

SZENT ISTVÁN EGYETEM

***In vitro* dihaploid kukoricavonalak szövettenyésztési
eredményei és kombinálódó-képesség vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

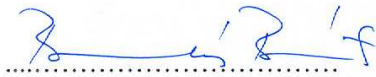
Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

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

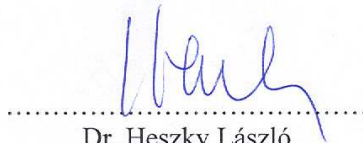
Dr. Sági László, PhD (biol.)
tudományos főmunkatárs
MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet



Dr. Barnabás Beáta
társtémavezető



Dr. Sági László
társtémavezető



Dr. Heszky László
iskolavezető

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

Száz éve új fejezet kezdődött a kukoricanevelés történetében, amikor George Harrison Shull elsőként számolt be beltenyészett vonalak keresztezéséből származó hibridek kedvező terméseredményeiről és nagyfokú kiegyenlítetttségéről (Shull, 1908). Hat évvel később bevezette a „heterózis” fogalmát, amelyre akkor a *hybrid vigor* kifejezést használta (Shull, 1914). A világon az 1930-as években kezdett jelentősen elterjedni a beltenyésztes hibridek termesztése, fokozatosan felváltva ezzel a szabadon elvirágzó kukoricafajtákat. Az új módszerrel előállított hibridkukoricák az addig használt tájfajtákat elsősorban termésben, betakarításkori szemnedvességben és egyöntetűségben múlták fölül; ez utóbbi tulajdonság a mezőgazdaság gépesítésének elterjedésével vált különösen fontossá.

A beltenyésztes időközben a hagyományos kukoricanevelés alapeszközévé vált, mellyel hosszú ideig stabilan fenntartható, más vonalaktól megkülönböztethető, de ugyanakkor egyöntetű nemesítési alapanyagokat hoztak létre.

1.1 Problémafelvetés

Az elmúlt száz esztendő nagy részében a beltenyésztes 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 beltenyésztes 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 beltenyésztes törzsek előállítási ideje viszont más módon csökkenthetővé vált a hatvanas évek közepétől.

A kukorica esetében a szántóföldi monoploid módszerrel (Chase, 1969) és a mikrspóra eredetű szövettenyésztéssel egy éven belül lehetőség van közel 100%-ban homozigóta vonalak előállítására a beltenyésztes 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 - nemesítói igényeknek megfelelő - kiválogatása előz meg.

Fenti módszerek megítélése az elmúlt három évtizedben sokat változott, a kereskedelmi hibridek piaci élettartama 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 beltenyésztési technikákkal szemben.

1.2 Célkitűzés

A kísérletek 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 dihaploid (DH) szülővonalak hibridkombinációinak termésstabilitása különböző termőterületeken és évjáratokban?
- A DH szülőkomponensű hibridek elérik-e a kereskedelmi forgalomban lévő hibridek (standardok) termésátlagát úgy, hogy közben a betakarításkori szemnedvességük az elvárható értékek közelében marad?
- Melyek a jövőbeli perspektívái a portoktenyésztési technikának a hibridnemesítésben?

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 A vizsgált genotípusok

A portoktenyésztési kísérletekben két jól regeneráló, kínai vonal eredetű (DH 109 és DH 105) genotípus szerepelt, továbbá egy martonvásári, a szövettenyésztésre nem jól reagáló elit vonal (HMv 5405). A fent említett vonalakból végzett egyszeres, reciprok és visszakeresztezéssel előállított szisztematikus sorozat képezte a kísérlet alapját. Vizsgáltuk még három, szomatikus szövettenyésztésre elterjedten használt genotípus (A 188, B 73, Oh 43), valamint a 4C1 négyvonalas és három martonvásári csemegekukorica hibrid haploidindukciós képességét is. A vetésidő hatását a DH 109-nek az elit vonallal alkotott reciprok hibridkombinációiban vizsgáltuk.

2.2 Dihaploidok előállítása

Martonvásáron a jó haploid kalluszindukciós és megfelelő regenerálódó képességű kínai genotípusra hatékony portoktenyésztési és DH előállítási módszer épült (Barnabás *et al.*, 1999).

2.2.1 Mintagyűjtés

Munkánk során kizárólag szántóföldön nevelt növények címerhányás előtt izolált virágzataiból származó portokokat használtunk explantumként. A portokokban található mikrospórák fejlettségi állapotát a laboratóriumban kárminecetsavas festéssel állapítottuk meg.

A vetésidő hatásának vizsgálatokor a 4 kísérleti évben a reciprok F_1 hibrideket mindig ugyanazokon a napokon (május 2., 9., 16. és 23.) vetettük el.

2.2.2 Az explantumok előkezelése

Az éretlen portokokat tartalmazó címert a burkoló levelekből kibontottuk, majd alumínium fóliába csomagolva 10 napos előkezelést végeztünk 7°C-on a leoltás előtt (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 állapotú mikrospórákat tartalmazó portokokból indítottuk. A felszíni sterilizálás 70%-os etanollal 2 percig, majd 20%-os hypoklorit oldattal 20 percig történt, amit háromszor megismételt steril desztillált vizes öblítés követett.

2.2.3 A táptalajok összetétele

A haploidindukciót ún. F táptalajon (500 mg·l⁻¹ kazein hidrolizátum, 120 g·l⁻¹ szaharóz, 0,1 mg·l⁻¹ 2,3,5-TIBA, 5 g·l⁻¹ aktív szén és 2,5 g·l⁻¹ Gelrite hozzáadásával módosított Yu-Pei táptalaj, Genovesi és Collins, 1982) vizsgáltuk. A növényregeneráció N₆ alapú (Chu *et al.*, 1975) táptalajon történt 1 mg·l⁻¹ kinetin és 0,5 mg·l⁻¹ alfa-naftil-ecetsav kiegészítéssel. Ezt a táptalajt a kisebb növények felneveléséhez használtuk, majd csökkentett cukortartalmú (20 g·l⁻¹ szaharóz), hormonmentes N₆O₁ táptalajon neveltük a növénykéket a megfelelő mennyiségű gyökér és szár differenciációjáig.

2.2.4 Az *in vitro* tenyésztés

A tenyészeteket a leoltás után 28 napig 28°C-on, sötétben inkubáltuk, majd a képződött struktúrákat megszámláltuk, és növényregenerációs táptalajra helyeztük. Egy Petri csészébe 20-30 kalluszt helyeztünk, majd 26°C-on 16 órás megvilágítás mellett növénynevelő kamrában tartottuk a tenyészeteket.

A hajtáskezdemények fél centiméteres nagyság elérése után kerültek sterilizált befőttesüvegbe, hormonmentes N₆O₁ táptalajra. Az 5-7 cm-t elért gyökeres növényeket ezután tápkockába ültettük. Az akklimatizációt követően a növényeket növénynevelő kamrában neveltük 18°C-os nappali és 15°C-os éjszakai hőmérsékleten (16 órás megvilágítással).

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

2.3 Szántóföldi kombinálódó-képesség vizsgálatok

Martonvásáron, 3 egymást követő évben (2005-2007), 12 DH kukoricavonalat és a martonvásári elit vonalat (HMv 5405) használtuk szülőkomponensként keresztezéses kísérleteinkben. A teszterek martonvásári testvérvonal keresztezéssel létrehozott Lancaster és Iowa Stiff Stalk Synthetic (ISSS) SLC apák voltak, valamint egy harmadik, az ismert rokonsági köröktől eltérő, nem rokon SLC (NR SLC) tesztet használtunk.

A vizsgált hibridek teljesítményét az OMMI (később MgSzH) kísérleteiben is használt, az éréscsoportnak megfelelő standardokéval vetettük össze.

2.3.1 Tenyészkerti elrendezés és a teljesítményvizsgálatok

A martonvásári eredményekből számítottuk ki a DH vonalak, a HMv 5405 és tesztereik általános és specifikus kombinálódó-képességét, míg a teljesítménykísérletek eredményeit több termőterületről (Martonvásár, Mezőkövesd és Szarvas) 3 évben (2006-2008) gyűjtött értékekkel határoztuk meg. A terméseredményeket ($t \cdot ha^{-1}$) 15% szemnedvességre átszámolva adtuk meg.

2.3.2 Morfológiai jellemzés

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 rögzíthettünk néhány morfológiai tulajdonságot.

2.4. Az eredmények statisztikai értékelése

A vizsgálatok alapadatait varianciaanalízisnek vetettük alá, amit az „Agrobase 99[®] for Microsoft Windows[®]” számítógépes programmal végeztünk el, majd Sváb (1981) útmutatása alapján értelmeztünk.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A szövettenyésztés eredményei

A DH 109 szülőkomponensű F₁ hibridek *antérválasza* 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 egyszeres keresztezésekből származó DH vonalaknál nagyobb, míg az elittel visszakeresztett BC₁ hibridekből származó vonalak esetében kisebb antérválaszt tapasztaltunk.

A DH 105 vonal F₁ hibridjein és DH származékain végzett kísérletek a fenti megállapításainkat megerősítették. A hibridek 25-27% között, a DH vonalak 10 és 17% között mutattak antérválaszt. A gyakoriságok tehát azonos tendenciát mutattak, de az értékek kisebbek voltak a DH 109-nél tapasztaltaktól. Ezzel összhangban a két- donor genotípus közül a DH 109 13%-os, a DH 105 pedig kisebb, 8%-os antérválaszt mutatott. A legjobb antérválaszt a DH 109 származékain végzett vizsgálatokban: a DH 31, DH 136 vonalakon, valamint az F₁ és a reciprok kombinációkon tapasztaltunk. A DH 105 rokonságán végzett kísérletek eredményei ettől elmaradtak, és a legtöbb kalluszt az F₁ hibridek portokjairól izoláltuk.

A kísérletben a martonvásári elit vonal is reagált a szövettenyésztésben. A HMv 5405 portokjaiból összesen 16 db kalluszt sikerült indukálni (1,8%). Ez arra enged következtetni, hogy egyes elit genotípusok között is lehetséges kis mértékű indukció.

Az F₁ kombinációk a *kalluszindukcióra* 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. 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. A DH 109 szülőkomponensű F₁ 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 7,8%-a regenerált teljes növényt. A genotípusok között a DH 136 és a DH 31 a vártnál alacsonyabb regenerációs hatékonysággal rendelkezett. A hibrid fölény és az anyai hatás nem volt következetesen megállapítható. A DH 105 származékainál például a DH vonalak rendszerint fölülmúlták az F₁ hibridek eredményeit. A zöld növény gyakoriság azonban ebben az esetben is 1,5-3,5% között alakult.

A felnevelt intakt növények 60-80%-a termelt 10 szemnél többet, amelyeket *fertilisnek* tekintettünk, kivétel ez alól a - DH 109 származási csoportjából - a DH 141 volt (45%). A DH 105 és utódjainak esetében ez az arány 30-60% között alakult.

Az éretlen embriótenyésztésben sikeresen és gyakran alkalmazott, ún. „modell” *genotípusok* (A 188, B 73, 4C1, Oh 43; Green és Phillips, 1975; Gengenbach, 1982), valamint egyéb martonvásári csemegekukoricák kalluszindukciós képességét is vizsgáltuk a DH módszerünkkel. Kísérleteink eredménye, hogy a fenti genotípusok többsége, még az 1%-os indukciós gyakoriságot sem érte el, kivétel ez alól az Oh 43 volt (2,2%). A relatív kalluszindukció a gyengén reagáló genotípusok esetében 100-225% között volt, azaz az összes kallusz mennyisége 900 leoltott mennyiségből maximum 62 db volt, ami 6,9%-ot jelent az Oh 43 esetében. A gyenge morfogén válasz miatt a zöld növény regeneráció sem sikerült.

A portoktenyésztés a szántóföldön nevelt növények esetében a mintaszedésben munkacsúcsot okoz, amikor a címerhányás előtt nagy mennyiségű explantumot kell a laboratóriumban tenyészteni. Ezért felmerült a kérdés, hogy elnyújtható-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 F₁ hibridet és annak reciprokát használtuk fel.

Négy vetésidőben, 4 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 igazolható - különbségek tapasztalhatók, de a legkorábbi május 2-i vetéshez képest mindhárom vetésidő szignifikánsan kisebb antéraválaszt és kalluszindukciós értékeket eredményezett.

A 4 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 kalluszprodukciónak ítéztünk elő.

3.2 A szántóföldi vizsgálatok eredményei

A szövetenyésztési technikában vizsgált 9 DH vonalat kiegészítve további hárommal (DH 384, DH 53 és DH 63) tenyészkereszt, keresztezési programba állítottuk. A GCA értékek alapján a vizsgált 12 DH vonalból 5 vonal rendelkezett javító értékkel. Közülük a DH 56 átlagosan 0,7 t·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 kívánalmaknak. A kontrollként vizsgált HMv 5405 GCA értéke felülmúlta a DH vonalak értékét ($1,6 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$), 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 $0,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ -ral javított a hibridek termésátlagán. A vizsgált DH vonalak a teszterek közül a NR SLC teszterrel alkották a legkedvezőbb kombinációkat, míg a Lancaster és ISSS SLC apák nem realizáltak megfelelő teljesítményt hibridkombinációikban.

A DH vonalak kombinálódó-képessége mellett nagyon fontos, hogy megfelelő agronómiai-morfológiai tulajdonságokat örökítsenek. A küllemi bírálat utal az adott vonal hazai termesztési körülmények közé történt adaptáltságára is. 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 (Györfly *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. 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.

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 a hibridek teljesítménye mindkét tulajdonságra nézve a vártnak megfelelően normál eloszlást mutatott. A szemtermés tekintetében a DH szülőkomponensű hibridek többsége (25 kombináció) a standardok átlagától kisebb termést adott, 11 DH eredetű hibrid viszont elérte a kívánt termésszintet, és egy hibrid - statisztikailag nem jelentősen - meg is haladta azt. Hasonlóan kedvező eredményt ért el továbbá a 2 kontroll kombináció is.

A kísérlet főátlaga $8,9 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ statisztikailag igazolhatóan kisebb volt a standard átlagnál ($10,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$). 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 a

kívánalmaknak, míg 23 kombináció szemnedvessége nem tért el a standard hibridek átlagától, de ebből 12 szemtermése kevesebb volt $9,4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ -nál, azaz szignifikánsan kevesebbet termelt 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 hibridek termésbiztonságát az évenkénti és termőhelyenkénti termésingadozással lehet becsülni (Szél, 1998). A termésstabilitás vizsgálatához a DH szülőkomponensű hibridek egy kisebb csoportjával három 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 többsége (11 kombináció) nem érte el a standard átlagot, de 3 kombináció statisztikailag igazolhatóan azonos termést ért el, mint a standard hibridek. A standardok több termőhelyes kísérletekben elért terméseredményei (standard átlag: $9,8 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) kisebb volt, mint a martonvásári teljes hibridsorral végzett kísérletünkben (standard átlag: $10,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$). A DH hibridek eredményeinek főátlaga a két teljesítménykísérletben azonos volt ($8,9 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$).

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 meghaladta - statisztikailag nem jelentősen - a standardok terméseredményeit.

4. MEGVITATÁS (KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

4.1 A szövettenyésztés eredményei alapján tett következtetések

Az eredeti kínai szülőtől genetikailag távolabb eső DH származékok antérválasza csökken. Ugyanakkor a képesség megbízhatóan öröklődik, és a tulajdonság a hibridekben heterózishatást mutat (Wenzel és Uhrig, 1981), valamint keresztezéssel könnyen átvihető tulajdonság (Obert *et al.*, 1998). A reciprok kombinációk között - nem minden esetben - anyai hatás is tapasztalható (Tomes és Smith, 1985).

Az *abszolút 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 száma genotípusfüggő, de nem következetesen az antérválasszal együtt változó eredmény (Barnabás *et al.*, 1988). Általánosságban elmondható, hogy amennyiben egy genotípus antérválasza és relatív kalluszindukciós képessége megfelelő, akkor ez megalapozhatja a növényregeneráció sikerét.

A vizsgált vonalak közül a DH 136, DH 31 és a DH 141 genotípusok válasza volt kedvező. A HMv 5405 elit vonal esetében az összes indukált kallusz egyike sem differenciálódott. A kísérletek alapján nem dönthető el, hogy ennél az elit vonalnál jelentkező kismértékű kalluszindukció megismételhető-e más - a gyakorlat számára fontos - genotípusokon. Felvetjük azonban annak lehetőségét, hogy a keresés eredményes lehet, ha az szélesebb genetikai bázison nyugszik.

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

A DH 109 szülőkomponensű F₁ hibridek a portoktenyésztés feltételeinek optimalizálásához is felhasználhatók, mert megbízhatóan reagálnak a tenyésztési körülmények megváltozására, ugyanakkor nagy hatékonysággal rendelkeznek optimális nevelési feltételek között.

Éretlen embriótenyésztésben használt genotípusok vizsgálatakor megállapítható, hogy a felsorolt genotípusok egyike sem alkalmas az általunk használt táptalajokon és optimalizált tenyésztési feltételek között a portoktenyésztésben való használatra, ami megerősíti Brettel *et al.* (1981) és Genovesi és Collins (1982) korábban, más genotípusok és feltételek között kapott megállapításait.

A vetésidőnek jelentős hatása van az antérválaszra és a kalluszindukciós képességre. Ennek okát annak tulajdoníthatjuk, hogy a későbbi vetés miatt a növény vegetációs időszaka mind jobban belecsúszik a hőstressz és légköri aszály által sújtott július eleji időszakba, így a növények fokozottabb stressznek vannak kitéve, ami kedvezőtlenül hat a mikrospórák életképességére.

Következtetésünk egybeesik Nitsch *et al.* (1982), valamint Dieu és Beckert (1986) megállapításával. A vetésidő szerepével kapcsolatban Genovesi (1990) a hőmérséklet napi ingadozásának tulajdonította az eltérő vetésidőkben mutatkozó különbségeket, amelynek hatása volt a tenyésztett portokok minőségére.

4.2 A szántóföldi vizsgálatokból levont következtetések

Összesen 12 DH és az elit vonalat három, eltérő rokonsági körbe tartozó martonvásári SLC teszterrel kereszteztük, majd hibridjeiket teljesítmény-vizsgálatokba állítottuk. Munkánk célja a vonalak általános és specifikus kombinálódó-képességének (GCA, illetve SCA) kiszámítása volt, amely segítségével szolgál a genotípusok nemesítési értékének meghatározásához.

A kísérletben legjobbnak minősített kombináció a HMv 5405*NR SLC hibrid volt, amelynek mindkét szülője (GCA: 1,6 illetve 0,5 t·ha⁻¹) javított (additív genetikai hatás; Sprague és Tatum, 1942) a hibrid értéken, valamint a kombináció maga is terméstöbbletet eredményezett (SCA: 0,4 t·ha⁻¹; domináns és episztatikus hatások; Sprague és Tatum, 1942).

A DH vonalak utódjai közül a DH 56*NR SLC, valamint a DH 143*NR SLC kombinációk érték el egyidejűleg javító GCA és SCA értékeket.

A betakarításkori szemnedvesség értékekből számított GCA és SCA értékek alapján 6 DH vonal (és az elit HMv 5405) GCA eredménye felelt meg a várakozásoknak. A vonalak között ismét szerepelt a DH 56 1%-os, és a DH 64 0,5%-os javító hatással, míg a teszterek közül az ISSS SLC szülő 0,5%-kal javított hibridjei értéken. Az SCA összesen 2 hibrid esetében javította a szemnedvesség értéket a szülők kedvező hatásán felül. A további szemtermés értékeket javító DH 136, DH 143, DH 57 vonalak a betakarításkori szemnedvességet rontották. A szülővonalak közül a DH 56 és a DH 64 genotípusokat találtuk megfelelőnek a két tulajdonságot tekintve.

A vizsgált morfológiai tulajdonságok tekintetében a DH vonalak küllemük alapján kissé eltérőek voltak, de a hagyományos technikával előállított beltenyésztett vonalakhoz képest lényegi különbségeket nem mutattak. 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 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 értékelésével egészítjük ki.

Több évben, több termőhelyen vizsgált 14 hibrid átlagát tekintve megállapíthatjuk, hogy a kombinációk eltérő szemnedvesség mellett változó szemterméssel reagáltak a különböző évekre és környezeti hatásokra. A statisztikai elemzés 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 19,3% körüli maradt. A másik két év nagyobb termést és a szemek magasabb víztartalmát eredményezte.

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 termőhelyek jelentősen befolyásolták a DH eredetű hibridek eredményeinek alakulását. Mezőkövesden kifejezetten alacsony, Szarvason viszont nagy terméseredményeket mértünk, magasabb szemnedvességgel. Az évjáratok termésre kifejtett hatását jelentősebbnek ítéltük, mint a különbségeket a termőhelyek között. Az eltérő évjárat közel $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, a különböző környezet $3 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ legnagyobb termésingadozást okozott. 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. A termőhely és évjárat együttesen legnagyobb $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ terméseredménybeli változást és 4-5%-os szemnedvesség eltéréseket idézett elő betakarításkor.

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 portoktenyésztésből 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 portoktenyésztésben. 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 vonaloknak.
8. Portoktenyésztési munkákban a DH 109 F₁ 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.

IRODALOMJEGYZÉK

1. 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
2. Barnabás B., Szakács É., Sági L., Kovács G. (1988): A haploid kalluszindukció és növényregeneráció genetikai javításának lehetőségei búza antérakultúrában; Növénytermelés 37: 289-292
3. Brettel R.I.S., Thomas E., Wernicke W. (1981): Production of haploid maize plants by anther culture; Maydica 26: 101-111
4. Chase S.S. (1969): Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays L.*); Bot. Rev. 35: 117-167
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. Genovesi A.D., Collins G.B. (1982): *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture; Crop Sci. 22: 1137-1144
11. Green C.E., Phillips R.L. (1975): Plant regeneration from tissue cultures of maize; Crop Sci. 15: 417-421
12. Györfly B., I'so I., Bölöni I. (1965): Kukoricatermesztés; Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
13. Kovács G., Kovács M., Barnabás B. (1992): A genotípus és az indukciós táptalaj hatásának vizsgálata kukorica antérakultúrában; Növénytermelés 41: 193-199
14. Kuleshov N.N. (1955): World's diversity of phenotypes of maize; J. Amer. Soc. Agron. 25: 688-700
15. 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
16. 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
17. Shull G. H. (1908): The composition of a field of maize; Am. Breeders Assoc. Rep. 4: 296-301
18. Shull G. H. (1914): Duplicated genes for capsule form in *Bursa bursa-pastoris*; Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl. 12: 97-149
19. Sprague G.F., Tatum L.A. (1942): General vs. specific combining ability in single crosses of corn; J. Am. Soc. Agron. 34: 923-932
20. Sváb J. (1981): Biometrical Methods in Research Work. Mezőgazdasági Kiadó, pp. 113-116
21. Szél S. (1998): Hibridválasztás; In: Sziberth D., Széll E. (eds.) Amit a kukoricatermesztésről a gyakorlatban tudni kell; Agroinform Kiadó, Budapest
22. Tomes D.T., Smith O.S. (1985): The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize germplasm; Theor. Appl. Genet. 70: 505-509
23. Wenzel G., Uhrig H. (1981): Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture; Theor. Appl. Genet. 59: 33-340

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

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. Növénytermelési 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

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; XX 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 Növénytermelési 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 Növénytermelési 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; International Conference of „Green Plant Breeding Technologies” Vienna-Austria, February 2-5 2010, *Abstracts Book*, p. 81

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 „Növénynevelés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel” programjában való részvételemhez.

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

Köszönetet mondok a MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet, Kukoricanevelési 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.