22: 1137-1144
57. Gernand D., Rutten T., Varshney A., Brüss C., Pickering R., Matzk F., Houben A. (2004): Selective chromosome elimination in embryos of interspecific crosses; 15th Intern. Chromosome Conf., Brunel Univ., London, Sept. 5-10 2004 (poster)
58. Green C.E. (1983): New developments in plant tissue culture and plant regeneration; In: Hollaender A., Laskin A.I., Rogers P. (eds.) Basic Biology of New Developments in Biotechnology. Plenum Publishing Corp., pp. 195-209

59. Green C.E., Phillips R.L. (1975): Plant regeneration from tissue cultures of maize; Crop Sci. 15: 417-421
60. Green C.E., Phillips R.L., Kleese R.A. (1974): Tissue cultures of maize: Initiation, maintenance and organic growth factors; Crop Sci. 14: 54-58
61. Green J.M. (1948): Relative value of two testers for estimating topcross performance in segregating maize populations; J. Am. Soc. Agron. 40: 45-57
62. Griffing J.B. (1953): An analysis of tomato yield components in terms of genotypic and enviromental effects; Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull. p. 397
63. Griffing J.B. (1956): Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems; Austr. J. Biol. Sci. 9: 463-493
64. Gyenes-Hegyi Zs., Pók I., Kizmus L., Zsubori Zs., Nagy E., Marton L.C. (2002): Plant height and height of the main ear in maize (*Zea mays* L.) at different locations and different plant densities; Acta Agron. Hung. 50: 75-84
65. Győrffy B., I'so I., Bölöni I. (1965): Kukoricatermesztés; Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
66. Hallauer A. R. (1975): Relation of gene action and type of testers in maize breeding procedures; Proc. Annu. Corn Sorghum Res, Conf. 30: 150-165
67. Hallauer A.R., Miranda J.B. (1981): Testers and combining ability; In: Quantitative Genetics in Maize Breeding, Iowa State Univ. Press, Ames, pp. 267-298
68. Hayes H.K. (1936): A Professor's story of hybrid corn; cit. Hallauer A.R., Miranda J.B. (1981): Testers and combining ability; In: Quantitative genetics in maize breeding, Iowa State Univ. Press, Ames, pp. 267-298
69. Hegyi Zs. (2003): A termőhely és tőszám hatása különböző rokonsági körökbe tartozó beltenyésztett kukorica törzsek és hibridjeik tulajdonságaira eltérő évjáratokban; Doktori (PhD) dolgozat, Gödöllő-Martonvásár
70. Hegyi Zs., Berzy T., Pintér J. (2006): Eltérő körülmények között termesztett kukoricahibridek fontosabb tulajdonságainak vizsgálata; Növénytermelés 55: 3-4
71. Heszky L., Simonné Kiss I. (1992): "Dáma" az első magyar "biotech" növényfajta; Növénytermelés 41: 555-557
72. Hu D. (1986): Jinghua No.1, a winter wheat variety derived from pollen sporophyte; In: Hu H., Yang H. (eds.) Haploids of Higher Plants *in Vitro*; Springer-Verlag, Berlin, pp. 137-148
73. Huang B., Sunderland N. (1982): Temperature stress pretreatment in barley anther culture; Ann. Bot. (London) 49: 77-88
74. Hull H.F. (1945): Recurrent selection for specific combining ability in corn; J. Am. Soc. Agron. 37: 134-145

75. Jäger K., Kőszegi D., Barnabás B. (2005a): Regeneration capacity of microspore-derived structures in anther cultures of maize (*Zea mays* L.); Acta Physiol. Plantarum 27: 621-629

76. Jäger K., Kőszegi D., Barnabás B. (2005b): A kukorica portoktenyészetekben a legnagyobb számú spontán dihaploid növényt eredményező mikrospóra eredetű struktúra morfológiai és citológiai jellemzése; Növénytermelés 54: 23-33

77. Jenkins M.T. (1929): Correlation studies with inbred and crossbred strains of maize; J. Agric. Res. 39: 677-721

78. Jenkins M.T. (1935): The effect of inbreeding and of selection within inbred lines of maize upon the hybrids made after successive generations of selfing; Iowa State J. Sci. 3: 429-430

79. Jensen C.L. (1974): Chromosome doubling techniques in haploids; In: Kasha K.J. (ed.) Haploids in Higher Plants: Advances and Potential; University of Guelph, Canada, pp. 153-190

80. Johansson L. (1983): Effects of activated charcoal in anther cultures; Physiol. Plantarum 59: 397-403

81. Johnson I.J., Hayes H.K. (1940): The value of hybrid combinations of inbred lines of corn selected from single crosses by the pedigree method of breeding; J. Am. Soc. Agron. 32: 479-485

82. Kovács G., Kovács M., Barnabás B. (1992): A genotípus és az indukciós táptalaj hatásának vizsgálata kukorica antérakulturában; Növénytermelés 41:193-199

83. Kovács G., Obert B., Barnabás B. (1999): Fertilis növények előállítása egysejtmagvas mikrospórák korai kolhicin kezelésével kukorica (*Zea mays* L.) antérakultúrában; Növénytermelés 48: 13-23

84. Kuleshov N.N. (1955): World's diversity of phenotypes of maize; J. Amer. Soc. Agron. 25: 688-700

85. Kuo C., Guo Z.C., Li Z., Gui Y. (1994): Anther culture and haploid breeding of maize in China; In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 25, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 149-161

86. La Rue (1949): Cultures of the endosperm of maize. (Abstr.) Am. J. Bot. 36: 798 In: King P., Shimamoto K. (1984): Handbook of Plant Cell Culture; pp. 72-73

87. Láng L. (1999): Eredmények és törekvések a martonvásári búzanemesítési kutatásokban. In: Bedő Z., Veisz O. (eds.) Ötven éves a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézete: a Jubileumi Tudományos Ülés Kiadványa. Martonvásár, MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, pp. 66-69

88. Lantos Cs., Mihály R., Páricsi S., Kertész Z., Mesterházi Á., Matuz J., Pauk J. (2006): Using of androgen-derived haploids in wheat breeding; XIXth International Congress on Sexual Plant Reproduction, 11-15 July 2006, Budapest, Hungary; Abstract book: 91-92

89. Lashermes P., Beckert M. (1988): Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines; Theor. Appl. Genet. 76: 405-410

90. Lazar M.D., Shaeffer G.W., Baenziger P.S. (1984): Cultivar and cultivar x enviroment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat; Theor. Appl. Genet. 67: 273-277

91. Levan A. (1938): Effect of colhicine on root mitosis in *Allium*; Hereditas 24: 471-486

92. Linsmaier-Bednar E.M., Bednar T.W. (1972): Light and hormonal control of root formation in *Zea mays* callus cultures; Dev. Growth Differ. 14: 165-174

93. Loeffel F.A. (1964): S1 crosses compared with crosses of homozygous lines; Proc. Ann. Corn Sorghum Res. Conf. 19: 95-104

94. Loeffel F.A. (1971): Development and utilization of parental lines; Ann. Corn Sorghum Res. Conf. 26: 209-217

95. Longin C.F.H., Utz H.F., Reif J.C., Schipprack W., Melchinger A.E. (2006): Hybrid maize breeding with doubled haploids: I. One-stage versus two-stage selection for testcross performance; Theor Appl. Genet. 112: 903-912

96. Longin C.F.H., Utz H.F., Melchinger A.E., Reif J.C. (2007a): Hybrid maize breeding with doubled haploids: II. Optimum type and number of testers in two-stage selection for general combining ability; Theor Appl. Genet. 114: 393-402

97. Longin C.F.H., Utz H.F., Reif J.C., Wegenast T., Schipprack W., Melchinger A.E. (2007b): Hybrid maize breeding with doubled haploids: III. Efficiency of early testing prior to doubled haploid production in two stage selection for testcross perfrmance; Theor Appl. Genet. 115: 519-527

98. Lowe K., Taylor D.B., Ryan P., Paterson K.E. (1985): Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73; Plant Sci. 41: 125-132

99. Lu C., Vasil I.K., Ozias-Akins P. (1982): Somatic embryogenesis in *Zea mays* L.; Theor. Appl. Genet. 62: 109-112

100. Molnar S.J., Gordon P.N., Rice T.B. (1980): Initiation of totipotent tissue cultures from undeveloped axillary and secondary ears; Maize Genet. Coop. Newslett. 54: 52-53

101. Mórocz S. (1993): Szövettenyésztési rendszerek létesítése és géntranszformált növények előállítása kukoricán; Kandidátusi tézisek. Gabonatermesztési Kutatóintézet.

102. Mórocz S., Donn G., Németh J., Dudits D. (1990): An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embriogenic suspension culture; Theor. Appl. Genet. 80: 721-726

103. Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures; Physiol. Plantarum 15: 473-497

104. Murigneux A., Barloy D., Leroy P., Beckert M. (1993a): Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines; Theor. Appl. Genet. 86: 837-842

105. Murigneux A., Baud S., Beckert M. (1993b): Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. 2. Comparison with single-seed-descent lines; Theor. Appl. Genet. 87: 278-287

106. Nagypál B. (2006): DH kukorica nemesítés gyakorlati alkalmazása és eredményei a KWS csoportban; XII. Növénynemesítési Tudományos Napok 2006. március 7-8. Abstract book: 130

107. Nanda D.K., Chase S.S. (1966): An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.); Crop Sci. 6: 213-215

108. Nitsch, C., Andersen, S., Godard, M., Neuffer, M. G., Sheridan, W. F. (1982): Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis; In: Earle E.D., Demarly Y. (eds.) Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture, Praeger, New York, pp. 69-91.

109. Obert B., Orosz Á., Kovács G., Barnabás B. (1998): A haploidindukciós képesség vizsgálata jól indukálható és antérakultúrában nem reagáló kukoricatörzsek hibridjeiben; Növénytermelés 47: 473-481

110. Orosz Á, Barnabás B. (1997): *Per se* analysis of DH maize (*Zea mays* L.) lines in field experiments; Acta Agron. Hung. 45: 277-280

111. Orosz Á, Barnabás B. (2000): A kukoricanemesítési alapanyagok változatosságának növelése exotikus genotípusok felhasználásával; VI. Növénynemesítési Tudományos Napok 2000. március 8-9. Abstract book: 59

112. Pace G.M., Reed J.N., Ho L.C., Fahey J.W. (1987): Anther culture of maize and the visualization of embryogenic microspores by fluorescent microscopy; Theor. Appl. Genet. 73: 863-869

113. Pauk J. (1985): Production of haploid plants of maize (*Zea mays* L.) through androgenesis; Cereal Res. Commun. 13: 47-53

114. Pauk J., Kertész Z., Beke B., Bóna L., Csősz M., Matuz J. (1995): New winter wheat variety: ‚GK Delibab' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenezis. Cereal Res. Commun. 23: 251-256

115. Pauk J., Mihály R., Puolimatka M. (2003): Protocol for wheat (*Triticum aestivum L.*) anther culture. In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds.) Doubled Haploid Production in Crop Plants; Kluwer Academic Publishers, pp. 59-64

116. Pescitelli S.M., Mitchell J.C., Jones A.M., Pareddy D.R., Petolino J.F. (1989): High frequency androgenesis from isolated microspores of maize; Plant Cell Rep. 7: 673-676

117. Pescitelli S.M., Johnson C.D., Petolino J.F. (1990): Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature and sucrose level; Plant Cell Rep. 8: 628-631

118. Pescitelli S.M., Johnson C.D., Petolino J.F. (1994): Isolated microspore culture of maize; In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 25. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 187-200

119. Petolino J.F., Jones A.M. (1986): Anther culture of elite genotypes of maize. Crop Sci. 26: 1072-1074

120. Petolino J.F., Thompson S.A. (1987): Genetic analysis of anther culture response in maize; Theor. Appl. Genet. 74: 284-286

121. Phillips R.L., Somers D.A., Hibberd K.A. (1988): Cell/Tissue cultures of maize In: Sprague G.F., Dudley J. (eds.): Corn and Corn Improvement. ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp. 345-387

122. Picard E., DeBuyser J. (1977): High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats; Ann. Amelior. Plant. 27: 483-488

123. Potrykus I., Harms C.T., Lörz H. (1979): Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.); Theor. Appl. Genet. 54: 209-214

124. Randolph L.F. (1932): Some effects of high temperature on polyploidyand other variations in maize; Genetics 18: 222-229

125. Rawlings J. O., Thompson D.L. (1962): Performance level as criterion for the choice of maize testers; Crop Sci. 2: 217-220

126. Richey F.D., Mayer L.S. (1925): The productiveness of successive generations of self-fertilized lines of corn and of crosses between them; USDA Bull. 1354

127. Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H. (2005): *In vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding; Maydica 50: 275-283

128. Sarkar K.R., Pandey A., Gayen P., Mandan J.K., Kumar R., Sachan J.K.S. (1994): Stabilization of high haploid inducer lines; Maize Genet. Coop. Newslett. 68: 64-65
129. Shannon J.C., Batey J.W. (1973): Inbred and hybrid effects on establishment of *in vitro* cultures of *Zea mays* endosperm; Crop Sci. 13: 491-493
130. Shatskaia O.A., Zabirova E.R., Scherbak V.S., Chumak M.V. (1994): Mass induction of maternal haploids in corn; Maize Genet. Coop. Newslett. 68: 51
131. Sheridan W.F. (1975): Tissue culture of maize. I. Callus induction and growth; Physiol. Plantarum 33: 151-156
132. Shull G. H. (1908): The composition of a field of maize; Am. Breeders Assoc. Rep. 4: 296-301
133. Shull G. H. (1914): Duplicated genes for capsule form in *Bursa bursa-pastoris*; Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl. 12: 97-149
134. Spitkó T., Tóth S., Toldi O., Kiss E., Heszky L. (2001): Kukorica genotípusok hajtásregenerációjának összehasonlítása *in vitro* rendszerben; VII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, p. 130.
135. Sprague G.F. (1939): An estimation of the number of top crossed plants required for adequate representation of corn variety; J. Am. Soc. Agron. 38: 11-16
136. Sprague G.F. (1946): Early testing of inbred lines of corn; J. Am. Soc. Agron. 38: 108-117
137. Sprague G.F., Tatum L.A. (1942): General vs. specific combining ability in single crosses of corn; J. Am. Soc. Agron. 34: 923-932
138. Straus J. (1958): Spontaneous changes in corn endosperm tissue cultures; Science 128: 537-538
139. Sunderland N., Roberts M., Xu Z.H. (1982): Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*; J. Exp. Bot. 33: 1086-1095
140. Suprasanna P., Rao K.V., Reddy G.M. (1986): Plantlet regeneration from glume calli of maize; Theor. Appl. Genet. 72:120-122
141. Sváb J. (1971): Utódcsoportok analízise; In: Sváb J. A populációgenetika alapjai; Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 126-146
142. Sváb J. (1981): Biometrical Methods in Research Work. Mezőgazdasági Kiadó, pp. 113-116.
143. Swanson E.B., Coumans M.P., Wu S.C., Barsby T.L., Beversdorf W.D. (1987): Efficient isolation of microspores and the production of microspore derived embryos from *Brassica napus*. Plant Cell Rep. 6:94-97
144. Szarka B., Dévényi K., Mórocz S. (1999): Termékeny kukoricanövények előállítása mikrospórákból; Növénytermelés 48: 571-582

145. Szél S. (1998): Hibridválasztás; In: Sziberth D., Széll E. (eds.) Amit a kukoricatermesztésről a gyakorlatban tudni kell; Agroinform Kiadó, Budapest

146. Szundy T., Barnabás B., Kovács-Schneider M., Gyenes I. (1995): Dihaploid kukorica beltenyésztett törzsek értékelése tesztkeresztezésekben; I. Növénynemesítési Tudományos Napok, 1996. január 22-23. Abstract book: 31

147. Thiemt E.M., Oettler G. (2008): Agronomic performance of anther-derived doubled haploid and single seed descent lines in crosses between primary and secondary winter triticale; Plant Breeding 127: 476-479

148. Ting Y.C., Yu M., Zheng W.Z. (1981): Improved anther culture of maize (*Zea mays*); Plant Sci. Lett. 32: 139-145

149. Tomes D.T., Smith O.S. (1985): The effect of parental genotype on initiation of embriogenic callus from elite maize germplasm; Theor. Appl. Genet. 70: 505-509

150. Torne J.M., Santos M.A., Pons A., Blanco M. (1980): Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays* L.; Plant Sci. Lett. 17: 339-344

151. Troung-Andre I., Demarly Y. (1983): Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L.) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant; Z. Pflanzenzücht. 92: 309-320

152. Tyrnov V.S., Zavalishina A.N. (1984): Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize (in Russian); Dokl. Akad. Nauk. SSSR 276: 735-738

153. Vergne P., Ricardi F., Beckert M., Dumas C. (1993): Identification of a 32-kDa anther marker protein for androgenic response in maize (*Zea mays* L.); Theor. Appl. Genet. 86: 843-850

154. Wan Y., Petolino J.F., Widholm J.M. (1989): Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus; Theor. Appl. Genet. 77: 889-892

155. Wan Y., Duncan D.R., Rayburn A.L., Petolino J.F., Widholm J.M. (1991): The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther derived maize callus; Theor. Appl. Genet. 81: 205-211

156. Wenzel G., Foroughi-Wehr B. (1984): Anther culture of cereals and grasses; In: Vasil I.K. (ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 1, pp. 311-327

157. Wenzel G., Uhrig H. (1981): Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture; Theor. Appl. Genet. 59: 33-340

158. Zabirova E.R., Chumak M.V., Shatskaia O.A., Scherbak V.S. (1996): Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian); Kukuruza I sorgo N 4: 17-19

8. MELLÉKLETEK

M1 Alkalmazott tenyésztő táptalajok és módosított változataik

Tápoldat összetevők	**YP (Yu-pei)** mg/l	**F** mg/l	**N_6** mg/l	**N_6O_1** mg/l
KNO_3	2500	2500	2830	2830
NH_4NO_3	165	165	-	-
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370	370	185	185
$CaCl_2 \times 2H_2O$	176	176	166	166
KH_2PO_4	510	510	400	400
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	463	463
$MnSO_4 \times 4H_2O$	4,40	22,30	4,40	4,40
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	1,50	8,60	1,50	1,50
H_3BO_3	1,60	6,20	1,60	1,60
KI	0,80	0,83	-	-
$CuSO_4 \times 5H_2O$	-	0,025	0,025	0,025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	-	0,025	0,025	0,025
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	-	0,25	0,25	0,25
$FeSO_4 \times 7H_20$	27,80	27,80	27,80	27,80
Na_2EDTA	37,30	37,30	37,30	37,30
Nikotinsav	1,30	-	0,50	0,50
Glicin	7,70	-	2,00	2,00
Thiamin-HCl	0,25	0,50	0,10	0,10
Piridoxin-HCl	0,25	-	0,50	0,50
Mezo-inozit	-	100	-	-
L-Asparagin	-	150	-	-
Kazein hidrolizátum	500	500	-	-
Ca-pantotenát	0,25	-	-	-
2,3,5-TIBA	0,10	0,10	-	-
NAA	-	-	0,50	-
Kinetin	-	-	1,00	-
Szaharóz	120 000	120 000	40 000	40 000
Aktív szén	5 000	5 000	-	-
Agar	8 000	-	6 000	6 000
Gelrite	-	2 500	-	-
pH	5,80 (KOH)	5,80 (KOH)	5,80 (KOH)	5,80 (KOH)

YP - Genovesi és Collins (1982) alapján
F - YP közeg általunk módosított változata
N_6 - Chu (1978) alapján
N_6O_1 - módosított, hormonmentes N_6 táptalaj

M2 A teljesítménykísérletben vizsgált hibridek terméseredményei ($t \cdot ha^{-1}$)
Termőhely: Martonvásár; 4 ismétlés és 3 év átlagai (2005-2007)

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	LANC. SLC	ISSS SLC	NR SLC
DH 109	Chi 592	7,94	7,57	8,83
DH 384	Chi 592*A2	7,97	7,80	9,21
DH 136	DH 109*HMv 5405	9,16	9,69	9,30
DH 143	(DH 109*HMv 5405) *HMv 5405	8,96	8,82	9,82
DH 31	HMv 5405*DH 109	8,80	8,82	7,97
DH 141	(HMV5405*DH109)* HMv 5405	9,69	7,31	9,47
DH 105	SR 88*Chi 592	8,25	8,34	9,68
DH 57	DH 105*HMv 5405	9,84	9,27	9,26
DH 64	DH 105*HMv 5405	8,05	9,81	9,61
DH 56	(DH105*HMv5405)* HMv 5405	8,10	10,21	10,62
DH 53	HMv 651-4-ET3* DH 105	7,83	9,16	9,58
DH 63	DH104*(HMv5302*HMv 124-2)	7,40	6,91	8,01
HMv 5405	HMv 5405	10,71	9,48	11,42

Standardok átlaga: 10,46 $t \cdot ha^{-1}$; $SzD_{5\%}$=1,02 $t \cdot ha^{-1}$; Főátlag: 8,94 $t \cdot ha^{-1}$

M3 A teljesítménykísérletben vizsgált hibridek betakarításkori szemnedvesség értékei (%)
Termőhely: Martonvásár; 4 ismétlés és 3 év átlagai (2005-2007)

GENOTÍPUS	GENETIKAI HÁTTÉR	LANC. SLC	ISSS SLC	NR SLC
DH 109	Chi 592	22,94	22,75	23,86
DH 384	Chi 592*A2	20,77	19,78	20,11
DH 136	DH 109*HMv 5405	21,02	22,14	22,79
DH 143	(DH 109*HMv 5405) *HMv 5405	20,32	21,03	21,92
DH 31	HMv 5405*DH 109	24,23	21,50	23,83
DH 141	(HMV5405*DH109)* HMv 5405	19,67	21,61	20,91
DH 105	SR 88*Chi 592	22,74	19,59	20,94
DH 57	DH 105*HMv 5405	22,88	20,01	20,90
DH 64	DH 105*HMv 5405	20,05	20,24	20,67
DH 56	(DH105*HMv5405)* HMv 5405	19,89	19,39	20,23
DH 53	HMv 651-4-ET3* DH 105	21,76	20,20	20,41
DH 63	DH104*(HMv5302*H Mv 124-2)	17,88	17,43	17,94
HMv 5405	HMv 5405	19,60	18,56	20,14

Standardok átlaga: 19,74%; $SzD_{5\%}$= 1,40; Főátlag: 20,84%

M4 Az értekezés témájában megjelent első- és társszerzős közlemények

Elsőszerzős közlemények:

T. Spitkó, L. Sági, L.C. Marton, B. Barnabás (2006): Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays L.*) lines of various origin and of their hybrids; *Maydica* 51: 537-542

T. Spitkó, L. Sági, J. Pintér, L.C. Marton, B. Barnabás (2006): Field performance of hybrids developed from doubled haploid maize inbred lines; *Cereal Research Communications Suppl*. 34: 665-668

T. Spitkó, L. Sági, C.L. Marton, B. Barnabás (2007): Combining ability of doubled haploid maize parental lines; *Cereal Research Communications Suppl.* 35: 1085-1088

T. Spitkó, L. Sági, J. Pintér, C.L. Marton, B. Barnabás (2008): Effect of soil and location on field performance of maize hybrids with doubled haploid pedigree; *Cereal Research Communications Suppl.* 36/2: 987-990

T. Spitkó, J. Pintér, B. Barnabás (2009): Effect of abiotic stress on field performance of maize hybrids; *Cereal Research Communications Suppl.* 37/1: 25-28

Spitkó T., Sági L., Pintér J., Marton L.C., Barnabás B. (2009): *In vitro* dihaploid kukoricavonalak kombinálódó-képessége; XV. Növénynemesítési Tudományos Napok, *Proceedings Book*, pp. 432-436

Spitkó T., Sági L., Marton L.C., Pintér J., Barnabás B. (2010): *In vitro* dihaploid szülőkomponensű kukoricahibridek szántóföldi teljesítményvizsgálata; *Növénytermelés* 59: *(in press)*

T. Spitkó, L. Sági, L.C. Marton, J. Pintér, B. Barnabás (2010): General and specific combining ability of *in vitro* doubled haploid lines on field; *Acta Agronomica Hungarica* 58(2): 167-177

T. Spitkó, L. Sági, L.C. Marton, J. Pintér, B. Barnabás (2010): Combining ability of *in vitro* doubled haploid maize parental lines; *Növénytermelés Suppl.* 59: 547-550

Társszerzős közlemény:

B. Barnabás, T. Spitkó, K. Jäger, J. Pintér, L.C. Marton (2005): Strategy for improvement of doubled haploid production in maize; *Acta Agronomica Hungarica* 53: 177-182

M5 Konferencia-részvétel az értekezés témájában

T. Spitkó, L. Sági, L.C. Marton, B. Barnabás (2006): Haploid induction ability of Hungarian maize (*Zea mays* L.) hybrids; „Haploids in Higher Plants III" Conference, Vienna-Austria; *Abstracts Book* p. 56

T. Spitkó, L. Sági, L.C. Marton, J. Pintér, B. Barnabás (2006): Maize hybrid combinations with doubled haploid parental background; XXth International Conference of the EUCARPIA Maize and Sorghum Section; *Abstracts Book* p. 121

Spitkó T., Sági L., Marton L. Cs., Barnabás B. (2007): *In vitro* dihaploid kukoricavonalak kombinálódó-képességének vizsgálata; XIII. MTA Növénynemesítési Tudományos Napok; 2007. március 12. *Abstracts Book* p. 140

Spitkó T., Sági L., Pintér J., Marton L. Cs., Barnabás B. (2008): Dihaploid szülőkomponensű kukoricahibridek termőhelyi reakciója; XIV. MTA Növénynemesítési Tudományos Napok; 2008. március 12.; *Abstracts Book*: p. 96

T. Spitkó, L. Sági, J. Pintér, L. C. Marton, B. Barnabás (2009): Combining ability of doubled haploid maize parental lines; XXI. EUCARPIA Conference "Maize and Sorghum Breeding in the Genomics Era" *Abstracts Book* p. 108.

T. Spitkó, L. Sági, L.C. Marton, B. Barnabás (2010): Haploid induction ability of Hungarian maize (*Zea mays* L.) hybrids; The International Conference of „Green Plant Breeding Technologies" Vienna-Austria, February 2-5 2010, *Abstracts Book*, p. 81

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm **Dr. Barnabás Beáta** és **Dr. Sági László** témavezetőknek a szakmai segítséget, és a lehetőséget, hogy a dolgozatban bemutatott témákkal foglalkozhattam, továbbá köszönöm **Dr. Heszky László** programvezetőnek, hogy lehetőségét nyújtott a Doktori Iskola „Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel” programjában való részvételemhez.

Köszönettel tartozom **Dr. Marton L. Csabának** a szántóföldi keresztezési programok összeállításában nyújtott segítségéért és a hibridkísérletek elvégzésére kapott lehetőségért. Hálával tartozom továbbá **Gondos Erikának** és **Marosánné Zajácz Annának** a szövettenyésztéshez, **Pók Istvánnak** a statisztikai értékeléshez, valamint **Harasztos Barbarának** az angol szöveg elkészítéséhez nyújtott segítségükért.

Köszönetet mondok a MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet, Kukoricanemesítési Osztály munkatársainak, elsősorban **Dr. Pintér Jánosnak** és **Dr. Hadi Gézának** értékes tanácsaikért és az **összes dolgozónak** a kísérletek kivitelezésében nyújtott áldozatos munkájukért.

A szövettenyésztési és a szántóföldi munkákat a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal támogatta (**Jedlik Ányos Pályázat**, OM-00063/2008), valamint utazási segítséget az **Apponyi Albert Program** (Mecenatúra) nyújtott több alkalommal.