

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

dr. Mészáros Annamária

**Budapest
2006**

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

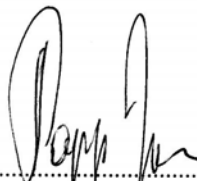
tudományága: Multidiszciplináris agrártudományok
(Növénytermesztési és kertészeti tudományok,
Biológiai tudományok)

vezetője: Dr. Papp János
egyetemi tanár, DSc.

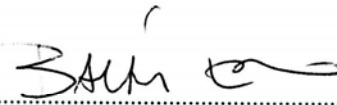
Budapesti Corvinus Egyetem,
Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

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 MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Bevezetés

A mikroszaporítás kifejezés lényegében egy több, egymást követő lépésben megvalósuló technológiai folyamatot jelöl, melynek célja, hogy egy vagy több kiválasztott anyanövényből tetszőleges számú utódot állítsanak elő *in vitro* körülmények között. Az üzemi méretekben működő technológiák természetesen 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 növekedésszabályozó anyagok hatásának vizsgálata, a genotípus és környezeti tényezők kölcsönhatásának kérdései kerültek előtérbe. A 90-es évek elejétől a technológiai fejlesztés, a léptéknövelés lehetőségeinek vizsgálata felé fordult a figyelem. A kutatás fő irányai a növényanyag minőségének javítását, a tenyésztés környezeti feltételeinek lehetséges optimalizálását, ezzel a szaporítási folyamat hatékonyságának növelését és az előállítási költségek csökkentését foglalták magukban. Általánosságban elmondható hogy ezen a tudományterületen a kutatás és a gyakorlat szoros kölcsönhatása viszi előre az ismeretek bővülését: a kutatás a gyakorlat által felvetett problémákra keres megoldást és viszont, a kísérletes munka eredményei az üzemi szaporításban realizálódnak.

A problémák felvetése és a kísérletek célja

1. A mikroszaporítás folyamata a kiinduló növényanyag több egymást követő tenyészciklusban történő megsokszorozása, citokininek 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

Munkánk első időszakában a citokininek hatását vizsgáltuk a hajtásképződés folyamatában két eltérő növekedési típusú növény: 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 hatásfokát.

Ezzel párhuzamosan arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy a növények különböző szomatikus szöveteiben lehet-e hajtásképződést kiváltani, illetve, hogy mely szövetek alkalmasabb leginkább a hajtásindukcióra.

2. 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. 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. Munkacsoportunk az elsők között kezdte vizsgálni a triakontanol hatását a mikroszaporítás sajátos körülményei között. Citromfűvel, majd gyümölcs alanyokkal végzett kísérleteink során minden esetben a triakontanol pozitív hatásait tapasztaltuk. Ezen eredmények ismeretében döntöttünk a munka továbbfolytatása mellett, annak érdekében, hogy további – gazdaságilag jelentős - növényfajokon is vizsgálhassuk a triakontanol hatásait.

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.

3. Napjainkban 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 bioreaktort 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 tenyészmedényekben 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.

Ezt a munkánkat, amely a technológiai fejlesztésre irányult, 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 tenyésztés megfelelő hatékonyságú, valamint, hogy a bioreaktorban szaporított növények, növekedési paramétereiket és élettani tulajdonságaikat tekintve legalább olyan jó minőségűek, mint a hagyományos szilárd táptalajon fejlődött társaik.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

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.

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" hajtástenyészeteiben 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).

2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában

Korábbi pozitív tapasztalataink alapján indokoltnak láttuk újabb, üzemi méretekben szaporított növények szaporítására is kiterjeszteni a vizsgálatokat. Jelen munkában a málna (*Rubus idaeus*) Malling Exploit fajtáját, a B5 jelű gerbera (*Gerbera Jamesonii*) fajtát ill. a spárga (*Asparagus officinalis*) 1113 kódszámú, francia eredetű klónját választottuk vizsgálati objektumként.

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 (TRIA) 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. A triakontanolt 2, 5, 10 és 20 µg/l koncentrációban adtuk a táptalajokhoz.

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

Kísérleti munkánk során egy új típusú bioreaktorban, folyékony közegben szaporítottuk a növényeket. Különböző tenyésztési módszereket hasonlítottunk össze. Az egyik kezelésben a növények zárt rendszerben, csak a tápoldattal vagy a reaktor henger levegőjével érintkeztek, a másokban steril levegő bejuttatásával rendszeres légcserét biztosítottunk a hengerben. 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 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.

A triakontanos kísérletek során 500 ml térfogatú befőttes üvegeket használtunk tenyészedenként, melyeket a megfelelő légszere biztosítása érdekében átlyukasztott és a lyukba húzott szivacsdarabbal ellátott fém tetővel zártunk le.

A tenyészeteket oldalsó megvilágítású fényszobában helyeztük el, ahol a hőmérséklet $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, a fotoperiódus 16/8 óra, a fényintenzitás pedig $80 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ volt.

A bioreaktor esetében a reaktor modulok, azaz a hengerek szolgálták tenyészedenként. A reaktort 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 vízszintes tengely mentén elforduló hengerek, az alsó szinten azonos megvilágítás mellett helyeztük el a kontroll tenyészeteket tartalmazó üveg edényeket. Így biztosítani tudtuk az azonos környezeti feltételeket.

A vizsgált tulajdonságok

A tenyészetek fejlődését általában 4 hetes tenyészciklus végén értékeltük. Mértük a növények növekedésére és fejlődésére jellemző tulajdonságokat (hajtás- és gyökérszám, a hajtások és gyökerek hossza, a növények friss és száraz tömege), valamint fotoszintetikus jellemzőiket (fotoszintetikus pigment tartalom, fluoreszcencia indukciós kinetika).

Vizsgálati módszerek

A fotoszintetikus pigment tartalom meghatározásához a növények leveleiből 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.

A növények fotoszintetikus aktivitását fluoreszcencia indukciós mérésekkel határoztuk meg (Lichtentaler és Rinderle, 1988). Az indukciós görbe alakulásából következtethetünk a fotoszintetikus elektrontranszport lánc működésére. A vizsgálatokhoz Plant Efficiency Analyser (PEA) hordozható fluoreszcencia mérő készüléket (Hansatech Ltd., King's Lynn, UK) használtunk. A mérési adatokat PEA Analyser nevű számítógépes programmal (Hansatech Ltd.) értékeltük ki.

A fotoszintézis mértékének vizsgálatát hordozható infra vörös gázanalizátorral (LI-6200 típus, LI-COR Inc.) végeztük.

A növények anatómiai vizsgálatához szövettani metszeteket készítettünk és ezeket fénymikroszkópos ill. pásztázó elektronmikroszkópos felvételek segítségével értékeltük.

Az adatok statisztikai értékelése

Minden kísérletet legalább három ismétlésben végeztük, s minden ismétlésben legalább tíz mérést végeztünk kezelésenként. Az adatok statisztikai értékelését az SPSS 7.0 programmal végeztük el, és t-próbát alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

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 orientáció nem befolyásolta. A polaritást tekintve a levélváll eredetű darabok regenerációs képessége bizonyult a legjobbnak. A levélnyel- és internódium darabjai szintén képesek voltak hajtásindukcióra, egyes kezeléseknél az új hajtások száma explantátumonként 3-4 közöttinek adódott, koncentráció függést azonban itt sem tapasztaltunk. Gyökérdarabokból a hajtásregeneráció citokinin alkalmazása nélkül, csak auxint tartalmazó táptalajon is bekövetkezett, citokinin jelenlétében azonban rövidebb idő alatt több hajtás képződött.

Populus alba esetén a hajtáscsúcsból illetve nódusból történő hajtásképződés folyamatában a BAP bizonyult a leghatékonyabbnak, a legtöbb hajtás (3,8 db) 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 BAP hatását. A legtöbb hajtás kifejlődése mindkét explantátum típusnál a 0,5 mg/l koncentráció hatására következett be. 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 levélcsőcs darabok hajtásszámai. Az internódium darabokon bekövetkezett hajtásindukció mértéke mindkét hormon esetében felülmúlta a levéldarabokét. A TDZ sok apró hajtás, vagy inkább levélcsozor képződését 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.

2. A triakontanol alkalmazási lehetőségének vizsgálata kertészeti növények mikroszaporításában

Munkacsoportunk korábban már 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 triakontanolt, 2, 5, 10 ill. 20 µg/l koncentrációban adtuk a táptalajokhoz mind a szaporítás, mind a gyökereztetés fázisában.

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 a kontroll 4,22 db-hoz képest átlagosan 7,84 hajtást eredményezett explantatumonként. Gerberánál az 5 és 20 µg/l közötti tartomány egyforma hatékonyságúnak bizonyult, minden esetben 7 feletti hajtásszámot regisztráltunk. Ezzel szemben a spárga tenyészetekben már a 2 µg/l TRIA is serkentő hatást fejtett ki, és az ennél magasabb koncentráció tartományban további növekedés nem következett be. 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 $\mu\text{g/l}$) koncentráció idézte elő. A gyökerek hossza is növekedett. Gerberánál már a legalacsonyabb koncentrációban is szignifikánsan (kétszeresére) nőtt a gyökérszám, a gyökérhossz lényeges változása nélkül. A spárga tenyészetek gyökeresedését tekintve szintén a 2 $\mu\text{g/l}$ 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 a kontroll táptalajhoz képest folyamatos emelkedést mutatott a TRIA koncentráció emelkedésével párhuzamosan és maximumát a 20 $\mu\text{g/l}$ TRIA koncentrációnál érte el. A klorofill fluoreszcencia indukciós kinetika F_v/F_m értékei is folyamatosan növekedtek, és csak a legmagasabb TRIA koncentráció mellett érték el a 0,8 körüli normál értéket.

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

Kísérleti munkánk során egy új típusú bioreaktor (Revert Rotary Reactor, 3R System) működését teszteltük a szaporítási folyamat során. Vizsgálataink célja annak megállapítása volt, hogy a kiválasztott növények esetében milyen hatással jár a folyadékban történő tenyésztés, illetve, hogy az eljárás alkalmas lehet-e nagy tömegű növényanyag egységes kezelésére.

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. Ananász esetében háromszoros, *Hosta* és banán esetében is több, mint kétszeres mennyiségű hajtás fejlődött, a kontroll értékekhez képest. A csak forgatott hengerek tenyészeiben is javult a szaporodási ráta, de a kontrollhoz képest itt nem találtunk szignifikáns különbséget. A hajtások hossza jelentősen nem változott az egyes kezelésekben, 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. 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 Fv/Fm 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.

ÚJ TUDOMÁNYOS 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 hatású a tenyészetek szaporodására.
- Élettani mérésekkel alátámasztva megállapítottuk, hogy a tenyészvény 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 állapotú növényekéhez, így akklimatizálásuk is eredményesebb lehet.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. Különböző citokininek hatásának vizsgálata a hajtásképződés folyamatában

A hajtáscsúcsból indított tenyészeteket 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.

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.

A *Populus alba* "Silver" hajtáscsúcs tenyészetekben szintén a BAP bizonyult a hajtásindukciót elősegítő citokininek. 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 hajtástenyészeiben 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. A növekedésszabályzók azon koncentrációja, amely előidézi a morfogenezist, gyakran az explantátum méretétől és típusától függ (George, 1993).

A levelet ill. annak darabjait 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 előidézésére 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 előidézésében 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). 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 levélcsúcsokon. A megfigyelések arra utalnak, hogy a genotípusnak, és a növényi rész tápanyagtartalmának valamint endogén hormon tartalmának is lényeges szerepe lehet a folyamatban.

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 képződött. 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 (Pierik., 1987).

Külön ki kell emelni a TDZ alkalmazásával kapcsolatos tapasztalatainkat. 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 citokinin-t tartalmazó, esetleg hormon mentes közegre helyezni a növényeket, annak érdekében, hogy a hajtások kifejlődhessenek és továbbnevelésre alkalmassá váljanak.

Eredményeink alapot adnak mindkét növény esetében egy hatékony regenerációs rendszer kidolgozására, mely akár a tömegszaporítás, akár a genetikai manipulációs kísérletek céljaira felhasználható. A továbbiakban érdemes lenne a vizsgált citokininek koncentráció tartományát mindkét irányban tovább bővíteni, mert elképzelhető, hogy a 2-iP magasabb, a BAP és a zeatin pedig alacsonyabb koncentrációban még kedvezőbb hatást fejt ki.

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 Chibnall és munkatársai (1933) írtak le, mint a lucerna epikutikuláris viaszanyagainak alkotórészét. Azóta számos kísérletben bizonyították növényi növekedést serkentő hatását üvegházi vagy szabadföldi kultúrákon, állományban.

Munkacsoportunk korábban már 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.

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 gyökeresedést 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 hajtáscsokraiban. 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. Vagy a TRIA vagy a bomlástermékei vagy egy másodlagos messenger az, ami gyorsan mozog a növényben és befolyásolja a szénhidrát metabolizmussal kapcsolatos enzimeket és a növekedési folyamatokat (Ries és mtsai., 1977)

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 ezáltal 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.

3. Folyadék alapú tenyésztési módszer: egy új 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 annyiban tér el a jelenleg használatos, időszakos bemeztetés elvén működő rendszerektől, hogy elemei, a reaktor modulok vízszintes tengely mentén elforduló műanyag hengerek, amelyekben nem a tápfolyadék szintje változik, hanem az explantátumok emelkednek ill. 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 tenyésztésben, 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 tenyésztetek fejlődését és a növények minőségét. A legmagasabb szaporodási rátát és a legjobb minőségű hajtásokat minden növény esetében a levegőztetett folyadékban 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) vizsgálták a növények fotoszintetikus kapacitását, és hozzánk hasonlóan azt tapasztalták, hogy sem a klorofill tartalom, sem az indukciós kinetika értékei nem különböztek az agaros nevelés illetve időszakos elárasztás körülményei között.

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 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.

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.

Saját kísérleteink eredményei szerint 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, 2004a).

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, 2004b). 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 tenézcikluson 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.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Adelberg, J.. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation. (2005) Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81:359-368.
- Alvard, D., Cote, F., Teisson, C. (1993) Comparison of methods of liquid culture for banana micropropagation. Plant Cell Tis. Org.Cult. 32 : 55 - 60.
- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1
- 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.
- Chibnall, A. C., Williams, Latner, A. L., Pipes, A. H. (1933) The isolation of n-triacontanol from lucerne wax. Biochem J. 27: 1885-1888.
- 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.
- 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.
- 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 1st International Congress on Bioreactor Technology in Cell, Tissue Culture and Biomedical Applications, Tampere, Finland, 14-18 July.
- 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.

- George, E. F. (1993) Plant propagation by tissue culture. Part I.-II. Exegetics LTD.
- Huetteman, C., Preece, J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:105-119.
- 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, 1. p.: ssi S29-S85.
- 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)
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479.
- Park, Y.G., Son, H.S. (1988) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis 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.
- Ries, S. K., Wert, V. F., Sweeley C. C. (1977) Triacantanol: a new naturally occurring plant growth regulator. *Science* 195: 1339-1341.
- Tantos, Á., Mészáros, A., Kissimon, J., Horváth, G., Farkas, T. (1999) The effect of triacantanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. *Plant Cell Rep.* 19 : 88-91.
- Tantos, Á., Mészáros, A., Farkas, T., Szalai, J., Horváth, G. (2001) Triacantanol supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Rep.* 20 : 16-21.
- Tóth, E. T., Onisei, T., Amariei, D., Lazurca, D. (1991) Variability in tissue culture regenerated plants of *Atropa belladonna*. *Acta Hort* 289:269-270.
- 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.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Folyóirat cikkek

- Tantos, Á., **Mészáros, A.**, Horváth, G., Farkas, T. (1999) The effect of triacontanol on micropropagation of *Melissa officinalis* L. Plant Cell Reports, 19: 88-91.
- Tantos, Á., **Mészáros, A.**, Farkas, T., Szalai, J., Horváth, G. (2001) Triacontanol supported micropropagation of woody plants. Plant Cell Reports, 20 : 16 - 21.
- Kissimon, J., Tantos, Á., **Mészáros, A.**, Jámbor-Benczúr, E., Horváth, G. (1999) Alterations in growth parameters, pigment content and photosynthetic functions under the stress condition of in vitro culture. Z. Naturforsch. 54c. 834-839.
- Tantos, Á., **Mészáros, A.**, Farkas, T., Kissimon, J., Horváth, G., (2000) Triacontanol supported micropropagation of horticultural plants. Plant Physiol. Biochem. 38:256

Konferencia kiadványok

- Mészáros, A.** (1986) A szövettenyésztési eljárások alkalmazása a szaporítóanyag termelésben. In: Napjaink biotechnológiája, OMIKK-OMFB, Budapest, pp.43-52.
- Mészáros, A.**, Tantos, Á., Kissimon, J., Jámbor-Benczúr, E., Horváth, G. (1998) Triacontanol as a potential growth regulator in tissue cultures. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel. Book of Abstracts pp. 94.
- Kissimon, J., Tantos, Á., **Mészáros, A.**, Jámbor-Benczúr, E., Horváth, G. (1998) Alteration in photosynthetic functions under different *in vitro* culture conditions. Int. Workshop on Stress Synergism in Plants, Abiotic and Biotic Stress in Photosynthesis, 23-26. Aug. Tata, Hungary. Program and Abstracts pp.48
- Tantos, Á., **Mészáros, A.**, Farkas, T., Kissimon, J., Horváth, G., (2000) A triakontanol mint természetes növekedésszabályozó néhány kertészeti növény mikroszaporításában. Lippay János Tud. Ülésszak Közleményei pp. 178-179.
- 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.
- Mészáros, A.**, Jámbor-Benczúr, E. Fári, M.G. (2004) Micropropagation of *Hosta tokudama* in bioreactor culture. COST 843 WG3 Meeting, 8-12 September, Debrecen, Hungary. Scientific Programme and Abstracts.

- Mészáros, A.,** Domokos-Szabolcsy, É. Halász, K. Kálai, K. Fári, M.G. (2004) An efficient micropropagation system: 3R bioreactor. 5th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 12-18. September, Debrecen, Hungary. Book of Abstracts and Programme pp. 193.
- 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.

Szakkönyv részletek

- Mészáros, A.** (1987) Szövettenyésztés. In: A gerbera termesztése (szerk. di Gleria E., Tusnádi, Cs.K.) Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 101-107.
- Mészáros, A.** (1990). A növényi mikroszaporítás gyakorlata. Folia Biotechnologica (OMIKK-OMFB): pp. 1-47.
- Mészáros, A.** (1993) Gerbera. In: Dísznövények mikroszaporítása (Szerk: Jámborné, Benczúr E.) Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem jegyzetei pp. 47-50.
- Mészáros, A.** (1999) Mikroszaporítási módszerek a gyümölcs-faiskolai termesztésben. In: Gyümölcsfaiskola. (Szerk.: Hrotkó, K.) Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp.: 217-228.
- Mészáros, A.** (2004) Trópusi gyümölcsök: banán, ananász. In: Kertészeti növények mikroszaporítása. (Szerk: Jámborné, Benczúr E., Dobránszki J.) Mezőgazda Kiadó, Budapest,

Egyéb szakmai anyagok

- Mészáros, A.** (1986) Meriklón technológiák. Kézirat. Rozmaring Nyomda, Budapest
- Mészáros, A.,** Molnár, Gy. (1988) Technológiai előirat a hálózati laboratóriumok számára. Kézirat. Rozmaring Nyomda, Budapest.