

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## ***AZ IN VITRO* SZAPORÍTÁS HATÉKONYSÁGÁNAK FOKOZÁSÁT CÉLZÓ ELJÁRÁSOK ALKALMAZÁSA KERTÉSZETI NÖVÉNYEKEN**

**dr. Mészáros Annamária**

**Budapest  
2006**

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Kertészettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Multidiszciplináris agrártudományok  
(Növénytermesztési és kertészeti tudományok,  
Biológiai tudományok)

**vezetője:** Dr. Papp János  
egyetemi tanár, DSc.

Budapesti Corvinus Egyetem,  
Kertészettudományi Kar,  
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

**Témavezető:** Dr. Balázs Ervin  
kutató professzor, MHAS.  
MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete  
Alkalmazott Genomikai Osztály

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Dr. Papp János  
(Az iskolavezető jóváhagyása)

.....  
Dr. Balázs Ervin  
(A témavezető jóváhagyása)

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2006 november 28.-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke:**

**Hrotkó Károly, DSc, Budapesti Corvinus Egyetem**

**Tagjai:**

**Droppa Magdolna, DSc, Budapesti Corvinus Egyetem**

**Szőke Éva, DSc, Semmelweis Egyetem**

**Dobránszky Judit, CSc, Debreceni Egyetem**

**Opponensek:**

**Jenes Barnabás, CSc, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont**

**Bisztray György, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem**

**Titkár:**

**Jámborné Benczúr Erzsébet, CSc, Budapesti Corvinus Egyetem**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>5</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>8</b>
2.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában.....	8
2.1.1. Az <i>in vitro</i> szaporítás néhány fontosabb módszere.....	8
2.1.2. A fontosabb növényi növekedésszabályzó anyagok.....	8
2.1.3. Az <i>Atropa belladonna</i> szövettenyésztésének eddigi eredményei.....	9
2.1.4. A <i>Populus</i> nemzetség szövettenyésztésének eddigi eredményei.....	10
2.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában .....	11
2.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata .....	15
2.3.1. Új típusú tenyésztő berendezések: a bioreaktorok .....	15
2.3.1.1. A bioreaktorok típusai.....	16
2.3.2. Az ananász ( <i>Ananas comosus</i> ) mikroszaporítása.....	18
2.3.3. A banán ( <i>Musa nana</i> ) mikroszaporítása.....	18
2.3.4. Árnyékliliom ( <i>Hosta</i> ) fajták mikroszaporítása.....	19
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>21</b>
3.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában .....	21
3.1.1. Növényanyag.....	21
3.1.2. Táptalajok.....	21
3.1.3. A növénynevelés körülményei.....	22
3.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában.....	22
3.2.1. Növényanyag.....	22
3.2.1.1. Málna ( <i>Rubus idaeus</i> L.).....	22
3.2.1.2. Gerbera ( <i>Gerbera jamesonii</i> Bolus ex. Hook) .....	22
3.2.1.3. Spárga ( <i>Asparagus officinalis</i> L.).....	23
3.2.2. Táptalajok.....	23
3.2.3. A növénynevelés körülményei.....	24
3.2.4. A fotoszintetikus pigment tartalom mérése .....	24
3.2.5. A fotoszintetikus aktivitás vizsgálata .....	24

3.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata .....	26
3.3.1. Növényanyag.....	26
3.3.2. Táptalajok.....	26
3.3.3. A növénynevelés körülményei.....	27
3.3.3.1. A bioreaktor és működése .....	27
3.3.3.2. A növényanyag manipulálása – a hengerek ürítése és újratöltése .....	28
3.3.4. Fotoszintézis mérése hordozható infra vörös gázanalizátorral .....	29
3.3.5. Anatómiai vizsgálatok.....	29
3.4. A kísérletek értékelésének módszere.....	30
<b>4. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>31</b>
4.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában.....	31
4.1.1. <i>ATROPA BELLADONNA</i> .....	31
4.1.1.1. Hajtáscsúcsból indított tenyészetek.....	31
4.1.1.2. Szomatikus szövetekből létesített tenyészetek.....	32
4.1.2. <i>POPULUS ALBA</i> .....	39
4.1.2.1. Hajtáscsúcsból indított tenyészetek .....	39
4.1.2.2. Nóduszból indított tenyészetek .....	40
4.1.2.3. Szomatikus szövetekből létesített tenyészetek.....	41
4.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában .....	46
4.2.1. Triakontanol hatása málna ( <i>Rubus idaeus</i> 'Malling Exploit') tenyészetek szaporodására és gyökeresedésére.....	46
4.2.2. A triakontanol hatása gerbera ( <i>Gerbera jamesonii</i> ) tenyészetek szaporodására és gyökeresedésére.....	49
4.2.3. A triakontanol hatása a spárga ( <i>Asparagus officinalis</i> ) szaporodására és gyökeresedésére.....	52
4.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer : egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata a szaporítás folyamatában .....	55
4.3.1. Kísérletek ananász ( <i>Ananas comosus</i> ) tenyészetekkel.....	55
4.3.2. Kísérletek <i>Hosta</i> tenyészetekkel.....	56
4.3.3. Kísérletek banán ( <i>Musa nana</i> ) tenyészetekkel .....	60
4.4. Új eredmények .....	63
<b>5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....</b>	<b>64</b>
5.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában.....	64

<b>5.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában .....</b>	<b>67</b>
<b>5.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata a szaporítás folyamatában .....</b>	<b>69</b>
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>74</b>
<b>6.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában.....</b>	<b>74</b>
<b>6.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában .....</b>	<b>75</b>
<b>6.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioraktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata a szaporítás folyamatában .....</b>	<b>76</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>79</b>
<b>7.2. Application of triacontanol in the micropropagation of horticultural plants.....</b>	<b>79</b>
<b>7.3. Liquid culture system: trials with a novel type bioreactor in the propagation process.....</b>	<b>80</b>
<b>MELLÉKLETEK.....</b>	<b>82</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>83</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>91</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>2-iP</b>	<b>2-izopentenil-adenin</b>
<b>BAP</b>	<b>6-benzilamino-purin</b>
<b>IES</b>	<b>indol-3-ecetsav</b>
<b>IVS</b>	<b><math>\beta</math>-indol-vajsav</b>
<b>KIN</b>	<b>kinetin (6-furfurilaminopurin)</b>
<b>MS</b>	<b>Murashige &amp; Skoog (1962) táptalaj</b>
<b>NES</b>	<b><math>\alpha</math>-naftil-ecetsav</b>
<b>TDZ</b>	<b>tidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea)</b>
<b>TRIA</b>	<b>triakontanol</b>
<b>ZEA</b>	<b>zeatin</b>

## 1. BEVEZETÉS

Az *in vitro* szaporítás, mint a kertészeti szaporítóanyag előállítás egyik módszere, az elmúlt évtizedek alatt létjogosultságot szerzett a hagyományos eljárások mellett. Előnyei mellett szól a genotípusok értékes tulajdonságainak fenntartása, a nagy tömegű, egységes növényanyag előállításának lehetősége, a hagyományos módszerekhez képest jóval kisebb felület igény. Az egyébként nehezen szaporítható növényfajok esetében különösen indokolt lehet a bekapcsolása a szaporítás vagy fajtafenntartás rendszerébe. Az üzemi méretekben működő technológiák hosszas kutató-fejlesztő munka eredményeként alakultak ki. A 70-es, 80-as években a kutatások a steril tenyésztés módszertanának kidolgozására, a gazdaságilag jelentős növényfajok/fajták szaporításba vételére irányultak. Ennek keretében a különböző táptalajok kifejlesztése, a növekedésszabályzó anyagok hatásának vizsgálata, a genotípus és környezeti tényezők kölcsönhatásának kérdései kerültek előtérbe.

A mikroszaporítás folyamata a kiinduló növényanyag több egymást követő tenyészciklusban történő megsokszorozása, citokininnek által előidézett folyamatos hajtásképződés útján. Az egyes citokinineknek a növényekre gyakorolt hatása eltérő lehet, a citokinin típusa, koncentrációja, a növény genotípusa, a tenyésztetbe vont szövetek kora, élettani állapota mind befolyásoló tényezők. Egy adott növényfaj vagy fajta szaporításba vétele előtt célszerű megállapítani, hogy melyik az a citokinin amelynek alkalmazása a legtöbb új hajtás képződését idézi elő a tenyészciklus folyamán hajtáscsúcsból vagy a növény más szöveteiből kiindulva. A növényi sejtek totipotenciája elviekben lehetőséget nyújt arra, hogy szomatikus sejtekből is lérejöhessen a teljes növény. A genetikai transzformáció sikerének alapvető feltétele, hogy ismerjük azokat a feltételeket, melyek között a sebzett szövetek sejtjei képesek új hajtások regenerálására. Mivel az *in vitro* tenyésztés környezeti feltételei adottak, ezért általában a növekedésszabályzó anyagok, a citokininek és auxinok alkalmazásával, típusuk, mennyiségük és arányuk meghatározásával szabályozhatók ezek a folyamatok. Kísérleti munkánkban két modellnövényen vizsgáltuk a különböző citokininek hatását a hajtásképződés folyamatában.

A mikroszaporítási technológiák rutinszerű alkalmazása során, az üzemi gyakorlatban bebizonyosodott, hogy a növekedésszabályzó anyagok mennyiségének növelése, ill. a magas koncentrációk folyamatos alkalmazása egy idő után nem emeli a szaporodási rátát, sőt a növényanyag minőségének leromlásához vezet. Sok esetben figyelték meg vitrifikáció, hajtás- vagy levél torzulás, többfejűség megjelenését az optimálisnál magasabb citokinin koncentráció hatására. Ezért komoly érdeklődésre tarthat számot minden olyan módszer, amely a szaporítási folyamat hatékonyságát növeli, akár azzal, hogy a kihozatali arányt emeli, akár azzal, hogy a növényanyag



minőségét javítja, lehetővé téve ezzel a jobb túlélési arány elérését. Így fordult a figyelem különböző természetes anyagok felé, melyeknek a növények növekedésére gyakorolt pozitív hatását szabadföldi kísérletekben már igazolták. Érdeklődésünket a triakontanol iránt egy szőlő ültetvény permetezését követő kedvező tapasztalatok keltették fel. Munkacsoportunk az elsők között kezdte vizsgálni a triakontanol hatását a mikroszaporítás sajátos körülményei között. Citromfűvel, majd gyümölcs alanyokkal végzett kísérleteink messzemenően igazolták a várakozásokat, minden esetben a triakontanol pozitív hatásait tapasztaltuk. Ezen eredmények ismeretében döntöttünk a munka továbbfolytatása mellett, annak érdekében, hogy további növényfajokon is vizsgálhassuk a triakontanol hatásait.

Az 1990-es évek elején a kereskedelmi mikroszaporítás fejlődése - a korábbi 14-16%-os éves bővülés után – megtorpant. Ennek az volt a magyarázata, hogy a mikroszaporítás népszerűsége a magas termelési költségek miatt erősen csökkent. A magas termelési költségek legfontosabb elemei a nagy élómunka ráfordítás, az alacsony szaporítási fok és a gyenge túlélési arány az akklimatizáció során. Napjainkban is elmondható hogy a mikroszaporítás további térhódítása csak a költségek csökkentésével képzelhető el. Erre szolgáltat lehetőséget az automatizálás, melynek különböző megoldásait intenzíven vizsgálják. Az új technológiák alkalmazásához ideális eszköz a folyékony táptalajok alkalmazása. Az elmúlt évtized intenzív kutatásai nyomán sokféle, különböző elven működő bioraktort fejlesztettek ki, melyek közül több ma már szabadalmi oltalom alatt áll. Ehhez új edényeket, új berendezéseket is kellett kialakítani. Ezen berendezések legtöbbször működése az időleges elárasztás elvén alapul, azaz a tenyészetek nem állandóan, vagy nem teljes felületükkel merülnek a folyadékba. A tenyészedényekben a folyadékot kezdetben csak forgatták vagy kevertették, később a steril levegő bevezetését is megoldották, így a növények életképessége lényegesen javult. Napjainkban már a légtér összetételének megváltoztatására törekszenek, széndioxid bevezetésével. Kísérleti munkánk egy hazai fejlesztésű bioreaktor kipróbálására irányult, három különböző növény növekedési paramétereinek vizsgálatával.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk első időszakában a citokininek hatását vizsgáltuk a hajtásképződés folyamatában két eltérő növekedési típusú: a lágyszárú *Atropa belladonna*, mely fontos gyógynövény, és a díszítő értéke valamint fája miatt értékes fehér nyár (*Populus alba*) tenyészeteiben.

Kísérleteink során arra a kérdésre kívántunk választ kapni, hogy a különböző citokininek milyen mértékben képesek a hajtásképződést előidézni és ezzel javítani mind a szaporítás, mind a regeneráció hatékonyságát.

Vizsgálni kívántuk azt is, hogy a növények különböző szomatikus szöveteiben lehet-e hajtásképződést kiváltani, illetve, hogy mely szövetek alkalmasabb leginkább a hajtásindukcióra.

A triakontanol hatásának vizsgálata során azt kívántuk megállapítani, hogy a szer alkalmazása hogyan változtatja az egyes növények növekedési és élettani tulajdonságait. Mivel a szaporítás folyamata ténylegesen két fázisra, a felszaporításra majd a gyökereztetésre különíthető el, célul tűztük ki, hogy mind a hajtás- mind a gyökérfejlődés folyamatában nyomon kövessük a triakontanol hatásait. Célunk volt az is, hogy eredményeink közvetlenül hasznosulhassanak a gyakorlatban, ezért olyan növényeket választottunk kísérleti objektumként, – málna (*Rubus idaeus*), gerbera (*Gerbera Jamesonii*), spárga (*Asparagus officinalis*)- melyek mikroszaporítása világszerte kereskedelmi méretekben folyik.

A technológiai fejlesztésre irányuló munkánkat szintén a gyakorlat számára átadható eredmények elérése motiválta. Egyik célunk volt, hogy igazoljuk egy hazai fejlesztésű szaporító berendezés (bioreaktor) gyakorlati alkalmazhatóságát és összehasonlítási alapot szolgáltatassunk más berendezésekkel való összevetéshez. Ehhez olyan növényeket választottunk – banán, ananász- amelyek gazdasági szempontból fontosak, tehát számos országban szaporítják őket, és mi is rendelkezünk előzetes tapasztalatokkal ezen a téren.

Célul tűztük ki annak bizonyítását is, hogy a folyadék alapú tenyészetek megfelelő hatékonyságúak, valamint, hogy a bioreaktorban szaporított növények, növekedési paramétereiket és élettani tulajdonságaikat tekintve legalább olyan jó minőségűek, mint a hagyományos szilárd táptalajon fejlődött társaik.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

#### 2.1.1. Az *in vitro* szaporítás néhány fontosabb módszere

A merisztéma- és hajtáscsúcs kultúrák esetében már differenciálódott növekedési pontokból indul meg az organogenezis folyamata. A merisztémák izolálása nehéz és a túlélés aránya általában alacsony, ezért az ilyen tenyészeteket inkább csak vírusmentesítés céljára használják. A hajtáscsúcsból indított tenyészeteket széles körben alkalmazzák szaporítási célokra, mivel nagy fokú genetikai stabilitást biztosítanak (Pierik, 1987).

Mind a merisztémából, mind a hajtáscsúcsból hajtás vagy gyökeres növényke fejlődik, amely megfelelő körülmények között tovább szaporítható. Az alkalmazott táptalajok összetétele, hormontartalma a növényfajtól, az explantátum fejlettségétől, valamint a szaporítás céljától és nagyságrendjétől függően széles skálán változik. A hajtás proliferáció általában citokinin alkalmazásával segíthető elő (Debergh és Maene, 1991).

A különböző növényi szövetekből, amelyekben nincsenek rügyprimordiumok, *in vitro* körülmények között új növények fejlődése indukálható. Ha az új hajtás az explantátum szöveiteiből fejlődött ki, közvetlen organogenezisről, ha pedig az explantátum szöveiteiből először kallusz fejlődik és a kalluszból differenciálódnak az új növények, közvetett organogenezisről beszélünk (George, 1993). Az, hogy közvetlenül járulékos hajtás képződik-e, az adott növényfaj sajátosságaitól és a táptalaj összetételétől függ. A hajtásindukció általában citokinin hatására következik be, a hajtások megnyúlását ellenben a citokinin szint csökkentésével, esetleg auxin tartalmú vagy hormonmentes táptalajon való továbbneveléssel lehet előidézni (George, 1993).

A közvetett járulékos hajtásfejlődés előfeltétele a kallusz regenerációs képessége. A kalluszok ugyanis elvileg korlátlan ideig fenntarthatók szilárd vagy szuszpenziós tenyészetekben, a folyamatos szubkultúrák során azonban elvesztik morfogenetikus képességüket. A kalluszok indukciója és fenntartása auxin tartalmú táptalajon történik. Az auxintartalom csökkentése merisztemoidok képződését eredményezi a kallusz felszínén vagy mélyebb sejtrétegeiben. Ezekből a hajtás kifejlődése, majd meggyökeresedése számos tényezőtől függ, ezért bizonytalan (George, 1993).

#### 2.1.2. A fontosabb növényi növekedésszabályzó anyagok

Az ide sorolt anyagok alapvető élettani hatásokat fejtenek ki a növényekben. Ezek megnyilvánulása függ az adott anyag típusától, koncentrációjától, más szabályzókkal való

kölcsönhatásaitól, valamint az adott növény genetikai – élettani tulajdonságaitól (Minocha, 1987) . Az *in vitro* szaporítás során két vegyület csoport játszik fontos szerepet: az auxinok és a citokininek.

Az auxinoknak a legfontosabb szerepük a sejtek megnyúlásos növekedésében és a gyökérbérbékezésben van. A különféle szövetkultúrák igénye igen eltérő, az *in vitro* növénykéek saját maguk is képesek auxint szintetizálni. Az auxinok a koncentráció függvényében hatnak a tenyészetekre, az optimális koncentrációt túllépve gátló hatásúvá válnak. Az indol-ecetsav (IES) természetes auxin, melynek felfedezését és molekula meghatározását követte a szintetikus auxinok előállítása és felhasználása. Ezek közül a legfontosabbak a naftil-ecetsav (NES), indolil-vaicsav (IVS) és a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2-4D) (Jámborné, 1993).

A citokininek a sejtosztódást segítik elő, szabályozzák a szöveti differenciálódást és a kloroplasztisz fejlődést. Az öregedés visszafordításában (rejuvenilizáció) és csúcsdominancia kialakításában is fontos szerepet játszanak. A legfontosabb endogén citokininek a zeatin és az izopentenil-adenin (2iP). Szintetikus citokininek a kinetin (KIN), N<sup>6</sup>-benzil-aminopurin (BAP), N<sup>6</sup>-tetrahidropiranyl-benzil-adenin (PBA) és a tidiazuron (TDZ). Lágyszárú növények mikroszaporításához elsősorban a kinetint, míg a fás növények esetén a BAP-ot alkalmazzák (Jámborné, 2005).

A szövettenyésztésben elsőként Skoog és Miller (1957) fedezte fel, hogy az auxin és a citokinin együttes hatása megindítja a kallusztényészetekben a merisztéma fejlődést - tehát a morfogenezist. A citokininek az auxinokhoz hasonlóan, a koncentráció függvényében hatnak a tenyészetekre. A szövettenyésztés, illetve mikroszaporítás központi kérdése a tenyésztéshez szükséges hormonok azok optimális koncentrációinak, és arányainak meghatározása a tenyésztés minden szakaszában.

### **2.1.3. Az *Atropa belladonna* szövettenyésztésének eddigi eredményei**

Mikroszaporításra, illetve szaporítási célú morfogenetikai vizsgálatokra vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre. Eapen és mtsai. (1978) a morfogenetikus kapacitást vizsgálták haploid és diploid növények összehasonlításával. A felhasznált levéldarabokon 2 mg/l NES és 0,5 mg/l KIN tartalmú táptalajon 3 hét elteltével aktívan növekedő szövettömeg képződött. Ez a diploid növények esetében később is differenciálatlan állapotban maradt, míg a haploid vonalak esetében rügyek, majd hajtások fejlődtek belőle ugyanezen a táptalajon. Ha a kallusz szövetet 1mg/l BAP tartalmú táptalajra helyezték át, 100%-os hajtásregenerációt értek el. A tenyészetenkénti hajtásszám magasabb volt a haploid (11,8 db), mint a diploid (6,7 db) növények esetében. A diploid kallusz organogenetikai kapacitása fokozatosan csökkent, a 8. szubkultúra után teljesen elveszett, míg a haploidé változatlan maradt. A tenyészetek alkaloid tartalmát vizsgálva azt tapasztalták, hogy a regenerálódott hajtások kétszer annyi össz-alkaloidot tartalmaznak, mint a kallusz.

Benjamin és mtsai. (1987) hajtáscsúcsból és hónaljrügyekből indított hajtás tenyészetekben vizsgálták a növekedésszabályozók hatását a szaporodásra. A rázatott tenyészetek friss súlya 5 mg/l BAP-ot tartalmazó folyékony MS táptalajban 5-6-szorosára nőtt a 35 napos tenéyzidőszak végére. Három szubkultúra után a hajtásokat különböző hormontartalmú táptalajokon tenyésztették tovább. BAP nélküli közegen a levelek kiterülését és gyökeresedést figyeltek meg. A BAP 1-5 mg/l tartományban hajtásképződést idézett elő, 10 mg/l viszont gátolta a növekedést. Az 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NES tartalmú táptalajon hajtásképződés következett be, minimális sejtproliferációval az alapi részen. A 0,2 mg/l KIN + 0,1 mg/l IES ill. NES kombináció gyökeresedést indukált. 0,05 mg/l KIN + 0,2 mg/l 2,4-D együttes hatása kalluszosodást eredményezett. A különböző táptalajokon nőtt tenyészetek alkaloid tartalmában nem találtak lényeges különbséget. Magas hatóanyag tartalomra (0,2-0,4%) szelektált anyanövényekből indított tenyészetekben a mért hatóanyag tartalom nem haladta meg az átlagos növényekből indított tenyészetek szintjét, tehát az *in vitro* tenyészetek nem mutatták a kívánt szülői tulajdonságot. A feltételezések szerint ennek oka a növények juvenilis állapota. Kalluszból regenerált hajtásokat neveltek fel és vizsgáltak Tóth és mtsai. (1991). Kimutatták, hogy ezek hatóanyag tartalma lényegesen meghaladja a kontroll növényekét, mind a hajtás, mind a gyökér esetében. Azt tapasztalták, hogy a kalluszból regenerálódó hajtások között igen nagy mértékű a változékonyság.

#### **2.1.4. A *Populus* nemzetség szövettenyésztésének eddigi eredményei**

Velander és mtsai. (1989) a *Populus vilsoarpa* több lépcsős mikroszaporítási módszerét fejlesztették ki, annak érdekében, hogy könnyebben szaporítható legyen ez a faj. Ez a technika magába foglalja a duzzadó rügyek növekedésserkentő táptalajra való helyezését, mely a következőket tartalmazta: a Chu közeg (Chu és mtsai., 1989) makroelemei, az MS mikroelemei és vitaminjai, 0,5 mg/l BAP-pal kiegészítve. A hajtások megsokszorozása WPM, ill. Chu alapú táptalajokon történt, melyeket 20 g/l szacharózzal, 0,5 mg/l BAP-pal és 0,001 mg/l NES-sel egészítettek ki. Szignifikáns különbséget találtak a nyugalmi állapotban lévő vesszőkről származó rügyek és az augusztusban, a növekedő hajtásokról származó rügyek között a hajtásfejlődést tekintve. A hajtásmegnyújtás és gyökereztetés szintén egy WPM alapú, 1 mg/l GA<sub>3</sub>-mal kiegészített táptalajon ment végbe.

A nyárfá szövettenyésztésének eredményességét nagymértékben befolyásolják a különböző fajok és fajták közti genetikai, élettani különbségek. Coleman és Ernst (1989) a citokininek és a genotípus kölcsönhatását vizsgálták a *P. deltoides* hajtás regenerációjának folyamatában.

Jelentős különbségeket figyeltek meg az *in vitro* járulékos hajtásregeneráció során, a *P. deltoides* három genotípusának internódium explantátumain, melyek táptalaját 3 különböző citokininek (BAP, 2i-P, ZEA) 5 féle koncentrációjával egészítették ki. Mindegyik genotípus esetében a

hajtások nagy része a zeatint tartalmazó táptalajokon regenerálódott. A BAP-pal kiegészített táptalajokon mind a három genotípus explantátumain szövet elhalás következett be.

Rutledge és Douglas (1988) 12 *Populus* klónt szaporított *in vitro* úton merisztéma csúcsból, hajtáscsúcsból és nódusz darabokból. A legerőteljesebb hajtásregenerációt a nódusz darabokon érték el (70%-os regeneráció), 4 hetes kultúrában. Az alaptáptalaj minden esetben az MS volt, melyhez, ha BAP-ot, vagy zeatint adagoltak, akkor nagyobb mértékben képződtek hónaljajtások, mint 2-iP adagolása esetén. Ha a BAP koncentrációt 4,4  $\mu\text{M}$ -ról 1,1  $\mu\text{M}$ -ra csökkentették, nőtt a hosszú hajtások száma, melyek előnyösek a gyökereztetés szempontjából. Vizsgálataik alapján bebizonyosodott, hogy a hajtásképződésre a genotípus nagyobb hatással van, mint a táptalaj összetétele.

Egy *P. nigra* x *P. maximowiczii* hibrid különböző explantátumait használta fel Park és Son (1988) annak vizsgálatára, hogy a növekedési hormonok milyen hatással vannak a morfogenezisre. Kísérleteikben ép, illetve egy sok apró túból álló eszközzel megszurkált vagy átluggatott leveleket használtak fel. A megsebzett leveleken nagyobb arányú volt mind a kalluszosodás, mind a hajtásregeneráció, mind pedig a gyökeresedés, mint a sértetleneken. A hajtásregenerációra a 0,88  $\mu\text{M}$  BAP + 0,5  $\mu\text{M}$  2,4D; a gyökeresedésre a 0,44  $\mu\text{M}$  BAP + 2,69  $\mu\text{M}$  NES; a kallusz képződésre a 0,44  $\mu\text{M}$  BAP + 2,26  $\mu\text{M}$  2,4D) tartalmú táptalajok fejtették ki a legkedvezőbb hatást. A lyuggatott levelekből származó kalluszokon embriók is keletkeztek, ezek száma 0 és 30 között változott levelenként. Egy *P. alba* x *P. grandidentata* hibrid regenerációs képességét, levél-, szár- és gyökér darabokból nyert kalluszokból kiindulva szintén Son és Hall (1990a) vizsgálta. A kalluszból történő hajtás regeneráció 4 héten belül bekövetkezett a legtöbb táptalajon. A legnagyobb mértékű hajtásindukciót azokban a kezelésekben érték el, melyekben a 0,05  $\mu\text{M}$  IVS-t egyenként kombinálták 12,5  $\mu\text{M}$  ill. 22,5  $\mu\text{M}$  2-iP-vel, vagy 22,5  $\mu\text{M}$  ZEA-val. A szerzők a *P. alba* x *P. grandidentata* egyedek különböző korú gyökérdarabjainak regenerációjával is foglalkoztak (Son és Hall, 1990b). Vizsgálataikhoz 15-90 napos gyökérdarabokat használtak fel, melyeket különböző citokinineket (BAP, kinetin, 2-iP, ZEA) tartalmazó WPM alapú táptalajra tettek. A legnagyobb mértékű hajtásindukciót a 22  $\mu\text{M}$  ill. 14  $\mu\text{M}$  ZEA tartalmú táptalajra helyezett 60 napos gyökérdarabokon figyelték meg.

## **2.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában**

A triakontanol egy hosszú szénláncú elsődleges alkohol, összegképlete:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{CH}_2\text{OH}$ , molekulásúlya 438,8, olvadáspontja  $88^\circ\text{C}$ . Vízen és egyéb poláros oldószerekben gyakorlatilag

oldhatatlan, apoláros oldószerekben, mint például a kloroform, jól oldódik. Hőstabil, ezért tisztán és oldatban is autoklávozható, ami alkalmassá teszi steril kultúrákban való egyszerű felhasználásra (Ries, 1985).

A növények viaszanyagának alkotóelemeként a természetben is előfordul. Elsőként lucernában mutatták ki (Chibnall és mtsai., 1933). Azóta számos más növényben is megtalálták, mint például az áfonya (*Vaccinium ashei*) (Freeman és mtsai., 1979), fehér here (*Trifolium repens*) (Waldron és mtsai., 1961), a tyúkhúr (*Stellaria media*) (Archana-Pande és mtsai., 1995), különböző *Rhododendron* fajok (Wang és mtsai., 1999) és az *Euphorbia caducifolia* (Waqar és mtsai., 1992), melyeknél a növény epikutikuláris viaszanyagai között található meg, a *Jatropha mollissima*, melynek a gyökeréből mutatták ki (Santos és Mukherjee, 1992), a *Schorea robusta*, melynek magja tartalmazza (Bhattacharya és Saha, 1992).

A növényi növekedést serkentő hatását 1977-ben igazolták (Ries és mtsai., 1977). Egy krizantémmal folytatott üvegházi kísérletben (Skogen és mtsai., 1982) azt tapasztalták, hogy a 100 µg/l koncentrációban a növények tápoldatához adagolt TRIA hatására megemelkedett a növények szárazanyag tartalma, valamint a virágzatok száma. Emellett a kezelt növényeken megkétszereződött az osztályon felüli minőségű virágzatok száma. A szerzők azt is megfigyelték, hogy a virágzás egy héttel korábban következett be a kezelt növényeknél, mint a kontroll esetében, azonban a virágok tartósságában nem volt különbség. A szerzők azzal magyarázták a magasabb számú virágzatot, hogy a triakontanol csökkentette az apikális dominanciát, és korábbi irodalmi adatokra hivatkozva (Henry és Gordon, 1980) valószínűnek tartották, hogy az auxin lebomlását serkentette valamilyen módon. Azt is lehetségesnek tartották, szintén irodalmi adatokra hivatkozva (Eriksen és mtsai., 1981), hogy a triakontanol hatására megváltozik az arány a fotorespiráció és a fotoszintézis között a fotoszintézis javára, és ez okozza a jobb növekedési erélyt.

4 napos vízkultúrában nevelt saláta levelére permetezve  $10^{-7}$  M TRIA 13-20 %-kal emelte a levelek, valamint 13-24 %-kal a gyökerek friss és száraz tömegét a kontroll (csak vízzel permetezett) növényekéhez képest (Knight és Mitchell, 1987). Paradicsom palántákon lombtrágya formájában alkalmazott kezelés hatására megnőtt a növények magassága, megemelkedett a hajtások és a termések száma, valamint az ezermagtömeg és javult a magok csírázóképesége is (Sharma, 1995). Egy 1993-ban közölt kísérletben (Bartolini és mtsai., 1993) olíva fákat permeteztek a virágzás kezdetekor és teljes virágzásban különböző növekedésszabályozó anyagokkal, melyek között egy állati eredetű aminosav-származék, bórsav, egy NES-B-vitamin keverék és TRIA szerepelt. A vizsgált anyagok közül a TRIA emelte meg legnagyobb mértékben a pollen csírázóképeségét, és csak a triakontanollal kezelt fákon termett gyümölcsök esetében nőtt meg a hús/mag arány. Ezek a termések szignifikánsan nagyobbak is voltak, mint akár a kontroll, akár a többi növekedésszabályozóval kezelt fákon termett bogyók.

Őszibarack esetében is megfigyelték a TRIA kedvező hatását a gyümölcsök méretére (Mehta és mtsai., 1990). 'Newcastle' fajta állományában, két alkalommal (teljes virágzáskor és a csonthéj szilárdulásakor) végzett, 20 mg/l TRIA permetezéssel érték el a legnagyobb gyümölcsméretet, ezzel párhuzamosan emelkedett a gyümölcsök tömege, cukortartalma és csökkent a savasságuk is.

Több paprikafajtán végzett laboratóriumi vizsgálatok tanúsága szerint a 0,5-3 mg/l koncentrációjú TRIA oldattal permetezett növények növekedése és vízfelvétele kedvezőbben alakult, mint a kontroll növényeké (Ray, 1991). Ebben a kísérletben a 0,5 mg TRIA/l bizonyult a leghatékonyabbnak. Szabadföldi mérések során (ahol már csak a 0,5-1 mg TRIA/l koncentrációkat alkalmazták) a triakontanollal kezelt növényeknek megemelkedett a szárazanyag tartalma, és a levélfelülete, valamint a relatív növekedési rátája.

A triakontanol képes befolyásolni egyes gyógynövények hatóanyag tartalmát is. Az *Artemisia annua* cv. Washington növények artemizin tartalma szignifikánsan megemelkedett 1 és 1,5 mg/l TRIA kezelés hatására (Shukla és mtsai., 1992). A TRIA kezelés után emelkedett a gibberellinsav-szerű aktivitás és csökkent az abszcizinsav mennyisége a növényekben. A szerzők szerint az artemizin szint emelkedését a TRIA a növény növekedésének serkentésén keresztül éri el, nem pedig azért, hogy az artemizin bioszintézisét szabályozza.

*Mentha arvensis* esetében 0,1g TRIA/m<sup>3</sup> levélre való permetezésével szignifikánsan emelni lehetett a növények friss és száraz tömegét, nettó fotoszintetikus rátáját, klorofill tartalmát, mikroelem felvételét és esszenciális olaj tartalmát (Srivastava és Sharma, 1991). Az illóolaj tartalom emelkedését azzal magyarázták, hogy a növények esszenciális olaj tartalma pozitív korrelációban áll a nettó fotoszintetikus rátával és a friss- és száraz tömeg alakulásával, melyeket a TRIA kedvezően befolyásolt.

Gyakorlatilag ugyanezeket az eredményeket írták le mákkal (*Papaver somniferum*) végzett kísérletekben is (Srivastava és Sharma, 1990).

Rózsaiilatú muskátli (*Pelargonium* cv. Bourbon) triakontanolos permetezés után szignifikánsan kedvezőbb növekedési tulajdonságokat mutatott, mint a kontroll növények (Bhattacharya és Rao, 1996). Megemelkedett a hajtáshossz, a hajtásszám, a levél-, hajtás és gyökértömeg és az esszenciális olaj tartalom. A szerzők megfigyelése szerint a gyökértömeg növekedést sokkal nagyobb mértékben serkentette a TRIA, mint a hajtások tömegének gyarapodását, amiből arra következtettek, hogy a TRIA elsősorban a gyökérnövekedésre hat. Ugyanebben a kísérletsorozatban a TRIA serkentette a *Pelargonium* levéldugványainak gyökeresedését.

A triakontanol kedvező hatásait írták le *Vigna radiata* magoncokkal kapcsolatban is (Kumaravelu és mtsai., 2000). A magoncokat 0; 0,5; 1,0 illetve 2,0 mg/dm<sup>3</sup> triakontanollal permetezték le 15 és 25 nappal az ültetés után. 0,5 mg/dm<sup>3</sup> triakontanol hatására szignifikánsan



megemelkedett a növények magassága és friss tömege. Ezen kívül klorofill, aminosav, szacharid, keményítő és oldható fehérje tartalmuk is jelentős mértékben meghaladta a kontrollokt.

Annak ellenére, hogy a szabadföldi kísérletekben ilyen biztató eredmények születtek, szövettenyésztésben, illetve mikroszaporításban alig néhány kutatócsoport kísérletezett triakontanollal. Hangarter és Ries (1977) számolt be arról, hogy a TRIA kedvező hatással volt néhány növény kallusznövekedésére, s úgy találták, hogy a szövettenyésztés igen alkalmas módszer a TRIA élettani hatásainak vizsgálatára. 'Fuji' alma fajta *in vitro* hajtástenyésztéseiben Ma és mtsai (1977) a táptalajhoz adott triakontanol hatását növekedésszabályozó hatásként értékelték. Sárgarépa szomatikus embrióinak későbbi fejlődésére gyakorolt hatását vizsgálták és azt találták, hogy ha TRIA-t adagoltak a táptalajhoz, majd hormonmentes MS közegre helyezték az embriókat, akkor egyöntetűbb egyedfejlődést kaptak, mint TRIA alkalmazása nélkül (Baker és mtsai, 1985).

Munkacsoportunk először citromfű (*Melissa officinalis*) mikroszaporítási folyamatában vizsgálta a TRIA hatásait, 2-20 µg/l közötti koncentráció tartományban. Azt tapasztaltuk, hogy a triakontanol alkalmazása minden koncentrációban pozitív volt a vizsgált tulajdonságokra nézve. Jelentősen megnövelte a szaporodási rátát és a gyökeresedés mértékét (Tantos és mtsai., 1999). Az eredmények alapján a továbbiakban néhány nehezen szaporítható alma és cseresznye alany mikroszaporítása során alkalmaztuk a triakontanolt és vizsgáltuk hatásait. Ez esetben is bebizonyosodott, hogy a TRIA növekedésszabályozó vagy ahhoz hasonló hatást gyakorol a növényekre (Tantos és mtsai., 2001). Eredményeink megjelenését követően napvilágot látott még néhány cikk, melyek szintén az általunk is vizsgált koncentráció tartományban tanulmányozták a triakontanol hatásait. Reddy és mtsai (2002) egy lágyszárú növény a *Capsicum frutescens* és egy indiai cserje a *Decalepis hamiltonii* mikroszaporítása során használták eredményesen. Bár az optimális koncentrációt eltérőnek találták növényenként és fázisonként egyaránt, minden esetben a TRIA serkentő hatásait regisztrálták. Hasonló tapasztalatokról számolt be egy olasz munkacsoport (Fraternale és mtsai., 2002). Egy gyógynövény, az örökzöld, nehezen szaporítható cserje, a *Bupleurum fruticosum* szaporítási technológiájának kidolgozása során, a hatékonyság növelése érdekében próbálták ki a triakontanolt, különböző növekedésszabályzókkal kölcsönhatásban. Már a legalacsonyabb (2 µg/l) alkalmazott koncentrációban is megmutatkozott a TRIA serkentő hatása, sőt ezt az értéket találták optimálisnak mind a szaporítási mind a gyökereztetési fázisban. Ugyancsak egy gyógynövény, a *Thymus mastichina* volt a vizsgálati objektum a szerzők egy másik munkájában. (Fraternale és mtsai., 2003). Ez esetben is a növekedési paraméterekre gyakorolt pozitív hatásról számoltak be, a TRIA és a szaporítás során használt hormon kombinációk együttes alkalmazásának eredményeként. A növények esszenciális olaj tartalmának növekedését is megfigyelték, mikor a triakontanolt hormon mentes táptalajhoz adták. Az olajok összetételében nem okozott változást egyik kezelés sem.

Úgy tűnik, a triakontanol alkalmazásának pozitív hatásáról beszámoló eredményeink felkeltették a mikroszaporító szakma figyelmét ez iránt az anyag iránt. Legalább is a megjelent cikkek és hozzánk érkezett kérések ill. kérdések száma erre utalt. Mi is indokoltnak láttuk, hogy megfigyeléseinket további növényfajokra is kiterjesszük. A továbbiakban bemutatott új eredményeink szerves folytatását képezik a citromfűvel elkezdett munkának és megerősítik az eddigi tapasztalatokat.

### **2.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata**

#### **2.3.1. Új típusú tenyésztő berendezések: a bioreaktorok**

A bioreaktorok nagy mennyiségű növényi sejt, szövet vagy szerv folyadékkultúrában történő tenyésztésére való edények. Nevük a mikrobiológiai terminológiából származik és első változataik a növényi szövettenyésztés területén a másodlagos anyagcsere termékek kalluszban történő termeltetésére szolgáló fermentorok lehettek. A folyadékban történő tenyésztés már a mikroszaporítási technikák kialakulásának korai szakaszában is foglalkoztatta a kutatókat. Az első eredmények (Morel, 1974) orchideákkal kapcsolatosan jelentek meg, melyek rázatott tenyészetben protokormokat képeztek. A protokormokat szétválasztva és szilárd közegen tenyésztve nevelték fel a hajtásokat. Az orchideák leg többjének szaporítása azóta is rázatott vagy forgatott folyadék tenyészetekben történik (Mándy, 1993). A későbbiekben különböző dísnövényeket, pl. szegfűt és krizantémot (Earle és Langhans, 1976) szaporítottak folyadékban, forgatott tenyészédényekben. A módszer növelte a szaporodás mértékét, de a magas fokú hiperhidratáció miatt a tényleges kihozatali arány alacsony maradt. A 80-as évektől kezdve több szerző is foglalkozott a folyadék kultúra alkalmazási lehetőségével. A legtöbb közlemény a szilárd közegre rétegezett ugyanolyan, vagy esetleg más összetételű folyadék hatását vizsgálta (Hammerschlag, 1982; Maene és Debergh, 1985; Rodriguez és mtsai., 1991). Ez az ún. kettős fázisú tenyésztés jó hatásának bizonyult, mind a szaporítási, mind a gyökereztetési fázisban, a folyamat céljától függően. Emellett időlegesen csökkentette az élőmunka igényt is. A későbbi fejlesztő munkák már az egyes folyamatok lehetséges automatizálására irányultak. Az elsők között Tisserat és Vandercook (1985) tervezett és alkalmazott egy olyan mikroszaporító rendszert, amelynek szaporító edényeit periódikusan elárasztották friss tápoldattal, majd eltávolították azt.

Aitken-Christie és Davies (1988) egy félautomata rendszert fejlesztett ki hasonló elveket alkalmazva. A körforgásban tartott tápoldat az előre meghatározott programnak megfelelő időpontokban árasztotta el az inokulumokat. Teisson és Alvard (1995) azonos elveken alapuló mikroszaporító berendezést tervezett (RITA), amelyet azóta számos növényfajnál sikeresen alkalmaztak. A módszer elnevezése a szerzők nyomán TIS (Temporary Immersed System) azaz

időleges elárasztású rendszer. Escalona és mtsai. (1999) konkrétan az ananász tömegtenyésztésére kidolgozott időleges elárasztásos mikroszaporító rendszer tapasztalatairól számoltak be, melynek elve az előzővel azonos, de nagyobb méretű tenyészedenyeket használ. Ők PIB-nek (Periodically Immersed Bioreactor), vagyis periódikusan elárasztó bioreaktornak nevezték el a konstrukciót.

### **2.3.1.1. A bioreaktorok típusai**

A különféle bioreaktor- típusokat a növények, a kultúrák és a fejlődési állapotok széles skálájához fejlesztették ki. A növényi tenyészetek számára alkalmas bioreaktorok funkcionálisan két általános típusra oszthatók: az egyikben a kultúrákat részlegesen vagy ideiglenesen mártják a tápoldatba, a másikban pedig folyamatosan vannak elárasztva. Az utóbbi eljárást általában olyan kultúrák nagy sűrűségű szaporítása esetén alkalmazzák, amelyeknél az elárasztás nem eredményez abnormális növényfejlődést pl. protokorm-testek, embriogén kallusz tenyészetek, szomatikus embriók, merisztéma csokrok és nodulumok. Ezek mindegyike olyan organogén kultúra, amely merisztéma-csomókból épül fel, szignifikáns levél-, szár,-vagy gyökérfejlődés nélkül. Az elárasztott bioreaktorok használhatók szabadföldi termesztésre szánt kis hagymák vagy gumók kifejlesztéséhez is (Takayama, 1991).

#### **2.3.1.1.1. Elárasztott típusú bioreaktor**

Az elárasztott bioreaktoroknak alapvetően két változata van: a mechanikusan mozgatott és a levegővel mozgatott. A mechanikusan mozgatott bioreaktorok propellerekkel, turbinákkal, lapátkerékkel, vízikérekkel és vibrációs keverőkkel cirkuláltatják a tápoldatot. Mindegyik eszköz a másiktól különböző módon végzi a folyadék mozgatását az edényben (Preil, 1991). Minden típusú kultúra és növény számára optimalizálni kell az elnyíró tényezőket és a folyadék mozgását. Organogén tenyészetek számára nem találták előnyösnek (Ziv, 1999). Az elárasztott bioreaktorok közül a legegyszerűbbek a levegővel mozgatottak. A levegővel mozgatott bioreaktorokban steril levegőt vezetnek az edény alá; ez levegőzteti és mozgatja, emeli és cirkuláltatja a kultúrát (Hvoslef-Eide, 2003). Az ilyen, levegővel mozgatott bioreaktorokat nevezik - térfogatuktól függően - egyszerű levegőzésű vagy buborékoszlopos bioreaktoroknak. A levegővel mozgatott bioreaktorok edényeit általában autoklávozható üvegből vagy műanyagból és egyéb berendezésekből készítik. Ennek egy változata az autoklávban nem fertőtleníthető tiszta, flexibilis műanyagból készül, amelyet gamma-sugárzással sterilizálnak (Levin, 2000). Az egyszerű levegőztető vagy buborékoszlopos bioreaktorok könnyűek és működtetésük költségkímélő.

### **.3.1.1.2. Részlegesen elárasztó típus**

A részlegesen, vagy periódikusan elárasztó bioreaktoroknak több típusa ismert. Vannak gáz-fázisú, folyadékréteges és időnként bemártó bioreaktorok. Ezeket a típusokat a hiper-hidricitásra érzékeny növényanyag szaporítása során részesítik előnyben (Ziv, 1999, 2000). A gáz-fázisú bioreaktorokban a porózus alapon álló kultúrákat mechanikusan támasztják meg és időnként megpermetezik a tápoldattal (Ushiyama, 1988), vagy tápanyag-ködben tartják (Weathers és mtsai., 1988). A felesleges tápoldatot összegyűjtik az edényben és recirkuláltatják. Az ilyen bioreaktorokban az edények autoklávozható üvegből vagy műanyagból készülnek, és a nevelő helyiségen belül van szabályozva a megvilágítás és a hőmérséklet.

A folyadékréteges bioreaktorokban csak a növények alapi része van a tápoldatban. A megvilágítás, a hőmérséklet és a légtér összetétel szabályozása gyakorlatilag ugyanolyan, mint a hagyományos tenyésztő edényekben. Az egyszerű folyadékréteges eljárás, a LifeRaft™ egyszeri felhasználásra alkalmas (vagy újrahasznosítható) mikroporózus lemeztömegeből áll, amelyet egy lebegő (újrahasznosítható, autoklávozható), a tápoldat tetején lebegő úszótalp támaszt alá (Levin, 2000). A kereskedelmi laboratóriumokban az edények helyett használnak műanyag-filmből készült kis zsákokat is.

Az ideiglenesen elárasztó típusú bioreaktorok a kultúrákat előre beállított időtartamú periódusonként mártják a tápoldatba. A berendezések felépítése és működtetése nagyon egyszerű. A tipikus megoldásnál két (műanyag vagy üveg) edényt használnak, amelyek egyikében a tápoldat, a másikban pedig az explantátumok helyezkednek el. A tápoldat egy pumpás rendszer segítségével kerül át a növényeket tartalmazó edénybe, majd az elárasztási idő leteltével a nyomás megszűnik és a tápoldat visszaáramlik a tartó edénybe. Az ilyen típusú reaktoroknak két típusa van jelenleg kereskedelmi forgalomban: az előzőekben leírt RITA (Recipient for Automated Temporary Immersion) amely 1 liter térfogatú (Teisson és Alvard, 1995) illetve az ikerpalack rendszer (BIT, Escalona és mtsai., 1998.), amely két különálló műanyag- vagy üveg palackból tevődik össze. Ezek közül az egyik a tápközeget a másik a tenyészeteket tartalmazza, az összeköttetést műanyag csőhálózat biztosítja. A palackok űrtartalma 250 ml – 10 l között változtatható. Az ideiglenesen bemártó bioreaktorok másik változata egyetlen, tároló résszel ellátott edény, amelyet időszakonként mechanikusan az oldalára döntenek (Adelberg és Simpson, 2002). Ebben a rendszerben a tápoldat periódikusan elárasztja az edényekben levő kultúrákat és az inokulumokat függőleges helyzetben tartja.

A bioreaktorok, működésük során igazolták mindazon előnyöket, amiket elvártak tőlük. Csökkentik a növények előállításának költségeit azzal, hogy jobb helykihasználást tesznek lehetővé, csökken a tenyészetek manipulálására fordított idő, csökken a kis méretű hagyományos

tenyészedények száma, ezzel együtt a mosogatáshoz és a táptalaj töltéséhez szükséges idő és élőmunka igény is.

### **2.3.2. Az ananász (*Ananas comosus*) mikroszaporítása**

Az ananász szövettenyésztésével foglalkozó kutatások döntő többsége a mikroszaporítási módszerek kidolgozására koncentrált. Az első sikeres próbálkozásról Aghion és Beauchesne (1960) számolt be, akik kiültethető növényeket neveltek fel a kimetszett axilláris illetve terminális rügyekből. Az elért szaporítási ráta ekkor még nagyon alacsony volt. Ezt követően egy sor közlemény jelent meg a témában. Növényeket regeneráltak *in vitro* körülmények között a levélüstök apexéből illetve axilláris rügyeiből (Fichet, 1985; Mapes, 1973; Mathews és mtsai., 1976), oltószemekből (Sita és mtsai., 1974), laterális rügyekből (Zepeda és Sagawa, 1981).

Több szerző (Mathews és mtsai., 1976; Mathews és Rangan, 1979) már a korai vizsgálatokban azt találta, hogy a folyadék kultúra előnyösebb az axilláris rügyekből indukált hajtások proliferációjára, mint a szilárd táptalaj alkalmazása. Azt is megállapították, hogy a rázatott folyadék kultúra jobb eredményeket biztosít mint az álló.

Szintén rázatott tenyészetekkel dolgozott DeWald (1988) *A. comosus* és *A. bracteatus var. tricolor* felhasználásával. Axilláris rügyekből (hajtásüstök, oltószem és szár) nagyszámú, életképes növénykét tudott felnevelni. Marchal és Arvald ugyanebben az évben (1988) megjelent közleményében a táptalaj csere gyakoriságának hatásáról számolt be folyadék kultúrában. Azt találták, hogy a szénhidrát forrást (szacharóz) igen gyorsan elhasználták a növénykéék, a növekedés ezért lassabb volt, mint szilárd táptalajon. A tápoldat 20-30 naponkénti cseréje javította a növekedési erélyt. A 80-as évek végén Magyarországon is több szövettenyésztő laboratórium foglalkozott ananász mikroszaporításával (Kiss és mtsai., 1995, Mészáros és Molnár, 1988)

A folyadék kultúrát napjainkban már kiterjedten alkalmazzák az ananász gazdasági célú mikroszaporítására (Firoozabady és mtsai, 1997, Daquinta és Benega, 1997). Kiindulási anyagként merisztematikus szöveteket vagy axilláris rügyeket használnak több egymásra épülő tenyésztési lépésben szaporítva fel azokat.

### **2.3.3. A banán (*Musa nana*) mikroszaporítása**

Egyes szerzők szerint a banán talán a legintenzívebben mikroszaporított növény (George, 1993.) hiszen a trópusokon az egyik legfontosabb élelmezési cikk. A termesztett fajták vagy genotípusok általában tri- illetve tetraploidok és a *M. acuminata* és *M. balbisiana* interspecifikus hibridjeinek leszármazottai. Hagyományosan vegetatív úton, tőosztással szaporítják. A mikroszaporítás szerepe a kórokozó mentes szaporítóanyag előállítására ill. a genetikai alapanyagok fenntartására és cseréjére egyaránt kiterjed.

A tenyészetek indítása merisztémából vagy hajtáscsúcsból történik (Hwang et al., 1984). Ezt és az alatta elhelyezkedő rizóma szövet egy részét metszik ki és helyezik táptalajra a fertőtlenítést követően (Gupta, 1986.). Ha a vírusmentesítés is feladat, az anyanövényeket több hétig 38-40 °C-on tartják, mielőtt a merisztéma kipreparálására sor kerül. Ebben a fázisban az explantátumokat szilárd táptalajon tenyésztik. Vuylsteke (1988) 10 különböző genotípus szaporítás során azt állapította meg, hogy proliferáció mértéke a citokinin koncentráció és a genotípus függvényében változik, általában 2-10 közötti az egy explantátumon havonta elérhető hajtásszám. Arinaitwe és mtsai. (2000) szintén hasonló eredményekről számoltak be. Többféle citokinin hatását vizsgálták három különböző fajtán és egyértelmű összefüggést találtak a citokinin típusa és koncentrációja valamint a fajta sajátosságai között a proliferáció mértékét tekintve.

Mind a szaporítási, mind a gyökereztetési kísérletek során kezdettől fogva alkalmaztak szilárd és folyékony táptalajokat, ez utóbbiakat álló és rázatott kultúra formájában egyaránt. Általában azt tapasztalták, - és ezt saját, korábbi vizsgálataink is megerősítették - hogy, ha a folyadék szintje nem lepi el a tenyészeteket, nincs szükség rázatra. A folyékony közegben intenzívebb a tápanyagok felvétele, ezért a szaporodás felgyorsul, ennek következtében hamarabb öregszenek a tenyészetek. Hasonló okokból a folyadékban történő szaporítás esetén alacsonyabb citokinin szint alkalmazása is megfelelő szaporodást eredményez (Mészáros és Molnár, 1988).

A léptéknövelési és technológia fejlesztési hullám a banán mikroszaporítást is elérte. Ennek keretében többféle tenyésztési eljárás alkalmazhatóságát vizsgálták a szaporodási ráták, százsúly értékek és a növények habitusának összehasonlításával. Az eredményeket Alvard és mtsai. (1993) foglalták össze. 20 napos tenyészciklus után három, statisztikailag különböző csoportba sorolták a tenyészetek fejlődését. Az egyszerű folyadékközegben és a cellulóz hordozón proliferáció nem, vagy csak kis mértékben következett be. A szilárd közegen, a részleges elárasztással illetve a levegőztetett folyadékban a szaporodási ráták 2,2 - 3,1 között alakultak. A legmagasabb szaporodási rátát -- 5 felett -- az időlegesen elárasztott tenyészetekben mérték. Legjobbnek bizonyult a levegőztetett közeg, ebben viszont gyakran a külső levelek vitrifikációja következett be, valószínűleg a folyadékkal történő állandó érintkezés miatt. Az időszakos bemelegítéssel fejlődött tenyészetekben mért szaporodási ráták megegyeztek a Vuylsteke (1989) által több fajtára vonatkozóan közölt legmagasabb értékekkel. Egy további kísérletben 12 egymást követő tenyészciklusban igazolták az időleges elárasztás kedvező hatását.

#### **2.3.4. Árnyékliliom (*Hosta*) fajták mikroszaporítása**

A *Hosta* fajok és fajták mikroszaporítására vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. A tenyészetek indítására a legkülönbözőbb szervek használhatók (Lubomski, 1985) virágbimbó, virágzati szár és levél egyaránt. Szafián és mtsai (1996) tapasztalatai szerint a legnagyobb

szaporulatot a rizómán található, növekedésnek indult rügyekből, vagy fiatal hajtásokból indított kultúrák adják. A kiméra eredetű fajták fajtaazonossága így őrizhető meg a leginkább, mivel a kalluszosítás folyamata kimarad, a rügyekből egy lépésben hajtás fejlődik.

Lubomski (1985) különböző citokininek hatását vizsgálta a szaporítás folyamatában. A kinetint és a 2iP-t kevésbé, a BAP-ot nagyon hatásosnak ítélte. Szafián et al. (1995, 1996) tapasztalatai szerint az indító táptalajnak egyes fajtáknál (*H. 'Devon Green'*, *H. 'Blue Cadet'*, *H. 'Samurai'*) 6 mg /l BAP-ot, másoknál (*H. 'Dew Drop'*, *H. 'Gold Haze'*, *H. 'Gold Drop'*) 3 mg /l BAP-ot kell tartalmaznia a biztonságos indításhoz. A kinetin szintén előidézi a hajtásképződést, de alkalmazásakor a kezdeti fejlődés jóval lassúbb. A nagy BAP koncentráció csak a kezdeti fejlődést segíti, az inokulumokat 2-3 hét múlva kisebb hormonkoncentrációjú táptalajra célszerű áttenni.

A sokszorozó táptalaj általában MS makro-, mikroelemek és vitaminok, 0,5 mg /l NES és 0,1 mg /l BAP kiegészítéssel. Szafián és mtsai. (1995, 1996) eredményei alapján a fél töménységű MS makroelemeket, teljes töménységű MS mikroelemeket és vitaminokat, valamint 80 mg /l adeninszulfátot, 0,1 mg /l NES-t és 3 mg /l kinetint tartalmazó szilárd táptalaj bizonyult legjobbnak a fajták többségénél.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

##### 3.1.1. Növényanyag

Az *Atropa belladonna* PN 06 jelű klónját magas hatóanyag tartalomra szelektálták, ezt a tulajdonságot kívántuk *in vitro* körülmények között fenntartani. A *Populus alba* "Silver" tenyészeteket egy jó növekedési erélye és különösen szép ezüstös színe miatt kiválasztott fajtajelölt növény hajtásaiból létesítettük.

A kísérletek megkezdése előtt a felhasználni kívánt növényeket egy tenyészcikluson keresztül növekedésszabályzó anyagokat nem tartalmazó táptalajon neveltük.

A növények különböző részeit használtuk fel: 3-4 leveles hajtáscsúcsokat, levéldarabokat, valamint internódium-, levélnyel- és gyökér darabokat is. A levél eredetű explantátumokat a csúcs alatti régió már kiterült levelei (2.-4.) szolgáltatták. A leveleket ollóval a főerre merőlegesen, keresztirányban vágtuk fel három darabra, melyek a levél csúcsát, középső ill. váll részét tartalmazták. A levéldarabokat részben színükkel lefelé, részben pedig azzal felfelé helyeztük táptalajra, úgy, hogy a sebzett szélek a táptalajjal érintkezzenek. Az internódium-, levélnyel- és gyökér darabokat kb. 1 cm hosszúságban, vízszintesen elfektetve helyeztük a táptalajra. Minden esetben 3-4 hetes korú tenyészeteket használtunk fel a kísérletekhez.

##### 3.1.2. Táptalajok

A hajtásképződés mértékét az *Atropa* hajtástenyészetekben KIN, 2iP és BAP tartalmú táptalajokon vizsgáltuk. Mindhárom citokinint 0,5; 1,0 és 2,0 mg/l koncentrációban adtuk az alaptáptalajhoz.. A szomatikus szövetekből történő hajtásindukció előidézésére használt táptalajok 1,0, 2,0, és 5,0 mg/l BAP-ot ill. 2, 5, és 10 mg/l KIN-t tartalmaztak, mindkét citokinin mellett 0,2 ill. 1,0 mg/l IES-sel. A gyökérdarabokból történő regenerációs kísérlet táptalajai 0,5 mg/l NES-t ill. IES-t, valamint 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NES-t tartalmaztak.

A *Populus alba* "Silver" hajtástenyészeiben BAP, 2-iP ZEA, és TDZ tartalmú táptalajokon hasonlítottuk össze a képződött új hajtások számát. A BAP és a 2-iP hatását 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l koncentrációban vizsgáltuk, a ZEA koncentrációja 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l volt, a TDZ-t 0,05, 0,1; 0,25; 0,5 mg/l koncentrációban alkalmaztuk..

Alaptáptalajként minden esetben a Murashige-Skoog közeggel dolgoztunk, mely 20 g/l szaharózt tartalmazott (Murashige és Skoog, 1962).



### 3.1.3. A növénynevelés körülményei

A hajtáscsúcs tenyészetek számára 0,25 l-es, alufóliával fedett befőttes üvegeket, a többi növényi részből indított tenyészetek számára 10 cm átmérőjű Petri csészéket használtunk, ill. esetenként a befőttes üvegeket is.

A tenyészeteket fényszobában neveltük, oldalsó megvilágítással, 16/8 órás fényperiódus, 60  $\mu\text{m}/\text{m}^2/\text{s}$  fényintenzitás mellett,  $22 \pm 2$  °C hőmérsékleten.

## 3.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában

### 3.2.1. Növényanyag

#### 3.2.1.1. Málna (*Rubus idaeus* L.)

A bogyósgyümölcs szaporítóanyag előállítás nagyságrendjét tekintve messze elmarad az almafélék vagy a csonthéjasok mögött, részint gazdasági jelentősége miatt, részint pedig, mert a termesztés csak meghatározott éghajlati feltételek között valósítható meg. Ez esetben a laboratóriumi háttér a vírusmentes anyatelepek alapanyagának ellátását szolgálja. A Malling Exploit málna fajta a standard fajtaválaszték tagja, kis mennyiségben ugyan, de igényli a piac. Ez a fajta az általunk vizsgáltak közül a legnehezebben szaporíthatónak bizonyult. A növények rendszeres sárgulása és a többi fajtához képest gátolt hajtásnövekedés, ennek következtében alacsonyabb szaporodási ráta jellemezte a tenyészeteket. Előzetes tapasztalataink szerint a triakontanol képes a klorofill tartalom, ezzel együtt a fotoszintetikus teljesítmény növelésére, ezért feltételeztük, hogy ez a tulajdonsága a málna szaporítás során is megnyilvánul majd. A kísérletek során 3-4 leveles hajtáscsúcsot használtunk inokulunként.

#### 3.2.1.2. Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook)

A gerbera napjaink egyik legnépszerűbb dísnövénye világszerte. A fajtaösszetétel folyamatosan változik, ezzel együtt a termesztési módszerek is korszerűsödtek. A minőségi szaporítóanyag iránti egyre növekvő igény – melyet anyanövények fenntartásával már régen nem lehetne ellátni – hívta életre a nagy szaporító laboratóriumokat és ma már a palánták gyakorlatilag 100 %-ban *in vitro* szaporításból kerülnek ki. Mint minden növényfaj, így a gerbera esetében is érvényes, hogy a mikroszaporítás sikeressége erősen genotípus függő (Mészáros, 1986). A gyakorlati tapasztalatok alapján általában jól szaporíthatók a piros és sárga virágú fajták, kevésbé jól a rózsaszín virágúak és a legrosszabbul reagálnak a fehérek. A megfelelő színválaszték biztosítása érdekében azonban ezeket is igénylik a termesztők. Ezért komoly érdeklődésre tarthat számot minden olyan módszer, amely a szaporítási folyamat hatékonyságát növeli, akár azzal, hogy

a kihozatali arányt emeli, akár azzal, hogy a növényanyag minőségét javítja, lehetővé téve ezzel a jobb túlélési arány elérését a rosszul reagáló genotípusok esetén.

Gerbera esetében a B5 kódszámú fajttal dolgoztunk, melynek anyanövényei egy nemesítő cégtől származtak. Inokulumként 3-5 leveles önálló hajtásokat használtunk, melyeket – törzsszár növényről lévén szó – V alakú metszéssel választottunk le a hajtáscsokorról.

### **3.2.1.3. Spárga (*Asparagus officinalis* L.)**

Spárga esetében egy korábbi munkánk során szintén lényeges különbségeket tapasztaltunk az egyes genotípusok szaporodási és gyökeresedési képességében (Mészáros és Molnár, 1988). Mivel a spárga a mediterrán régióban fontos gazdasági növény és termesztése újra fellendülőben van, indokolt a szaporítási technológia fejlesztése. Ezért választottuk harmadik modellnövénynek az egyik spárga fajtát. Ezt a választást még a spárga egyszikű mivolta is indokolta, hiszen eddig csak kétszikű növényeken írták le a triakontanol hatását.

A spárga mikroszaporítási folyamatában különböző az inokulum mérete és anatómiája a szaporítás ill. a gyökereztetés során. Ennek megfelelően szaporítási kísérleteinkben közel azonos tömegű gyökertörzs darabok, a gyökereztetési fázisban egy hosszú hajtással rendelkező mini-koronák képezték az inokulumot. Az alapanyagot a 1113 jelű, francia nemesítésű fajta szaporító tenyészetéből szelektáltuk.

### **3.2.2. Táptalajok**

A triakontanol, kémiai szerkezetéből eredően rendkívül nehezen oldódik vízben és poláros oldószerekben, ezért irodalmi adatok alapján (Ries, 1985) 2 mg triakontanolt 1,5 ml kloroformban oldottunk fel, majd desztillált vízzel hígítottuk enyhe (5-6 másodperc) melegítés közben. Ezután 2 csepp Tween 20-at adtunk az elegyhez, melyet végül desztillált vízzel 400 ml végtérfogatra töltöttünk fel. A kísérletek során 2, 5, 10 és 20 µg/l triakontanol koncentrációval dolgoztunk. Mivel a vegyület hőstabil, a szükséges mennyiségeket autoklávozás előtt adagoltuk a kísérleti táptalajokhoz.

Alaptáptalajként a Murashige-Skoog (1962) közeget használtuk, N6 vitamin kiegészítéssel (inozitol 100 mg; tiamin 1 mg; piridoxin 0,5 mg; nikotinsav 0,5 mg literenként). A gyökereztetési kísérletek során növekedésszabályzó anyagokat nem alkalmaztunk, annak érdekében, hogy a triakontanol hatását önmagában vizsgálhassuk. A szaporítási fázisban minden növény esetében a rutinszerűen alkalmazott hormon kombinációval dolgoztunk, az alábbiak szerint. Gerbera: 3 mg KIN + 0,1 mg IVS; málna 0,5 mg BAP + 0,1 mg IVS; spárga 2 mg KIN + 0,2 mg NES 1 liter táptalajban.

### 3.2.3. A növénynevelés körülményei

Tenyészedényként 500 ml térfogatú befőttes üvegeket használtunk, melyeket a megfelelő légcserre biztosítása érdekében átlukasztott és a lyukba húzott szivacsdarabbal ellátott fém tetővel zártunk le. Egy üvegbe általában 10 db inokulumot helyeztünk el.

A tenyészetek fenntartása fényszobában történt, ahol a hőmérséklet  $22 \pm 2$  °C, a fotoperiódus 16/8 óra, a fényintenzitás pedig  $80 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$  volt.

### 3.2.4. A fotoszintetikus pigment tartalom mérése

A klorofill tartalom meghatározásához a növények leveleiből - spárga esetében a hajtások csúcsi részeiből - 50 mg mintát vettünk és összesen 6 ml 80%-os acetonnal homogenizáltuk. Ezután 3 percig 4000g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót használtuk fel. A méréshez Arnon (1949) két hullámhossz módszerét használtuk.

Az összklorofill ( $kl_a + kl_b$ ) tartalmat az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$kl(a+b) \mu\text{g/g fr.súly} = (8,02 \times A_{663} + 20,2 \times A_{644}) * V/w \quad \text{ahol}$$

A: az adott hullámhosszon mért abszorpció

V: az oldat térfogata

w: a felhasznált levél tömege

A karotinoid tartalom kiszámítása a következő képlet alapján történt:

$$kar \mu\text{g/g fr.súly} = 5,01 \times A_{480} * V/w \quad \text{ahol}$$

A: az adott hullámhosszon mért abszorpció

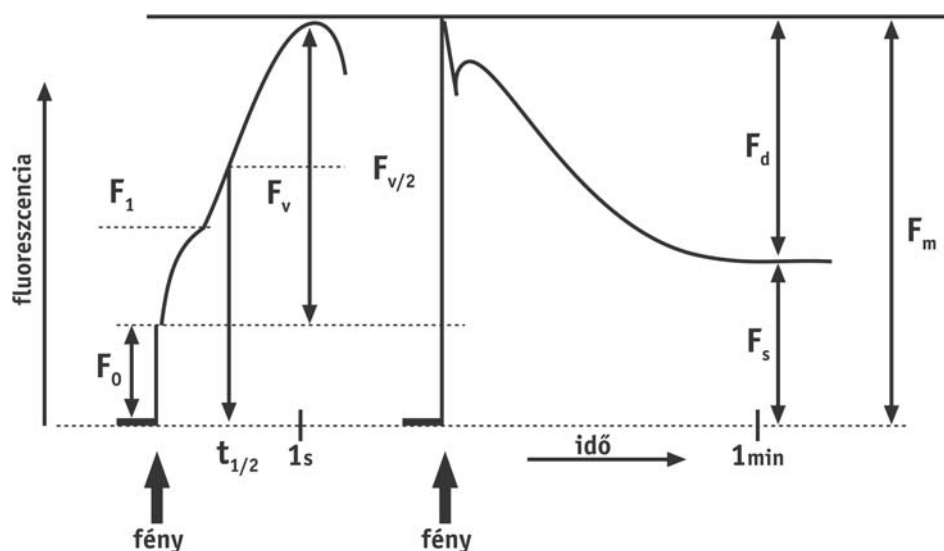
V: az oldat térfogata

w: a felhasznált levélszövet tömege

### 3.2.5. A fotoszintetikus aktivitás vizsgálata

A növények fotoszintetikus aktivitását fluoreszcencia indukciós mérésekkel határoztuk meg. Ez a vizsgálat azon alapul, hogy a sötétben tartott növények fluoreszcenciája megvilágítás hatására időben változó intenzitást mutat (Lichtentaler és Rinderle, 1988). Az indukciós görbe alakulásából következtethetünk a fotoszintetikus elektrontranszport lánc működésére (19. ábra). Ennek élettani háttere a következő: a fotoszintézis során az egészséges levelekben a fotoszintetikusan aktív fényt a fény-gyűjtő klorofill-fehérje komplexek (LHC) pigmentjei abszorbeálják és továbbítják az I-es és II-es reakciócentrum (PSI, PSII) felé. Ott történik az akceptor molekulák jelenlétében lejátszódó töltésszétválasztás, az elektrontranszfer. Az abszorbeált energia egy része elvész a rendszerből és fluoreszcencia formájában jelenik meg. Ez a növények alapfluoreszcenciája ( $F_0$ ), mely független a kémiai folyamatoktól. A sötétadaptált növényeknél a megvilágítás kezdetén az elektrontranszport

lánc minden tagja oxidált állapotban van. A megvilágítás hatására igen rövid idő alatt ( $<1 \mu\text{s}$ ) megjelenik az alapfluoreszcencia. Ahogy az elektrontranszport lánc komponensei fokozatosan bekapcsolódnak a folyamatba és redukálódnak, úgy nő a fluoreszcencia értéke is, hiszen minél több redukált komponens van, annál kevesebb foton energiáját tudja a rendszer hasznosítani. A fluoreszcencia ezért egy lassabb folyamatban először egy I értéket ér el ( $F_i$ ), ami a PSII redukált elsődleges kinon akceptorának, a  $Q_A$ -nak a mennyiségével arányos, majd egy telítési maximumhoz érkezik ( $F_m$ ), mely a PSII elektrontranszportlánc összes komponensének redukált állapotát tükrözi. Ez az a pont, amikor már nem következhet be újabb töltésszétválasztási lépés, ezért a PSII által elnyelt teljes fényenergia fluoreszcencia formájában jelenik meg. Ilyenkor az összes  $Q_A$  redukált állapotban van. Az idő múlásával a fluoreszcencia az  $F_m$  érték alá csökkenni kezd ( $F_d$ ), mert a Calvin ciklus működésbe lép és megkezdődik a keletkezett NADPH és ATP felhasználása, így az elektrontranszport lánc komponensei ismét oxidálódnak és lehetőség nyílik az elektrontranszport újbóli megindulására.



1. ábra. Rövid és hosszú idejű fluoreszcencia indukció kinetikája (Bolhár-Nordenkamp és Öquist, 1993) nyomán

A két folyamat körülbelül 80-120 s alatt egyensúlyba kerül és a fluoreszcenciában is beáll az egyensúlyi, ú.n. steady state ( $F_s$ ) állapot. A rövid időtartamú fluoreszcenciából tehát a fotoszintetikus elektrontranszport működéséről, a hosszú idejű kinetikából pedig a kloroplasztisz karboxilációs kapacitásáról kaphatunk információt (Lichtentaler és Rinderle, 1988).

A növények fotoszintetikus működésének jellemzésére általában a változó és a maximális fluoreszcencia arányát ( $F_v/F_m$ ), a PSII állapotáról tájékoztató  $dF_i/F_v$  értéket és a karboxilációs kapacitást jellemző, ú. n. vitalitási indexet ( $F_d/F_s$ ) szokták használni. Az  $F_v/F_m$  értéke ép, kifejezett

növényeknél 0,8 - 0,85 (Bolhár-Nordenkampf és Öquist, 1993). Ha értéke 0,8 alá csökken, akkor a növény fotoszintetikus kapacitása nagy mértékben sérült.

A vizsgálatokhoz Plant Efficiency Analyser (PEA) hordozható fluoreszcencia mérő készüléket (Hansatech Ltd., King's Lynn, UK) használtunk. A mérés előtt a növények levelére erősíthető csipeszek segítségével 20 perces sötétadaptációt alkalmaztunk és 60 %-os fényteltettséggel 80 másodperces megvilágítással dolgoztunk. A mérési adatokat PEA Analyser nevű számítógépes programmal (Hansatech Ltd.) értékeltük ki.

### **3.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata**

#### **3.3.1. Növényanyag**

A *Hosta tokudama* 'Dew Drop' tenyészeteket lélegző fóliával lezárt bébiételes üvegekben tartottuk fenn. A továbbsszaporítás során a hajtáscsokrokat 2-2 hajtással rendelkező csomókra vágtuk szét és helyeztük a táptalajra. Az *Ananas comosus* 'Lucidus' illetve a banán *Musa nana* 'Dwarf Cavendish' fajtáját kétlépcsős módszerrel (Mészáros, 1986) szaporítottuk, a hajtások nagyságától függően. Az erős, 4 cm-nél hosszabb hajtásokat egyenként választottuk le, merisztémájukat kb. 1 cm mélyen függőlegesen bemetszettük és a hajtásindukáló táptalajra helyeztük őket. A kisebb hajtásokat ill. hajtás kezdeményeket kis csomókban helyeztük a szaporító táptalajra, amely csökkentett mennyiségű citokinint tartalmazott, lehetővé téve ezzel a hajtások megnyúlását és teljes kifejlődését. Minden szaporítási ciklus végén ilyen alapelv szerint jártunk el. Az ananász és banán tenyészeteket műanyag, ún. VegBox dobozokban neveltük.

#### **3.3.2. Táptalajok**

A *Hosta* növényeket  $\frac{1}{2}$  makro- és mikroelem koncentrációjú MS közegen szaporítottuk 3 mg/l kinetinnel (Szafián és mtsai, 1999.) Ugyanezzel a táptalaj összetétellel dolgoztunk a reaktoros kísérletekben is. Az ananász és banán tenyészetek szaporítására teljes töménységű MS alaptáptalajt használtunk N6 vitamin kiegészítéssel. Banán esetében a hajtásindukáló táptalaj 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IVS-t tartalmazott, a szaporító táptalajban a citokinin szintet csökkentettük 1 mg/l BAP mennyiségre. Az ananász szaporítása alacsonyabb citokinin tartalom mellett történt, 0.5 mg/l BAP –ot használtunk a hajtásindukáló és 0.25 mg/l –t a szaporító táptalajban. A reaktoros kísérletekhez mindkét növény esetében a szilárd hajtásindukáló táptalajról származó tenyészeteket használtunk melyeket a szaporító közegre, folyadékba tettünk át. Kontrollként a szilárd szaporító közegen fejlődő növényanyag szolgált.

### 3.3.3. A növénynevelés körülményei

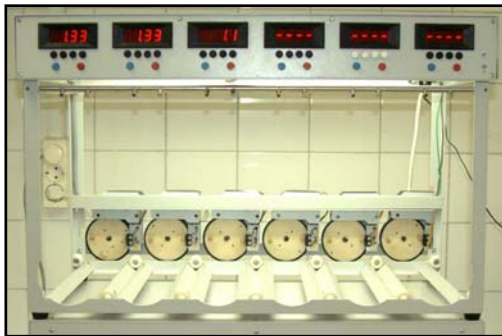
A reaktor egységet egy jól szigetelt, 22°C hőmérsékletű laboratóriumi helyiségben állítottuk fel. A megvilágítást a szerkezet saját fényforrása biztosította és automatika szabályozta. A berendezés felső szintjén helyezkedtek el a forgó hengerek, az alsó szinten azonos megvilágítás mellett helyeztük el a kontroll tenyészeteket tartalmazó edényeket. Így biztosítani tudtuk az azonos környezeti feltételeket. A kísérletek során kétféle rendszerben vizsgáltuk a folyadékban történő tenyésztés hatásait. Az egyikben a reaktor hengerek lezárt ("lefojtott") rendszert alkottak, légcserle lehetősége nélkül, a másikkban a hengerek aktív légcseréjét steril levegő bevezetése biztosította.

#### 3.3.3.1. A bioreaktor és működése

A technológiai fejlesztés érdekében létrehozott, hazai gyártmányú kísérleti *horizontális szubmersz-emersz (HSE)* reaktor legfőbb újdonsága, hogy benne az inokulumok emelkednek-süllyednek, és nem a tápfolyadék szintje. A reaktor test edzett, hőálló, megfelelően méretezett (hossz, átmérő, falvastagság) átlátszó műanyag cső ill henger, a végek felől hővel sterilizálható, biztonsági zárószervezettel. A zárószervezetbe cső és egyéb csatlakozók kerültek beépítésre, amelyek segítségével különböző technológiai feladatokat lehet megvalósítani, pl. a tápfolyadék cseréjét és friss levegő bejuttatását. A reaktor test (henger) közepén egy hővel is sterilizálható hosszirányban futó térelválasztó rács van, amelyen a tápfolyadék minden irányban átjut, azonban a növények nem esnek át rajta. Ez a szerkezet a reaktor-testet két kamrára osztja, amelyek közül csak az egyikbe kerülnek az inokulumok. A tápfolyadék a feltöltés után a reaktor-test alsó felében található. Az inokulumok a szükséges mennyiségű fényt a henger falán keresztül kapják, a környezettől függően mesterséges vagy természetes megvilágítással. A reaktor henger méretei: 30 cm hosszú, 10 cm átmérőjű, 500 ml közeg befogadására alkalmas. Működés közben a reaktor teste vízszintesen fordul el a hossztengelye körül, programozott kerületi sebességgel, irányban és időtartammal. Ennek során az inokulumok hol a tápfolyadékba merülnek (szubmerziós, "S"-fázis), hol pedig az elválasztó rácson kiemelkednek belőle (emerziós, "E"-fázis). Kísérleteink során egy periódus időtartama 180 perc volt, ebből a bemelegítés azaz az S fázis 15 percig tartott. A berendezést Fári és mtsai. (2004) hozták létre és alakították folyamatosan az üzemelés közben szerzett tapasztalatok alapján. A rendszer szabadalmi oltalom alá helyezése jelenleg folyik. Mivel a berendezés alapvetően eltér a többi ismert bioreaktortól, az alábbi néhány képen mutatjuk be a szerkezeti egységeit valamint a működtetését.



2. ábra. A szétszerelt állapotú reaktor modul, illetve a fejrész a csőcsatlakozókkal



a.



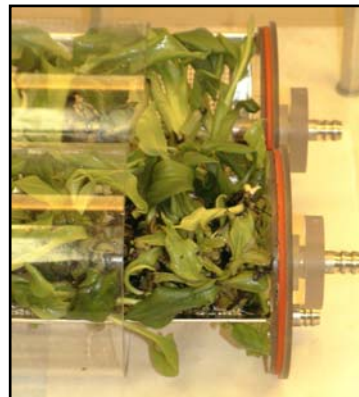
b.

3. ábra. A reaktor test modulok nélkül (a) és a modulokkal valamint a kontroll tenyészetekkel (b).

### 3.3.3.2. A növényanyag manipulálása – a hengerek ürítése és újratöltése

A tenyészciklus végén, a hajtáscsokrok szétszedéséhez és az új tenyészciklus indításához a modulokat kiemeltük a helyükről és egyenként a steril munkatérbe vittük át. A reaktor hengereket függőleges állásba helyeztük és eltávolítottuk a homlok oldalon található, rozsdamentes anyagból készült levegőző és leeresztő csomók zárókupakját. Ezt követően vízszintes helyzetbe fordítottuk a

hengereket, és az alsó csonkokon át főzőpohárba leeresztettük a táptalajt. Ezután kicsavartuk a reaktor modulok nyitására szolgáló műanyag csavarfejet, ezzel a homlokrész zárófedele előbb résnyire megnyílt, majd tovább csavarva teljesen szabaddá vált. Így a reaktorcső hengeréből ki tudtuk húzni a növényeket tartó, belső rozsdamentes hálóból kialakított tálcát és a hajtáscsokrokat steril lapra helyeztük át.



4. ábra. A tápfolyadék leengedése a modulból, majd a zárófedél kinyitása

### 3.3.4. Fotoszintézis mérése hordozható infra vörös gázanalizátorral

A készülék LI-6200 típus, a LI-COR Inc. gyártmánya, amelynél a legkisebb kamrát alkalmaztuk, a  $250 \text{ cm}^3$  köbtartalmút. A kamrán átpumpált levegő széndioxidtartalmát a készülék infra vörös fényelnyelés alapján méri. A programban megadott képletekkel a levelek fotoszintézisét a megvilágítás során felhasznált széndioxidmennyiség alapján számolja a készülék. Ha a széndioxid mennyisége nem csökken, hanem nő, akkor légzést mérünk.

Az értékelés során 5-5 növényke 1-2 levelét a mérőkamrába helyeztük és a reaktor fényerejénél nagyobb fényerő mellett ( $80\text{-}110 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) megmértük a levélke  $\text{CO}_2$  forgalmát.

### 3.3.5. Anatómiai vizsgálatok

A növények leveleiből az alábbi anatómiai preparátumokat készítettünk:

- Fiatalabb és fejlettebb növények levélnyel- és levél keresztmetszetének összehasonlítása scanning (pásztázó) elektronmikroszkóppal (SM preparátumok);
- Fiatalabb és fejlettebb növények levélnyel- és levél keresztmetszetének összehasonlítása félvékony metszeteken, fénymikroszkóppal;
- Fiatalabb és fejlettebb növények levél színének és fonákának összehasonlítása scanning (pásztázó) elektronmikroszkóppal (SM preparátumok).



A vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Budai Campusának Központi Laboratóriumában végeztük.

### **3.4. A kísérletek értékelésének módszere**

A tenyészciklus végén értékeltük a növények növekedési paramétereit azaz a különböző táptalajokon fejlődött hajtások számát és hosszát, illetve a gyökerek számát és hosszát a tenyésztés aktuális fázisának megfelelően. Mértük a tenyészetek tömeggyarapodását a friss és száraz tömeg, illetve a szárazanyag tartalom értékeinek felvételezésével. Ugyancsak vizsgáltuk a növények fotoszintetikus tulajdonságait, azaz mértük a fotoszintetikus pigment tartalmat és a fluoreszcencia indukciós kinetika értékeit, illetve a fotoszintetikus kapacitás változásait. Esetenként feljegyeztük a hajtások egyéb látható tulajdonságait (szín és forma, kalluszképződés mértéke, torz, vizes hajtások képződése).

Minden kísérletet legalább három ismétlésben végeztünk, s minden ismétlésben átlagosan tíz mérést végeztünk kezelésként a növekedési paraméterekre vonatkozóan. A fotoszintetikus sajátosságok mérése során általában alacsonyabb mintaszámmal (2-5) dolgoztunk. Az adatokat SPSS programcsomaggal értékeltük és a t próbát is elvégeztük. Az ábrákon feltüntetett szignifikancia értékek az alábbi valószínűségi szinteket jelölik: \*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ .

## 4. EREDMÉNYEK

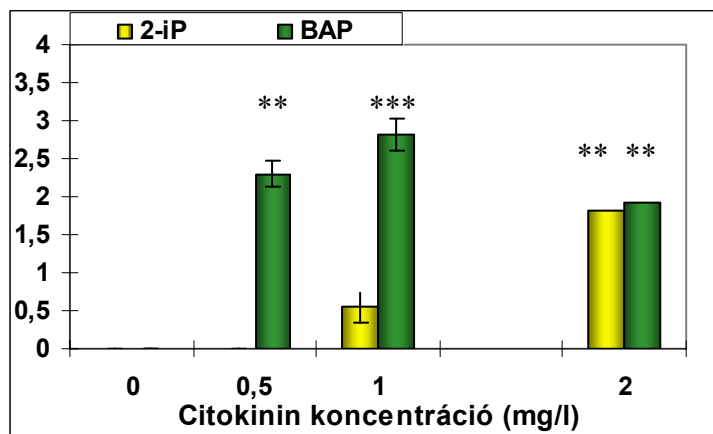
### 4.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

#### 4.1.1. *ATROPA BELLADONNA*

##### 4.1.1.1. Hajtáscsúcsból indított tenyészetek

A hajtáscsúcsból indított tenyészetekben háromféle citokinin – KIN, 2-iP és BAP – 0,5; 1 és 2 mg/l koncentrációjának a hajtásképződésre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A kinetin egyik koncentrációja sem idézett elő hajtásfejlődést. A 2-iP és a BAP járulékos hajtásképződést indukált, tehát nem oldalhajtások törtek elő a hónaljrygyekből, hanem a hajtáscsúcs alapi részének szöveteiből fejlődtek ki az új hajtások. A 2-iP esetében az 1 és 2 mg/l a hatékony tartomány, míg a BAP már 0,5 mg/l koncentrációban is előidézte a hajtásdifferenciálódást. A hajtásszám tekintetében az 1 mg/l koncentráció bizonyult a legjobbnak, a 2 mg/l már gátló hatásúnak tűnik. A BAP 0,5 és 1,0 mg/l koncentrációja 2,3 ill. 2,8 hajtást eredményezett explantátumonként, míg a 2,0 mg/l koncentrációnál az átlagos hajtásszám 2 alatt maradt. A 2-iP esetében az 1,0 mg/l koncentráció 0,6, a 2,0 mg/l 1,6 hajtás differenciálódását idézte elő. A számadatokból nem látható, de szembetűnő volt, hogy a 2-iP által indukált hajtások nagyon aprók a BAP-os táptalajon fejlődöttekhez képest. Az 5. ábrán a különböző BAP koncentráció hatására fejlődött hajtások számának alakulását figyelhetjük meg.



5. ábra. A különböző BAP ill. 2iP tartalmú táptalajokon regenerálódott hajtások számának alakulása *Atropa* hajtáscsúcs tenyészetekben 4 hetes tenyészciklus után ( \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )



6. ábra. *Atropa* hajtáscsúcs tenyészetekben képződött új hajtások számának alakulása BAP különböző koncentrációinak (1=0,5 mg/l, 2=2 mg/l, 3=1 mg/l) hatására 4 hetes tenyészciklus után.

#### 4.1.1.2. Szomatikus szövetekből létesített tenyészetek

Kísérleteinkben levél-, levélnyél és internódium darabok regenerációs képességét vizsgáltuk. A táptalajok 1, 2, és 5 mg/l BAP-ot ill. 2, 5, és 10 mg/l KIN-t tartalmaztak, mindkét citokinin mellett 0,2 ill. 1,0 mg/l IES kiegészítéssel.

##### 4. 1.1.2.1. Levéldarabok

Ha megfigyeléseinket a vizsgált citokininek hatásai szerint összegezzük, azt tapasztaljuk hogy az 5,0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IES tartalmú táptalajon a keletkezett hajtások egy része vitrifikált, enyhén torz, az alapi részen erősen kalluszos volt. A hajtások nagyobb része 2-3 cm hosszúságú volt, kevesebb volt az 1 cm alatti hajtás. Az 5 mg/l BAP + 1.0 mg/l IES hormontartalmú táptalajon fejlődött hajtások az előzőnél valamivel kisebb méretűek voltak. A kalluszképződés szerint eltérő képet mutattak. Egyesek erősen kalluszos hajtásokat képeztek, míg másokra ez csak kis mértékben vagy egyáltalán nem volt jellemző. Gyakori volt a vizes, torz hajtások képződése. A 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l IES tartalmú táptalajon a hajtások csak ritkán voltak kalluszosak. Torz, vizes hajtások az előzőeknél ritkábban fordultak elő. Jellemző, hogy sok apró, 0,5-1 cm alatti hajtáskezdemény keletkezett, amelyeket külön nem, csak kis csomókban tudtunk leválasztani. A 2 mg/l BAP + 1 mg/l IES tartalmú táptalajon lévő inokulumokból fejlődött a legtöbb továbbnevelésre is alkalmas, 1 cm feletti hajtás. A leválasztott hajtások általában 2-3 cm hosszúak voltak, de nem volt ritka a 4-5 cm-es hajtás sem. A keletkezett hajtások csak kis mértékben voltak kalluszosak. Sok apró hajtáskezdemény fejlődött, amelyeket csak kis csomókban lehetett leválasztani. Az 1 mg/l BAP + 0.2 mg/l IES-tartalmú táptalajon az előző táptalajhoz képest kevesebb hajtás képződött. A hajtások

mérete igen eltérő volt, a többségük 3-5 cm nagyságú, de sok 1 cm alatti növény is fejlődött. A képződött hajtások csak enyhén voltak kalluszosak.

Kísérleteinkben az explantátumok egy részét színükkel lefelé, másik részét a színükkel felfelé fektettük a táptalajra, az orientáció esetleges hatásának vizsgálata érdekében.. A hajtásképzés mértékének vizsgálata mellett értékeltük azt is, hogy a levél egyes részei különböznek-e morfogenetikus kapacitás tekintetében, illetve, hogy van-e az explantátumok polaritásának szerepe a differenciálódásban, ill. a hajtások kifejlődésében. A levélcúcsokból történt hajtásregeneráció folyamán a legtöbb hajtás az 1 mg/l BAP tartalmú táptalajon fejlődött, 2,5 db egy explantátumon. Ennél kevesebb, 1,5-2 közötti hajtásszámot regisztráltunk a 2 és 5 mg/l BAP-ot tartalmazó táptalajokon. A levéldarabok helyzete nem volt hatással a hajtásszámra, kivéve az 5 mg/l BAP koncentrációt, itt a színükkel felfelé fordított explantátumokon valamivel kevesebb hajtás fejlődött. Az adatokat az 1. táblázatban tüntettük fel.

A levelek középső részéből származó explantátumok összességében jobb regenerációs képességet mutattak, főként az 1 és 2 mg/l BAP koncentráció mellett, ahol 3 vagy e fölötti volt az átlagos hajtásszám. Az 5 mg/l koncentrációnál ennél valamivel kevesebb, 2,2-2,8 közötti. Általában a színükkel felfelé fordított levéldarabokon regenerálódott több hajtás. Az értékeket az 1. táblázat tartalmazza.

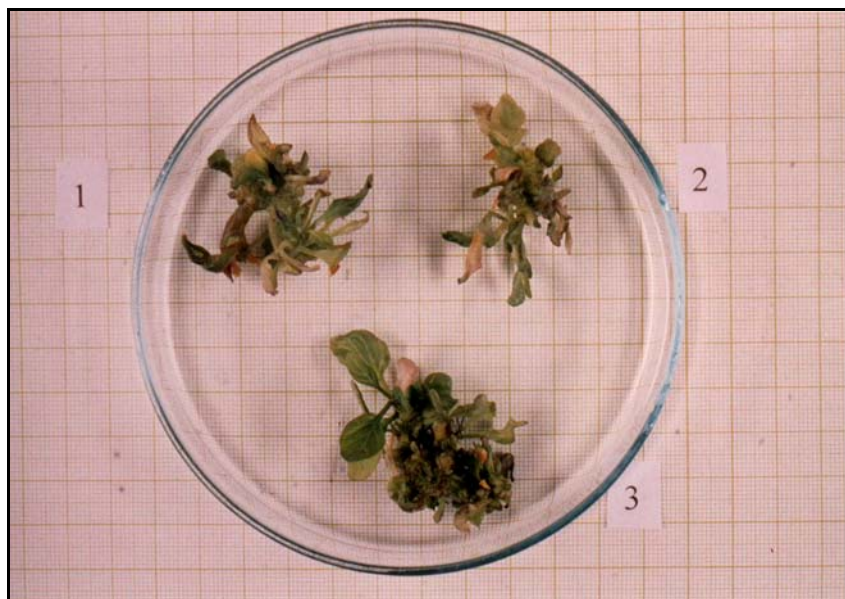
A legtöbb hajtás a levélváll darabokon képződött, mindegyik BAP koncentráció esetében 3 fölötti volt a számuk explantátumonként. Az orientáció tekintetében nem látható koncentráció függés. A számszerűsített értékeket az 1. táblázatban összesítettük.

1. táblázat. Különböző hormonkombinációk hatása a hajtásképződés mértéke *Atropa* különböző eredetű explantátumain. Az egyes sorokban a felső érték a színükkel felfelé, az alsó a színükkel lefelé fordítva elhelyezett explantátumokon kapott hajtásszámokat jelzik.

Hormonok	Levél csúcs	Levél közép	Levél váll	Levélnyel	Internódium
	Hajtások száma db/explantátum				
5 mg/l BAP	1,18	2,34	3,75	1,61	2,30
+ 0,2 mg/l IES	1,89	2,18	2,81		
5 mg/l BAP	1,36	2,22	1,40	3,34	1,89
+ 1,0 mg/l IES	1,90	2,76	1,98		
2 mg/l BAP	1,80	3,85	1,85	2,24	1,80
+ 0,2 mg/l IES	1,85	3,12	2,40		
2 mg/l BAP	1,90	3,41	3,62	2,62	4,11
+ 1,0 mg/l IES	1,92	3,10	2,70		
1 mg/l BAP	2,51	3,72	3,41	1,30	2,00
+ 0,2 mg/l IES	2,48	3,12	3,56		



7. ábra. Hajtásregeneráció *Atropa* levéldarabokon 4 hetes tenyészciklus után  
 Táptalajok: 1 = 5 mg/l BAP + 0,2 mg/l IES; 2 = 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IES



8. ábra. Hajtásregeneráció *Atropa* levéldarabokon 4 hetes tenyészciklus után.  
 Táptalajok: 1 = 5 mg/l BAP + 0,2 mg/l IES  
 2 = 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IES  
 3 = 2 mg/l BAP + 1,0 mg/l IES

A kinetin tartalmú táptalajokon az inokulumok antociánosak lettek, majd elhaltak. Néhány esetben tapasztaltunk csak kismértékű kalluszképződést. Ezeken a táptalajokon a regeneráció jóval kisebb mértékű volt, kevesebb volt a reagáló explantátumok száma is, ezért itt az adatokat csak a levéldarabok összességére vonatkozóan értékeltük, tekintet nélkül azok eredetére és elhelyezkedésére. Az átlagos hajtásszám az egyet nem haladta meg, 2 ill. 10 mg/l kinetin tartalom mellett 0,2 alatti míg az 5 mg/l koncentrációnál 0,8-1 közötti értéket adott (az adatok nincsenek bemutatva).

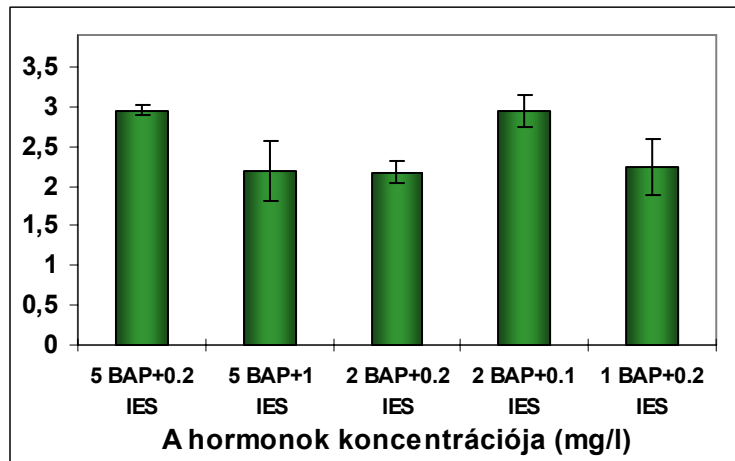
#### **4.1.1.2.2. Levélnyel darabok**

Kísérleteinkben a levélnyel darabokból regenerálódott hajtások száma elég nagy szórást mutat a BAP tartalmú táptalajokon, mint ahogy azt az 1. táblázatban láthatjuk. Az átlagos hajtásszám 1,3 és 3,4 között változik. Úgy tűnik, hogy a magasabb BAP koncentrációk valamivel hatékonyabbak, ill. az azonos BAP koncentráció mellett a magasabb IES tartalom kedvezőbb. A hajtások minősége és méret szerinti megoszlása ez esetben is megegyezik a levéldaraboknál leírtakkal. A kinetin tartalmú táptalajokon hajtásregeneráció nem történt.

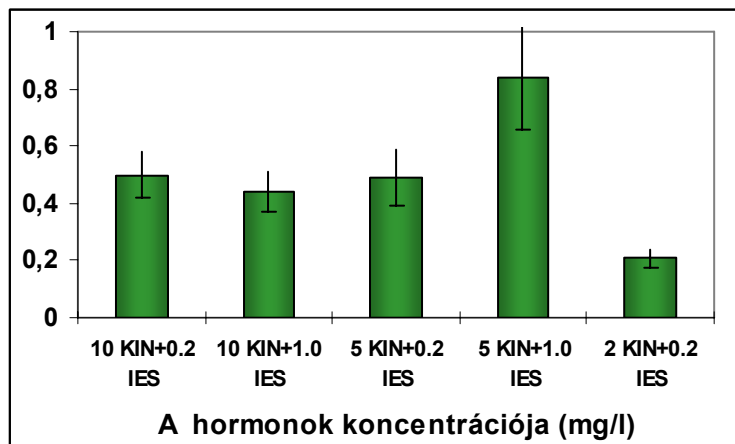
#### **4.1.1.2.3. Internódium darabok**

Kísérleteink értékelése során az egyes táptalajokon fejlődött hajtások minősége és méret szerinti megoszlása a levéldaraboknál leírt képet mutatta. Itt is a BAP bizonyult aktívabbnak a hajtásindukció tekintetében. Az egyes táptalaj kombinációk hatása között lényeges eltérést nem tapasztaltunk, az átlagos hajtásszám 1,8-2,2 között mozgott. Kivétel a 2 mg/l BAP + 1 mg/l IES kombináció, mely a többiekhez képest kétszeres hajtásszámot eredményezett (1. táblázat). A kinetines táptalajok esetében csak a 10 mg/l koncentráció hatására következett be hajtásregeneráció, az átlagos hajtásszám 0,4 db volt explantátumonként.

Ha a különböző kísérletek eredményeit az inokulumonként fejlődött hajtások száma szerint összegezzük, tekintet nélkül az inokulumok eredetére, azt látjuk, hogy a BAP tartalmú táptalajokon átlagosan 2-3 között mozog a fejlődött új hajtások száma. A koncentráció és a hajtásszám között nem látni összefüggést. A kinetin tartalmú táptalajok mindegyike indukál ugyan hajtásképződést, de szinte csak véletlenszerűen, az átlagos hajtásszám mindenütt egy alatti érték. Az adatokat összefoglalóan a 9. és 10. ábra mutatja..



9. ábra. A BAP tartalmú táptalajok hatása a hajtásregenerációra *Atropa* különböző eredetű inokulumain 4 hetes tenyészciklus után



10. ábra. A kinetin tartalmú táptalajok hatása a hajtásregenerációra *Atropa* különböző eredetű inokulumain 4 hetes tenyészciklus után

#### 4.1.1.2.4. Gyökérdarabok

A gyökérdarabokból történő regenerációs kísérlet táptalajai 0,5 mg/l NES-t ill. IES-t, valamint 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NES-t tartalmaztak.

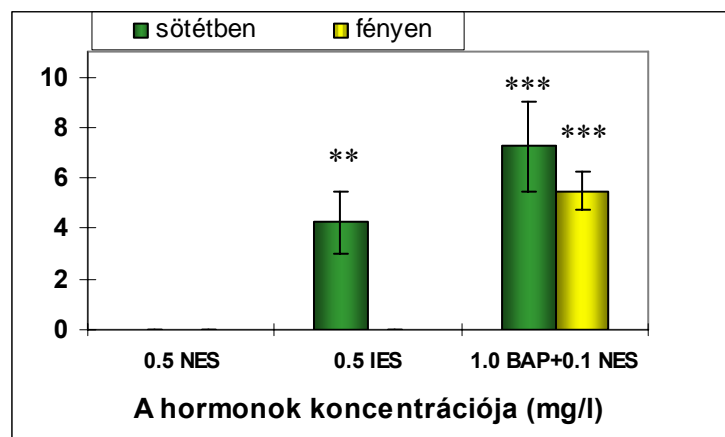
A hajtásindukciós képességet vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 0,5 mg/l NES-t tartalmazó táptalajon a gyökerek növekedtek, a sötétben elhelyezetteken több, a fényen lévőknél kevesebb kallusz képződött. A gyökerek inkább vastagodtak, és hosszirányban növekedtek, de csak kis mértékben ágaztak el. Hajtásregeneráció nem következett be, sem sötétben, sem fényen.

A 0,5 mg/l IES-t tartalmazó táptalajon a gyökerek növekedtek és el is ágaztak. A sötétben neveltek kis mértékben kalluszosodtak, de hajtás nem fejlődött rajtuk. Ezt követően fényre helyeztük őket, ahol már egy hét elteltével tapasztaltuk a hajtásfejlődés megindulását. Két hét után újra értékelve gyökereenként 2-5 darab 0,5-1 cm közötti hajtást számoltunk. A kezdettől fogva fényen nevelt

tenyészeteken 4 hét után apró hajtáskezdemények jelentek meg, majd újabb két hét után ezekből hajtások fejlődtek.

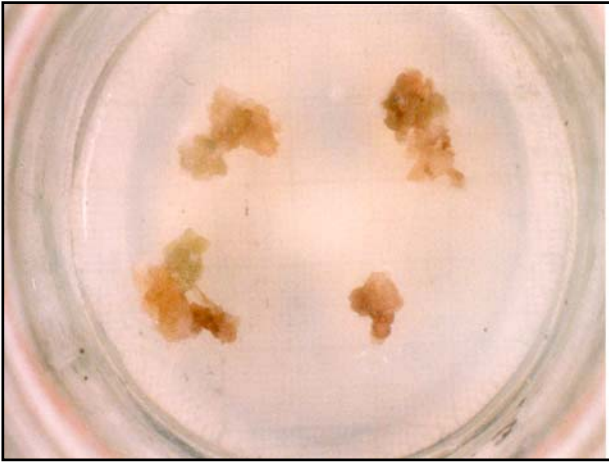
Az 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NES összetételű táptalajon a gyökerek növekedtek, kismértékben elágaztak. A fényen lévőek kalluszosodtak, gyökereenként 1-3 darab 1-2 cm nagyságú hajtást fejlesztettek. A sötétben lévőek erősen kalluszosodtak, a 6. héten kifejlődött hajtás nem volt rajtuk, csak apró dudorok jelentek meg. Ezek feltehetőleg apró hajtáskezdemények voltak, mivel fényre helyezve a tenyészeteket 1 hét után itt is megfigyeltük a hajtásképződés megindulását. Két hét elteltével gyökereenként 1-3 darab 1-2 cm-es és 5-10 darab apró, 0,5-1 cm-es hajtás képződött.

A 11. ábra a gyökérdarabokon regenerálódott hajtások számának alakulását mutatja.

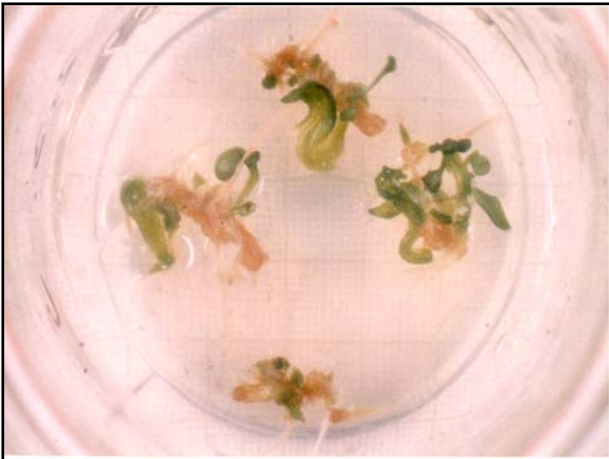


11. ábra. *Atropa* gyökér darabokon regenerálódott hajtások számának alakulása a különböző táptalajokon, sötétben ill. fényen történő nevelést követően 4 hetes tenészciklus után (\*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

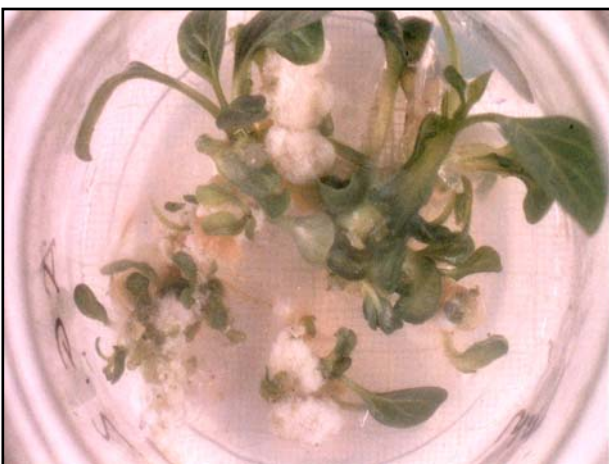




12. ábra. Kallusz képződés hajtásindukció nélkül *Atropa* gyökérdarabokon 0,5 mg/l NES tartalmú táptalajon



13. ábra. Hajtásképződés *Atropa* gyökérdarabokon 0,5 mg/l IES tartalmú táptalajon



14. ábra. Intenzív hajtásképződés *Atropa* gyökérdarabokon 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l IES tartalmú táptalajon

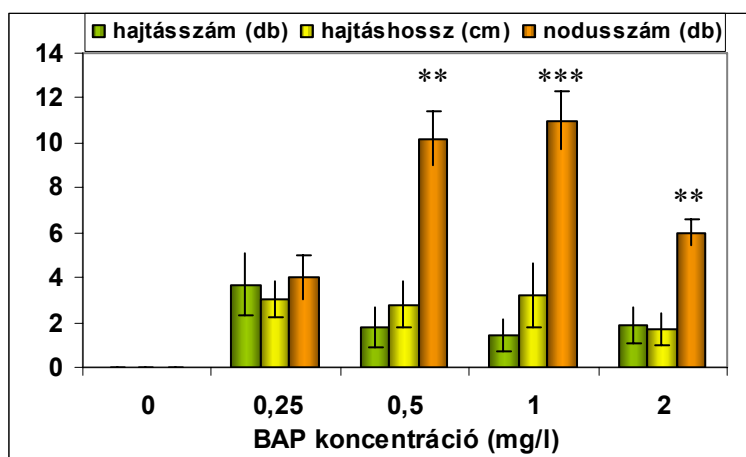
#### 4.1.2. *POPULUS ALBA*

Az explantátumokat különböző citokinineket - BAP, 2-iP ZEA, és TDZ - tartalmazó táptalajokra helyeztük, a hajtásképződés előidézése érdekében. A BAP és a 2-iP hatását 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l koncentrációban vizsgáltuk, a ZEA koncentrációja 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l volt, a TDZ-t 0,05, 0,1; 0,25; 0,5 mg/l koncentrációban alkalmaztuk.

##### 4.1.2.1. Hajtáscsúsból indított tenyészetek

A zeatin egyik vizsgált koncentrációja sem idézett elő hajtásindukciót, a 2-iP-t tartalmazó táptalajok közül is csak az 1,0 mg/l-es koncentráció mellett történt minimális oldalhajtás képződés. A BAP alkalmazása során minden koncentrációban oldalhajtások törtek elő a hónaljrygyekből. Hajtásszám tekintetében a 0,25 mg/l koncentráció bizonyult legjobbnak, és a hajtások hossza is megfelelőnek mutatkozott a további felhasználáshoz.

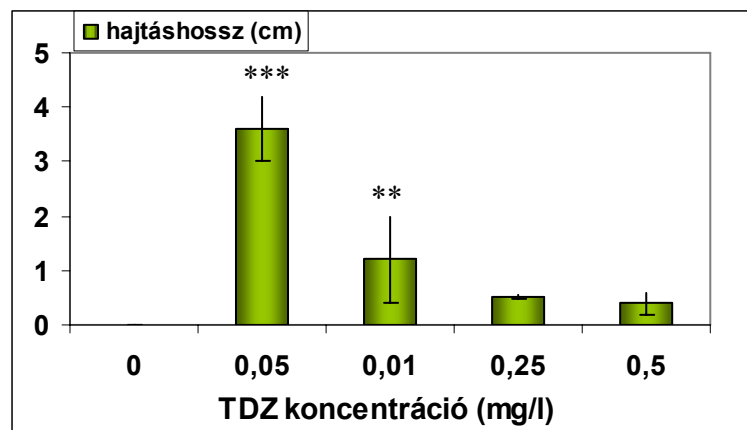
A 15. ábrán látható, hogy a BAP 0,25 mg/l-es koncentrációja közel 4 hajtást eredményezett explantátumonként, míg a többi koncentráció esetében az átlagos hajtásszám 2 alatt maradt. Az 1,0 mg/l BAP koncentráció esetén a hajtáshosszak átlaga valamivel 3 cm feletti értéket adott, de az ábrán látható, hogy a 0,25 és 0,5 mg/l-es koncentrációban is csak kicsivel marad 3 cm alatt. A 0,5 és az 1,0 mg/l koncentráció esetében átlagosan közel 10 darab levél fejlődött hajtásonként, míg az ennél magasabb és alacsonyabb koncentrációkban a levélszám ennél kevesebb volt.



15. ábra. BAP tartalmú táptalajokon regenerálódott hajtások különböző növekedési paramétereinek alakulása *Populus alba* hajtáscsúcs tenyészetekben 4 hetes tenyészciklus után (\*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

A TDZ minden koncentrációban nagyon apró (0,3 cm alatti) hajtások képződését eredményezte, melyeket egyenként nem is tudtunk megszámolni. Ezért hormonmentes MS közegre helyeztük át a csokrokat, hogy megfigyelhessük, kinövik-e a hormonhatást.

Két hónap elteltével a 0,05 illetve a 0,1 mg/l TDZ tartalmú közegről származó hajtások szépen megnyúltak, átlagosan 3,5 illetve 1,14 cm nagyságúak lettek. Az ennél magasabb koncentrációnál azonban a hajtások továbbra is aprók maradtak (16. ábra), az átlagos hajtáshossz nem haladta meg a 0,5 cm-t sem.



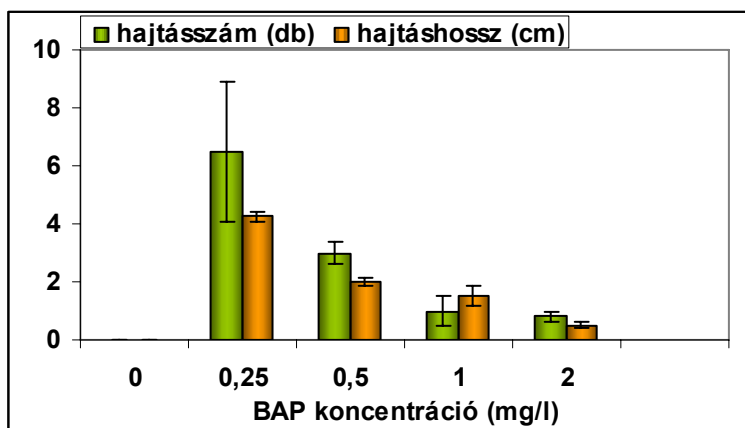
16. ábra. *Populus alba* hajtáscsúcs tenyészetekben különböző TDZ koncentrációjú táptalajokon regenerálódott hajtások hosszának alakulása két hónapos továbbnevelés után (\*\* p> 0,01; \*\*\* p> 0,005)

#### 4.1.2.2. Nóduszból indított tenyészetek

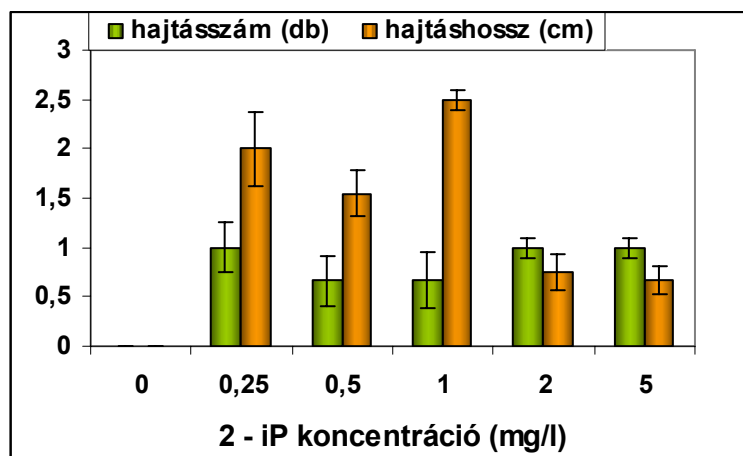
Zeatin alkalmazásával a kétrügyes explantátumokon sem sikerült kiváltanunk új hajtások képződését. A nóduszból történő hajtásképződés folyamatában a BAP hatékonyabbnak bizonyult, mint a hajtáscsúcsból történő indukció esetében volt, hiszen itt a 0,25 mg/l-es koncentrációnál átlagosan több mint 6 oldalhajtás képződött. Az ennél magasabb koncentrációknál egyre kevesebb hajtás képződött, a 0,5 mg/l-nél 3, míg 1,0 mg/l koncentráció esetében átlagosan 1 hajtás képződését figyelhettük meg. A 2,0 mg/l-es koncentráció már gátló hatással volt a hajtásfejlődésre nézve. A levélszám és a hajtáshossz is a 0,25 mg/l-es koncentrációjú táptalajon bizonyult a legmagasabbnak.

A 2-iP tartalmú táptalajokon a hajtásindukció mértéke a legjobb esetben is csak átlagosan 1,3 darab volt inokulumonként. A hajtáshossz az 1 mg/l-es koncentrációnál volt a legnagyobb, átlagosan 5 cm, ebben az esetben a levél szám nem haladta meg a 3 db-ot inokulumonként. Az

ennél alacsonyabb, ill. magasabb koncentráció rozztás hajtásokat eredményezett. Az eredményeket a 17. és 18. ábra mutatja.



17. ábra. Nóduszból történő regeneráció különböző BAP tartalmú táptalajokon *Populus alba* tenyészetekben



18. ábra. Nóduszból történő regeneráció 2-iP tartalmú táptalajokon *Populus alba* tenyészetekben

A TDZ hatása ez esetben is törpe hajtások vagy inkább levélcsokok létrejöttében nyilvánult meg, mint ahogyan a hajtáscsúcsoknál is. A hormonmentes közegen történő továbbnevelés után itt is csak a két legalacsonyabb TDZ koncentrációról származó hajtások nyúltak meg annyira, hogy önállóan leválaszthattuk őket.

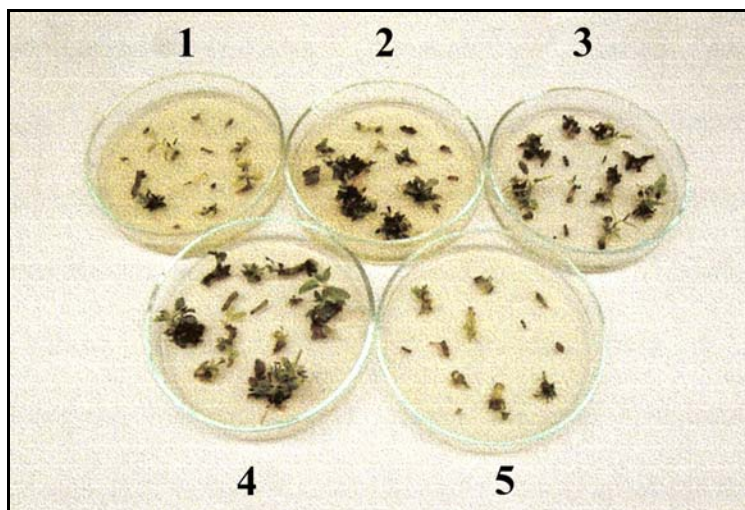
#### 4.1.2.3. Szomatikus szövetekből létesített tenyészetek

Kísérleteinkben levél-, internódium- és gyökér darabok regenerációs képességét vizsgáltuk.

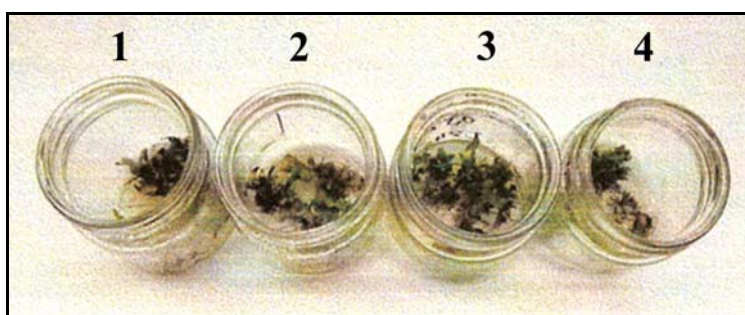
#### 4.1.2.3.1. Internódium darabok

Mind a hajtásszám, mind a hajtások minősége tekintetében a zeatin tartalmú táptalajok bizonyultak leghatékonyabbnak a hajtásképződés kiváltásában. A 0,2 mg/l zeatin koncentráció mellett az átlagos hajtásszám a 7,8 darabot is elérte az egyes explantátumokon, és ez az érték a többi koncentrációnál is megközelíti a hetet. (Az adatokat a 2. táblázatban mutatjuk be.)

A BAP és a 2-iP tartalmú táptalajokon fejlődött hajtások számát összehasonlítva a 2-iP tartalmú táptalajok bizonyultak kedvezőbbnek a regeneráció tekintetében. A 0,5 mg/l 2-iP koncentráció mellett közel kétszer annyi hajtás fejlődött átlagosan, mint azonos koncentráció esetében a BAP tartalmú táptalajon.



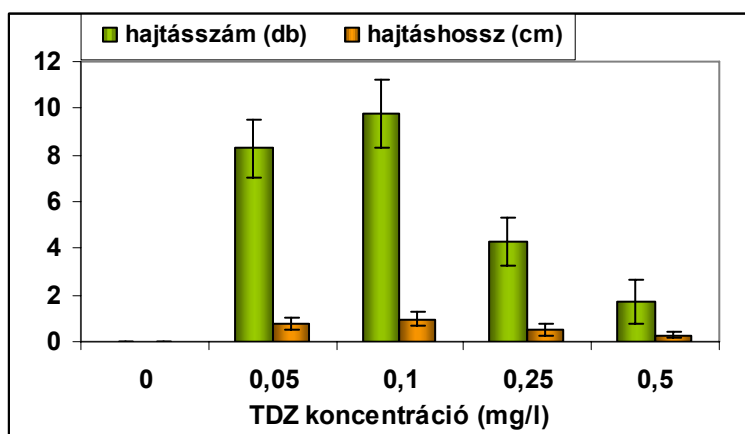
19. ábra. *Populus alba* tenyészetekben internódium darabokon regenerálódott hajtások mennyiségének alakulása a 2-iP koncentrációk függvényében (1= 0,25 mg/l, 2= 0,5 mg/l, 3=1,0 mg/l, 4= 2,0 mg/l, 5= 5,0 mg/l 2-iP)



20. ábra. *Populus alba* tenyészetekben internódium darabokon regenerálódott hajtások mennyiségének alakulása a zeatin koncentrációk függvényében (1= 1,0 mg/l, 2=0,5 mg/l, 3= 0,2 mg/l, 4= 0,1 mg/l zeatin)

A TDZ tartalmú táptalajokra helyezett internódium darabok egész felületén zöldes-fehér kallusz képződött, melyeken gombostűfej nagyságú zöld differenciálódó részeket figyeltünk meg. A kallusz csomókat hormonmentes MS táptalajra helyeztük, hogy az így kicsit megnyúlt hajtásokat meg tudjuk számolni.

A 21. ábrán látható, hogy a legtöbb hajtás a 0,1 mg/l TDZ tartalmú táptalajról származó kallusz csomók esetén regenerálódott, míg a 0,5 mg/l-es koncentrációnál már csak átlagosan 1,7 hajtás jött létre. A hajtások a legjobban szintén a 0,1 mg/l TDZ tartalmú táptalajon nyúltak meg, átlagosan 0,97 cm hosszúságot értek el..



21. ábra. TDZ tartalmú táptalajok hatása *Populus alba* internódium darabokon regenerálódott hajtások számának és hosszának alakulására 8 hetes továbbnevelés után

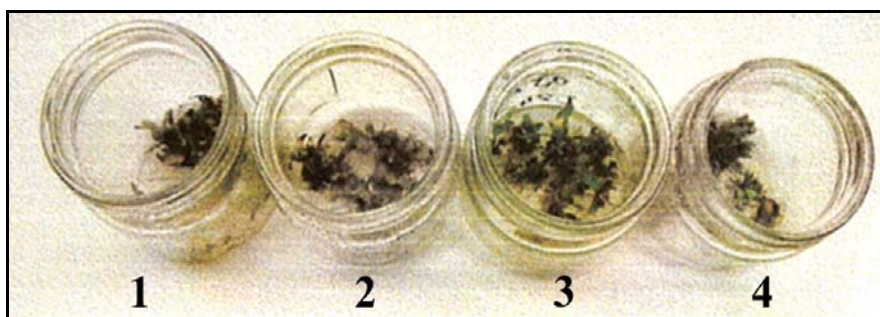
#### 4.1.2.3.2. Levéldarabok

A hajtásképződés kiváltására a 2-iP egyetlen koncentrációja sem bizonyult alkalmasnak. Ezzel szemben a BAP és különösen a zeatin tartalmú táptalajokon sikeres volt a hajtásindukció. Hatását tekintve a BAP 0,5 és 1 mg/l koncentrációja eredményesebb volt, mint a két szélső érték. Jóval hatékonyabbnak bizonyult a zeatin minden koncentrációban, és a 0,5 mg/l kiemelkedő hajtásszámot produkált. A levéldarabok polaritása, azaz, hogy a levél csúcsi-, közép- vagy váll részéről származtak, szintén befolyásolta a regeneráció mértékét. A legtöbb hajtás a levélváll darabokon képződött, ezt követték sorrendben a levél közép, majd a levélcsőcs darabokon fejlődött hajtások számadatai. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.



2. táblázat. A vizsgált citokininek hatása a hajtásregenerációra *Populus alba* különböző eredetű explantátumain

Citokinin	Koncentráció (mg/l)	Levél csúcs	Levél közép	Levél váll	Internódium
		hajtások száma db/explantátum			
BAP	0,25	0,6	0	0,3	2,4
	0,5	1,2	1,9	3,0	2,4
	1,0	1,6	2,0	1,6	0,5
	2,0	0,7	0,9	0,8	0,4
ZEA	0,1	1,1	2,1	2,3	6,2
	0,2	1,8	2,0	4,0	7,8
	0,5	2,5	5,5	5,5	7,1
	1,0	2,1	4,0	2,8	6,4
2 - iP	0,25				2,4
	0,5				4,6
	1,0				3,5
	2,0				4,2
	5,0				0,2

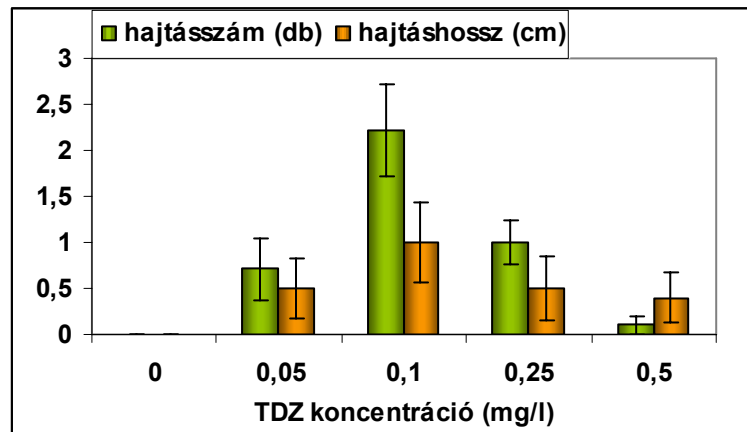


22. ábra. *Populus alba* levéldarabjain regenerálódott hajtások mennyiségének alakulása a BAP koncentráció függvényében (1= 0,25 mg/l, 2= 0,5mg/l, 3= 1,0 mg/l, 4= 2,0 mg/l BAP)



23. ábra. *Populus alba* levéldarabjain regenerálódott hajtások mennyiségének alakulása a zeatin koncentráció függvényében (1= 0,1 mg/l, 2= 0,2 mg/l, 3= 0,5 mg/l, 4= 1,0 mg/l ZEA)

TDZ tartalmú táptalajokon az internódiumokhoz hasonlóan a levéldarabok egész felületén zöldes-fehér kallusz csomók fejlődtek, melyeken apró hajtáskezdeményeket figyeltünk meg. A 24. ábrán jól látható, hogy a hormonmentes MS táptalajra helyezés után a legtöbb hajtás a 0,1 mg/l TDZ tartalmú táptalajon fejlődött szövettömegből regenerálódott, átlagosan 2,2 darab inokulumonként. A hajtás megnyúlás is ezen a koncentráción volt a legnagyobb mértékű, átlagosan 1 cm.



24. ábra. *Populus alba* levéldarabjain TDZ tartalmú táptalajokon regenerálódott hajtások számának és hosszának alakulása 8 hetes továbbnevelés után

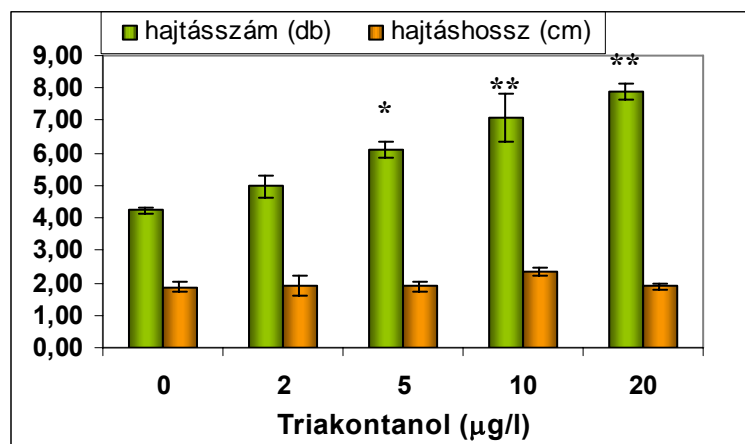
Gyökér darabokon egyik kezelésben sem következett be hajtásképződés.



## 4.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában

### 4.2.1. Triakontanol hatása málna (*Rubus idaeus* 'Malling Exploit') tenyészetek szaporodására és gyökeresedésére

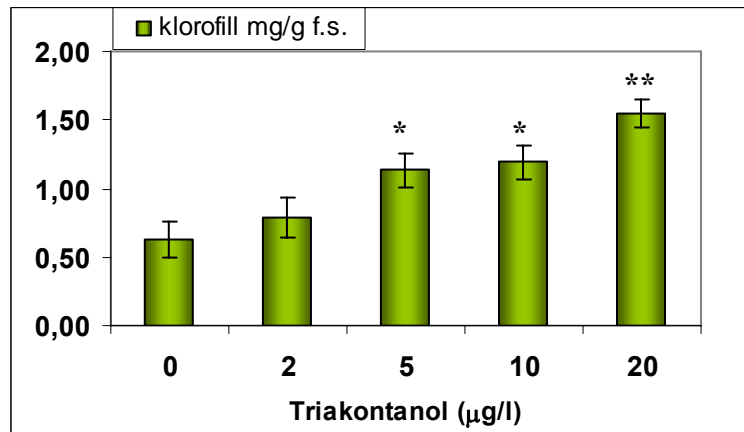
A málnával végzett szaporítási kísérletek során szinte minden vizsgált tulajdonságra nézve tapasztaltuk a triakontanol pozitív hatásait. A szaporítási ráta szignifikánsan megnőtt, a kontroll 4,22 db-hoz képest a 20 µg-os koncentráció átlagosan 7,84 hajtást eredményezett explantatumonként (25. ábra). A hajtáshossz a darabszám növekedésével gyakorlatilag nem változott, ugyanakkor a náduszok száma növekedett, ami azt eredményezte, hogy a triakontanollal kiegészített táptalajokon a kontrollhoz képest kompaktabb, tömörebb habitusúak növények fejlődtek.



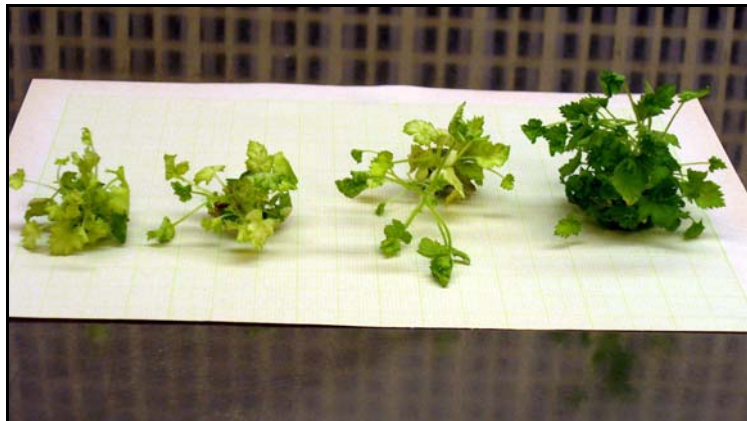
25. ábra. A triakontanol hatása a málna hajtásképződésére a szaporítási fázisban 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

A hajtáscsokrok friss tömege folyamatosan nőtt a triakontanol koncentráció emelkedésével párhuzamosan, a szárazanyag tartalom viszont az 5 µg-os kezelésben volt a legnagyobb (40 %). A magasabb TRIA koncentrációk hatása már csökkenő tendenciát mutatott, de a mért értékek még mindig meghaladták a kontrollét (13%).

A hajtások zöldülése a tenyészidőszak előrehaladtával szemmel látható volt, ezért megvizsgáltuk a levelek pigment tartalmát, hogy információt kapjunk a növények fotoszintetikus működéséről. Észlelésünket a műszeres mérések is megerősítették. A levelek klorofill tartalma folyamatos növekedést mutatott már a legalacsonyabb TRIA koncentrációtól kezdve, és az értékek szignifikánsan emelkedtek 5 µg/l-től a legmagasabb alkalmazott koncentrációig.



26. ábra. Málna levelek klorofill tartalmának (mg/g friss súly) alakulása TRIA hatására a szaporítási fázisban 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ )



27. ábra. Triakontanol tartalmú táptalajokon nevelt málna hajtáscsokrok képe 4 hetes szaporítási ciklus végén. A TRIA koncentrációi balról jobbra: 2 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 20 µg/l.

Hogy kiderítsük, a klorofill tartalom különbsége együtt járt-e a növények fotoszintetikus apparátusának hatékonyabb működésével, fluoreszcencia indukciós módszerrel megvizsgáltuk a növények fotoszintetikus aktivitását.

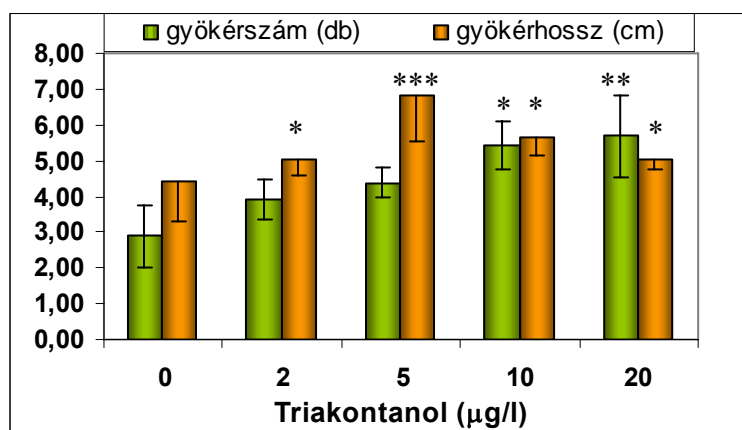
A klorofill fluoreszcencia indukciós kinetika értékei hasonló tendenciát mutattak, jelezve, hogy a fotoszintetikus apparátus működését lényegesen javította a triakontanol növekvő mennyisége. A

20 µg/l koncentráció mellett mért Fv/Fm érték (0.701) már közelít a stresszmentes környezetben mérhető alapértékhez, szemben a kontroll jóval alacsonyabb értékével (0,207).

3. táblázat. A TRIA hatása a klorofill fluoreszcencia indukciójára málna tenyészetekben 4 hetes szaporítási ciklus után /Fo = alapfluoreszcencia, Fm = maximális fluoreszcencia, Fv = változó fluoreszcencia/

	Fo (átlag±szórás)	Fm (átlag±szórás)	Fv (átlag±szórás)	Fv/Fm (átlag±szórás)
Kontroll	875 ± 101	1268±148	390±47	0,207±0,001
2 µg TRIA/l	1795±153,6	1890± 91,8	429±351	0,305±0,141
5 µg TRIA/l	1310±312	2005±916,4	696±165	0,378±0,130
10 µg TRIA/l	1784±603	3558±420,3	1774±548,5	0,499±0,165
20 µg TRIA/l	733±62,5	2450±47	1718±109,5	0,701±0,028

A gyökeresedési fázisban a triakontanolt a növekedésszabályzókat nem tartalmazó alaptáptalajhoz adtuk, hogy hatását önmagában vizsgálhassuk. A legtöbb gyöker fejlődését a 10 és 20 µg-os koncentráció idézte elő, ez utóbbinál a kontrollhoz (2,88) képest kétszeres (5,7) gyökérszámot regisztráltunk. A gyökerek átlagos hossza minden kezelésben megnövekedett, a legnagyobb mértékben az 5µg/l TRIA koncentrációnál, ahol 7,29 cm átlagos gyökér hosszúságot mértünk, szemben a kontroll növények gyökereinek 4,39 cm átlagos hosszával.

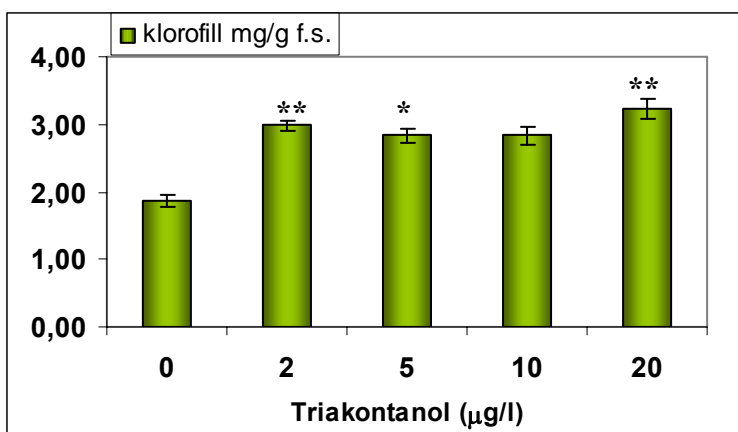


28. ábra. Triakontanol hatása a gyökeresedési paraméterek alakulására málna tenyészetekben 4 hetes gyökereztetési ciklus után (\* p > 0,05; \*\* p > 0,01; \*\*\* p > 0,005)



29. ábra. A gyökerek mennyiségének alakulása a TRIA koncentráció függvényében málna tenyészeteken 4 hetes gyökereztetési ciklus után (TRIA koncentrációk balról jobbra: felső sor= kontroll, 2 µg/l,; alsó sor= 5 µg/l, 10 µg/l, 20 µg/l)

A levelek klorofill tartalma a gyökeresedési fázisban is szignifikánsan megemelkedett már a legalacsonyabb triakontanol koncentráció hatására is, de a legmagasabb értéket a 20 µg/l koncentrációnál mértük.

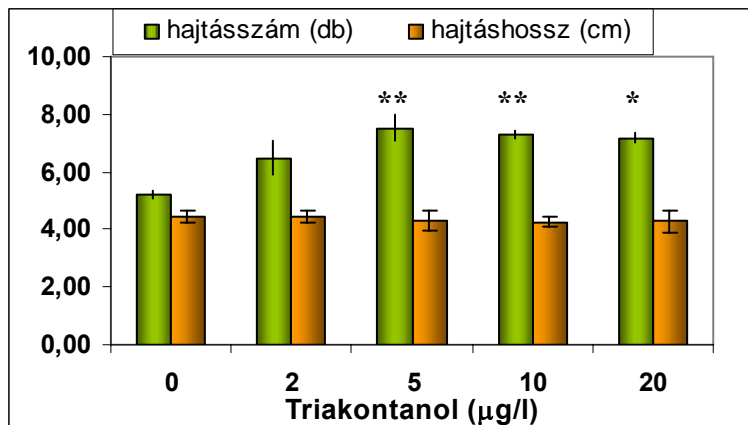


30. ábra. Málna levelek klorofill tartalmának (mg/g friss súly) alakulása triakontanol hatására a gyökeresedési fázisban 4 hetes tenyészciklus után (\* p > 0,05; \*\* p > 0,01)

#### 4.2.2. A triakontanol hatása gerbera (*Gerbera jamesonii*) tenyészetek szaporodására és gyökeresedésére

Gerbera esetében a TRIA hatása a szaporítási fázisban a hajtások számának növekedésében nyilvánult meg. A hajtásszám a növekvő koncentrációval párhuzamosan szignifikánsan emelkedő értéket mutatott, a legtöbb hajtás képződését (7,53 db egy hajtáscsoportban) az 5 µg/l TRIA eredményezte. Az ennél magasabb koncentrációkban enyhe csökkenés mutatkozott, de az átlagos

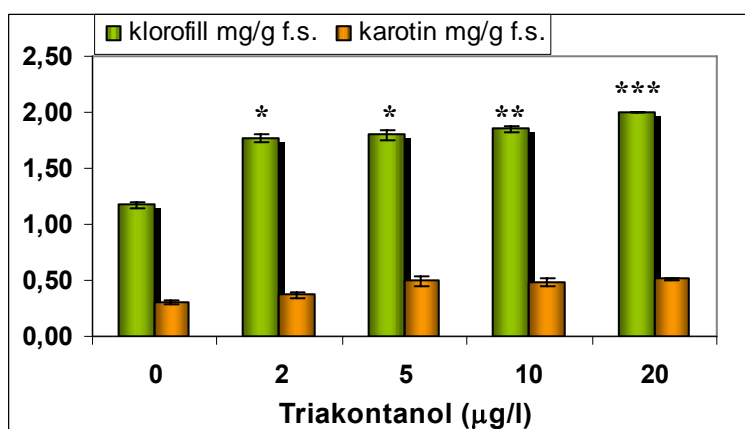
hajtásszám így is 7 fölötti érték maradt. A hajtások hossza gyakorlatilag nem változott egyik kezelésben sem.



31. ábra. A triakontanol hatása a hajtásképződésre gerbera tenyészetekben 4 hetes szaporítási ciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ )

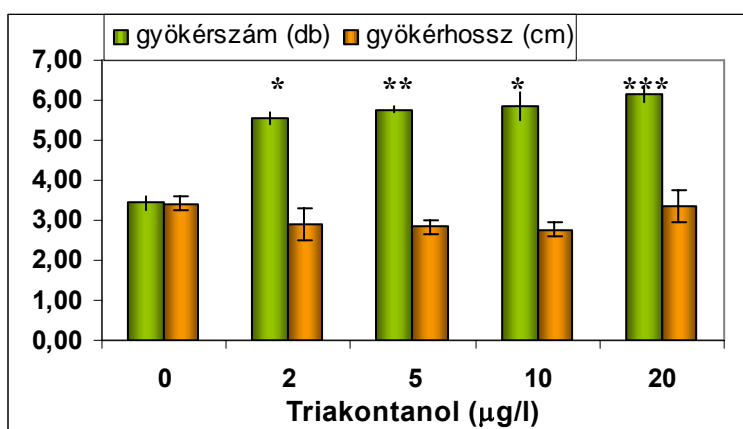
Nem találtunk számottevő különbséget a hajtások friss és száraz tömegében; a szárazanyag tartalom azonban, ha kis mértékben is, de folyamatosan emelkedett a koncentráció növekedésével párhuzamosan.

A levelek klorofill tartalmát már a 2 µg TRIA koncentráció is szignifikánsan megnövelte, és a magasabb koncentráció tartományban további kis mértékű növekedést regisztráltunk. A karotin tartalom mennyisége, kis mértékben szintén folyamatosan emelkedett a legmagasabb koncentrációig.



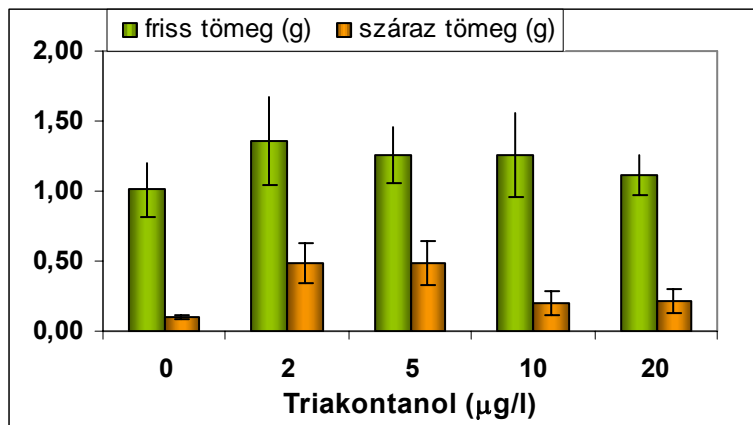
32. ábra. A triakontanol hatása gerbera levelek fotoszintetikus pigment tartalmára (mg/g friss súly) a szaporítási fázisban 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

Mivel ez a gerbera fajta kielégítően gyökeresedik hormon mentes közegen is, így lehetőség volt rá, hogy a TRIA hatását önmagában vizsgáljuk a gyökereztetési fázisban. A TRIA szignifikánsan megnövelte a gyökeresedési arányt, ezzel párhuzamosan csökkentette a gyökerek kifejlődéséhez szükséges időt. A növényenkénti gyökérszám csaknem kétszeresére nőtt már a 2 µg –os kezelésben, és a magasabb koncentrációknál további kis mértékű emelkedést tapasztaltunk. Az átlagos gyökérhossz lényegesen nem változott, szemmel látható volt azonban, hogy a gyökerek minden TRIA koncentráció mellett erősebbek, vastagabbak voltak a kontrollhoz képest.

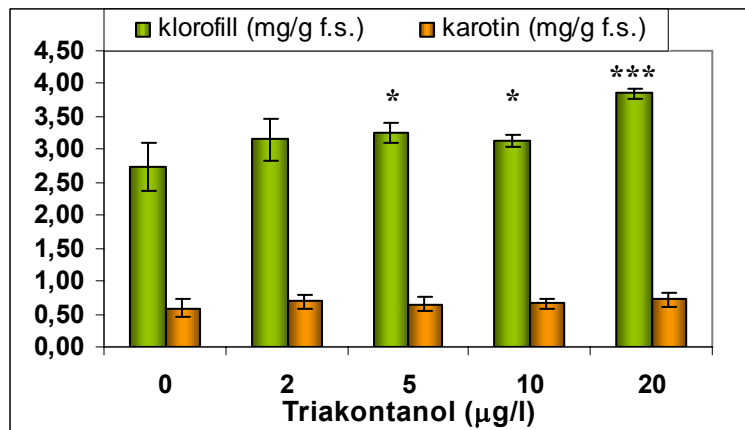


33. ábra. A triakontanol hatása a gerbera gyökeresedési paramétereinek alakulására 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

A hajtások hossza ezzel szemben minden kezelésben meghaladta a kontroll értékeket. A levelek száma gyakorlatilag nem változott az egyes kezeléseknél, a levelek területe azonban a koncentráció emelkedésével párhuzamosan valamelyest növekedett. Ezek a megfigyelések tükröződnek a tömeg adatok alakulásában is. Amikor külön-külön vizsgáltuk a hajtások és a gyökerek tömegadatainak alakulását, azt tapasztaltuk, hogy a kontrollt kivéve minden esetben a gyökerek szárazanyag tartalma volt a nagyobb, miközben a friss és száraztömeg értékek természetesen a lombzat esetében voltak magasabbak. (34. ábra). A levelek klorofill és karotin tartalma jelentős mértékben nem változott az egyes kezeléseknél (35. ábra).



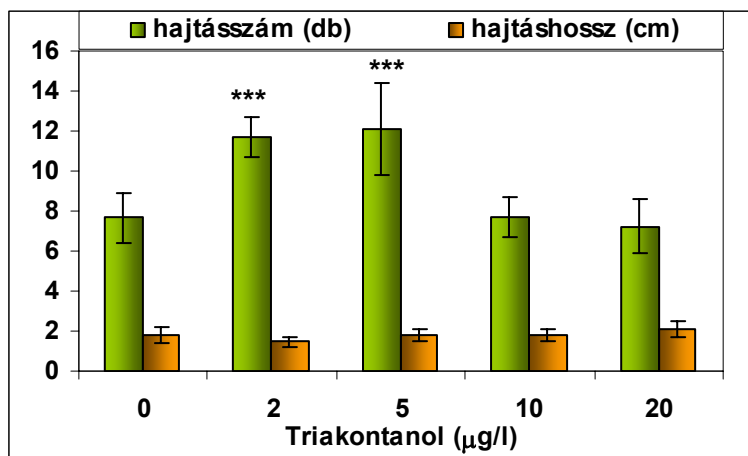
34. ábra. A gerbera növények friss és száraz tömegének változása triakontanol hatására a gyökeresedési fázisban 4 hetes tenyészciklus után



35. ábra. A gerbera levelek fotoszintetikus pigment tartalmának (mg/g friss súly) változásai a gyökeresedési fázisban a triakontanol hatására 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

#### 4.2.3. A triakontanol hatása a spárga (*Asparagus officinalis*) szaporodására és gyökeresedésére

Spárga esetében a két alacsonyabb triakontanol koncentráció serkentette a hajtásképződést, a 10 és 20 µg/l TRIA tartalmú táptalajokon viszont már nem szaporodtak jobban a növények, mint a kontroll táptalajon. A hajtások hosszát egyik kezelésben sem befolyásolta a triakontanol (36. ábra).



36. ábra. A triakontanol hatása a hajtásképződésre spárga tenyészetekben 4 hetes tenészciklus után (\*\*\*)  $p > 0,005$ ).

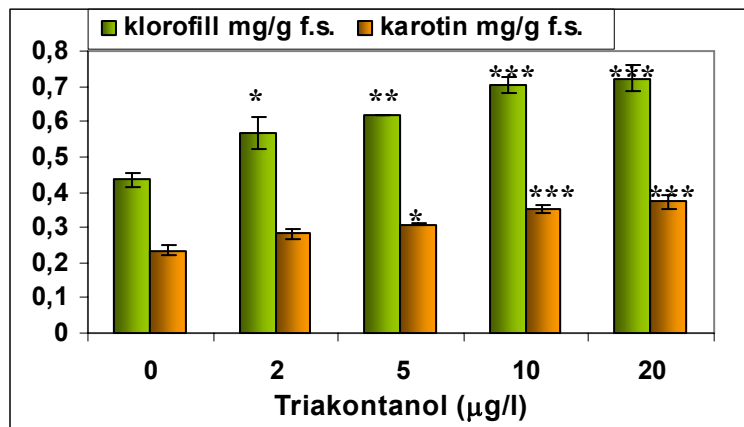


37. ábra. A hajtások mennyiségének alakulása spárga tenyészetekben TRIA hatására 4 hetes szaporítási ciklus után. (TRIA koncentrációk balról jobbra: kontroll, 2 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 20 µg/l)

Nem találtunk lényeges különbséget a növények friss tömegének értékeiben sem, annak ellenére, hogy a 2 és 5 µg TRIA/l-t tartalmazó táptalajokon a hajtások szemmel láthatóan erőteljesebbek, vastagabbak, húsosabbak voltak, mint a kontroll növények hajtásai.

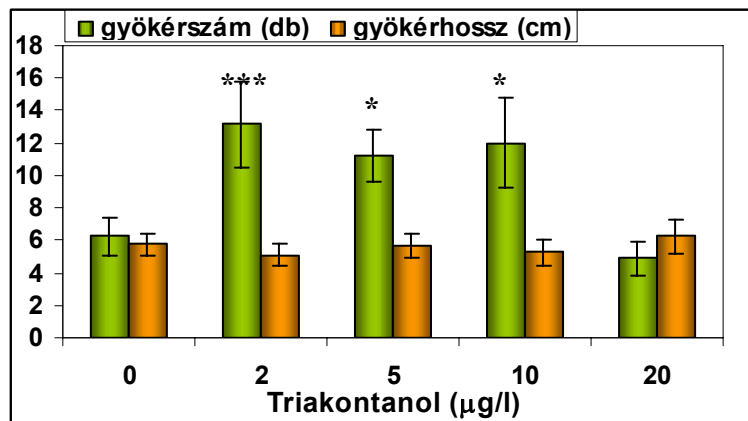
Érdekes, hogy míg a szaporodási ráta egyértelműen az alacsonyabb TRIA koncentrációk kedvezőbb hatását mutatta, addig a fotoszintetikus pigment tartalom a teljes vizsgált koncentrációban, bár kis mértékben, folyamatosan növekedett (38. ábra).





38. ábra. A triakontanol hatása a spárga hajtások pigment tartalmára (mg/g friss súly) a szaporítási szakaszban 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )

A TRIA a spárga esetében is serkentette a gyökeresedést. Mint a 39. ábrán látható, a legmagasabb koncentráció kivételével minden kezelésben lényegesen több gyökér képződött, mint a kontrollnál, de a gyökerek hossza nem változott.

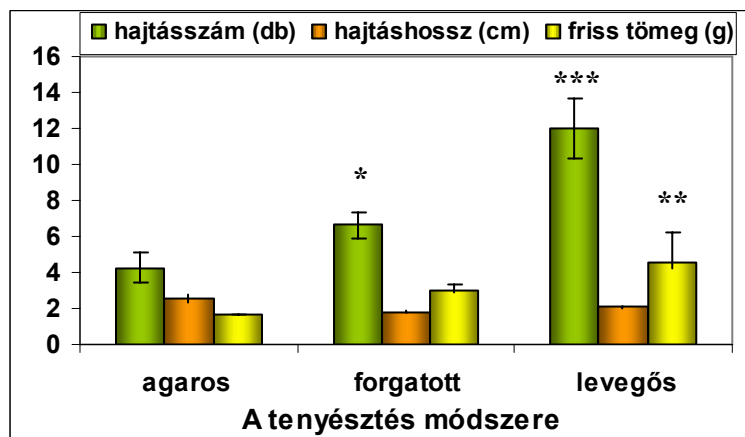


39. ábra. A triakontanol hatása a gyökeresedési paraméterek alakulására spárga tenyészetekben 4 hetes gyökereztetési ciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ ).

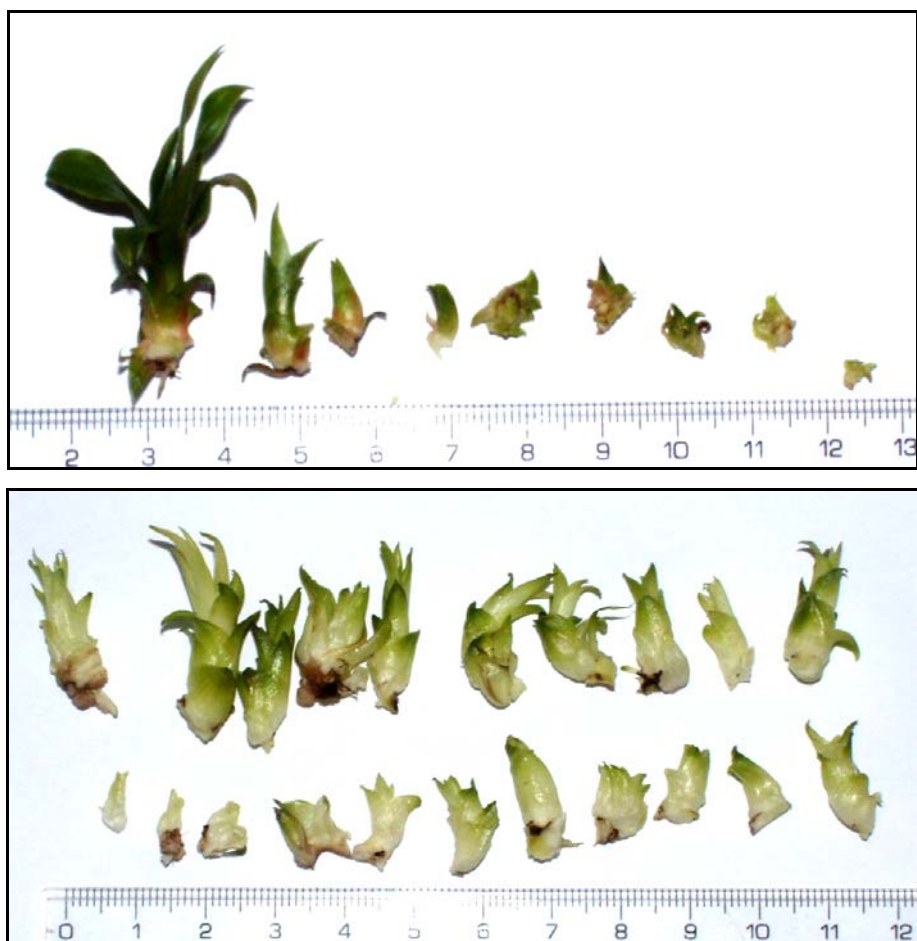
### 4.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer : egy új típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata a szaporítás folyamatában

#### 4.3.1. Kísérletek ananász (*Ananas comosus*) tenyészetekkel

A szaporodás mértéke jelentősen megnőtt a folyadékkultúrában. A levegőztetett reaktor hengerekben háromszor annyi hajtás fejlődött, mint a kontroll tenyészetekben. A hajtások hossza lényegében nem változott, a különbségek csak milliméterekben mérhetők. A zöldtömeg legnagyobb mértékű gyarapodása a levegőztetett tenyészetekben következett be, ezt követték az agaros kontroll végül a csak forgatott tenyészetek tömeg adatai (40. ábra). A szárazanyag tartalom értékei a friss tömeggel arányosan alakultak. A növények fotoszintetikus tulajdonságaiban lényeges változásokat nem okoztak a különböző nevelési körülmények. A klorofill tartalom közel azonos volt mindegyik kezelésben (1-1,2 mg/g friss súly) és az indukciós kinetika Fv/Fm értékei is minden esetben 0,8 körül alakultak.



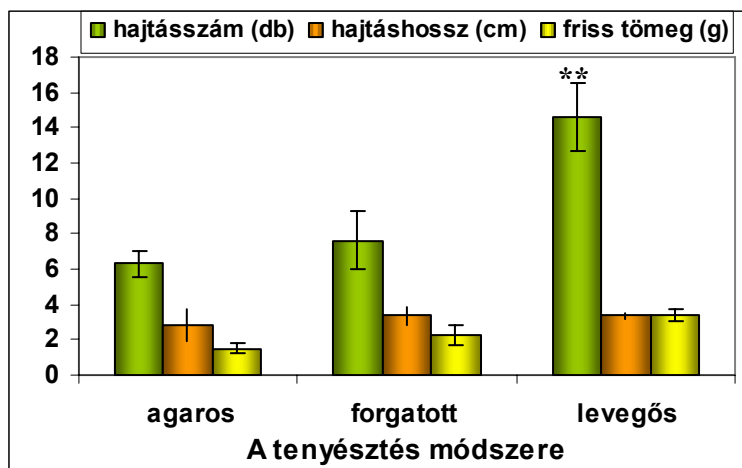
40. ábra. Ananász tenyészetek növekedési paramétereinek alakulása hagyományos és bioreaktoros nevelési körülmények között 4 hetes tenészciklus után (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )



41. ábra. Szilárd táptalajon (felső kép) és levegőztetett folyadékban (alsó kép) fejlődött hajtáscsokor hajtásszámainak alakulása 4 hetes tenyészciklus után.

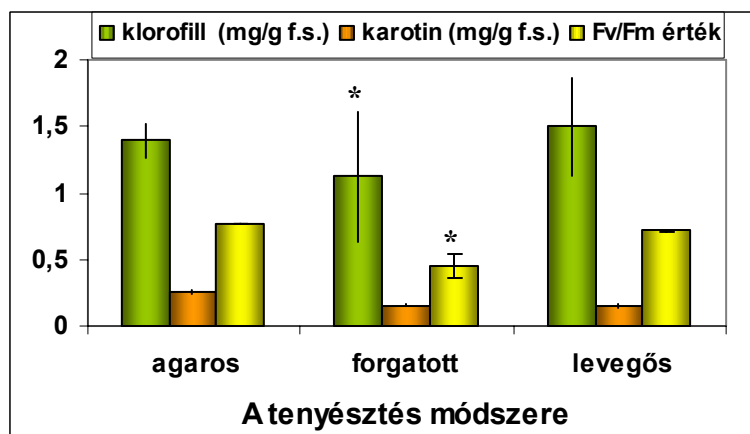
#### 4.3.2. Kísérletek *Hosta* tenyészetekkel

Az eredmények ennél a növénynél is azt igazolták, hogy a folyadékban történő nevelés pozitívan befolyásolja a növekedési paramétereket. Lényeges különbséget találtunk azonban a csak forgatott és a forgatott + levegőztetett hengerekben fejlődött tenyészetek élettani sajátosságai között. Az eredményeket a 42. ábrán összesítettük. Valószínű, hogy a szilárd közegen és a levegőztetett reaktor edényben megfelelő volt a légtér összetétele, míg a csak forgatott edényben, a növények össztömegéhez képest kevés volt a levegő ill. nem volt szellőzési lehetőség. Ez okozhatta, hogy itt gyakran hiperhidratáció lépett fel és az átlagos levélfelület is kisebb volt, mint a másik két kezelésben.



42. ábra. Növekedési paraméterek alakulása szaporodó *Hosta* tenyészetekben hagyományos és bioreaktoros nevelési körülmények között 4 hetes tenyészciklus után (\*\*  $p > 0,01$ )

Megfigyeléseinket a növények fotoszintetikus tulajdonságai is alátámasztották. Alacsonyabb klorofill tartalmat mértünk a csak forгатott tenyészetek leveleiben, mint akár az agaros, akár a levegőztetett tenyészetek leveleiben. Tekintettel arra, hogy a vizsgált fajta sárga-zöld tarka levelű, az értékek félrevezetőek is lehettek, ezért mértük a klorofill fluoreszcencia indukciót is. Az Fv/Fm értékek az agaros és a levegőztetett folyadék közeg esetében a normálhoz közeli értéket mutattak. 0,5 alá csökkent viszont az érték a csak forгатott henger növényei esetében, ami arra utal, hogy ebben a kezelésben a növények fotoszintetikus apparátusa gátlást szenvedett (43. ábra).



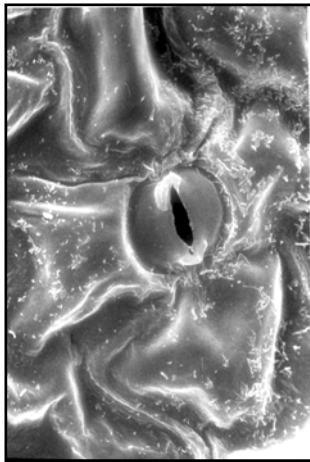
43. ábra. Fotoszintetikus jellemzők alakulása szaporodó *Hosta* tenyészetekben hagyományos és bioreaktoros nevelési körülmények között 4 hetes tenyészciklus után (\*  $p > 0,05$ )



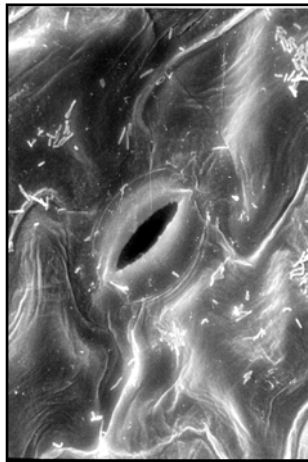
44. ábra. Agaros táptalajon (balról) és levegőztetett folyadékban (jobbról) fejlődött hajtáscsokrok hajtásszámának alakulása 4 hetes tenyészciklus után

A levelek anatómiai vizsgálata is megerősítette az elmondottakat. A hiperhidratáció tipikus jegeit – oszlopos parenchima hiánya, szivacsos mezofillum sejtek, nagy sztómák, vékony epidermisz réteg – figyelhettük meg a csak forgatott folyadék növényein, és bár jóval kisebb mértékben de esetenként a szilárd táptalajon fejlődött hajtások levelein is. Ezzel szemben a levegőztetett hengerekben fejlődött leveleken a vastagabb epidermisz; a működő sztómák, és a levélfelszíni viaszréteg kialakulására utaló felhalmozódások azt mutatják, hogy ezen növények szöveti képe igen közel áll az autotróf állapot szöveti képéhez.

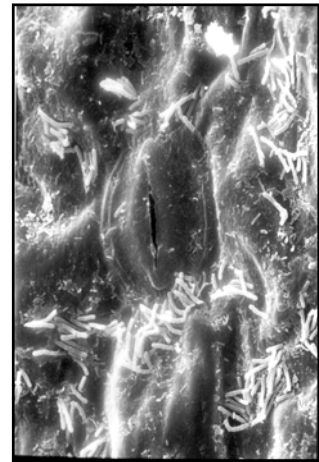
Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a légtér összetétele, a légcsere hiánya és nem a tápközeg folyékony állapota okozta a fent említett gátlásokat.



**a.**

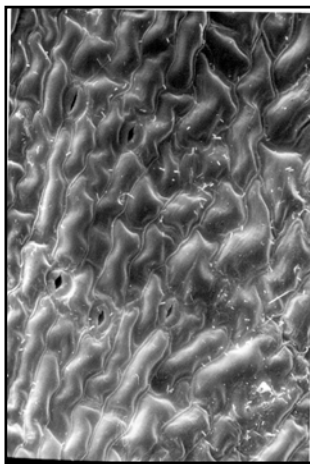


**b.**

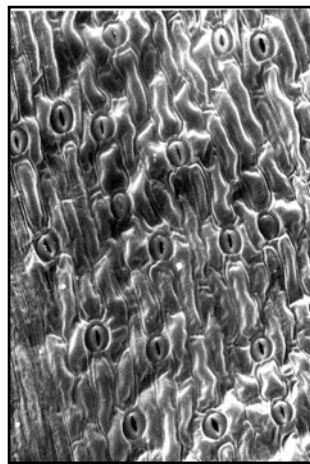


**c.**

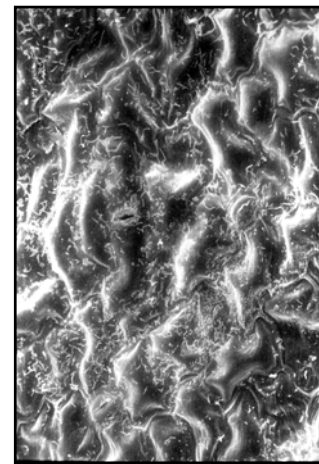
45. ábra. *Hosta* levelek alsó epidermiszén lévő sztómák képe (a = agaros táptalajon nyitott sztóma, b= forgatott folyadék, félig csukott sztóma, c= levegőztetett folyadék csukott sztóma körülötte viaszlemezkek). Nagyítás: 2000 x.



**a.**



**b.**

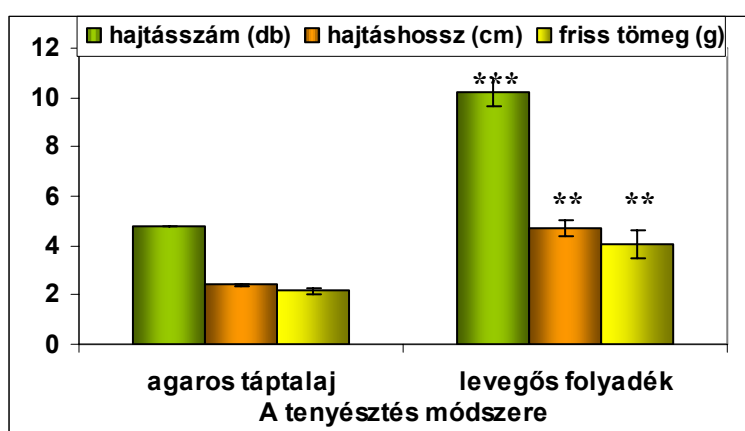


**c.**

46. ábra. *Hosta* levelek alsó epidermiszének képe (a= agaros táptalajon, b= forgatott hengerben, c= levegőztetett hengerben) folyadék kultúrában fejlődött hajtáson. Nagyítás 1000x.

### 4.3.3. Kísérletek banán (*Musa nana*) tenyészetekkel

Az előző növényekkel kapcsolatos tapasztalatok alapján a banán szaporítása során már csak a szilárd táptalaj és a levegőztetett folyadék hatásait hasonlítottuk össze. A folyadékos rendszerben történő tenyésztés egyértelműen a szaporodási ráta szignifikáns növekedését eredményezte, csaknem kétszeresére emelkedett a hajtások száma. Megnőtt a hajtások átlagos hossza és a levelek felülete is. Ezzel összhangban a folyadékban nevelt tenyészetek friss tömege meghaladta az agaros kontrollét, szárazanyag tartalma viszont kicsivel alatta maradt annak. Valószínű, hogy a tömegnövekedés oka a megnövekedett víztartalom, nem pedig a tápanyagok beépülése. A banánnal végzett kísérletek során mért növekedési paraméterek alakulása a 47. ábrán látható.



47. ábra. Szilárd táptalajon és levegőztetett folyadékban nevelt banán tenyészetek növekedési paramétereinek alakulása 4 hetes tenyésciklus után (\*\*  $p > 0,01$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ )



48. ábra. Banán tenyészetek a szaporítási fázisban, különböző fejlettségi állapotú hajtásokkal a levegőztetett reaktor modulban

A fotoszintetikus pigment koncentrációban nem találtunk számottevő eltérést, bár a bioreaktorban nevelt növényeken valamivel magasabb értékeket mértünk. A fotoszintézis aktivitás mérésének eredményeit és a levelek pigment tartalmának alakulását a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat. Szilárd táptalajon és folyadékkultúrában nevelt banán növények fotoszintetikus aktivitásának jellemző paraméterei

Nevelés módja	fotoszintézis	klorofill tartalom	karotin tartalom
	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$	mg/g fr. súly	mg/g fr. súly
szilárd táptalaj,	$-1,29 \pm 4,95 *$	$0,777 \pm 0,15$	$0,203 \pm 0,045$
bioreaktor, folyékony táptalaj	$2,59 \pm 2,14$	$0,889 \pm 1,11$	$0,213 \pm 0,054$

\* légzés

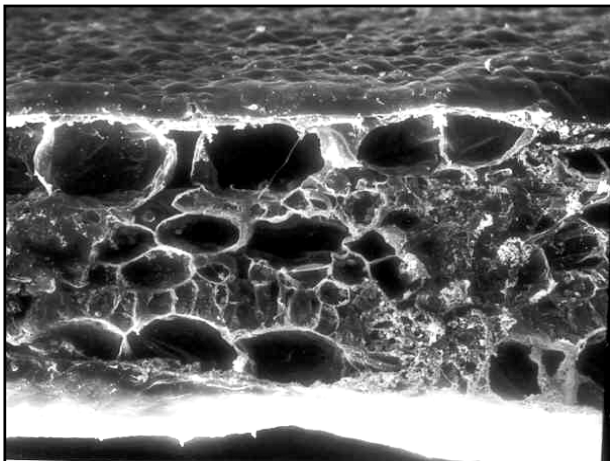
A fotoszintézis aktivitása a szilárd táptalajon nevelt növények esetében negatív érték volt, azaz a növények nem fotoszintetizáltak, de intenzíven lélegeztek. A folyadékban nevelt növények fotoszintézise már kialakult, az aktivitás értékek ugyan nem volt túl magasak, de a légzést felülmúlták. Minden esetben nagyon nagy volt a szórás, ami azt valószínűsíti, hogy az egyes növények fotoszintetikus aktivitása különböző, fejlettségi állapotuktól függően. Az agaros táptalajon nevelt növények között is volt olyan, amely mutatott gyenge fotoszintézist, ennek következménye a nagyon magas szóró érték.

A növények anatómiai vizsgálatának eredményei is a folyadékkultúra kedvező hatásait igazolták. A folyékony táptalajon fejlődött növények leveleinek anatómiai képén a vastagabb epidermisz réteget, a légcserenyílások funkcionálását és a kezdeti viaszlerakódások megjelenését láthatjuk. A szilárd táptalajon nőtt banán levelek epidermisz sejtsora vékonyabb, a légcserenyílások minden mintán zártak voltak és a viasz képződés sem indult meg. A levélnyel felépítését vizsgálva nem találtunk lényeges különbséget.



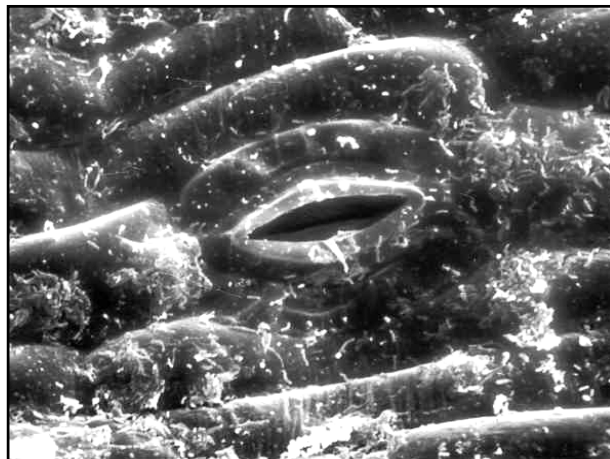


9. ábra. A reaktor modulban, levegőztetett folyadékban (balról) illetve agaros táptalajon (jobbról) fejlődött banán hajtáscsokrok képe 4 hetes szaporítási ciklus után



50. ábra. Levegőztetett folyadékban fejlődött banán levél keresztmetszetének képe. Látható a vastag epidermisz és a csökkent vastagságú mezofillum réteg

51. ábra. Levegőztetett folyadékban fejlődött banán levél fonákán lévő, félig csukott sztóma, körülötte viaszlemezekkel



#### 4.4. Új eredmények

- Bizonyítottuk a különböző citokininek –KIN, 2-iP, BAP- hajtásképződést befolyásoló hatását *Atropa belladonna* hajtástenyészetekben.
- Igazoltuk, hogy valamennyi vizsgált növényi rész képes hajtásindukcióra a megfelelő citokinin jelenlétében illetve, hogy a hajtásképződés mértéke a citokinin típusától és koncentrációjától függ.
- Bizonyítottuk a különböző citokininek -BAP, 2-iP, ZEA és TDZ - hajtásképződést befolyásoló hatását *Populus alba* hajtástenyészetekben.
- Igazoltuk, hogy a gyökér kivételével valamennyi vizsgált növényi rész képes hajtásindukcióra a megfelelő citokinin jelenlétében illetve, hogy a hajtásképződés mértéke a citokinin típusától és koncentrációjától függ.
- Elsőként mutattuk ki a triakontanol növekedésre és egyedfejlődésre, valamint fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatását gerbera tenyészetekben.
- Elsőként mutattuk ki a triakontanol növekedésre és egyedfejlődésre, valamint fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatását málna tenyészetekben.
- Elsőként mutattuk ki a triakontanol növekedésre és egyedfejlődésre, valamint fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatását egyszikű növényfajban, a spárgában.
- Sikeresen szaporítottunk különböző növényeket egy új típusú bioreaktor alkalmazásával.
- Bizonyítottuk, hogy a folyadék közeg kedvező hatása a tenyészetek szaporodására.
- Élettani mérésekkel alátámasztva megállapítottuk, hogy a tenyésztedény légterének összetétele, a megfelelő oxigénellátottság jelentős hatással van mind a szaporodás mértékére, mind pedig a növények fotoszintetikus képességének alakulására.
- Anatómiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a levegőztetett folyadékban fejlődő növények szöveti képe nagyon hasonló az autotróf állapotúnövényekéhez, így akklimatizálásuk is eredményesebb lehet.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

### 5.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

A hajtáscsúcsból indított tenyészeteiket széles körben alkalmazzák a különböző élettani és morfogenetikai vizsgálatok során. Emellett a leggyakrabban használt alapanyagai a kereskedelmi mikroszaporításnak is, mivel magas fokú genetikai stabilitást biztosítanak. A különböző citokininek hatására vonatkozó adatok is legnagyobb számban hajtástenyészetekben történő hajtásképződés vizsgálatából származnak. A kísérleti munkák többnyire annak tisztázására irányultak, hogy a vizsgált növényfajra melyik citokinin, milyen koncentrációban hat. Azt tapasztalták, hogy egy adott faj, vagy akár genotípus esetében nem mindegyik citokinin hatásos. A BAP elősegítette a hónaljtrügy proliferációt *Castanea* tenyészetekben, míg a zeatin csak kis mértékben, a kinetin pedig egyáltalán nem volt hatásos (Vieitez és Vieitez, 1980). *Prunus* esetén sem a kinetin, sem a 2iP nem indukált hajtásképződést, csak a BAP (Martinelli, 1985). Nem bizonyult hatékonynak a kinetin a BAP-pal ellentétben *Datura innoxiosa* hajtástenyészetekben sem (Dos Santos és mtsai, 1990). Kísérleteinkben *Atropa* hajtáscsúcs tenyészetekben sem idézett elő szaporodást a kinetin, a 2-iP és a BAP viszont igen. A BAP hatékony koncentráció tartománya 0,5 és 1 mg/l volt, a 2 mg/l-es kezelésben már csökkenő hajtásszámot eredményezett. Ezzel szemben a 2-iP a 2 mg/l koncentrációban fejtett ki kedvezőbb hatást. Eredményeinkkel összevethető irodalmi utalást *Atropa belladonna* mikroszaporítására vonatkozóan nem találtunk, mivel az *in vitro* kultúrák általában a hatóanyag tartalom vizsgálatának objektumai. A táptalaj hormon összetételének a tenyészetek alkaloid tartalmára gyakorolt hatását vizsgálták Benjamin és mtsai. (1987). A megfigyelt morfogenetikai változásokkal kapcsolatban annyit jegyeztek meg, hogy a BAP 1-5 mg/l koncentráció tartományban "bőséges" hajtásképződést idézett elő, a 10 mg/l koncentráció azonban gátolta a növekedést. A kinetin nem volt hatással a hajtásképződésre, esetenként elősegítette a gyökeresedést ill. kalluszképződést. Zárate és mtsai. (1997) *Atropa baetica* hajtástenyészetekben 0,25-2 mg/l tartományban vizsgálták a BAP hatását. Azt tapasztalták, hogy az új hajtások száma az idő függvényében változik, a koncentráció kevésbé befolyásolja. 17 napos tenyészetekben az átlagos hajtásszám 2 körüli volt, 24 nap elteltével 2,8-3,4 között alakult, 31 nap után pedig 5,4-5,8 közötti értékeket mutatott.

Kísérleteinkben a *Populus alba* hajtáscsúcs tenyészetekben szintén a BAP bizonyult a hajtásindukciót elősegítő citokininnek. A legmagasabb hajtásszámot (3,9) a 0,25 mg/l koncentrációnál regisztráltuk, az ennél magasabb tartományban 2 alatt maradt az új hajtások száma. Hasonló tapasztalatot közöltek Welander és mtsai. (1989). *Populus wilsoniana* szaporítása során a BAP 0,1 mg/l koncentrációja 5 körüli hajtásszámot eredményezett, míg a 0,5 mg/l koncentráció mellett ez az érték átlagosan 2,7 volt. Rutledge és Douglas (1988) 4 különböző nyárfák klón

hajtástenyészeteiben vizsgálta a citokininek hatását a hajtásképződésre. Ők is a BAP-ot találták leghatékonyabbnak, 0,25 mg/l koncentrációnál három genotípus esetén 3, 4 ill. 5 db hajtást számoltak explantátumonként. A ZEA 1 mg/l koncentrációja egy genotípus esetében adott kiugró - 6 db hajtás/ explantátum - eredményt, de a másik két genotípus esetében is 2 ill. 3,5 db hajtás képződését indukálta. A 2-iP nem eredményezett hajtásképződést.

A megfelelő explantátum kiválasztása igen fontos, ha szomatikus szövetekből kiindulva kívánunk hajtásképződést indukálni. Bár néhány faj esetében különböző eredetű explantátumok azonos mértékben képesek járulékos hajtásindukcióra, általában azonban a különböző szervekből, ill. különböző szervek szöveteiből származó explantátumok morfogenetikus kapacitása eltérő (George, 1993). A növekedésszabályzókon azokon a koncentrációkon, amelyek előidéznek a morfogenezist, gyakran az explantátum méretétől és típusától függ (Jaisval és mtsai., 1984). A levelet ill. annak darbjait számos növényfaj - pl. *Begonia*, *Betula*, *Chrysanthemum*, *Fragaria*, *Malus*, *Saintpaulia* - esetén sikeresen használják járulékos hajtásindukcióra és ennek eredményeként szaporításra (George, 1993). *Atropa belladonna* esetében is használtak járulékos hajtásképződés előidőzésére levéldarabokat kiinduló anyagként, BAP tartalmú táptalajokon tenyésztve (Eapen és mtsai., 1978., Tóth és mtsai., 1991.). Ezekben a munkákban azonban sem a hajtások számára, sem a különböző koncentrációk hatására vonatkozó adatokat nem találtunk. Saját kísérleteink eredménye azt mutatja, hogy 1-2 mg/l BAP-ot tartalmazó táptalajokon a levéldarabok képesek hajtásindukcióra. *Populus* esetében ép vagy darabolt levélből történő hajtásindukcióra vonatkozó adatokat nem találtunk az irodalomban. Munkánk során bebizonyosodott, hogy a vizsgált *Populus alba* klón levéldarabjain is kiváltható a hajtásképződés. A folyamat előidőzésében a zeatin hatékonyabbnak bizonyult, mint a BAP. A legmagasabb hajtásszámokat a 0,5 mg/l zeatin tartalmú táptalajokon kaptuk. Park és Son (1988) vizsgálatai szerint is a zeatin volt a leghatékonyabb a regeneráció kiváltásában egy *P. nigra* X *P. maximoviczii* klón levéldarabjain. A hajtásszám szerinti csökkenő sorrendben a BAP, a kinetin, majd 2-iP következett. A hajtásindukció eredményességét a táptalaj összetétele mellett számos más tényező befolyásolhatja, többek között a növényi szerv polaritása. Welander (1988) almán végzett kísérleteiben a levél alapi részéből származó explantátumokon nagyobb mértékű volt a hajtásregeneráció, mint a csúcsi eredetűeken. *Citrus mitis* magoncok leveleinek alapi részén 3 hét után már látszottak a hajtások, míg a csúcsi részeken még 12 hét után is csak elvétve fordult elő hajtásindukció (Sim és mtsai., 1989). Tapasztalataink szerint *Atropa* esetében a polaritás nem játszott szerepet, bár a levél középső és váll részéből származó explantátumok kicsivel jobb regenerációs képet mutattak, mint a csúcsi eredetűek. A *Populus* levéldarabok regenerációs képessége a polaritás függvényében változott. A legtöbb hajtás a levélváll darabokon képződött, a legkevesebb a levélcúcsokon.

A levéldarabok orientációja, azaz a táptalajhoz viszonyított helyzete szintén hatással lehet a morfogenezisre. Egy számoça fajta levéldarabjain több járulékos hajtás fejlődött, ha a levél színe érintkezett a táptalajjal, mint fordított esetben (Nehra és mtsai., 1988). Welander (1988) is hasonló eredményre jutott almánál. Kísérleteinkben az *Atropa belladonna* levéldarabjain képződött új hajtások számát nem befolyásolta az orientáció. *Populus* levéldarabok esetében nem vizsgáltuk az orientáció hatását. Érdeemes azonban megemlíteni Park és Son (1988) eredményeit, melyek szerint lényegesen nagyobb mértékű volt a hajtásindukció a színükkel a táptalajra fektetett levéldarabokon. Az ellentmondó megfigyelések arra utalnak, hogy a genotípusnak, és a növényi rész tápanyagtartalmának valamint endogén hormon tartalmának is lényeges szerepe lehet a folyamatban.

A különböző eredetű explantátumok kissé eltérő regenerációs képessége a polaritás mellett részben a sebzés hatásával magyarázható. A hajtásregeneráció többnyire a sebzési felületeken következik be (George, 1993.). Saját megfigyeléseink is ezt mutatták. A levelek csúcsi részeinek csak egyik oldala volt sebzett felület, míg a középső ill. váll részeken mindkét párhuzamos oldal, ahogy a levéllemezt feldaraboltuk. Talán ezzel magyarázható, hogy a középső ill. váll részeken valamivel több hajtás képződött. Levélnyel darabokból történő hajtásregenerációról számoltak be *Saintpaulia ionantha* esetén (Bilkey és mtsai., 1988), ill. cukorrépa esetén (Ritchie és mtsai., 1989). Mindkét növény jó morfogenetikus kapacitással rendelkezik, ezért 0,5-1 mg/l BAP már nagy mértékű hajtásképződést eredményezett. *Atropa* levélnyel darabok esetében is előidézte a BAP a hajtásképződést, de a koncentrációk hatásában nem találtunk egyértelmű különbséget.

Nyárfa gyökér darabokon egyik citokinin alkalmazásával sem sikerült regenerációt elérni. Az *Atropa* gyökerek viszont citokinin nélkül is képesek járulékos hajtásregenerációra, bár citokinin jelenlétében több hajtás képződik. Ez megegyezik George (1993) azon megfogalmazásával, mely szerint a citokinin jelenléte előnyösen befolyásolja a gyökérből induló morfogenetikus folyamatokat. Úgy tűnik, a rügydifferenciálódás sötétben is megindul, a hajtásfejlődés azonban csak fényen történik meg. Ezt a megfigyelésünket támasztják alá azok az irodalmi adatok, melyek szerint a járulékos hajtásképződés sötétben is bekövetkezhet, de rendszerint nagyobb mértékű fényen (Nehra és mtsai., 1987; Pierik., 1987).

Külön ki kell emelni a TDZ hatását. Huetteman és Preece (1993) megfigyelései szerint a TDZ hatása sok esetben rendellenes hajtásfejlődésben nyilvánul meg. A nyárfa explantátumok vizsgálata során egyértelműen bebizonyosodott, hogy a regeneráció megindításában nagyon kedvező hatású, a hajtások kifejlődését, vagy a hajtástengely megnyúlását viszont már gátolja. Célszerű ezért a hajtáskezdemények megjelenését követően alacsonyabb koncentrációjú, vagy másik citokinint tartalmazó, esetleg hormon mentes közegre helyezni a növényeket, annak érdekében, hogy a hajtások kifejlődhessenek és továbbnevelésre alkalmassá váljanak

## 5.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a triakontanol hatékonynak bizonyult a jelenleg vizsgált növények mikroszaporítási folyamatában is. Tapasztalatainkat összevetve korábbi munkáinkkal illetve más szerzők megfigyeléseivel megállapítható, hogy a triakontanol hatásai *in vitro* körülmények között növényfajonként eltérőek. Hormon kölcsönhatás nélkül, önmagában alkalmazva minden vizsgált növényfaj- és fajta esetében elősegítette a növények gyökeresedését. A gyökérszámot jelentősen megnövelte már a legalacsonyabb vizsgált koncentrációban is. Málna és gerbera esetén az értékek folyamatosan emelkedtek tovább és a maximumot a 20 µg TRIA koncentrációnál érték el. Korábbi kísérleteinkben hasonló eredményt kaptunk a JTE alma fajtavál is. Ezzel szemben a spárga tenyészetekben a legtöbb gyökér – a kontrollhoz képest több, mint kétszeres mennyiségű – a 2 µg/l koncentrációnál képződött és a magasabb tartományban már fokozatos csökkenést figyelhettünk meg. Korábbi munkánkban citromfű és egy meggy alany esetében is ezt tapasztaltuk (Tantos és mtsai, 1999, 2001). Hasonló eredményt kaptak Fraternalé és mtsai (2002; 2003) *Bupleurum* és *Thymus* növényekkel végzett gyökereztetési kísérletekben. Mindkét növény számára a 2 µg/l TRIA volt optimális, a magasabb koncentrációk már gátlónak tűntek. A gyökerek hossza általában nem változott jelentősen, vagy legalább is nem volt összefüggésben a TRIA koncentráció emelkedésével.

Annak ellenére, hogy a TRIA önmagában elsősorban a gyökerezedést serkentette, a vizsgált növények többségénél különböző citokininekkal kombinálva igen nagy mértékben elősegítette a hajtásképződést, és az adatok tanúsága szerint elsősorban a szaporodásra volt hatással, nem a hajtások megnyúlásos növekedésére. Málna esetében az új hajtások száma folyamatosan nőtt és a maximumot a 20 µg-os kezelésben érte el. Fraternalé és mtsai (2003) ugyanezt tapasztalták *Thymus mastichina* szaporítása során. Gerberánál a legmagasabb hajtásszámot az 5 µg/l koncentráció eredményezte. Az ennél magasabb koncentráció tartományban a hajtásképződés mértékének enyhe csökkenése következett be, de a hajtások száma még mindig magasabb volt, mint akár a kontroll akár a 2 µg/l-es kezelés hajtáscsokeiben. A JTE alma alany szaporítása során a 10 µg/l TRIA bizonyult a leghatékonyabbnak, az ennél magasabb ill. alacsonyabb koncentrációk kevesebb hajtás képződését eredményezték. Spárga esetében valamint citromfűnél és meggyénél a triakontanol a 2-5 µg/l koncentráció tartományban serkentette a hajtásképződést, az ennél magasabb koncentrációknak nem volt hatása. Reddy és mtsai (2003) vizsgálatai szerint a *Capsicum frutescens* és a *Decalepis hamiltonii* esetében is az alacsonyabb koncentráció tartomány eredményezte a jobb szaporodást. Az a tény, hogy a TRIA más-más koncentrációban volt hatékony a különböző növények esetében, magyarázható a genotípus hatással, a tenyészetek eltérő endogén hormon tartalmával illetve az alkalmazott táptalajok eltérő hormon tartalmával. Azokban a kísérletekben (Tantos, 2001),

amelyekben két, különböző BAP tartalmú szaporító táptalajhoz adtuk a triakontanolt, minden esetben a magasabb BAP koncentráció mellett figyeltük meg a triakontanol kedvező hatását. Ez arra utal, hogy a szaporodási rátát a citokinin koncentráció emelte elsősorban. Az alacsony TRIA koncentrációk valószínűleg azért lehetnek hatékonyak, mert az explantátumok már az extrém alacsony mennyiségre is érzékenyen reagálnak (Biernbaum et al. 1988). Vagy a TRIA vagy a bomlástermékei vagy egy másodlagos messenger az ami gyorsan mozog a növényben és befolyásolja a szénhidrát metabolizmussal kapcsolatos enzimeket (Ries és Houtz, 1983) és a növekedési folyamatokat (Ries és Wert, 1977)

A korábban leírtakhoz hasonlóan (Sharma, 1995; Shukla et al., 1992; Srivastava és Sharma, 1991; Bhattacharya és Rao, 1996; Kumaravelu et al., 2000) egyértelműen kimutatható volt a növények friss tömegére, fotoszintetikus teljesítményére és általános produkciójára gyakorolt kedvező hatása. A szaporítási fázisban a TRIA koncentráció növekedésével párhuzamosan a klorofill tartalom folyamatos emelkedését tapasztaltuk mindhárom vizsgált növény esetében. Ugyanezt figyelték meg Reddy és mtsai (2003) a *Decalepis hamiltonii* esetében is.

A gyökereztetési fázisban már a legalacsonyabb TRIA koncentráció is megnövelte a klorofill tartalmat és az értékek gyakorlatilag nem nőttek tovább a magasabb koncentráció tartományban. A fotoszintetikus apparátus működésére gyakorolt hatása nem volt ennyire egyértelmű, csupán azokban az esetekben volt mérhető különbség, ahol a kontroll növények fotoszintézise valami miatt nem működött teljes hatékonysággal. A gerbera esetében, ahol a kontroll növények is jól működő fotoszintetikus apparátussal rendelkeztek, a TRIA nem tudott emelkedést elérni a hatékonyságban. Ezzel szemben a 'Malling Exploit' málna fajtánál, ahol a kontroll növények csökkent fotoszintetikus aktivitást mutattak, a triakontanollal kiegészített táptalajon nevelkedett növények fotoszintetikus aktivitása közelítette a normál értékeket. Ebből az a következtetést lehet levonni, hogy habár a TRIA nem képes a fotoszintetikus működés serkentésére, megóvhatja azt néhány károsító tényezővel szemben. Ez összhangban áll más kutatók által leírt eredményekkel (Shripathi és Swamy, 1994; Rajasekaran és Blake, 1999) és fontos tényező lehet, hiszen a mikroszaporított növények igen gyakran sérült fotoszintetikus apparátussal rendelkeznek, ami jelentősen megnehezíti az akklimatizációjukat. Ha a TRIA képes a fotoszintetikus működés megvédésére a károsító tényezőkkel szemben, akkor a mikroszaporított növények életképességét jelentős mértékben megnövelheti.

Tapasztalataink alapján a triakontanolt további kipróbálásra és felhasználásra ajánlhatjuk a mikroszaporított növények szélesebb körében. Különösen indokolt lehet a használata a nehezen szaporítható növényeknél, vagy olyan esetekben amikor a fotoszintetikus apparátus gátlását okozzák a nevelési körülmények. Ugyancsak érdemes lenne kipróbálni a fotoautotróf tenyésztési rendszerekben is.

### **5.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egyúj típusú bioreaktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata a szaporítás folyamatában**

Ennek a kísérletnek egyik fontos célja volt az újonnan kifejlesztett, folyadék alapú tenyésztést biztosító bioreaktor tesztelése. Ez a berendezés eltér a jelenleg használatos, időszakos bemeztetés elvén működő rendszerektől, mivel itt nem a folyadék szint mozog, hanem az explantátumok emelkednek-süllyednek, a reaktor henger mozgatása során. (Fári és mtsai., 2003.) A kezdeti problémák kiküszöbölése után a kísérleti eredmények egyértelműen igazolták, hogy a berendezés alkalmas akár kísérleti, akár nagyüzemi mennyiségű szaporítóanyag előállítására és versenyképes a jelenleg ismert TIS alapon működő rendszerekkel.

Célként tűztük ki továbbá annak vizsgálatát, hogy a bioreaktorban fejlődő növények mennyiben térnek el a hagyományos mikroszaporításból származó egyedektől. Igazolni kívántuk, hogy az általunk alkalmazott rendszerben a folyadék alapú tenyésztés nem rontja a növények minőségét és túlélési esélyét. Korábbi mikroszaporítási tapasztalataink szerint mind az ananász mind a banán jól szaporítható álló folyadék tenyészetben, de a folyadék borítottság mértéke jelentősen befolyásolja a módszer eredményességét. Azokban az esetekben, amikor a folyadék teljesen ellepte a növényeket, a szaporodás mértéke csökkent, hiperhidricitás lépett fel. A legjobb eredményt akkor kaptuk, amikor a folyadék csak vékony rétegben borította az edény alját, úgy, hogy csak a hajtások teljes hosszának 1/3-ad része állt benne (Mészáros, 1986, Mészáros és Molnár, 1988).

Jelen kísérleti munkánk során is bebizonyosodott, hogy az eltérő nevelési körülmények lényegesen befolyásolják a tenyészetek fejlődését és a növények minőségét. A legmagasabb szaporodási rátát és a legjobb minőségű hajtásokat minden növény esetében a levegőztetett folyadékokban történő tenyésztés során nyertük. Eredményeink párhuzamba állíthatók a vizsgált növényekkel kapcsolatban megjelent közleményekkel.

Tapasztalataink szerint ananász esetében a szaporodási ráta csaknem megháromszorozódott a levegőztetett hengerekben, az agaros kontrollhoz képest. Ennek megfelelően a friss tömeg növekedése is itt volt a legnagyobb mértékű. Nagyon hasonló eredményekről számoltak be Escalona és mtsai (1999). Három különböző tenyésztési módszert (szilárd táptalaj, folyadék kultúra és időleges elárasztás) hasonlítottak össze. Táptalajként az MS közeget használták 2,1 mg/l BAP + 0,3 mg/l NES kiegészítéssel. Az időleges elárasztásos módszerrel tenyésztett növények mutatták a legnagyobb szaporítási fokot, a másik két módszerhez viszonyítva 300 % -kal (folyadék kultúra) illetve 400 % -kal (szilárd táptalaj) növekedett ez az érték. A friss tömeg adatok is ilyen mértékben növekedtek, ugyanakkor a szárazanyag tartalomban nem volt különbség a kétféle folyadékos kezelés adatai között, ugyanúgy, mint ahogy a mi eredményeink is mutatták. Ez talán magyarázható azzal, hogy a TIS rendszerben szaporodott ananász növények levelei kisebbek voltak, mint a



folyadékban szaporodottaké. Az így előállított növények egyéb minőségi paraméterei is jobbak voltak. Escalona és mtsai (2003) vizsgálta a növények fotoszintetikus kapacitását, és hozzánk hasonlóan azt tapasztalta, hogy sem a klorofill tartalom, sem az indukciós kinetika értékei nem különböztek az agaros nevelés illetve időszakos elárasztás körülményei között. A szerzők egyenes összefüggés találtak a tápközeg mennyisége és a szaporodás mértéke között. A tenyészetenkénti optimális mennyiséget 200 ml-ben határozták meg. Mind az ennél kevesebb, mind a több közeg a proliferációs ráta csökkenését eredményezte. Tapasztalataik szerint az elérhető hajtásszám tekintetében a tenyészciklus optimális hossza 7 hét, de az edény mérete miatt ekkor már összezsúfolódnak és etiolálódnak a hajtások.

Dey (2005) Growtek bioreaktorban - mely egy műanyag doboz és benne egy lebegő és forgó perforált támaszték - mind álló mind rázógépen rázatott üzemmódban 0,6 mg/l BAP +0,2 mg/l NES tartalmú közegen tenyésztette a Queen ananász fajtát. Saját találmányát a Life Guard rendszerrel összehasonlítva majdnem háromszor (Life Guard) illetve huszonegyszer (rázatva huszonháromszor) annyi hajtást nyert, mint amennyi az agaros táptalajt tartalmazó üvegedényben fejlődött.

Firoozabady és Gutterson (2003) ugyanazt a tenyészedényt, egy 10 l térfogatú befőttes üveget használták különböző „üzemmódokban”. Amikor az üveg függőlegesen állt, a tenyészetek bemerültek a folyadékba és a levegőt a folyadékba vezették be. Ekkor a hajtások 80 %-a nekrotikussá vált és a szaporodási ráta is jelentősen csökkent mind a szilárd táptalajon nőtt, mind az időlegesen elárasztott tenyészetekhez képest. Tekintettel arra, hogy a legegészségesebb hajtások az edényben a folyadék tetején fejlődtek, egyértelművé vált, hogy az állandó folyadék borítottság okozta az említett tüneteket. Amikor az üveget az oldalára fektették és időnként megfordították, a hajtások minősége lényegesen javult, de a szaporodás mértéke nem volt kielégítő. Legjobbnak bizonyult a periodikus elárasztás, amikor a tápfolyadékot egy másik, ugyanolyan edényből átpumpálták a tenyészetekre, majd egy idő után visszaengedték. Ez az elrendezés az „iker-palack” vagy PIB vagy TIB (elnevezés kérdése) rendszer, amit Escalona és munkacsoportja (1999) is alkalmazott. Az eredmények szerint ebben a kezelésben jelentősen nőtt a szaporodási ráta és a hajtások egészségesek, élénk zöld színűek voltak az egész idő alatt. Mindegyik leírt folyamat megegyezik abban -és mi is ezt figyeltük meg- hogy a proliferáció során létrejött hajtáscsokor majdnem gömb alakú és a hajtások egy központi régió körül képződnek. Az említett szerzők tapasztalatai szerint a 6 cm-nél hosszabb hajtások közvetlenül kiültethetők az üvegházba, a kicsinek minősülő, 2-4 cm körüliek azonban még további nevelést igényelnek. Firoozabady és Gutterson (2003) szétvágták a hajtáscsokrokat és a hajtásokat egyenként gyökerezettették, vékony folyadék rétegben tálcán vagy dobozban, steril körülmények között. Escalona és mtsai (1999) két lépésben készítették elő az akklimatizálást: először gibberellin hozzáadásával megnyújtották a hajtásokat, majd indukálták a gyökeresedést, de a leírásból nem derül ki hogy egyenként vagy csoportosan

kezelték a hajtásokat. Az időleges v. periodikus elárasztás elvén működő reaktorok alkalmasak arra, hogy egy tápfolyadék cserével, a hajtáscsokrok szétvágása nélkül, egy lépésben indukálni lehessen a gyökeresedést és hajtásmegnyúlást.

A banán szaporítására irányuló kísérletek során is bizonyítást nyert, hogy a folyadék alapú tenyészet típusa nagy mértékben befolyásolja az explantátumok fejlődését. Alvard és mtsai (1993) immár úttörőnek minősülő kísérleteikben a Nalgene cég autoklávozható szűrő egységeit használták reaktor edényként. 20 napos tenyészidő után a három kísérleti csoportban különböző szaporodási rátákat mértek. Az álló folyadék közegben és a cellulóz hordozó anyagon a tenyészetek csak kis mértékben vagy egyáltalán nem szaporodtak, a szilárd közegen, a részleges bemártású és a levegőztetett kezelésben 2,2-3,1 közötti szaporodási rátákat regisztráltak. Az időszakos elárasztás eredményezte a legmagasabb (5,2) hajtásszámot. A folyadékba merülő hajtásokra nekrotikus foltok megjelenése és a levelek hiánya - pontosabban ki nem fejlődése - volt jellemző. Néhány apró levél jelent meg a folyadékba merülő cellulóz hordozón rögzített hajtásokon, a levegőztetett folyadékban fejlődő és az időszakosan elárasztott hajtásokon a levelek kifejlődése normálisan alakult. A buborékosan levegőztetett folyadékban fejlődött növények között sok vizesedő, törékeny példányt találtak. Ezek a növekedésbeli különbségek arra utaltak, hogy az oxigén hiánya a fő gátló tényező. A szerzők elsőként alkalmazták az időszakos elárasztás elvén működő szaporítási módszert, ami biztosítja szövetek oxigén ellátását a folyadékkal való meghatározott időtartamú érintkezés kedvező hatásaival kombinálva.

A tenyésztés módszere (a tenyészet típusa) mellett a közeg mennyisége banán esetében is befolyásolta a biomassza képződését. Ziv (2002) összefoglalója szerint 250 ml-es Erlenmeyer lombikban, 50 ml közegen 5,6 hajtást regisztráltak csomónként, műanyag reaktor modulokban 2500 ml folyadékban ez az érték 15,1 volt. Ennek megfelelően változott a növények friss tömege is. Roels és mtsai (2005) munkájában a legmagasabb szaporodási rátát a 30 ml közeg/inokulum eredményezte.

Saját kísérleteink egyelőre nem terjedtek ki az ilyen irányú összefüggések vizsgálatára, az azonban bebizonyosodott, hogy a levegőztetett bioreaktor hengerben kétszeres mennyiségű hajtás fejlődött a szilárd táptalajhoz viszonyítva, és a növények élettani paraméterei is kedvezőbben alakultak. Mind a fotoszintetikus rendszer működésének adatai mind pedig a növények anatómiai vizsgálata igazolta az autotróf életmódra való áttérést a levegőztetett időszakos elárasztású tenyésztési eljárásban (Mészáros és mtsai, 2004b).

Az is egyértelművé vált, hogy a levegőztetett folyadékos tenyésztés megnöveli a banán levelek felületét és a levélgyekek hosszát. Roels és mtsai (2005) szintén ezt tapasztalták. Feltehetően a többi szerző is, hasonló eredményre jutott, ezért kezdték vizsgálni különböző növekedésgátló anyagok alkalmazásának hatását (Ziv, 1998; Escalona, 1999). Az ancimidol és a paclobutrazol egyaránt

alkalmasnak látszik a hajtások méretének csökkentésére, anélkül, hogy a szaporodási rátát befolyásolná. A kezelés után a növények hormon mentes közegben 3-4 hét alatt megnyúlnak, meggyökeresednek és normálisan akklimatizálhatók. A miniatürizálás eredményeként növelhető az edényenkénti inokulum szám, így a kihozatali arány is, ami tömeges szaporítás esetén fontos költségcsökkentő tényező lehet.

*Hosta* esetében nem rendelkezünk előzetes pozitív tapasztalatokkal a folyadék közeg hatásait tekintve, ezért a kísérletek első fázisaként a szokásosan használt bébiételes üvegben kipróbáltuk a felöntéses módszert és a vékony filmréteg alkalmazását. A szaporodási adatokat nem regisztráltuk, de a folyadék káros hatásait nem tapasztaltuk. A reaktoros kísérletekben egyértelműen bebizonyosodott hogy a *Hosta* növények jóval érzékenyebbek az oxigén hiányra, mint a másik két vizsgált növény. A csak forgatott hengerekben ugyanis, bár a szaporodási ráta nem csökkent, a fotoszintetikus képességet jellemző paraméterek rosszabb értékeket mutattak, mint akár az agaros, akár a levegőztetett tenyészetek esetében. A levegős tenyészetekben kétszeresére nőtt a hajtások száma és ezzel párhuzamosan a friss tömeg is. A fotoszintetikus pigment tartalom és az indukciós kinetika mért adatai a szilárd tenyészetekéhez hasonlóan alakultak, a normális értékeket mutatva. Ezzel szemben a csak forgatott tenyészetekben mind a klorofill tartalom mind az indukciós kinetika alacsonyabb értékeket mutatott (Mészáros és mtsai, 2004a). Megfigyeléseinket az anatómiai vizsgálatok is megerősítették, csak a levegőztetett folyadékból származó növények mutatták az autotrófiára való áttérés jeleit. Ezek a funkcionális változások elengedhetetlen feltételei az akklimatizáció sikerének. Napjainkig egyedül Adelberg (2005) számolt be különböző *Hosta* fajták folyadékban történő tenyésztéséről. Az általuk kifejlesztett berendezés, melyet szabadalmaztattak is, a vékony rétegű folyadék és a rázatás előnyeit kombinálja. A tenyészeteket nagy szögletes edényekben nevelték, speciális rázó polcon. Az időnkénti mozgatás valamint a folyadék vékony rétege biztosította, hogy az inokulumok mozogni tudtak, nem ugyanabban a helyzetben merültek állandóan a folyadékba. Ez a tenyésztési mód minden esetben jobb szaporodást eredményezett, mint a szilárd közeg a bébiételes üvegekben.

Mindazon előnyök, amelyek a bioreaktorok alkalmazásának kiszélesítése mellett szólnak, az általunk vizsgált rendszerben is megnyilvánultak. A rendszer lehetővé teszi nagy tömegű növényanyag kis felületen történő elhelyezését. A növények folyamatos érintkezése a tápanyagokkal felgyorsítja a fejlődést és javítja a szaporítás hatásfokát. Ezzel egyidőben a légcsere, a folyamatos oxigén ellátottság kedvezően befolyásolja a növények fotoszintetikus tulajdonságait és szöveti felépítését, így a növények gyorsabban térnek át az autotróf életmódra és könnyebben akklimatizálhatók.

A kísérletek eddigi időszakában korlátozott számban álltak rendelkezésre a reaktor hengerek, ezért csak az alapvető vizsgálatokat végeztük el. A technológiák fejlesztése érdekében a

továbbiakban érdemes lenne figyelmet fordítani arra, hogy megállapíthassuk, az egyes növények esetében mennyi az az optimális folyadék mennyiség és elárasztási idő, ami a legjobb szaporodást és minőséget biztosítja. Szükséges lenne hosszú távon nyomon követni, hogy hány tenyészcikluson keresztül szaporítható a növényanyag anélkül, hogy a szaporodás mértéke csökkenni kezdene. A berendezés nagyüzemi hasznosításához biztosítani kell olyan vagy akkora steril munkateret, amely a továbbszaporítás során egyszerre teszi lehetővé a hengerek elhelyezését, a folyadékkal való feltöltést és a növényanyag manipulálását. Ez a jelenleg használatos lamináris boxokban nehézkes, és a szűk hely miatti esetleges fertőzésveszély is fennáll.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

### 6.1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

Az *in vitro* szaporítás során a megfelelő mennyiségű kiinduló anyag előállítása érdekében a hajtástenyészetek létrehozásához egyes esetekben szükséges felhasználni az anyanövény minden részét, kihasználni a levél vagy szár szövetek regenerációs képességét. A hajtásképződés folyamatát az adott genotípus sajátosságai mellett alapvetően az alkalmazott növekedésszabályozó anyagok, elsősorban a citokininek típusa és mennyisége befolyásolja.

Kísérleti munkánk egy lágyszárú - *Atropa belladonna* PN 06 jelű klónja - és egy fás növény - *Populus alba* 'Silver' típus - morfogenetikus képességének felderítésére irányult. Különböző citokininek hatását vizsgáltuk a hajtáscsúcsból, valamint levél-, levélnyél-internódium- és gyökérdarabokból történő hajtásindukció folyamatában.

A táptalajok *Atropa* hajtáscsúcs kultúrákban kinetint, 2iP-t és BAP-ot tartalmaztak, 0,5; 1,0 és 2,0 mg/l koncentrációban. A többi növényi rész esetében 1,0, 2,0, és 5,0 mg/l BAP-ot ill. 2, 5, és 10 mg/l KIN-t adtunk az alaptáptalajhoz, mindkét citokinin mellett 0,2 ill. 1,0 mg/l IES-sel. A gyökérdarabokból történő regenerációs kísérletekhez 0,5 mg/l NES-t ill. IES-t, valamint 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NES-t tartalmazó közegeket használtunk.

Eredményeink szerint az *Atropa belladonna* hajtáscsúcs tenyészeteiben a kinetin nem, de a BAP és a 2-iP egyaránt elősegítette a hajtásképződést, az előbbi 0,5-2 mg/l, az utóbbi 2 mg/l koncentrációban. A különböző szomatikus szövetekből történő hajtásindukció BAP hatására következett be, 1-5 mg/l koncentráció tartományban. Az egyes explantátumokon fejlődött hajtások száma 2-3 között változott, de a hajtásszám és a BAP koncentráció között nem találtunk összefüggést. A levéldarabokon bekövetkező regeneráció mértékét az explantátumok polaritása és orientációja nem befolyásolta. Gyökérdarabokból a hajtásregeneráció citokinin alkalmazása nélkül, csak auxint tartalmazó táptalajon is bekövetkezett, citokinin jelenlétében azonban rövidebb idő alatt több hajtás képződött.

*Populus alba* hajtáscsúcs tenyészeteiben a BAP és 2-iP (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l) valamint a zeatin (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/l) hatását vizsgáltuk. A szomatikus szövetek tenyészeteiben TDZ-t (0,05, 0,1; 0,25; 0,5 mg/l) is alkalmaztunk.

A hajtáscsúcsból illetve nóduszból történő hajtásképződés folyamatában a BAP bizonyult a leghatékonyabbnak, a legtöbb hajtás a legalacsonyabb vizsgált koncentráció mellett képződött. A 2-iP csak az 1 mg/l koncentrációban, a zeatin pedig egyáltalán nem volt hatásos. Ezzel szemben internódium- és levél darabokon a zeatin jelentősen felülmúlta a többi citokinin hatását. A legtöbb hajtás mindkét explantátum típusnál a 0,5 mg/l koncentráció mellett képződött. A levéldarabok esetében a regeneráció mértékét befolyásolta a polaritás is. A legjobb regenerációs képet a levélváll

darabok mutatták, ezt követték a levél középrész, majd a levélcsúcs darabok hajtásszámai. A TDZ sok apró hajtás, vagy inkább levélcsokor képződése eredményezte, amelyek a későbbiekben még hormon mentes közegen sem nyúltak meg, így további szaporításra nem voltak használhatók. A gyökér darabokon történő regenerációt egyik citokinin sem tudta előidézni.

Eredményeink alapján mindkét növény esetében kidolgozható egy hatékony regenerációs rendszer, mely akár a tömegszaporítás, akár a genetikai manipulációs kísérletek céljaira felhasználható.

## **6.2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában**

Az utóbbi években több, a növényekben megtalálható természetes anyagról bebizonyosodott, hogy növekedésszabályzó hatással is rendelkeznek. Ezen tulajdonságuk miatt indokolt lehet felhasználásuk az *in vitro* szaporítás folyamán is, a szaporítás hatékonyságának növelése érdekében. A triakontanol egy egyenes szénláncú primer alkohol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{CH}_2\text{OH}$ ), melyet először Ries és munkatársai írtak le, mint a lucerna epikutikuláris viaszanyagainak alkotórészét. Azóta számos kísérletben bizonyították növényi növekedést serkentő hatását üvegházi vagy szabadföldi kultúrákon, állományban. A kísérletek szinte egybehangzó eredményei alapján a triakontanollal történt kezelés hatására felgyorsult a növekedés, javult a virágképzés, sok növénynél magasabb terméseredményt értek el. Emellett a növények élettani sajátosságait is kedvezően befolyásolta, szinte minden esetben megemelkedett a klorofill tartalom, a növények friss és száraz tömege, valamint a fotoszintetikus aktivitásuk is.

Munkacsoportunk elsőként bizonyította a triakontanol növekedésserkentő hatását citromfű (*Melissa officinalis*), valamint alma és meggy alanyok *in vitro* szaporítása során. Ezen eredmények alapján indokoltnak láttuk a TRIA alkalmazási lehetőségének vizsgálatát kiterjeszteni további növények mikroszaporítására is.

Jelen munkánkban kísérleti objektumként három, gazdaságilag jelentős kertészeti növény, a málna (*Rubus idaeus*), gerbera (*Gerbera Jamesonii*), és a spárga (*Asparagus officinalis*) egy-egy fajtáját választottuk. A kísérletek beállítása során minden vizsgálati növénynél azonos elvet követtünk. A triakontanolt, 2, 5, 10 ill. 20  $\mu\text{g/l}$  koncentrációban adtuk a táptalajokhoz. A szaporítási fázisban az illető növényfaj számára kedvező citokinin/auxin tartalmú, előzetesen már alkalmazott szaporító táptalajokat használtunk, a következők szerint: málna 0,5 mg BAP + 0,1 mg IVS; gerbera 3 mg KIN + 0,1 mg IVS; spárga 2 mg KIN + 0,2 mg NES 1 liter táptalajban. A gyökereztetési fázisban növekedésszabályzó anyagokat nem tartalmazó közeghez adtuk a triakontanolt, hogy önmagában vizsgálhassuk ugyanezen koncentrációk hatását. Alaptáptalajként minden esetben a Murashige-Skoog formulát használtuk.

A kísérletek kiértékelésekor vizsgáltuk a tenyészetek növekedési paramétereinek - hajtásszám, hajtáshossz, gyökérszám, gyökérhossz - alakulását, valamint tömeggyarapodásuk mértékét. A növények klorofill tartalmának és fotoszintetikus aktivitásának mérését is elvégeztük.

Eredményeink bizonyították, hogy növényfajonként változó mértékben, de minden növény esetében pozitív hatású volt a triakontanol alkalmazása. A szaporítási fázisban szignifikánsan megnövelte a hajtások számát. Málna esetében a legmagasabb (20 µg/l) koncentráció eredményezte a legtöbb új hajtás fejlődését, gerberánál az 5 és 20 µg/l közötti tartomány egyforma hatékonyságúnak bizonyult. Ezzel szemben a spárga tenyészetekben a 2 µg/l TRIA fejtett ki serkentő hatást, és az ennél magasabb koncentráció tartományban már nem volt további növekedés. A hajtások hossza egyik növény esetében sem változott jelentősen. A növények friss tömege esetenként növekedett, ez részben a megnövekedett hajtásszámnak, részben a triakontanol hatására néha bekövetkező kalluszosodásnak volt köszönhető.

A gyökeresedési folyamat során mind a gyökeresedés aránya, mind a növényenkénti gyökérszám növekedett, ennek következtében a növények friss tömege is nőtt a kontrollhoz képest. Málna esetében a legtöbb gyökér fejlődését a két legmagasabb (10 és 20 µg/l) koncentráció idézte elő. A gyökerek hossza is növekedett. Gerberánál már a legalacsonyabb koncentrációban is szignifikánsan megnőtt a gyökérszám, a gyökérhossz lényeges változása nélkül. A spárga tenyészetek gyökeresedését tekintve szintén a 2 µg/l TRIA koncentráció volt a legkedvezőbb.

A növények fotoszintetikus rendszerét is kedvezően befolyásolta a triakontanol. Mind a szaporítás, mind a gyökeresedés fázisában jelentősen megemelkedett a klorofill tartalom már a legalacsonyabb TRIA koncentráció hatására is, és további lényeges növekedést a magasabb koncentrációk nem okoztak. Kivétel a málna, amelynél a levelek klorofill tartalma a szaporítási fázisban folyamatos emelkedést mutatott és maximumát a legmagasabb TRIA koncentrációnál érte el.

Eredményeink a jelen munka során is azt igazolták, hogy a triakontanol eredményesen használható különböző növények mikroszaporítása során. Minden esetben szükséges azonban az aktív koncentráció tartomány megállapítása, mert ez a növényfajtól, és az alkalmazott táptalajtól függően változhat az egyes növekedési fázisokban.

### **6.3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új típusú bioraktor alkalmazási lehetőségének vizsgálata a szaporítás folyamatában**

A mikroszaporítás folyamata szubkultúrák sorozatából áll, azaz a növényanyagot 4-6 hetes periódusonként helyezik át friss táptalajra. A növények ezen idő alatt felhasználják a közeg tápanyagtartalmát és a szövettömeg gyarapodása miatt ki is nőik a tenyészedényt. A kultúrák feldarabolása és átültetése a legidőigényesebb lépése a folyamatnak és a legtöbb emberi munkát

igényli. A nagyszámú, kis méretű tenyészedeny tisztítása, újratöltése, mozgatása szintén munka és időigényes feladat.

Így érthető, hogy a technológiai fejlesztés olyan módszerek kidolgozására irányult, amelyek segítségével csökkenthető az explantátumok egyedi kezelése, és növelhető a tenyészedenyek mérete. A léptéknövelést és a megfelelő minőségű növényanyag előállítását többek között a különböző bioreaktor típusok kialakítása és bennük a környezeti feltételek lehetséges optimalizálása tette lehetővé. Kísérleti munkánk során egy új típusú bioreaktor (Revert Rotary Reactor, 3R System) működését teszteltük a szaporítási folyamat során.

Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a kiválasztott növények esetében milyen hatással jár a folyadékban történő tenyésztés, illetve, hogy az eljárás alkalmas lehet-e nagy tömegű növényanyag egységes kezelésére.

Különböző tenyésztési módszereket hasonlítottunk össze. Az egyik kezelésben a növények zárt rendszerben, csak a tápoldattal vagy a henger levegőjével érintkeztek, a másikban steril levegő bejuttatásával rendszeres légcserét biztosítottunk. Kontrollként a szilárd táptalajon, fémtetővel lezárt befőttes üvegben nevelt tenyészetek szolgáltak.

Három növényfajtát: egy tarka levelű *Hosta tokudama*-t, egy banán (*Musa nana* "Dwarf Cavendish") és egy ananász (*Ananas comosus* "Lucidus") fajtát vontunk be a vizsgálatokba.

A tápközeg minden kezelésben azonos volt: banán és ananász esetében az MS alapközeget használtuk 1 mg/l BAP és 0,1 mg/l IVS ill. 0,25 mg/l BAP és 0,1 mg/l IVS kiegészítéssel. A *Hosta* esetében ½ MS közeget használtuk szaporító táptalajként 3 mg/l kinetin + 0,1 mg/l IVS kiegészítéssel.

A 30 napos tenyészciklus végén a különböző növekedési paraméterek – hajtásszám, hajtáshossz, tömeggyarapodás – alakulását jegyeztük fel. A növények élettani állapotának jellemzése érdekében a fotoszintetikus jellemzőiket, a klorofill tartalmat és a klorofill fluoreszcencia indukciós kinetikáját vizsgáltuk. A fotoszintetikus aktivitás változását infravörös gázanalizátor segítségével követtük nyomon. A levelek szöveti felépítését pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

A kísérletek értékelése során arra kerestük a választ, melyik módszer eredményezi a legmagasabb szaporodási rátát azaz a tenyészetenkénti legnagyobb hajtásszámot valamint, hogy milyen körülmények között állíthatók elő olyan hajtások, melyek minőségük és élettani állapotuk alapján a gyökereztetésre, majd az akklimatizációra leginkább alkalmasak.

Eredményeink alapján mindhárom növény esetén a levegő befúvással kombinált időszakos elárasztás módszere bizonyult a legjobbnak. Összességében elmondható, hogy a kontroll tenyészetekhez képest szignifikánsan megemelkedett a hajtásszám a levegőztetett hengerekben. A csak forgatott hengerek tenyészeteiben is javult a szaporodási ráta, de a kontrollhoz képest itt nem



találtunk szignifikáns különbséget. A hajtások hossza jelentősen nem változott az egyes kezeléseknél, kivéve a banánt, ahol a növekedés inkább a levél hosszúságában nyilvánult meg, nem a hajtástengely megnyúlásában. *Hosta* esetében is megfigyeltük a levéllemez felületének növekedését a folyadék kultúrákban. A hajtáscsokrok friss tömegének növekedésében is hasonló tendencia volt megfigyelhető, bár ezzel nem állt mindig párhuzamban a szárazanyag tartalom növekedése. Mivel ennek adatai csak kis mértékű eltérést mutattak az egyes kezeléseknél, arra a következtetésre jutottunk, hogy a friss tömeg gyarapodását a folyadék felhalmozódása okozta, nem pedig a tápanyagoké. A növények fotoszintetikus tulajdonságait tekintve is különbségeket találtunk az egyes kezelésekből származó minták között, a levegőztetett hengerekben megemelkedett a levelek klorofill tartalma. *Hosta* esetében mind a klorofill tartalom, mind a fluoreszcencia indukciós kinetika értékeinek jelentős csökkenését mértük a zárt hengerben fejlődött levelekben. Ez arra utal, hogy ebben a rendszerben a fotoszintetikus apparátus gátlást szenvedett. Az indukciós kinetika  $F_v/F_m$  értékei a másik két növény esetében 0,7-0,8 körül mozogtak, ami az *in vivo* növények esetében mért szokásos érték. A növények anatómiai sajátosságai szempontjából szintén kedvezőnek bizonyult a levegőztetett folyadék kultúra, a mikroszkópos felvételek tanúsága szerint. A levelek szöveti felépítése az *in vivo* növényekéhez hasonló képet mutatott, szemben a kontrollal. Az agaros közegen fejlődött banán növények leveleiben intenzív légzést mértünk. Ezzel szemben a szellőztetett hengerek folyadék közegében fejlődött banán növények fotoszintetikus aktivitása már kialakult, intenzitása felülmúlta a légzését. A levelek szövettani képe a hiperhidratáció tüneteit - az oszlopos parenchima hiánya; nagy, nyitott sztómák; vékony epidermisz réteg - mutatta a zárt rendszerben fejlődött növények esetében. Ezzel szemben a vastagabb epidermisz; a működő, zárt sztómák; az epikutikuláris viaszanyagok megjelenése a levegőztetett hengerben fejlődött növények levelein arra utal, hogy ezek a növények közelebb állnak az autotróf állapothoz. Ezt a tápanyagok jobb felvehetőségével illetve a folyamatos légcserre lehetőségével magyarázhatjuk, hiszen a tápközegek összetételén nem változtattunk.

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy rendszerünkben a levegőztetett folyadék hatékony tápanyag felvételt és megfelelő légcserét tesz lehetővé. Ezáltal a növekedés feltételei kedvezőbbek, jelentősen megnő a szaporodási ráta és jó minőségű növények állíthatók elő.

## 7. SUMMARY

### 7.2. Application of triacontanol in the micropropagation of horticultural plants

In the last years it became evident, that different substances, occurring naturally in plants, are exhibiting growth regulator effects. These properties make it reasonable to test them in the conditions of *in vitro* systems, in order to increase the efficiency of propagation.

Triacontanol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{CH}_2\text{OH}$ ), a long-chain aliphatic alcohol was found in 1933 (Ries et. al.) as a part of the epicuticular waxes of alfalfa. Since then, its growth regulating effect have been shown in several greenhouse and field experiments and a number of attempts were made to clarify its mode of action as well. However, up to now no final explanation was found for its wide range of effects. Almost without exception the plants treated with triacontanol had better growth rates and yield, had higher chlorophyll content, elevated fresh and dry weights and photosynthetic activity.

Growth stimulating effects of triacontanol in the micropropagation process of *Melissa officinalis* and fruit rootstocks had been demonstrated at first by our group. Based on the positive results, we decided to explore its application to other horticultural plants as well.

In the present experiments raspberry (*Rubus idaeus*), gerbera (*Gerbera Jamesonii*), and asparagus (*Asparagus officinalis*) plants served as objects of investigations. Murashige-Skoog medium (1962) was used supplemented with 0,5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IAA in the case of raspberry, 3 mg/l KIN + 0,1 mg/l IBA in the case of *Gerbera*, and 2 mg/l KIN + 0,1 mg/l NAA for *Asparagus* in the multiplication phase. Basal medium without plant growth regulators was applied in the root induction phase, in order to test the effects of TRIA when applied alone. Both the multiplication and rooting media were supplemented with 0, 2, 5, 10 and 20  $\mu\text{g/l}$  triacontanol.

For evaluation of the experiments growth parameters like as number and length of shoots and roots was recorded, fresh mass, dry weight and chlorophyll content of the plants was measured after four weeks of culture.

Our results demonstrated, that, although in a different degree, triacontanol exhibited a positive influence in the case of all plants. Due to its effect, the number of shoots increased significantly in the multiplication phase. In raspberry cultures most of the new shoots developed at the highest (20  $\mu\text{g/l}$ ) triacontanol concentration. In case of *Gerbera* all concentrations in the range of 5-20  $\mu\text{g/l}$  proved to be stimulatory. In contrast, the lowest (2  $\mu\text{g/l}$ ) concentration of triacontanol enhanced significantly the total shoot number of asparagus. Higher concentrations up to 20  $\mu\text{g/l}$  did not give any further increase. The length of shoots was not influenced by the treatments. Rise in the fresh weights was recorded in some cases, due to the elevated shoot number and development of callus.

In the rooting phase a stable elevation of both the proportion of rooted plants and the number of roots per plantlet was registered in all treatments. The rate of root induction in raspberry cultures

was the highest on media supplemented with 10 and 20  $\mu\text{g/l}$  triacontanol. In case of *Gerbera* significant increase of root number was evident even at the lowest TRIA concentration. The number of roots of *Asparagus* was significantly enhanced by 2 $\mu\text{g/l}$  triacontanol too and the higher concentrations did not result any further increase.

Photosynthetic system of the plants was positively influenced by the triacontanol treatments. A significant increase of chlorophyll content of *Gerbera* and *Asparagus* plants was registered both in the multiplication and the rooting phase even at the lowest concentration. In case of raspberry leaf chlorophyll content increased continuously and reached its maximum at 20  $\mu\text{g/l}$ .

Results of the present work clearly demonstrate, that triacontanol can be effectively applied in the micropropagation of different plants. However, it is necessary to determine the optimal concentration range, because it can be different depending on the plant species and nutrient media applied in the certain growth phases.

### **7.3. Liquid culture system: trials with a novel type bioreactor in the propagation process**

Plant micropropagation involves periodic transfers of plant material to fresh media, after subcultures of 4-6 weeks, due to exhaustion of the nutrients in the medium and also because of continuous tissue growth and proliferation, which is rapidly limited by the size of the culture container. Cutting and planting represents the most time- and labour consuming part of the process. The cleaning, filling and handling of a large number of containers is also laborious. Therefore technology development have been focused to diminish individual handling of the plants and to grow the size of containers. The construction of scaled-up liquid bioreactors made it possible to automate procedures together with improving the quality of plants. In our experiments the operation of a new type of bioreactor, called Revert Rotary Reactor (3R) have been tested.

The aim of the work presented here was to investigate the effect of culture conditions on *Hosta*, *Ananas* and *Musa* as model plants cultivated in different systems, thus to prove the usefulness of our bioreactor in the micropropagation process.

Three different culture systems were compared. In one treatment plantlets were grown in a closed reactor modul without the change of internal air, while in the other treatment active ventillation was provided by pumping filter-sterilized air into the modul. Cultures grown on the usual solid multiplication media in small containers were considered as control.

The nutrient media were the same in all treatments. *Hosta* plantlets were propagated on  $\frac{1}{2}$  MS media with 3 mg/l kinetin. The culture media consisted of the MS formula with the addition of 1  $\text{mgL}^{-1}$  BAP + 0.1  $\text{mgL}^{-1}$  IBA for shoot multiplication in case of banana, and 0.25  $\text{mgL}^{-1}$  BAP + 0.1  $\text{mgL}^{-1}$  IBA for propagation of *Ananas*.

After a 30 days growth-cycle the parameters of growth, e.g. number of shoots in the cluster, length of shoots, fresh and dry weights were recorded. In order to determine the physiological status of the plants, photosynthetic characters like chlorophyll content and data of chlorophyll fluorescence induction kinetics were analyzed. Changes in photosynthetic activity were monitored by Infra Red Gas Analyser. The anatomical structure of the leaves was investigated by scanning electron microscope.

Our results showed, that growth parameters were positively influenced by the liquid media. The number of shoots in the clusters increased significantly in the case of plants grown in the aerated vessel. An increase of the multiplication rate was registered in the cultures grown in the closed vessel too, but the differences were not significant compared to the control. No differences were found concerning length of the shoots except banana, but this deviation was caused more by the increase in the leaf size rather than in elongation of the shoot axis. Leaf area of *Hosta* shoots increased too in the liquid media. All of these changes were followed by the increase of fresh and dry weights. However data of dry matter content showed a very small deviation between the treatments. It seems that the elevated biomass production is caused rather by the absorption of liquid than the increased accumulation of nutrients.

Differences were found in the photosynthetic characters between plants from the different treatments. The chlorophyll content was higher in the aerated vessel than in the other treatments. In case of *Hosta* chlorophyll content and data of fluorescence induction kinetics were much lower in the closed system than that of the normal value. This shows that there is a certain inhibition in the function of the photosynthetic apparatus. Values of Fv/Fm ratio measured in the leaves of *Ananas* and banana in all treatments showed a level of 0.7-0.8 that is very close to the normal level of the *in vivo* plantlets. No photosynthetic activity but intensive respiration was detected in banana plants grown on agar media. In contrast photosynthesis of plants grown in ventilated liquid has already evolved, its activity exceeded respiration.

Analysis of the leaf anatomy showed symptoms of hyperhydration (lack of palisade parenchyma, spongy mesophyll cells, large stomatas, thin layer of epidermis) in the case of plants cultured in the closed reactor modul. In contrast, the thicker epidermis, the functioning stomatas and the beginning of excretion of epicuticular waxes showed that the plants grown in the ventilated modul are much near to the autotrophic state. All the differences mentioned above suggest that the permanent ventilation and the absorption of nutrients from the liquid media are responsible for the favourable effects.

As a summary, we can conclude that our system allows an efficient nutrient uptake and a good aeration in the same time, thus provides good growing conditions and makes it possible to achieve high multiplication rate of good quality plants.

# **MELLÉKLETEK**

## IRODALOMJEGYZÉK

- Adelberg, J.. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation. (2005) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81:359-368.
- Aghion, D., Beauchesne, G. (1960) Utilisation de la technique de culture stérile d'organes pour obtenir des clones d'ananas. *Fruits* 15:464-466.
- Aitken-Christie, J., Davies, H. (1988) Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Hort.* 230:81-87.
- Alvard, D., Cote, F., Teisson, C. (1993) Comparison of methods of liquid culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32 : 55 - 60.
- Archana-Pande, Shukla, Y. N., Tripathi, A. K., Pande, A. (1995) Lipid constituents from *Stellaria media*. *Phytochem.* 39/3: 709-711.
- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1
- Baker, C. M., Bryan, H. H., Cantliffe, D. J., Litz, R. E. (1985) Influence of media on mature carrot (*Daucus carota* 'Hicolor 9') somatic embryo development. *Hort.Sci.* 20:3, sect.2., 576
- Bartolini, S., Viti, R., Vitagliano, C., Lavee, S (ed.), Goren, R. (1993) Effects of different growth regulators on fruit set in olive. *Acta Hort.* 329: 246-248.
- Benjamin, B. D., Roja, P. C. Heble, M. R., Chadha, M. S. (1987) Multiple shoot culture of *Atropa belladonna*: effect of physico-chemical factors on growth and alkaloid formation. *J. Plant Physiol.* 129:129-135.
- Bhattacharya, A. K., Rao, B. R. R. (1996) Effect of triacontanol and mixtalol on rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *J. Ess. Oil. Res.* 8(4): 383-388.
- Bhattacharya, A., Saha, P. K. (1992) n-Triacontanol from the seeds of *Shorea robusta* Gaertn. F. *Adv. Plant Sci.* 5/1: 225-227.
- Biernbaum, J.A., Houtz, R.L., Ries, S.K. (1988) Field studies with crops treated with colloiddally dispersed triacontanol. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 113:679-684.
- Bilkey, P.C., McCown, B.H., Hildebrandt, A.C. (1987) Micropropagation of African violet from petiole cross section. *Hort. Sci.* 13:37-38.
- Bolhár-Nordenkamp, H. E., Öquist, G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Chapman and Hall, pp.: 193-206.
- Chibnall, A. C., Williams, Latner, A. L., Pipes, A. H. (1933) The isolation of n-triacontanol from lucerne wax. *Biochem J.* 27: 1885-1888.
- Chu, C. C. (1987) The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 11: 221-226.

- Coleman, G.D., Ernst, S.G.(1989) *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effects of cytokinin and genotype. Plant Cell Rep. 8:459-462.
- Cronauer, S.S., Krikorian, A.D. (1984) Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. Hort. Sci. 19 : 234 - 235.
- Daquinta, M., Benega, R. (1997) Brief review of tissue culture of pineapple. Pineapple News. 3:7-9.
- de Almeida, W. A. B., de Matos, A. P., da Souza, S. (1997) Effects of benzylaminopurine on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Acta Hort. 425
- Debergh, P. C, Maene L. J.: (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort. 14:335-345.
- DeWald MG, Moore GA, Sherman WB, Evans MH (1988) Production of pineapple plants *in vitro*. Plant Cell Rep 7:535-537.
- Dey, S. (2005) Cost-effective mass cloning of plants in liquid media using a novel growtek bioreactor. In: Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (eds.) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. p. 127-141.
- Dos Santos, M. C. F.; Esqibel, H. A.; Dos Santos, A. V. P. (1990) *In vitro* propagation of the alkaloid producing plant *Datura innoxiosa*. Barb. Rodr. Plant Cell Tiss. Org.Cult. 21:75-78.
- Drew RA (1980) Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. Queensland Agr. J. 106:447-451.
- Eapen, S. Rangan, T. S., Chadha, M. S., Heble, M. R. (1978) Morphogenetic and biosynthetic studies on tissue cultures of *Atropa belladonna* L. Plant Sci Lett 13:83-89.
- Earle, E. D, Langhans, R. W.(1974) Propagation of Chrysanthemum *in vitro*. J.Am.Soc.Hort.Sci. 99:128-132.
- Earle, E. D, Langhans, R. W.(1975) Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. HortSci. 10:608-610.
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.L., Desjardins, Y., Borroto, C.G. (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep. 18:743-748.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C.G., Desjardins, Y. (2003) Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. In Vitro Cell Dev. Biol – Plant: 39:651-656.
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69(3): 215-231.
- Fári, M. G., Mészáros, A. (2003) Bioreaktorok a növényi szövettenyésztésben. 'Lippay János–Ormos Imre–Vas Károly' Tudományos Ülésszak, november 6-7. Budapest. Összefoglalók pp. 80-81.

- Fári, M.G., Kertész, T., László, M., Varga, Zs. (2003) Design of a revert rotary plant micropropagation bioreactor –'3R' system: application for research, possibilities of scaling-up and limitations. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Congress on Bioreactor Technology in Cell, Tissue Culture and Biomedical Applications, Tampere, Finland, 14-18 July.
- Fichet, M. (1990) Organogenesis in callus cultures of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) *Acta Hort.* 275:267-274.
- Firoozabady, E., Gutterson, N. (2003) Cost-effective *in vitro* propagation method for pineapple. *Plant Cell Rep.* 21(9): 844-850.
- Fraternale, D., Giampieri, L., Ricci, D., Rocchi, M.B.L. (2002) Micropropagation of *Bupleurum fruticosum*: The effect of triacontanol. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 69 135-140.
- Fraternale, D., Giampieri, L., Ricci, D., Rocchi, M.B.L., Guidi, L., Epifano, F., Marcotullio, M.C. (2003) The effect of triacontanol on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 74 : 87-97.
- Freeman, B., Albrigo, L. C., Biggs, R. H. (1979) Cuticular waxes of developing leaves and fruit of blueberry, *Vaccinium ashei* Reade cv. Bluegem. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104:398-403.
- George, E. F. (1993) Plant propagation by tissue culture. Part I.-II. Exegetics LTD.
- Gupta, P.R.(1986) Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult* 6: 33 - 39.
- Hammerschlag, F. (1982a) Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of plum rootstock Myrabolan /*Prunus cerasifera* Ehrh./ *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107: 44-47.
- Hammerschlag, F. (1982b) Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. *HortSci.* 17: 85-86.
- Hangarter, R., Ries, S. K., Carlson, P. (1978) Effect of triacontanol on plant cell cultures *in vitro*. *Plant Phys.* 61: 855-857.
- Hartmann, T., Witte, L., Oprach, F., Toppel, G. (1986) Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures and cell suspension cultures. *Planta Med.* 52: 390-395.
- Huetteman, C., Preece, J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.* 33:105-119.
- Hvoslef-Eide, A. K. (2000) Bioreactor cultures of silver birch (*Betula pendula* Roth.) *Acta Horticulturae* 499.
- Hwang, S. C., Chen, C. L., Lin, J. C., Lin, H. L. (1984) Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. *HortSci.* 19:231-233.
- Jaiswal, S. K., Bhojwani, S. S., Bhatnagar, S. D. (1987) *In vitro* regeneration of seedling explants of *Brassica carminata* A. Braun. *Phytomorph.* 37: 235-241.



- Jámborné, Benczúr, E. (1993) Dísznövények mikroszaporítása. Egyetemi jegyzet, KÉE. Budapest.
- Jámborné, Benczúr, E. (2005) A mikroszaporítás sikerességét meghatározó tényezők. pp. 39-45. In: Jámborné, Benczúr E., – Dobránszki J. (eds.) Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G., Heszky, L. E. (1995) A novel method for rapid micropropagation of pineapple. HortSci. 30:127-129.
- Knight, S. L., Mitchell, C. A. (1987) Stimulating productivity of hydroponic lettuce in controlled environments with triacontanol. HortSci. 22(6): 1307-1309.
- Kumaravelu, G., Livingstone, V. D., Ramanujam, M. P. (2000) Triacontanol-induced changes in the growth, photosynthetic pigments, cell metabolites, flowering and yield of green gram. Biol. Plant. 43:2 287-290.
- Levin, R., Alper, Y., Stav, R., Vatad, A. A. (2000) Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. Patent registration number: 1320012
- Lichtentaler, H.K., Rinderle, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress condition in plants. CRC Crit. Rev. An. Chem., Vol 19, Suppl. 1. p.: ssi S29-S85.
- Lubomski, M. (1988) *In vitro* shoot regeneration from different explants of *Hosta sieboldiana* cv. Gold Standard. Acta Horticulturae 251: 113-114.
- Ma, F. W., Wang, J. C., Rong, W. (1990) Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of apple cultivar Fuji. J. Fruit Sci. 7:4, 201-206.
- Maene, L., Debergh, P. (1985) Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5:23-33.
- Mapes, M. O. (1973) Tissue culture of bromeliads. Congr. Proc Intl Plant Prop Soc 3:47-55.
- Martinelli, A. (1985) Factors effecting *in vitro* propagation of the peach-almond hybrids. Acta Hort. 173.
- Mathews, V. H., Rangan, T. S., Narayanaswamy, S. (1976) Micropropagation of *Ananas sativus* in vitro. Z. Pflanzenphysiol 79:450-454
- Mándy, A. (2005) Orchídeák. pp 214-222. In: Jámborné Benczúr E. – Dobránszki J. (eds.) Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Mehta, K., Rana, H. S., Awashti, R. P. (1990) Effect of triacontanol and paclobutrazol on quality of apricot cv. New Castle (*Prunus armeniaca*). Adv. Plant Sci. 3(2): 219-223
- Mészáros, A. (1986) Meriklón technológiák. Kézirat. Rozmaring Nyomda, Budapest
- Mészáros, A., Molnár, Gy. (1988) Technológiai előirat a hálózati laboratóriumok számára. Kézirat. Rozmaring Nyomda, Budapest
- Mészáros, A., Domokos-Szabolcsy, É., Halász, K., Kálai, K., Fári, M.G. (2004a) An efficient micropropagation system: 3R bioreactor. Acta Horticulturae (in press)

- Mészáros, A., Jámbor-Benczúr, E., Fári, M.G. (2004b) Micropropagation of *Hosta tokudama* in bioreactor culture. *Acta Horticulturae* (in press)
- Mészáros, A., Kálai, K., Halász, K. (2005) Growth promoting effects of triacontanol in the micropropagation of horticultural plants. COST 843 Final Conference. 2-5. July, Stara Lesna. Book of Abstracts p. 85-86.
- Minocha, S. C. (1987) Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees In: Bonga, J. M., Durzan, D. J.: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht (Boston) Lancaster. 50-66.
- Misra, A., Srivastava N. K., (1991) Effect of triacontanol formulation 'Miraculan' on photosynthesis, growth, nutrient uptake and essential oil yield of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) *Plant Growth Regul.* 10:57-63.
- Morel, G. (1974) Clonal multiplication of orchids. pp. 169-222. In: Wither (ed): *The orchids*. Wiley et. Sons.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479.
- Nehra, N.S., Chibbar, R.N., Kartha, K.K., Datla, R.S.S., Crosby, W.L., Stushnoff, C. (1990) *Agrobacterium* -mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 9:11-13.
- Paek, K. Y., Hahn, E. J., Paek, S., H. (2001) Application of bioreactors for scale-up micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plants* 37: 149-157.
- Park, Y.G., Son, H.S. (1988) *In vitro* organogenesis and somatic embriogenesis from punctured leaf of *Populus nigra x Populus maximoviczii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15: 95-105.
- Pierik, R.L.M. (1987) *In vitro* culture of higher plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81:359-368.
- Rajasekaran, L. R., Blake, T. J. (1999) New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. *Plant Growth Reg.* 18: 175-181.
- Ray, R. C. (1991) Effect of triacontanol on growth and yield of capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Adv. Hort. Sci.* 5(4): 153-156.
- Reddy, B.O., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. (2002) The effect of triacontanol on micropropagation of *Capsicum frutescens* and *Decalepis hamiltoni* WA. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71 : 253-258.
- Richard, N., K., Ries, S. K. (1981) Rapid growth and apparent total nitrogen increases in rice and corn plants following applications of triacontanol. *Plant Physiol.* 68: 1279-1284.
- Ries, S. K. (1985) Regulation of plant growth with triacontanol. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2(3): 239-285.

- Ries, S. K. (1991) Triacontanol and its second messenger 9-beta-L (+)-adenosine as plant growth substances. *Plant. Phys.* 95:986-989.
- Ries, S. K., Savithiry, S., Wert, V., Widders, I. (1993) Rapid induction of ion pulses in tomato, cucumber and maize plants following a foliar application of L(+)-adenosine. *Plant Phys.* 101: 49-55.
- Ries, S. K., Wert, V. F., Biernbaum, J. A., Gibson, T. W., Bradley, W. J. (1983) Factors altering response of plants to triacontanol. *J. Am. Hort. Sci.* 108: 917-922.
- Ries, S. K., Wert, V. F., Sweeley C. C. (1977) Triacontanol: a new naturally occurring plant growth regulator. *Science* 195: 1339-1341.
- Ries, S. K., Wert, V., O'Leary, N. F. D., Nair, M. (1990) 9-Beta-L (+)-adenosine: a new naturally occurring plant growth substance elicited by triacontanol in rice. *Plant Growth Reg.* 9:263-273.
- Ritchie, G.A., Short, K.C., Dawey, M.R. (1989) *In vitro* shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet. *J.Exp.Bot.* 40:277-283.
- Rodriguez, R., Diaz-Sala, C., Cuzzo, L., Ancora, G. (1991) Pear *in vitro* propagation using a double-phase culture system. *Hort.Sci.* 26:62-64.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J. Sandoval, J., Debergh, P. (2005) Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82:57-66.
- Rutledge, C. B., Douglas, G. C. (1988) Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar *in vitro*. *Phys. Plant.* 72:367-373.
- Santos, M. C., Mukherjee, R. (1992) Constituents of *Jatropha mollissima* roots. *Fitoter.* 63/1: 88.
- Sharma, S. K. (1995) Response of triacontanol application on certain morphological characters, fruit and seed yield and quality of tomato seed. *Annal. Agr. Res.* 16(1): 128-130.
- Shripathi, V., Sivakumar Swamy, G., Chandrasekhar, K. S. (1997) Microviscosity of cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit protoplast membranes is altered by triacontanol and abscisic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1323: 263-271.
- Shripathy, V., Swamy, G. S. (1994) Effect of triacontanol on the lipid composition of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves and its interaction with indole-acetic acid and benzyl adenine. *Plant Growth. Reg.* 14: 45-50.
- Shukla, A., Farooqi, A. H. A., Shukla, Y, N., Sharma, S. (1992) Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisin yield in *Artemisia annua* L. *Plant Growth Reg.* 11: 165-171.

- Sim, G.E., Goh, C.J., Loh, C.S. (1989) Micropropagation of *Citrus mitis* 'Blanco'- multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. *Plant Sci.* 59:203-210.
- Simonton, W., Robacker, C., Krueger, S. (1991) A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 27:211-218.
- Sita, L. G., Sing, R., Iyer, C. P. A. (1974) Plantlets through shoot tip cultures in pineapple. *Current Sci. (India)* 45:724-725.
- Skogen, D., Eriksen, A. B., Nilsen, S. (1982) Effect of triacontanol on production and quality of flowers of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Sci. Hort.* 18:87-92.
- Skoog, F, Miller, C. O.:(1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues in vitro. *Symp. Soc. Exp., Biol.* 11:118-131.
- Son, H.S., Hall, R.B. (1990a) Plant regeneration capacity of callus derived from leaf, stem and root segments of *Populus alba* x *P. Grandidentata*. *Plant Cell Rep.* 9:344-347.
- Son, H.S., Hall, R.B. (1990b) Multiple shoot regeneration from root organ culture of *Populus alba* x *P. Grandidentata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20:53-57.
- Srivastava N. K., Sharma, S. (1990) Effect of triacontanol on photosynthesis, alkaloid content and growth in opium poppy (*Papaver somniferum* L.) *Plant Growth. Reg.* 9:65-71.
- Srivastava N. K., Sharma, S. (1991) Effect of triacontanol on photosynthetic characteristics and essential oil accumulation in japanese mint (*Mentha arvensis* L.) *Photosynth.* 25:55-60.
- Szafián, Zs., Jámbor-Benczúr, E., Ferenczy A. 1995. *In vitro* propagation of *Hosta fortunei* I. *Hortic. Sci.* 27(1-29): 16-19.
- Szafián, Zs., Jámbor-Benczúr, E., Ferenczy A. 1996. *In vitro* propagation of *Hosta fortunei* II. *Hortic. Sci.* 28(1-2): 8-10.
- Tantos, Á., Mészáros, A., Kissimon, J., Horváth, G., Farkas, T. (1999) The effect of triacontanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. *Plant Cell Rep.* 19 : 88-91.
- Tantos, Á., Mészáros, A., Farkas, T., Szalai, J., Horváth, G. (2001) Triacontanol supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Rep.* 20 : 16-21.
- Teisson, C., Alvard, D. (1995) A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A (eds) *Current issues in plant molecular and cellular biology.* Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp105-109.
- Thakur, P. S., Thakur A. (1993) Influence of triacontanol and mixtalol during plant moisture stress in *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Plant Phys. Biochem. Paris* 31(3): 433-439.
- Tisserat, B., Herman, C., Silman, R., Bothast, R. J. (1997) Using ultra-high carbon dioxide levels enhances plantlet growth *in vitro*. *Hortic. Technol.* 7:282-289.

- Tisserat, B., Vandercook, C. E. (1985) Development of an automated plant cell culture system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 5:107-117.
- Tóth, E. T., Onisei, T., Amariei, D., Lazurca, D. (1991) Variability in tissue culture regenerated plants of *Atropa belladonna*. *Acta Hort* 289:269-270.
- Tzfira, T., Jensen, C.G., Wang, W. (1997) Transgenic *Populus tremula*: a step by step protocol for its *Agrobacterium* - mediated transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:219-235.
- Vieitez, A.M., Vieitez, M.L. (1982) *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hort.* 18:343-351.
- Vuylsteke, D.R., Ortiz, R. (1996) Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa ssp.* AAB group). *HortSci.* 3 : 862-865.
- Waldron, J. D., Growers, D. S., Chibnall, A. C., Piper, S. H. (1961) Further observations on the paraffins and primary alcohols of plant waxes. *Biochem. J.* 78: 435-442
- Wang-YueFang, Braman, S. K., Robacker, C. D., Latimer, J. G., Espelie, K. E., Wang, Y. F.(1999) Composition and variability of epicuticular lipids of azaleas and their relationship to azalea lace bug resistance. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 124/3: 239-244.
- Waqar-Ahmad, Muhammad-Nazir, Rabi, N. A., Khan, S. A., Ahmad, W, Nazir, M. (1992) Epicuticular wax of *Euphorbia caducifolia* Haines. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 35/11: 454-458.
- Welander, M. (1988) Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *J. Plant. Physiol.* 132: 338-344.
- Welander, M., Jansson, E., Lindquist, H. (1989) *In vitro* propagation of *Populus x wilsocarpa* – a hybrid of ornamental value. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 18:209-219.
- Zárate, R., Cantos, M., Troncoso, A. (1997) Induction and development of adventitious shoots of *Atropa baetica* as a means of propagation. *Euphytica* 94:361-366.
- Zepeda, C., Sagawa, Y. (1981) *In vitro* propagation of pineapple. *HortScience* 16:495
- Zhou, W. J., Xi, H. F. (1993) Effects of mixtalol and paclobutrazol on photosynthesis and yield of rape (*Brassica napus*) *J. Plant Growth. Regul.* 12:157-161.
- Ziv, M. (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews.* John Wiley & Sons, Inc. 24: 1-30.

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS