

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

**Hosta fajták mikroszaporításának biológiai és technológiai
összefüggései**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szafián Zsolt

Témavezető:

Jámborné dr. Benczúr Erzsébet
egyetemi tanár

Készült a Budapesti Corvinus Egyetem
Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszékén
Budapest
2010

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Jámborné dr Benczúr Erzsébet
egyetemi tanár, mezőgazdasági tudomány kandidátusa, habil
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Dísnövénytermesztési és Dendrológiai Tanszék

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, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Dr. Tóth Magdolna
(Az iskolavezető jóváhagyása)

.....
Jámborné dr. Benczúr Erzsébet
(A témavezető jóváhagyása)

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2010. március 9-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Rimóczi Imre, DSc, Budapesti Corvinus Egyetem

Tagjai

Hrotkó Károly, DSc, Budapesti Corvinus Egyetem

Lévai Péter, PhD, Kecskeméti Főiskola

Gémesné Juhász Anikó, PhD, MTA Mg KI

Opponensek

Dobránszki Judit, CSc, Debreceni Egyetem

Mészáros Annamária, PhD, MTA Mg KI

Titkár

Honfi Péter, PhD, Budapesti Corvinus Egyetem

TARTALOMJEGYZÉK

<i>Rövidítések jegyzéke</i>	7
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
2.1. <i>A Hosta nemzetség rendszertani besorolása és botanikai leírása</i>	13
2.2. <i>A vizsgálatokban felhasznált fajták rövid leírása</i>	17
2.3. <i>A Hosták hagyományos szaporítása és felhasználása</i>	19
2.4. <i>A mikroszaporítás és szakaszai</i>	20
2.4.1. <i>Előkészítő szakasz</i>	21
2.4.1.1. <i>A Hosta sp. előkezelése, az anyanövény kiválasztása</i>	22
2.4.2 <i>A kultúra indítása</i>	22
2.4.2.1. <i>A Hosta sp. kultúrák indítása</i>	24
2.4.3. <i>Sokszorozás</i>	25
2.4.3.1. <i>A Hosta sp. sokszorozása</i>	27
2.4.4. <i>In vitro gyökeresítés</i>	28
2.4.4.1. <i>A Hosta sp. gyökeresítése</i>	29
2.4.5. <i>Akklimatizálás</i>	30
2.4.5.1. <i>A Hosta sp. akklimatizálása</i>	30
2.5. <i>A táptalaj összetétele</i>	31
2.5.1. <i>Ásványi anyagok</i>	32
2.5.2. <i>Szénhidrátok</i>	33
2.5.3. <i>Növekedésszabályozó anyagok</i>	34
2.5.4. <i>Egyéb szerves kiegészítők</i>	35
2.5.5. <i>Támasztó és gélképző anyagok</i>	36
2.5.6. <i>Gázok</i>	38
2.6. <i>Anatómiai változások a mikroszaporítás során</i>	38
2.7. <i>A tarka levelű növények és a kimérák</i>	43
2.7.1. <i>A tarka levelű növények kialakulásának okai</i>	43
2.7.2. <i>A tarka növények szaporítása</i>	55
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	61
3.1. <i>Az anyanövények származása és előkezelése</i>	61
3.2 <i>In vitro tenyészetek létesítése</i>	62
3.3. <i>Táptalajok és kiegészítők</i>	63
3.4. <i>Az in vitro tenyésztés körülményei</i>	66
3.5. <i>Az in vivo tenyésztés körülményei</i>	67
3.6. <i>Az üzemi szaporítás és nevelés körülményei</i>	67
3.7. <i>Az anatómiai vizsgálatok módszerei</i>	68
3.8. <i>Az adatok kiértékelésének módszerei</i>	69

4. EREDMÉNYEK.....	71
4.1. A kultúra indítása, fertőtlenítési eljárások vizsgálata	71
4.2. A szacharóz hatása a fajták szaporodására és a fajtaazonosságra.....	74
4.2.1. A szacharóz mennyiségének hatása a szaporodásra	75
4.2.2. A különböző cukrok hatásának vizsgálata a fajták szaporodására és állandóságára	77
4.3. A növekedésszabályzó anyagok és természetes kiegészítők hatása a <i>Hosta</i> taxonok gyökeresedésére	85
4.4. Szöveti változások a <i>Hosta</i> taxonok mikroszaporítása és akklimatizációja során	87
4.4.1. A szabadföldi növény levélszövegeinek jellemzői	87
4.4.2. Szöveti változások az in vitro kultúrában és az akklimatizáció során	89
4.4.3. Sarjdifferentiálódás in vitro kultúrában.....	92
4.4.4. Az in vitro tenyésztés során fejlődő gyökerek.....	93
4.5. Az üzemi szaporítás eredményei	95
4.6. Mikroszaporítási technológia különböző <i>Hosta</i> taxonok szaporításához.....	98
4.7. Új tudományos eredmények	101
5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	101
5.1. A mikroszaporítás eredményei	103
5.2. A különböző szénhidrátok és töménységeik hatása a fajtaazonosságra	105
5.3. Az anatómiai vizsgálatok eredményei	106
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	109
Summary.....	111
IRODALOMJEGYZÉK.....	115
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	128

Rövidítések jegyzéke

MS:	Murashige és Skoog táptalaj (1962) teljes sókoncentráció
FMS:	Murashige és Skoog táptalaj (1962) fél makroelemkoncentráció
BM:	Jámborné dr. Benczúr Erzsébet és Márta Kálmánné (1990) által kidolgozott makroelem-összetételű táptalaj
NES:	naftil-ecetsav
IVS:	indol-vajsav
IES:	indol-ecetsav
BA:	benzil-adenin
BAR:	benzil-amino-purin –ribozid
M-TOP:	meta-topolin
KIN:	kinetin
PBA:	tetrahidroprianil-benzil-adenin
2iP:	izopentenil-adenin
TDZ:	thidiazuron
AC:	aktív-szén
SEM:	scanning elektronmikroszkóp

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedek legnagyobb mértékű fejlődésén talán az évelő dísznövények termesztése ment át. A világ vezető dísznövény-előállító országaiban, pl. Hollandia, Németország, USA, fokozatosan növekedett a szabadföldi dísznövények előállításában az évelők aránya. Korábban tradicionálisan díszfa termesztőnek számító cégek kínálatában jelentek meg az évelő dísznövények, s napjainkra sok esetben meghatározókká váltak.

Hazánkban is megfigyelhetők ezek a változások, noha a világban mutató tendenciát 3-5 éves késéssel követik a magyar árutermelő kertészetek. Magyarországon az évelő növények fogalma sajátosan összemosódott, s szinte eggyé vált a sziklakerti növényekkel. A hazai piacon megjelenő évelő növények 70%-a ebből a csoportból kerül ki. A nem sziklakerti évelők előállítása néhány termesztőre korlátozódik, s ezek kínálatában is háttérbe szorulnak az árnyéki kertek kialakításában alkalmazható dísznövények.

Nyugat-Európában és az USA-ban szinte példa nélküli karriert futott be a *Hemerocallis* és a *Hosta* nemzetség. Ez utóbbi meghatározó szerepet kaphat az árnyéki kertek kialakításában. Jelenleg mintegy 4000 taxonról tudunk, de csupán 2000-t regisztráltattak (Zillis, 2000). A rengeteg fajtából mintegy 500 található meg kereskedelmi forgalomban, különösen kedveltek Angliában, Hollandiában, az USA-ban, Németországban valamint Japánban.

A hihetetlen külföldi kínálattal szemben hazánkban 4-5 alapfaj és körülbelül 20 fajta jelenti az elérhető választékot. Ezek is egymáshoz sok tulajdonságban hasonló, szerényebb díszértéket képviselő taxonok. Gyűjtőktől azonban sok új és érdekes fajta szerezhető be (Márton, 2004, Fransen, 2009).

Az árnyékliliomokat hagyományosan tavaszi tőosztással szaporítjuk, azonban az elmúlt években jelentős szerep jut a mikroszaporításnak is. A módszer előnye, hogy rövid idő alatt egy növényből igen nagy számú egyedet lehet előállítani. Hátránya viszont, hogy a tőosztáshoz képest drágább eljárás, s az így előállított növények csak bizonyos esetekben versenyképesek a

hagyományos úton előállított növényekkel. A magas árat csak az új fajtáknál, illetve hazánkban a fajták bevezetésénél lehet könnyen érvényesíteni, hiszen itt a cél a gyors felszaporítás. További hátrányt jelent a mikroszaporítás során fellépő szomaklonális mutáció illetve a kiméra tulajdonságú fajták hasadása.

Bár Európa és Amerika legnagyobb mikroszaporító laboratóriumai az elmúlt években egyre nagyobb mennyiségben állítanak elő mikroszaporított árnyékliliomokat, a mikroszaporítás technológiájára vonatkozóan kevés az irodalmi adat. Az említett nagy laboratóriumokban az előállítás részletei, a táptalaj összetétele szigorúan őrzött titkok. Magyarországon ez ideig nem volt ezen növényekre kidolgozott szaporítástechnológia.

Munkámat 1993-ban a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Dísnövénytermesztési és Dendrológiai Tanszékén kezdtem a *Hosta fortunei* 'Albopicta' fajtának a szaporításával (Szafián et al. 1995, 1996), majd további 6 taxon vizsgálatával.

Munkám célja volt a hazai évelőkínálatba bevonni néhány új, sokat ígérő *Hosta* taxont, s ezekből biztosítani a megfelelő szaporítóanyagot.

Munkám további célja volt a hazai tömegtermesztés számára a szaporítástechnológia kidolgozása, mely a kultúra indításával kezdődött s magába foglalta a szaporítási szakaszban alkalmazható, nagy hatékonyságú táptalaj-összetétel kidolgozását

Különös figyelmet fordítottam a szénforrásként szolgáló cukrok mennyiségének és fajtájának megválasztására, illetve az alkalmazott növekedés-szabályzók fajtájának, mennyiségének meghatározására.

A szaporítástechnológia kidolgozása kapcsán az alábbi problémákat kívántam megoldani:

- A sterilizálás módjának kidolgozása, steril tenyészetek létrehozása
- Indító, sokszorozó és gyökeresítő táptalajok összeállítása, különös tekintettel a
 - növekedés-szabályzó anyagok (BA, KIN, NES) hatására,
 - a szénhidrátok (szacharóz, glükóz, fruktóz) fajtájának és mennyiségének hatására
- A fajtaazonosság megőrzésének lehetőségeit megvizsgálni és a gyakorlat számára átadni.
- A kísérletbe vont taxonok tömegszaporítási technológiáját kidolgozni

Anatómiai vizsgálatok segítségével nyomon kívántam követni a mikroszaporítás során bekövetkező változásokat, melyeket más növények esetében mások is megfigyeltek és leírtak.

A szöveti felépítés vizsgálatánál célul tűztem ki:

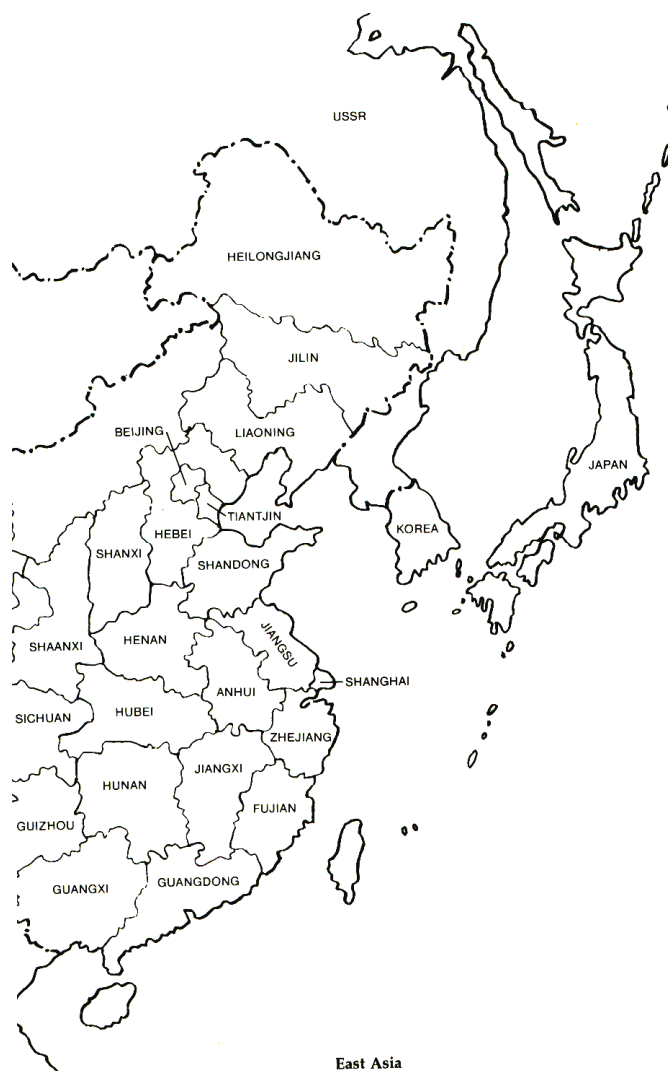
- a szabadföldön fejlődött növények szöveti felépítésének vizsgálatát, valamint összehasonlítását
- az *in vitro* fejlődött növényekre jellemző anatómiai eltérésekkel, és
- az akklimatizálódó növények szöveti szerkezetében megjelenő változásokkal.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Hosta* nemzetség rendszertani besorolása és botanikai leírása

A *Hosta* nemzetség Terpó (1987) és Borhidi (1995) szerint a zárvatermők (*Angiospermatophyta*) törzsébe, az egyszikűek (*Monocotyledonopsida*) osztályába, a liliom alkatúak (*Liliidae*) alosztályba, a liliomfélék (*Liliaceae*) családjába, azon belül az *Asphodelioideae* alcsaládba tartozik. Ezt a besorolást Mathew (1988) a *Liliaceae* Dahlgreen által végzett felosztásának alapos vizsgálatakor megváltoztatta és a *Hosta* nemzetséget az újonnan létrehozott *Hostaceae* családba helyezte. Ezzel a besorolással mások is egyetértettek (Tsvelev, 2000, Churikova, 2008). Az új család monotipikus, mindössze a *Hosta* nemzetség tartozik ide. A nemzetségben 43 faj található. Hazájuk Kelet-Ázsia, főként Japán, Korea és Kína észak-keleti része (1. ábra). Egyes kutatók azonban az embrionális jellemzők, a szerológiai és kromoszómális vizsgálatok alapján inkább az *Agavaceae* családba tartozónak vélik (Zhizn'rastanii, 1982).

Nevezéktanuk sok változáson ment keresztül, míg elérte mai formáját. A nemzetség képviselői akkor váltak ismertté a nyugati világ botanikusai számára, mikor is Engelbert Kaempfer 1712-ben publikálta *Amoenitatum exoticarum politico-physico-medicarum* c. munkáját, mely tartalmazott egy listát japán növényekről. Ezek között megtalálható volt két árnyékliliom is, a *Joskan vulgo Giboosi* és a *Giboosi altera*. Ezek a növények nem is kaptak tudományos nevet egészen 1780-ig, mikor Peter Thunberg svéd botanikus, Linné egykori tanítványa az *Aletris japonica* nevet adta az egyik fajnak. A közlés és a névadás érvényes volt, tehát az *Aletris* név az első név az árnyékliliomok számára. Négy évvel később azonban rájött, hogy a besorolása nem helytálló, és a nemzetséget áthelyezte a *Hemerocallisok* közé és a nevüket is megváltoztatta *Hemerocallisra* (Thunberg, 1784).



1. ábra A *Hosta* nemzetség elterjedési területe (Schmid 1991 nyomán)

Feltűntek a névadás szempontjából kisebb jelentőségű névváltozatok is az idők során. 1807-ben Salisbury a *Saussurea* nevet javasolta, de nem született érvényes leírás, így ez a név egy *nomen nudum*. A továbbiakban a *Saussurea* név (Candolle, 1810, Hylander, 1954) az *Asteraceae* család egyik nemzetségének nevévé vált, így minden kapcsolata megszakadt a *Hostákkal*.

1812-ben Leopold Trattnick osztrák botanikus javasolta a nemzetség számára a *Hosta* nevet, Nickolaus Thomas Host (1761-1839 botanikus és udvari orvos tiszteletére. Azonban Trattnick elnevezése érvénytelen volt, mivel léteztek már korábban érvényesen publikált homonymák: *Hosta* - Jacquin 1797 (= *Cornutia* L. 1753, *Verbenaceae*) és *Hosta* – Vellozo ex Pfeiffer 1874 (= *Horta*, Vellozo, = *Clavija*, Ruiz-Lopez et Parón, *Myrsiniaceae*).

Léteztek továbbá a hasonló hangzású *Hostia* /Moench, 1802/ (= *Crepis* L., *Asteraceae*) és a *Hostea* /Willdenow, 1797/ (= *Matalea* Aublet, *Asclepiadaceae*) nevek is. Kitérőt jelent nemzetség elnevezésében a Kurt Sprengel által adott *Funkia* név is, mely a XIX. században elterjedten volt használatban, sőt még napjainkban is feltűnik, igaz helytelenül. Ez a név igen kedvelt Németországban /Funkie/, Hollandiában és a Skandináv országokban /Funkia/ (Aden, 1990).

Az 1905-ben összeült Nemzetközi Botanikai Kongresszus (IC) úgy határozott, hogy tisztázza a *Hosta* nemzetség elnevezését és megőrzi a Trattnick által 83 évvel korábban adott *Hosta* nevet.

A nemzetséget először Salisbury osztotta fel azon tulajdonság alapján, hogy a fajok éjjel vagy nappal virágoznak, s így létrejött a *Niobe* (*Hosta plantaginea*=*Hemerocallis japonica*) és a *Bryocles* (*Hosta ventricosa*=*Bryocles ventricosa*=*Hemerocallis caerulea*) alnemzetség. Az azóta eltelt közel 200 év alatt sokan próbálták felosztani és rendszerezni az ismert fajokat, számtalan felosztás, csoportosítás és rendszer született, melyeknek ismertetése nem ennek a dolgozatnak a feladata. Itt csak a napjainkban leginkább elfogadott, Schmid (1991) által kidolgozott rendszer vázlatát adnám közre. Ez a felosztás magába foglalja a korábbi rendszereket (Bailey, 1930, Maekawa, 1940, Hylander, 1954, Fujita, 1976) valamint kisebb kiegészítéseket is tartalmaz (2. ábra).

Az árnyékliliomok hosszú életű rizómás évelők, leveleik törzszát alkotnak, spirálisan elrendeződve félgömb alakú bokrot képeznek. Néhány faj terjedő tövű (pl. *Hosta clausa*), a föld alatt messzire kinyúló sztolókat nevel. Leveleik változatos alakúak, a hosszú keskenytől a tojásdadon át a közel szív alakúig igen sokfélék, 20-60 cm hosszúak. Színük lehet zöld, kék, sárga és fajtától függően tarka. A kétivarú virágok színe a fehértől a sötétkéig változhat, gyakran a lila különböző árnyalataiban, vagy fehéren csíkozottan pompáznak. A virágok alakja is változatos, a harang alakútól a trombita formájúig terjed, hosszuk 3-10 cm. Virágképletük: $P_{3+3} \text{ v. } (3+3) A_{\underline{3+3}} G_{(3)}$. A termő a porzó fölé emelkedik, a bibeszál fonalas, megnyúlt. Termésük hengeres, három részre hasadó tok. A magok barnásak vagy feketék, kissé szárnyaltak.

2.2. A vizsgálatokban felhasznált fajták rövid leírása

Hosta 'Blue Cadet' /Nemesítő:Paul Aden, bejelentés éve: 1974/



A növény 40 cm magas, 70 cm átmérőjű bokrot nevel. Levelei kb. 13 x 10 cm nagyságúak, színük zöldeskék, szíves alakúak, felületük sima. Virágszára kb. 60 cm magas, egyenes, csupasz. Virágai közepes nagyságúak, harang alakúak, levendulakékek, a tenyészidő közepén nyílnak, fertlisek. (*Hosta x Tokudama* hibrid) (Zillis, 2000).

Hosta 'Gold Drop' /Nemesítő:Anderson, bejelentés éve: 1977/



A növény bokra 15 cm magas, 25 cm átmérőjű. Levelei 7,5 x 5 cm nagyok, sárgásak (viridescensek), szív alakúak. Virágszárjai egyenesek, fellevelei nincsenek, 40 cm hosszúak. Lila virágai közepes méretűek, harang alakúak, fertilisek, a nyár közepén nyílnak. (*Hosta venusta x Hosta 'August Moon'*) (Zillis, 2000).

Hosta 'Dew Drop' /Nemesítő: Walters Gardens, bejelentés éve: 1988/



A növény 15 cm magas, 20 cm átmérőjű. Levelei kb. 9 x 6 cm nagyok, sötétzöldek, fehér szegéllyel szegettek, szív alakúak, felületük sima. A virágszárak 35 cm hosszúak, egyenesek, fellevelek találhatók rajtuk. Virágai közepesek, harang alakúak, halvány lilák, a nyár közepén nyílnak. Másodvirágzásra hajlamos. (*Hosta 'Gold Drop'* mutáció) (Zillis, 2000).

Hosta 'Devon Green' /Nemesítő: Bowden, bejelentés éve: 1994/



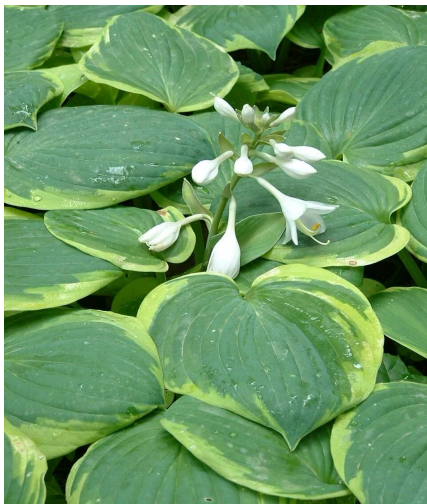
A növény közepes termetű, bokra 40 cm magas, 50 cm átmérőjű. Levelei fényesek, sötétzöldek, børszerűek. Virágszárak pirosan pettyezetek, levéltelenek. Virágai augusztus-szeptemberben nyílnak, halvány lilák. (*Hosta 'Halcyon'* sport) (Zillis, 2000).

Hosta 'Gold Haze' /Nemesítő: Schmid, bejelentés éve: 1988/



A növény a *Hosta fortunei* 'Aurea' sárga színének stabilizálását célzó nemesítés egyik eredménye. Bár a levélzete sárga színét hosszabb ideig megtartja, mint a kiidulási növény, sajnos ez is visszazöldül a tenyészidőszak végére. Bokra 50 cm magas, 60 cm átmérőjű. Levelei 30 x 20 cm nagyok, kihajtáskor sárgák, nyár végére sárgászöldek. Virágszárak 80 cm magasak, virágai halvány lilák, tölcsér alakúak, torkuk fehérrel mintázott. (*Hosta fortunei* 'Aurea' x *Hosta sieboldiana*) (Zillis, 2000).

Hosta 'Samurai' /Nemesítő: Aden, bejelentés éve: 1981/



Nagytermetű bokra akár 100 cm széles és 60 cm magas is lehet. Levelei 33 x 28 cm nagyok, szív alakúak, zöldeskékek, szélükön sárga szegéllyel. Fehér virágai augusztusban jelennek meg a 60 cm hosszú egyenes virágszárakon. Levelei kevésbé érzékenyek a napégésre. A *Hosta sieboldiana* sárga levélszélű sportja (Zillis, 2000).

2.3. A *Hosták* hagyományos szaporítása és felhasználása

A *Hosták* hagyományos szaporítása a tőosztás, melyet leggyakrabban tavasszal vagy nyár elején végeznek el. A rizómákat egy vagy több rügyes darabokra osztják szét (Nagy et al. 1988). Az egyrügyes rizóma általánosan elterjedt kereskedelmi kategória, különösen az új fajták piaci bevezetésekor. A módszer kevésbé hatékony és a hozam erősen függ az egyes fajták rügypézésének mértékétől. (Keever, 1994, Keever et al., 1995, László, 1995). Az tőosztáshoz használt tövek BA-es kezelésével növelhető a rizómán kialakuló rügyesek száma. Garner et al. (1997) beszámolnak arról, hogy a 125-4000 ppm koncentrációjú BA oldattal történő permetezés vagy a 80-120 mg/l koncentrációjú BA oldattal történő beöntözés növelte a rizómákon fejlődő rügyesek számát. Hasonló eredményre jutottunk kísérleteinkben, kimutatva, hogy az egyes fajták eltérően reagálnak a BA-nel történő kezelésre (Szafián, 2001.)

Ezeknek a szívós évelőknek sokféle kertészeti alkalmazása ismert. Mint találó magyar nevük, az árnyékliliom is mutatja, legfőbb erényük a jó árnyéktűrő képesség. Árnyékos helyen leveleik nagyobbakra nőnek, vékonyabb szövetűek. Egyes fajták azonban napos helyen is jól fejlődnek, de ekkor fokozottabb vízellátásra van szükségük. A sárga vagy tarka fajták egy részének levelei az erős napfény hatására könnyen megégnek, vesztenek díszítő értékükből. A hamvas, kék levelű fajták napsütötte helyen jobban színeződnek. Az alacsony fajtákat előszeretettel ültetik

árnyéki gyepptólként is. A természetesebb fajtaakat nagy levélzetük miatt előszeretettel alkalmazzák vízpartimitátorként kerti medencék köré ültetve. Szoliterként és edénybe ültetve is megállják helyüket. Az eltérő habitusú fajtákkal szép harmóniákat és erős kontrasztokat is ki tudunk alakítani (Lászá, 1995, Zillis, 2000)

Kertészeti alkalmazásuk mellett nem felejtkezhetünk el a virágkötészeti felhasználásukról sem. A változatos levelek kedvelté teszik őket mind a hagyományos japán ikebanában, mind az európai virágkötők körében (Aden, 1990).

Az európaiak számára szokatlan felhasználása a *Hosta montana* és *Hosta sieboldiana* fajoknak a gasztronómiai alkalmazás. Fialat hajtásait enyhén sós vízben főzve levesekbe, szószokba, különféle salátákba vagy köretként is használják. Egyes sushi féleségekben is megtalálhatók (Aden, 1990).

Gyógyászati szempontból is jelentőséggel bírnak. A hagyományos népi gyógyászatban már régóta szereplő *Hosta plantaginea var. japonica* és *Hosta longipes* fajokat vizsgálva, azok rizómáiban leukémiás és más tumoros sejtekre ható szteroid-glükózidokat találtak (Mimaki et al. 1995, 1997, Li et al., 2006).

2.4. A mikroszaporítás és szakaszai

A mikroszaporítás egy szelektált genotípusú növény különböző vegetatív szerveinek, szöveteinek illetve sejtjeinek tenyésztését jelenti steril *in vitro* körülmények között (Dudits és Heszky, 1990, Deberg és Read, 1991).

A mikroszaporítás folyamatát elsőként Murashige (1974) írta le, és osztotta három fő fázisra:

- I. Steril kultúra létrehozása
- II. A tenyészetek felszaporítása
- III. A növények előkészítése a talajba ültetéshez (elongáció) és gyökeresítése

Az első szakasz elé Debergh és Maene (1981) egy 0. szakasz beiktatását javasolja. Ennek fontosságát ma már egyre jobban belátjuk, s a bővítést jogosnak tartjuk. Dolgozatomban így a Debergh és Read (1991) által alkalmazott megfogalmazást követem.

- 0. Előkészítő szakasz
- I. Kultúra indítás
- II. Szaporítás (sokszorozás)
- III. Elongáció és gyökér indukció, *in vitro* gyökér fejlődése
- IV. Akklimatizáció

2.4.1. Előkészítő szakasz

Az előkészítő szakaszban az anyanövényeket a szabadföldinél sterilebb, üvegházi körülmények között nevelve csökkenteni lehet a növények felületén mindig előforduló szaprofita szervezetek számát. A fertőtlenítés könnyebbé tételéhez ebben a szakaszban fokozhatjuk a növényvédelmet. Általános eljárás, hogy a leveleket visszavágják. Az öntözést alulról, felszívással oldják meg (Debergh és Maene, 1981).

Sok esetben mikor a leveleket közvetlenül a fertőtlenítés előtt távolítják el, a fertőtlenítőszer a friss levélalapi sebeken át behatolnak a növények szöveteibe és ott jelentős roncsolást okozhatnak. Ezt a hatást csökkenthetjük a Jámborné (1991) által alkalmazott eljárással, melynek során a leveleket a kultúra indítása előtt 2-4 héttel eltávolítják, így a helye beszárad, a fertőtlenítőszer nem tud a seben keresztül behatolni.

Ebben a szakaszban tudjuk az anyanövények fiziológiai (élettani) állapotát megváltoztatni. Ezt elsősorban a nappalhosszúság megváltoztatásával és hőkezeléssel érhetjük el. A nappalhossz változás hatására jó példa Heide (1968) eljárása, aki *Begonia* leveleket tett *in vitro* szaporításra alkalmasabbá a megvilágítás hosszának növelésével.

Hagymás és fás szárú növények esetében az aktív nyugalmi állapotot hidegkezeléssel lehet megszüntetni. Debergh és Read (1991) fás szárú fajokat 4-5 °C-on tartva ért el kedvező

eredményeket. Ismert módszer a vesszők hajtatása is (Read és Yang, 1985, Yang és Read, 1993), vagy a hajtások benzil-adeneinnel történő permetezése (Arrillaga et al., 1991).

2.4.1.1. A *Hosta* sp. előkezelése, az anyanövény kiválasztása

Az anyanövények kiválasztásánál több szempontot is figyelembe kell vennünk. Sajnos a kereskedelemben az egyes fajták több „változata” is megtalálható, ami természetesen fajtakeveredésnek köszönhető. Az anyanövények gyakorta hajlamosak rügymutációra (sportok), s ez a tavaszi, kihajtás előtt elvégzett töosztások során nem vehető észre. Az így forgalomba kerülő növények csak a fajta nevét, jellemzőit viszont nem viszik tovább (Grenfell, 1996). Ezért az anyanövényeket a fajtára jellemző tulajdonságokat leginkább mutató fenológiai fázisban kell kiválasztani. Ez köthető egy időponthoz, hiszen vannak olyan fajták, melyek csak kihajtáskor mintázottak (*Hosta fortunei* 'Albopicta'), míg mások csak a tenyészidőszak második felében (*Hosta* 'Guacamole') (Schmid, 1991). A tarka fajták jellemzője a mintázottság mértéke is. Ezeket a szempontokat figyelembe véve kell kiválasztanunk az anyanövényeket (Zillis, 2000). Előkezelésről az irodalmi adatok nagyon keveset szólnak, a legtöbb kutató nem is alkalmazta (Papachatzi et al. 1980, Meyer, 1976). Ha nyáron végezzük a kultúra indítását, akkor a hideghatás biztosításával gyorsabbá tehetjük a sarjak megjelenését (Zillis, 1981, Falstad, 1988).

Hoover et al. (1988) és Garner et al. (1997) benzil-adenines permetezés hatékonyságáról számol be. A 4000 ppm töménységű benzil-adenin oldattal történő permetezés hatására az anyanövényeken fejlődő sarjak száma az átlagos 0,2-ről 4,7-re emelkedett.

A *Hosta fortunei* 'Albopicta' fajta esetében nem volt szükség előkezelésre, a növények nyugalmi állapotát a természetes hideghatás biztosította a tél folyamán (Szafián et al. 1995).

2.4.2 A kultúra indítása

Az indító szakasz célja a steril kultúra létrehozása. Ennek első lépése, a kiválasztott növényi részek előáztatása, mosása. Az explantátumként használt növényi részek nagyon változatosak

lehetnek. Elméletileg - a totipotencia elve alapján - egy növény bármely szerve, sejtje használható lehet, de a gyakorlatban inkább olyan részt választanak, mely merisztematikus szövetét tartalmaz, vagy hajlamos merisztéma differenciálására. Ezek legtöbbször a csúcs- vagy a hónaljrügyek. Alkalmazhatók a levelek vagy levéldarabok is pl. *Anthurium* ssp. (Pierik és Steegmans, 1976), *Petunia* ssp. (Economou és Read, 1982), *Ficus lyrata* (Debergh és De Wael, 1977). Egyes esetekben a virág vagy virágzat részei, pl. fészektányér darabok – *Gerbera* ssp. (Pierik et al., 1975) vagy virágkocsány – *Saintpaulia* (Molgaard és Roulund, 1991). Hagymás és gumós növényeknél leggyakrabban a hagymát vagy a gumót használjuk kiindulási anyagként (Matsuo et al., 1989, Jámborné, 1993).

Előáztatáshoz gombaölőszerek kis koncentrációjú oldatait használjuk, vagy tiszta vizet. Mosáshoz folyó csapvizet és felületfeszültség-csökkentő anyagokat, rendszerint Tween 20-at vagy Tween 80-at alkalmazunk.

Mosás után a fertőtlenítéshez különböző fertőtlenítőszereket, általában Na-hipokloritot (Hypo, Clorox), Ca-hipokloritot (klórmész) (Jámborné, 1986), etil-alkoholt, hidrogén-peroxidot, ezüst-nitrátot, higany-kloridot használhatunk. Egyes humán célra kifejlesztett fertőtlenítőszereket is kipróbáltak már tenyészetek indításánál pl. Predentál, Dodessept (Végvári, 1996).

2.4.2.1. A *Hosta* sp. kultúrák indítása

A *Hosta* sp. mikroszaporításáról először 1976-ban jelentek meg közlemények (Hammer, 1976, Meyer 1976). Ekkor és egészen az 1980-as évek elejéig a kiindulási alapanyagot a levéldarabok, virágszárdarabok, illetve éretlen bimbók jelentették (Papachatzi et al., 1980). Ezekből a növényi részekből kalluszt indukáltak 0,1 mg/l BA és 10 mg/l NES tartalmú táptalajon, majd a kalluszsejteket 0,01 mg/l NES-t és 5 mg/l BA-t tartalmazó táptalajon növényekké regenerálták. A módszer azonban nem felel meg a különböző kiméra eredetű, tarka levelű fajták szaporítására. 1981-ben Papachatzi és munkatársai a *Hosta decorata* 'Thomas Hogg' szaporításánál alkalmazta a növényházban nevelt növények hajtáscsúcsát. A szaporítás során mind oldalhajtások (axiláris hajtások), mind adventív hajtások képződését megfigyelték. A kultúrában tartás hosszabbá válásával párhuzamosan a keletkező hajtások egyre inkább elvesztették tarkaságukat, noha ez a tulajdonság igen fontos jellemzője a fajtának. Az oldalhajtások 80%-a azonban 12 hetes hidegkezelés után visszanyerte tarkaságát. Ezt a járulékos rügyekből fejlődött hajtások esetében nem tapasztalták vagy csak csekély mértékben.

Később a *Hosta* tenyészetek létrehozásánál felhasználták a rhizómán található rügyeket is (Papachatzi et al., 1981, Leifert et al. 1992 a,b). Lubomski (1989b) a növények levéldarabjaiból is sikeresen hozott létre tenyészetet. Hill és munkatársai (1989) *Hosta sieboldiana* tenyészeteket indítottak, melyhez a növény fiatal virágbimbóiból preparáltak ki fellelő darabokat, valamint felhasználták a virágkocsány- és levéllemez-darabokat is. A legnagyobb mértékű kalluszfejlődést a 5,4 mM/l NES-t és 4,4 mM BA-t tartalmazó táptalajon tapasztalták.

Williams és munkatársai (1998) *Hosta* 'Golden Scepter' *in vitro* szaporíthatóságát vizsgálták. A tenyészetek indításához éretlen termőt használtak. A termőket kettévágva 2,5 mM NES-t és 10mM BA-t tartalmazó táptalajra helyezték. A képződött kalluszból később növényeket tudtak regenerálni. (Williams et al., 1998).

Hiroyuki és Masaru (2002) *Hosta sieboldiana* virágkocsány darabokat és fiatal bimbókat használt fel tenyészeinek létrehozásához. A kalluszképződéshez NES-t, 2,4-D-t és BA-t vagy TDZ-t tartalmazó táptalajokat használtak. Két hónap elteltével az inokulomokból kalluszképződést tapasztaltak.

A fertőtlenítésre általában NaOCl 0,5%-os oldatát használták, mellyel 30-70 %-os sterilitást értek el. A virágzárakat és bimbókat könnyebb fertőtleníteni, míg a rhizómákon található rügyeket nehezebb, hiszen itt a talajszemcsékhez tapadó mikroorganizmusokat nehezebb eltávolítani a rügypikkelyek közül. Eredményesen használható a HgCl₂ 0,5 %-os oldata is (Szafián et al. 1995).

2.4.3. Sokszorozás

Ennek a szakasznak a célja a steril tenyészetek felszaporítása, kívánt mennyiségű sarjhajtás elérése. A mikroszaporításban alkalmazott eljárások alapvetően 3 eljárás változatainak tekinthetők (Dudits és Heszky, 1990):

- Hajtástenyészetek
- Járulékos szervtenyészetek
- Szomatikus embriogenezis

Hajtástenyészetek

A mikroszaporítás leggyakrabban használt eljárása, mely során az *in vitro* fejlődött hajtások és azok oldalhajtásainak oldalrügyet is tartalmazó darabjait vagy merisztémáit használjuk fel a továbbszaporításra. Noha ez az eljárás a másik két módszerhez képest lassúbb, mégis ez a genetikai egységességet legbiztonságosabban megőrző eljárás (Dudits és Heszky, 1990). Vannak olyan növények, melyek esetében ez az egyetlen bevált módszer. Ilyen a fás szárú növények többsége, ahol a kalluszból történő regeneráció vagy a szomatikus embriogenezis kevésbé járható út (Terres,

1988). Hajtástenyészetek létrehozása különböző dísznövényeknél is alkalmas módszer a tömeges mértetű szaporítóanyag előállítására is (Pierik 1987.).

Járulékos szervtenyészetek

Eme eljárás alkalmazásánál a növényi szöveteken járulékos szervek (hajtások, gumók, hagymák) jelennek meg (organogenezis).

Az organogenezis a növények regenerálásának leggyakrabban használt módja, melynek során a növény izolált szövetekből és különböző szervekből is regeneráltatható (Dudits és Heszky, 1990.)

Szomatikus embriogenezis

A szövettenyésztés során az utóbbi években egyre több növényfaj esetében kidolgozásra került eljárás, melynek során a tenyésztett sejtekből csíráképes embriók fejlődnek (Dudits és Heszky, 1990). Elsősorban rázatott és folyékony tenyészetekben, és az erre a célra kifejlesztett 'bioreaktorokban' állítják elő az embriók sokaságát, melyekből *in vitro* körülmények között fejlődnek a növények. A kiindulási anyag valamely szövetből nyert kalluszsejt.

A sokszorozási szakasz fontos leíró paramétere a szaporodási ráta. Ezt nagymértékben befolyásolják az alkalmazott szénhidrátforrások (összetétel és mennyiség), a citokininek koncentrációja és fajtája, valamint a szubkultúrák száma.

Az adott eljárások közül sok esetben nem a legnagyobb szaporodási rátát nyújtót kell alkalmazni, mert esetleg a szaporítás vagy a nevelés további szakaszaiban az rendellenességet okozhat (Debergh és Read, 1991, Jámborné, 1991, Ranillach et al.,1987).

2.4.3.1. A *Hosta* sp. sokszorozása

Kalluszból regeneráltak növényeket (Meyer, 1976, Hammer, 1976) 0,01 mg/l NES-t és 5 mg/l BA-t tartalmazó táptalajon. A kapott sarjakat ezután ugyanezen a táptalajon szaporították tovább. Papachatzi et al. (1981) valamint Leifert (1992b) sokszorozás céljából a virágszár darabokból kapott kalluszból regenerált növényeket 3,6 mMBA és 0,54 mM NES tartalmú táptalajra helyezték. Papachatzi (1980) 0,01 mg/l NES és 5 mg/l BA-t tartalmazó MS táptalajon sokszorozta a *Hosta plantaginea* hajtástenyészetét. Meyer (1980) a *Hosta sieboldiana* 'Helen Doreo' és 'Frances Williams' fajták esetében is MS alaptáptalajt alkalmazott 0,5 mg/l NES és 0,1 mg/l BA kiegészítéssel.

Lubomski (1989b) a bimbókból, virágszárból és levéllemezből regenerálódott hajtásokat 2iP, BA, KIN, IES és IVS tartalmú táptalajokon nevelve úgy találta, hogy a BA és az IES a leghatásosabb növekedésszabályzó ezen növényfaj esetében. A rügyekből kapott hajtások sokszorozásánál a 0,1 mg/l NES-t és 4 mg/l BA-t tartalmazó folyékony táptalaj biztosította a legnagyobb szaporodási rátát (5,3 hajtás/explantátum), de ekkor fellépett a vitrifikáció jelensége. Ennek elkerülése érdekében a 0,1 mg/l NES és 6 mg/l BA tartalmú szilárd táptalajt javasolja, bár ezen kisebb a szaporodási ráta (4,6 hajtás/explantátum). A kinetin gyengébb hatásának, míg a 2iP majdnem hatástalannak bizonyult a szaporítás során.

Miller és Wilson (1981) különböző növényi részekből indított tenyészeteket és sikeresen hajtott végre protoplaszt fúziót, több taxon esetében.

Szafián et al. (1995, 1996) a *Hosta fortunei* 'Albopicta' szaporítása során azt tapasztalta, hogy mind a KIN mind a BA hatással van a fajta szaporodására 2-6 mg/l koncentrációban alkalmazva. A BA hatása erőteljesebb mint a KIN-é.

Williams és munkatársai 1998-ban a *Hosta* 'Golden Scepter' szaporításának felszaporítási szakaszát vizsgálva azt találták, hogy a legtöbb sarjat a 2,5 mM NES-t és 30 mM BA-t tartalmazó táptalajon sikerült nevelniük.

Hiroyuki és Masaru (2002) a folyékony táptalajon nevelt kalluszcsonókat szilárd táptalajra helyezték. A legjobb eredményt a 0,1 mg/l NES-t és 5 mg/l TDZ-t tartalmazó táptalajon érték el. Kísérleteikben a BA adagolása nem vezetett eredményre.

A kalluszból történő regeneráltatás káros a növények genetikai stabilitására. Ezt a tényrt tapasztalta Meyer (1980) a *Hosta sieboldiana* 'Frances Williams' szaporításánál, mely során a kapott utódok 45%-a maradt tarka, 45%-a tiszta sárga és 10%-a tiszta zöld levélzetű lett. Ezt a jelenséget más növényeknél is megfigyelték, pl. *Hydrangea* (Stoltz, 1984), *Cordyline* (Samyn, 1995) esetében.

A genetikai változás azonban nem csupán a kallusz állapotnak köszönhető. A tenyésztés során az oldalhajtások fejlődése mellett adventív hajtások is megjelennek. Ezeknek az eredetét sokszor nem lehet tisztázni. A kimérák esetében az adventív hajtások más genetikai információval rendelkeznek mint az oldalhajtások, így a belőlük fejlődő növények is eltérőek lesznek. Papachatzis et al. (1981) a *Hosta decorata* 'Thomas Hogg' fajta szaporításánál tapasztalta, hogy a kapott növények mintegy 10%-a elvesztette tarkaságát.

2.4.4. *In vitro* gyökeresítés

Ide tartozik a sokszorozó szakaszban előállított hajtások meggyökeresítése. A gyökeresítést megelőzheti az elongációnak nevezett szakasz, melyben a túlságosan rövid szártagú hajtások ízközeinek „megnyújtását” végezzük. Erre csak azoknál a növényeknél van szükség, ahol ezek a rövid szártagú hajtások nem alkalmasak a meggyökeresítésre. A szakaszban előállított növények számszaki paraméterei mellett (gyökérszám, gyökérhossz) nagyon fontosak a minőségi paraméterek is. A kapott gyökerek hajszálgyökereinek száma, minősége nagymértékben befolyásolja a növények akklimatizáció alatti és utáni fejlődését. A szilárd táptalajon általában kisebb hajszálgyökereket fejlesztenek, mint a folyékony táptalajokon (Terres, 1988).

Mivel a gyökeresítés egy újabb átrakást és más táptalajt igényel, így az előállítási költségek 35-50 %-át is jelentheti (Debergh és Maene, 1981). A gyökeresítő táptalajok általában csökkentett

makro- és mikroelem koncentrációjúak, sok esetben még auxinokat sem tartalmaznak. A szerves kiegészítők (aminosavak, vitaminok) fajoként serkenthetik vagy éppen gátolhatják a gyökeresedést (Kamada és Harada, 1979).

A gyökereztető szakaszt megkérdőjelezi néhány kutató, akik azt tapasztalták, hogy az *in vitro* képződött gyökerek az akklimatizálás során elpusztulnak, illetve funkcióképtelenné válnak (McClelland, 1989).

A gyökeresítő táptalajra helyezés költségét csökkentendő, többen próbálkoztak e szakasz kihagyásával és a kapott hajtások mikrodugványként való kezelésével és *ex vitro* gyökeresítésével (Mc Comb és Newton, 1981; Zimmermann és Fordham, 1985).

2.4.4.1. A *Hosta* sp. gyökeresítése

A kalluszból regenerált hajtások gyökeresítésére Meyer (1976) NES tartalmú MS táptalajt alkalmazott sikerrel. Hasonlóan járt el Hammer (1976) is, aki szintén adagolt NES-t a gyökereztető táptalajhoz. Papachatzis és munkatársai a kalluszból regenerált *Hosta plantaginea* 'Grandiflora' hajtásai (1980) esetében azt tapasztalták, hogy a hajtások hormonmentes MS táptalajon jól meggyökeresednek. 1981-ben a *Hosta decorata* 'Thomas Hogg' fajta esetében a hajtásokat hormonmentes, 0.01, 0.1 és 1 mg/l NES tartalmú táptalajra helyezve a gyökeresedést vizsgálták. A hormonmentes táptalajon normális megjelenésű, hosszú gyökerek fejlődtek, hasonlóan a 0.01 mg/l NES-t tartalmazó táptalajhoz. A 0.1 NES tartalmú táptalaj esetében azonban a gyökérszám hirtelen növekedését tapasztalták. A táptalajhoz adagolt 1 mg/l NES azonban a gyökérszámot csökkentette, a fejlődött gyökerek rövidek és vastagok voltak, és egy köztes kalluszcseppel kapcsolódtak a hajtások alapi részéhez.

Hill és munkatársai (1989) szintén hormonmentes táptalajt ajánl. Kedvező hatású a táptalajhoz adott adenin-szulfát.

Leifert és munkatársai (1992a) a szaporítás során a táptalajhoz adott antibiotikumok hatását vizsgálták a gyökeresedésre. Megállapították, hogy míg az antibiotikumok a szaporodási rátát

erőteljesen csökkentették, addig a gyökeresedésre nem voltak hatással. Lubomski (1989a) szintén arra a következtetésre jutott, hogy a hajtások jól gyökeresednek hormonmentes táptalajon, de 0.1 mg/l NES hozzáadásával ez serkenthető.

Hosta 'Golden Scepter' sarjainak gyökeresítésére Williams és munkatársai (1998) 20mM IVS-t tartalmazó MS táptalajt használtak.

Hormonmentes táptalajt ajánl Hiroyuki és Masaru (2002) és Gollagunta et. al. is (2004).

2.4.5. Akklimatizálás

Az akklimatizálás a mikroszaporításból származó gyökeres növények, vagy gyökér nélküli mikrodugványok üvegházi, majd szabadföldi körülményekhez való szoktatását jelenti. A mikrodugványok esetében a kiültetéskor a dugványok alapi részét kezelhetjük auxintartalmú oldatokkal, vagy porokkal, s egyes fajok esetében így jó eredményeket érhetünk el (Bailey et al. 1986). Az akklimatizálást általában üvegházban, párafüggöny alatt, vagy fóliaalagutakban végzik. A növényeket fokozatosan szoktatva hozzá a csökkenő páratartalomhoz, egyre hosszabb ideig szellőztetnek vagy szakítják meg a párásítást. Az árnyékolás csökkentésével a növényeket fokozatosan kell hozzászoktatni a fényhez. A szabadföldi körülményekhez való szoktatást az üvegházból kikerült növények magas árnyékoló alá helyezésével érhetjük el. (Preece és Sutter, 1991).

2.4.5.1. A *Hosta* sp. akklimatizálása

Több szerző egybehangzó állítása szerint a *Hosta* taxonok akklimatizálása során nem tapasztaltak nehézségeket (Lubomski 1989a, Zillis, 1981, Mándy et al., 2000). A hajtások jól fejlődnek tőzeg:perlit, vagy talaj:tőzeg:perlit esetleg tőzeg:kavics azonos arányú keverékében. Hill et al. (1989) valamint Hiroyuki és Masaru (2002) vermikulitot ajánl az akklimatizáláshoz. Az

akklimatizálás általában 10 napot vesz igénybe, eredményessége 94-100%. Ezzel egybehangzó megállapítást tett Szafián et al. (1996).

Az akklimatizálás nagymértékben függ az egyes fajták tulajdonságaitól. Mándy et al. (2000) biokémiai módszerekkel követték nyomon 5 *Hosta* fajta akklimatizációjának folyamatát. Az akklimatizáció előtt hormonmentes táptalajon neveltük a növényeket és a kiültetés előtt mintát vettünk a leveleikből. Az akklimatizáció során még 4 időpontban vettünk mintákat. A levélminták peroxidáz aktivitását izoelektromos fókuszálással mértük pH 3-9 tartományban, PhatSystem rendszerrel. A 'Blue Cadet' fajta peroxidáz aktivitása folyamatosan csökken az akklimatizáció során, míg a 'Dew Drop' és 'Gold Drop' fajtánál az akklimatizáció elején csökken majd a harmadik mintavételi időpontban ismét emelkedik. Ez azt mutatja, hogy az akklimatizálás folyamatát lassítani kell, hosszabb időt adva az egyes fázisoknak (szellőztetés, fényhez szoktatás). A 'Samurai' fajta levéllemeze vastag, kutikulája viaszos. Ez megmutatkozik a peroxidáz szintek alakulásában is. Az akklimatizáció elején ugyan kis mértékben emelkedett a peroxidáz szint, de a továbbiakban ez fokozatosan csökkent. Ez is mutatja, hogy a fajta jól akklimatizálható, s a szabadföldi körülmények között is ellenálló.

2.5. A táptalaj összetétele

A táptalajok feladata, hogy az *in vitro* fejlődő sejteket, szöveteket vagy szerveket ellássa a fejlődésükhöz szükséges tápanyagokkal. Az egyes növényfajták speciális igényeket mutathatnak a táptalajok összetevőivel szemben, de ugyanazon növény is változtatja igényeit a szaporítás fázisai során. Ennek ellenére elmondható, hogy a táptalajok az alábbi összetevőket tartalmazzák.

2.5.1. Ásványi anyagok

Az ásványi anyagokat besorolhatjuk a makroelemek (N, K, P, Ca, S, Mg) vagy a mikroelemek (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, Ni, Na, Cl) közé. A felsorolt elemeket esszenciális elemeknek is nevezik. A Co és az Al szükségességéről megoszlanak a vélemények. Az általunk használt MS és BM táptalajok tartalmazzák a Co-t, míg Al-t nem. (Jámborné és Márta K.-né, 1990.)

A szükséges ionokat az elemek vízben jól oldódó sóinak adagolásával biztosítjuk, de nem feledkezhetünk el a szilárdító anyagoknak (agar, zselatin) a víznek és maguknak a vegyszereknek a makro- és mikroelem-szennyezettségéről sem.

Érdekes, sokak által alátámasztott megfigyelés, hogy a különböző agarok másként hatnak, még azonos körülmények között is az adott kultúrákra (Singha et al. 1985, Davis et al. 1977). Általunk is tapasztalt jelenség, hogy a tisztítatlan, szálas agar használatakor kevésbé lép fel a vitrifikáció (hiperhidratáció) jelensége, valamint a tenyészetek állapota jobb lesz. Ez nehezen mérhető, számszerűsíthető jellemző, inkább csak vizuális megfigyelés (Debergh, 1983).

A fenti jelenség is hozzájárul ahhoz, hogy a kísérletekben kapott eredmények nem mindig ismételhetők meg más laboratóriumokban az adott eredményekkel. A víz szennyezettségét desztillálással, vagy különösen fontos kísérletekben kétszeres desztillálással távolíthatjuk el.

Az elkészült táptalaj azonban minden igyekezetünk ellenére sem lesz állandó. A növények felvesznek belőle ionokat, s ugyanakkor különféle szerves anyagokat választanak ki bele (pl. polifenolok). A táptalaj a változások következtében nem marad homogén, az ásványi anyagok nem egyenletes eloszlását mutatta ki Debergh és Maene (1981).

2.5.2. Szénhidrátok

A korábbi kutatásokkal szemben, melyek csak néhány sejttenyészet autotrófiáját bizonyították az *in vitro* tenyésztés során, az újabb kutatások beszámolnak autotróf tenyészetekről is (Kozai 1989, 1991, Chandler et al. 1972).

Normál körülmények között azonban mind a sejt-, mind a szövet- és szervtenyészetek táptalajához szénhidrátokat is adagolnak. A szacharóz a legáltalánosabban használt szénforrás, de találkozhatunk fruktóz, glükóz és sorbitol alkalmazásával is (Gautheret 1945). Mivel a glükóz jóval drágább, mint a szacharóz, s csupán néhány tenyészet esetében mutatható ki a szacharóznál kedvezőbb hatása, használata csak különleges esetekben indokolt. A fruktózzal is közöltek olyan adatokat, melyek szerint egyes kultúrákban jobbnak bizonyult mind a szacharóznál, mind a glükóznál. Így például néhány orchidea magvetésénél a fruktóz jobb, mint a glükóz (Ernst 1967). A szacharózt fruktózzal helyettesítve a levél- és hajtásnövekedés kedvezőbbé vált a *Castanea crenata* tenyészteiben, sőt ilyen táptalajon még idős növényekről is sikerült a kultúra indítása (Chavin és Salesses, 1988).

Autoklávozás során a szacharóz fruktózzal és glükózzal hidrolizál (Ball 1953). Ezért joggal vetődik fel a kérdés, ugyanolyan-e a hatása a szacharóz helyett adagolt fruktóz-glükóz keveréknek, mint a szacharóznak. Az eredmények ellentmondóak. Jeffs és Northcote (1967) úgy találta, hogy a *Phaseolus* kalluszkultúrában nem lehet a szacharózt helyettesíteni a fenti keverékkel, míg Kromer és Kukulczanka (1985) *Canna indica* merisztémacsúcsának tenyésztésénél nagyobb túlélési százalékot tapasztalt 25 g/l glükóz és 5 g/l fruktóz keverékénél, mint 30 g/l szacharóz alkalmazásakor. Hasonló jelenséget tapasztalt Pierik et al. (1988) *Phapiopedilum* magvetésnél.

Az irodalomban találunk beszámolót arról, hogy egyes kiméra eredetű fajták mikroszaporítása során a kiméra jelleg megőrzését a táptalajhoz adott szénhidrátok koncentrációja nagymértékben befolyásolja. Samyn, (1995) a *Cordyline fruticosa* 'Rosa' mikroszaporítása során vizsgálta a táptalajhoz adott szacharóz mennyiségének hatását a fajtaazonosságra. Úgy tapasztalta,

hogy a magasabb szacharóztartalom ugyan csökkenti a szaporodási rátát, de a kapott utódok között nagyobb számban találhatók meg a fajtára jellemző mintázatot mutató egyedek.

Kísérleteinkben vizsgáltuk mind a szacharóz, mind a glükóz és fruktóz különböző koncentrációjának hatását a *Hosta* taxonok növekedésére.(Szafián et al., 1998a., 1998b.).

2.5.3. Növekedésszabályozó anyagok

Az *in vitro* tenyésztés kulcsfontosságú elemei a növekedésszabályozó anyagok. Ezek részben a növényben természetes módon megtalálhatók, részben ezen vegyületek szintetikusan előállított analógjai. Fő csoportjaik az auxinok, a citokininek, a gibberellinek és az abszcizinsav. Ezek közül, szintetikus úton előállított vegyületekkel nem sikerült kiváltani az abszcizinsavat és egyes gibberellinsavakat (George et al. 1988).

A növények sejtekből, szövetekből történő regenerálására irányuló korai kísérletek mindaddig nem vezettek sikerre, míg ezeket a növekedésszabályozó anyagokat nem adták a táptalajhoz. A kutatások felgyorsulásához nagymértékben hozzájárultak Skoog és Miller (1957) kísérletei.

Az alkalmazott koncentrációk és kombinációk száma szinte végeláthatatlan. Növényfajtól, fajtától, sőt az adott szövet állapotától is függ, hogy éppen melyik kombináció a legmegfelelőbb. A kiválasztásuk néhány törvényszerűség figyelembevételével általában próbálkozások hosszú sorával történik meg. Az alkalmazott koncentráció megválasztásakor figyelembe kell venni azt is, hogy ezek a növekedésszabályozók az autoklávozás és a táptalaj tárolása során milyen mértékben bomlanak le (Nissen és Sutter, 1991).

A közelmúltban előtérbe kerültek a különböző növekedésgátló anyagok alkalmazásai is. Hatásuk általában a vitrifikáció mértékének a csökkentése, valamint a levélnövekedés csökkentése, a hajtásszám növelése folyékony kultúráknál. Leggyakrabban alkalmazott képviselőik az ancymidol

és a paclobutrazol (Ziv 1989, Ziv és Ariel 1991). A gyökeresítő táptalajhoz adott paclobutrazol segíti a növények kiültetését követő akklimatizációt.

2.5.4. Egyéb szerves kiegészítők

Főként a korai kutatások során alkalmazott táptalajok nagyon sok meghatároz(hat)atlan összetételű kiegészítőt tartalmaznak. Ilyenek voltak a gyümölcslevek, a növényi kivonatok és könnyezési nedvek, a kókusztej, az élesztőkivonat vagy a banánpép. Ezek mindegyike különböző vitaminok és szerves savak keverékét tartalmazza, amelyek normális körülmények között a növényben szintetizálódnak. A későbbiek során részben azonosították összetevőiket és ezeket külön-külön is a táptalajhoz adagolták. Az összetevők az alábbiak szerint csoportosíthatók:

2.5.4.1. Vitaminok

A vitaminok kis mennyiségben minden élő szervezet, így a növények számára is létfontosságúak. A különbség az, hogy a növények ezeknek a vitaminoknak a szintézisére is képesek. Az *in vitro* tenyésztett sejtekben, szövetekben azonban hiánytünetek alakulhatnak ki, túlélésüket javítani tudjuk vitaminok adagolásával. A leggyakrabban használt vitaminok a thiamin (B1), a nikotinsav (niacin), pyridoxin (B6) és a myo-Inositol. A thiamin adagolásának előnyeit szinte egy időben fedezte fel Bonner (1937), Robbins és Bartley (1937) valamint White (1937). A nikotinsav és a pyridoxin alkalmazásáról Bonner (1940), Gautheret (1942) és White (1943) írt, miután Bonner és Devirian (1939) úgy találta, hogy a nikotinsav adagolása paradicsom gyökértenyészetéhez elősegíti annak növekedését. Ez a négy vitamin bekerült a MS táptalajba is (Murashige és Skoog, 1962) és széles körben alkalmazták és alkalmazzák a mai napig. Később több kutató is bizonyította, hogy nem minden kultúra igényli mind a négy vitamin jelenlétét, de vannak olyan tenyészetek is melyek az MS-vitaminban lévénél nagyobb mennyiségben igénylik azokat. Linsmayer és Skoog (1965) szisztematikus vizsgálatai alapján javasolták a nikotinsav és a pyridoxin kihagyását, ugyanekkor a tiamin mennyiségének négyszeresére emelését.

2.5.4.2. Aminosavak

Sok táptalajrecept tartalmaz valamilyen aminosavat vagy azok keverékét. Ezekkel fedezhetjük a növények redukált N-igényét, de mivel ezek drágák, a tömegszaporításban alkalmazásuk elsősorban ott célszerű, ahol bizonyítottan növelik az előállítható növények mennyiségét vagy javítják azok minőségét. A legnagyobb mértékben alkalmazott aminosav a glicin, de gyakran találkozunk glutamin, aszpargin és cisztein adagolásával is (George et al. 1988). A glicint általában 2 mg/l koncentrációban alkalmazzák (Linsmayer és Skoog 1965). A glicin mellett gyakran használják a citokinin-aktivitással is bíró adenin-szulfátot. Az adenin és származékai gyorsítják a fejlődés ütemét (Nwankwo és Krikorian, 1983) kinetin vagy BA jelenlétében.

Ezeknek a nitrogénkiegészítéseknek akkor van jelentőségük, ha a táptalajban a szerves nitrogénforrások relatív hiánya jelentkezik, s ez különösen igaz az ammóniumion hiányára. Ha mind a NO_3^- , mind a NH_4^+ ionok megfelelő mennyiségben jelen vannak a közegben, a szerves nitrogénkiegészítők hatásossága a fenti két nitrogénforma arányától függ (Grimes és Hodges 1990). A gyakran alkalmazott kazein-hidrolizátumban és az élesztőkivonatban a bennük található fehérjék savak vagy enzimek hatására kisebb darabokra bomlottak. Ezek a komplex keverékek tartalmazzák a legfontosabb aminosavakat, vitaminokat és ionokat a növények által könnyen felvehető formában. Előnyük, hogy sokkal olcsóbbak, mint a tisztított aminosavak. Emellett fontos Ca, P és mikroelem források is lehetnek (George et al. 1988).

2.5.5. Támasztó és gélképző anyagok

2.5.5.1. Mechanikai támasztóanyagok

Külön kell választani a kultúrákat az alkalmazott támasztóanyagok szerint. Lehet, hogy egyáltalán nem alkalmazunk semmiféle „támrendszert”, ilyenek a folyékony kultúrák (rázatott, forgatott kultúrák). De nem minden folyékony táptalajú kultúra nélkülözi a támasztórendszereket. Heller és Gautheret (1949a) beszámol a tenyészetek megtámasztására alkalmazott zúzott bőr-

szilikátüvegről és üvegszövetről szerzett tapasztalataikról. Ezeket az anyagokat a későbbiekben nem használták, mert jelentős mikroelemszennyezés forrásai voltak (bór). Később (1949b) megfelelő megoldást találtak: szűrőpapírból készült korongokon nevelték a kalluszkultúrákat, melyek így nem süllyedtek a tápoldatba, csak állandóan nedves körülmények között fejlődtek. Ezzel a módszerrel még az olyan kicsiny merisztémacsúcsok is sikeresen nevelhetővé váltak, melyek azelőtt a rázatott vagy forgatott kultúrákban megsemmisültek.

Azt, hogy az egyes kultúrák hol fejlődnek jobban, papírhídon vagy agaron, többen vizsgálták. Davis et al. (1977) beszámol róla, hogy a szegfű hajtáscsúcsai kevésbé fejlődnek papírhídon, mint 0,6%-os agargélen, de a *Protea (Leucospermum)* oldalrügyei nem maradtak életben agaron, ellentétben a szűrőpapírhídon neveltekkel, azonban 3-4 hónap után áthelyezhetőek voltak agarra. Hosszabb nevelés a szűrőpapíron vitrifikációt okozott. Látható, hogy a különböző növénykultúrák másként reagálnak a folyékony kultúrában való nevelésre.

Más porózus anyagokat is kipróbáltak kultúrák nevelésére. Tanaka et al. (1991) különféle növényeket nevelt Grodan közetgyapot kockában. Chang (1978) 3 mm vastag poliészter szövetet használt duglászfenyő kultúráknál. Mindkét módszer előnye, hogy a kultúrák zavarása nélkül lehet a tápközeget cserélni. Napjainkban a tömegszaporításban is megjelentek az olyan féligáteresztő membránokat tartalmazó rácsok, melyek úsznak a folyékony táptalaj felszínén, s így a kultúrák nem süllyednek a tápoldatba, csupán érintkeznek vele. Ezáltal jobb a tenyészetek oxigénellátása, s az agar sem jelent semmiféle akadályt a növekedéssel szemben (George et al. 1988).

2.5.5.2. Gélképző anyagok

A másik lehetőség, hogy a tápoldatokat gélesítő anyagokkal gélekké alakítjuk. A különböző agar márkák azonban eltérő minőségűek, s ezzel sokszor megmagyarázható a különböző laboratóriumok által megismételt kísérletek eltérő eredményei (Debergh 1983). Több szerző beszámol a kultúrák különböző növekedéséről az eltérő tisztaságú agargéleken (Singha et al. 1985, Davis et al. 1977, Romberger és Tabor 1971).

Az alkalmazott agar mennyisége is nagymértékben hozzájárul a kultúrák fejlődéséhez. Túl kevés agar (<0,7%) nem elég a megfelelő szilárdságú gél kialakításához, és az érzékeny kultúrák esetén hiperhidratáció (vitifikáció) léphet fel (Hakkaart és Verskijs 1983, Debergh et al. 1981, Singha 1982).

Az agar mellett gyakran használt anyag a Gelrite is. Ennek a polymernek jó tulajdonságai közé tartozik az átlátszósága, hidegen készíthetősége, és a vitifikációt csökkentő képessége. Nem ritka a két anyag keverése sem (George et al. 1988).

2.5.6. Gázok

Mind a tápközegben, mind a tenyészedény légkörében találhatunk különböző gázokat. A legfontosabb az oxigén, a szén-dioxid és az etilén. Az oxigén és a szén-dioxid fontos szerepet játszik a fejlődés fenntartásában, míg az etilén felszaporodása toxikus hatású is lehet (Kozai et al. 1987).

A különböző tenyészedények eltérő légcserét tesznek lehetővé. Vannak teljesen lezártak, a vízvesztést és a fertőződést elkerülendő, és vannak „lélegző” megoldások is. A tenyésztér CO₂ szintje nagy befolyással van a lezárt tenyészedényekben kialakuló CO₂ szintre (Kozai et al. 1987). A folyékony táptalajok levegőztetését különböző megoldásokkal tudjuk biztosítani, ugymint forgatás, rázatás vagy steril levegő befúvása.

2.6. Anatómiai változások a mikroszaporítás során

A mikroszaporítás során a növények szöveti felépítése megváltozik. Ezek a változások különböző mértékűek, de a faj vagy fajta számára legmegfelelőbb körülmények között is fellépnek. Ezen változások egy része minden esetben kialakul és normálisnak tekintendő, más része viszont

valamely kedvezőtlen körülmény hatására kialakuló rendellenesség pl. vitrifikáció (Dencső, 1987, Ziv 1991a).

A szövettani változások együtt járnak a szervek morfológiai és fiziológiai váltoásaival. Ilyen változás a leveleket természetes körülmények között borító kutinréteg és a kutikula elvékonyodása is (Grout and Aston, 1977). Ezt elsősorban a tenyészedényekben uralkodó magas relatív páratartalom okozza. Ezt igazolja az is, hogy a magas relatív páratartalmú üvegházban nevelt karfiol és káposzta levelein is megfigyelték ezt a változást. Ugyanakkor a mikroszaporított karfiol és káposzta növények leveleinek kutinréteg-vastagsága is csak az üvegháziakénak a 25%-át érte el (Grout és Aston, 1977; Sutter és Langhans, 1982). Mivel a kutikula elsődleges funkciója a perisztómás transpiráció csökkentése, s a vékonyabb réteg ezt a feladatot gyengébben tudja ellátni, az akklimatizáció során kezdetben magas relatív páratartalmat kell biztosítanunk a növényeknek. A páratartalom fokozatos csökkentésével a megfelelő vastagságú kutikula kialakulhat a növényeken (Grout and Aston, 1977).

Johansson és munkatársai (1992) a kutikula és a viaszréteg vastagságát vizsgálták *Rosa* 'Mme Isaac Pereire' *in vitro*, akklimatizálás alatt álló és *ex vitro* nevelt növényein. A viaszréteg az *in vitro* nevelt növények levelein nagyon vékony volt, az akklimatizálódó leveleken vastagabb volt, a szabadföldi növényeken pedig csupán kis mértékben vastagabb az előzőnél. Megfigyelték, hogy a sztómák *in vitro* körülmények között állandóan nyitottak.

A sztómák struktúrája, funkciója sok esetben megváltozik, számuk azonban legtöbbször nem (Ziv és Ariel, 1988.). A sztómák zárósejtjei kiemelkedőekké és kerekdedekké válnak, szemben a normál fejlődésű besüppedő és elliptikus alakú zárósejtekkel, mint pl. az almánál (Blanke és Belcher 1989), vagy a rózsza esetében (Capellades et al., 1990). Vannak azonban olyan eredmények, melyek szerint az *in vitro* fejlődött *Vaccinium corymbosum* 'Bluetta' növények levelein a sztómák sűrűsége nagyobb (361 db/mm²) mint a szabadföldön fejlődötteké (241 db/mm²) (Noe & Bonini, 1996). Kísérletek bizonyítják, hogy a sztómák felépítése és szerkezete a fényintenzitástól és a relatív páratartalomtól is függ, azonban a kettő kölcsönhatására még nincs bizonyíték. Wardle és

Short (1983), valamint Wetzstein és Sommer (1983) is beszámol arról, hogy az *in vitro* szaporításból akklimatizálásra kikerülő növénykéek sztómái nem képesek becsukódni. Sallanon és munkatársai (1993) vizsgálták az *in vitro* és az üvegházban nevelt rózsza sztómáinak működését. 7 órás fény, illetve 7 órás sötét periódus után vizsgálták a sztómák állapotát. Eredményeik szerint az *in vitro* szaporított növénykéek sztómái a sötétben sem csukódtak be. A vakuolás felület a zárósejtek összfelületének 40%-a volt mind a sötét- mind a fényperiódusban, az üvegházban nevelt növények esetében ez az érték 25%-ra csökkent a sötét periódusban, a zárósejtek becsukódtak.

A mikroszaporított növényeken hidatódák is előfordulnak (Donatelly et al., 1987, Donatelly és Skelton, 1987, Capellades et al., 1990), *in vitro* rózsza növénykéeken azonban az akklimatizálás során a relatív páratartalom csökkenésével ezek is eltűntek.

A levél szöveti felépítésére jellemző, hogy a mezofillum oszlopos parenchima sejtjei kisebbek és eltérő színűek (Mendoza et al., 1993). Fokföldi ibolya növénykéin a sejtek méretének csökkenését Ohki (1994) 15 nappal az indítás után figyelte meg.

Az *in vitro* növénykéek levelében a mezofillum kevésbé fejlett, nincs jól elkülöníthető paliszád parenchima (Grout és Aston 1977, Wetzstein és Sommer 1983), vagy 2-3 sejtsor helyett csak egy rétegű (Brainerd et al. 1981, Brainerd és Fuchigami 1981b, Schmidt és Waldenmaier, 1993). Brainerd és munkatársai (1981) *Prunus insititia* L. 'Pixy' fajtánál arra a megállapításra jutottak, hogy a mezofillum sejtközzti járatai az *in vitro* növényeknél a legnagyobbak, csökken a méret az akklimatizálás alatt álló, illetve a szabadföldi növények felé. A paliszád parenchima sejtjeinek mérete viszont ellentétesen változik. Mikroszaporított *Hydrangea* növények anatómiai vizsgálata során Kiss I. et al. (1994) azt tapasztalták, hogy a színi és fonáki epidermisz sejtjei kisebbek, sztómáinak zárósejtjei nagyobbak, kissé deformáltabbak és kiemelkedőek a szabadföldi növényhez viszonyítva. Dami és Hughes (1997) arról számol be, hogy az *in vitro* nevelt 'Valiant' szőlőfajta esetében a levelek mezofillum sejtjei nagyobbak voltak, az oszlopos parenchima hiányos felépítésű volt, a sejtközzti járatok tágak voltak. Szafián et al. (1997) mikroszaporított *Hosta*

fortunei 'Albopicta' esetében a különféle növekedésszabályzók eltérő hatását figyelte meg az epidermiszsejtek alakjának változására.

A *Prunus x davidiopersica* 'Piroska' és a *Sorbus rotundifolia* 'Bükk Szépe' mikroszaporítása során a levéllemezt vizsgálva Jámborné et. al (1999a,b) valamint Kiss I. et al. (1999) azt tapasztalták, hogy a mezophyllum elvékonyodik, a paliszád parenchima egy sejtissorossá válik, valamint a szivacsos parenchima sejtjeinek alakja jelentősen megváltozik.

A levél szöveti szerkezete az akklimatizáció során is változik. A szamóca már meglévő levelei vastagabbá váltak a paliszád sejtek növekedésével, azonban a paliszád parenchima sejtSORAI és a sejtKÖZÖTTI járatok mérete nem változott. A fejlődő új levelek azonban már a fajra jellemző sejtFELÉPÍTÉST mutatták (Fabbri et al. 1986). Apostolo és munkatársai (2005) arról számolnak be, hogy *Cynara scolymus* (articsóka) *in vitro* fejlődött levelek mezofillumában lévő szivacsos és oszlopos parenchima sejtek szabálytalan alakúak és rendezetlenek, a sejtKÖZÖTTI járatok szélesek és a kloroplasztiszok száma kevés. A levelek gázcsereNYÍLÁSAI nyitottak voltak, a kutikula réteg pedig nagyon vékony. A gyökeresítési fázisban a sejtfalak és a kutikula réteg vastagodását figyelték meg. A gázcsereNYÍLÁSOK működőképesekké váltak, a mezofillum sejtjei szabályosak lettek.

A mikroszaporított növény hajtása gyengébb, mint a szabadföldön növekvő növényé, kevesebb benne a kollenchima és a szklerenchima szövet (Ziv, 1991a,b).

Dobránszki és kutatótársai (2005) *Malus* 'Royal Gala' fajtájával végeztek mikroszaporítási kísérleteket, melyek során különböző növekedésszabályzók (BA, BAR, KIN, M-TOP, 0,5-2 mg/l koncentrációban) hatását vizsgálták. Vizsgálataik nagyon részletes szövettani megfigyeléseket is tartalmaznak, melyhez fénymikroszkópot használtak fel. A mintákat az *in vitro* nevelt növények két felső levele szolgáltatta. A hormonmentes táptalajon nevelt növények epidermisze szorosan összezáródó sejtekből állt, a színi epidermisz sejtjeiben nagy vakuolumokat figyeltek meg. A fonáki epidermiszben jórészt zárt sztómákat találtak. A parenchimaréteg 1 sejtSOROS oszlopos parenchimából és tágas sejtKÖZÖTTI járatokat tartalmazó szivacsos parenchomából állt. A táptalajhoz adott BA koncentrációjának növelésével a fonáki epidermisz sztómái egyre kiemelkedőbbekké és

nyitottakká váltak. Az oszlopos parenchoma kis BA koncentráció (0,5 és 1 mg/l) mellett 2 soros volt, a szivacsos parenchima sejtközötti járatai szűkebbé váltak. A BAR alkalmazásakor hasonló szöveti változásokat figyeltek meg, magasabb koncentráció (1,5 és 2 mg/l) alkalmazásakor nőtt az intercellulárisok mérete, a sztómák kiemelkedőbbekké és nyitottabbakká váltak. A M-TOP adagolása jelentős szöveti változásokat idézett elő. A színi és fonáki epidermiszt alig lehetett megkülönböztetni, a fonáki részen alig voltak gázcsere nyílások, s azok is nagyon fejletlenek és nyitottak voltak. 1 és 1,5 mg/l M-TOP adagolásakor mezofillum egységes, tömör képet mutatott, nehézkessé vált az oszlopos és a szivacsos parenchima elkülönítése. A legtöményebb (2 mg/l) M-TOP hatására -érdekes módon- kétsoros paliszád parenchima és sejtközötti járatokkal tagolt szivacsos parenchima fejlődött. A KIN tartalmú táptalajokon nevelt sarjak levelei voltak a legvastagabbak, mind a bőrszövet, mind a mezofillum sejtek nagyok voltak. Ugyan a KIN koncentrációjának növelése csökkentette a sejtek méretét, de a nagymértékű vakuolizáltság megmaradt, valamint csökkent a sejtközötti járatok tágassága. 2 mg/l KIN koncentráció esetében elkülöníthetővé vált a paliszád parenchima 2. sejsora. A sztómák nem emelkedtek ki a fonáki epidermiszből, fejletlenek és gyakran zártak voltak.

Mészáros és kutatótársai (2006) *Hosta 'Dew Drop'* kultúrákat neveltek szilárd és folyékony táptalajokon. Kutatásukban a 3R (Revert Rotary Reactor) rendszerben is nevelték a növényeket. Táptalajaik BA-t és IVS-t tartalmaztak különböző koncentrációban. A szellőztetés nélküli folyadékkultúrákban megfigyelték a vitrifikáció jelenségét. A szövetségi vizsgálatok kimutatták a az oszlopos parenchima hiányát, a a szivacsos szerkezetű mezofillumot, a vékony epidermiszt és a nagy sztómákat. Szellőztetett kultúrákban vitrifikáció nem lépett fel, a bőrszövet vastagabb volt és viaszos kutikula réteg borította. A sztómák működőképesek voltak.

Chrisantemum-nál (Smith et al. 1990) és málnánál (Donatelly et al. 1985) is kimutatták, hogy az *in vitro* fejlődött gyökerek gyengébben fejlettek, és a peridermaszövet vékonyabb.

2.7. A tarka levelű növények és a kimérák

2.7.1. A tarka levelű növények kialakulásának okai

Ha a környezetünkben található kertekre vagy parkokra csak futó pillantást vetünk is, rögtön szemünkbe ötlük, milyen sok tarka levelű növénnel találkozunk. Szinte a virágos növények minden családjában megtalálhatók képviselőik. A feljegyzett képviselők száma 3000 és 4000 között változik (Davson, 1995). A pontos számot nem lehet megadni, hiszen nem minden újonnan felbukkanó egyed kerül leírásra, sokuk mindenféle regisztráció nélkül létezik vagy tűnik el. A tarka levelű egyedek különböző növénycsoportokon belüli gyakoriságáról Hessayon (1985) a következőket közli:

Lombos fák és cserjék	4%
Kúszónövények	6%
Fenyők	4%
Lágyszárú növények	30%

Bár tarka növényeket már a rómaiak is ismertek (Evani, 1989), komoly tanulmányozásuk csupán a XIX. század végén indult el. Az első munkák többsége az oltásból származó kimérákkal foglalkozott (Winkler, 1907), s ezek tanulmányozása kapcsán csupán érintette a tarka növényeket is (Neilson-Jones, 1969, Tilney-Bassett, 1986). A témában megjelenő publikációkból kiderül, hogy a tarka növények mindig is nagy népszerűségnek örvendtek, s már a XVIII. században bizonyíthatóan dísnövényként használták őket (Burras, 1967; Taffler, 1989). Napjainkban is nagy jelentőségük van, ezt bizonyítja az a tény is, hogy kiállításokon szép számban kapnak elismerő érmeket, díjakat az új tarka fajták.

A tarkaság fogalmának meghatározása csak látszólag tűnik egyszerűnek, valójában bonyolult feladat. Többen próbálkoztak a megfelelő definíció megalkotásával, de egyik sem lett mindenre kiterjedő és pontos. Néhányan – köztük Kirk és Tilney-Bassett - a tarka növény fogalma

alatt azon egyedeket értik, melyeknek a faj jellemző példányaihoz képest, bármely részükön megjelenő klorofill- vagy más pigment-hiányt mutatnak, normál környezeti feltételek mellett. Ez a meghatározás kizárja a vírusok okozta fertőzések következtében kialakuló tarkázottságokat, az epidermisz felső rétege alatt található légbuborékok okozta mintázatot, a tápanyaghiány miatt fellépő elszíneződéseket, valamint azokat a mintákat, melyek a pigmenteken kívül található színyanyagok - mint pl. a vakuolumokban felhalmozódó antociánok – okoznak (Kirk and Tillney-Basett, 1978).

A kertészetben tarka növényeken értjük mindazokat a növényeket, melyek levelein fehér, sárga esetleg pirosas mintázottság jelenik meg. Ez a mintázottság rendkívüli változatosságot mutat mind intenzitásban, mind formában. Lehet a levelek szélén futó szegély, lehet a levéllemezen húzódnó csík, folt, pötty, levélerek által határolt terület is (Falstad, 1998). Ez a definíció nélkülözi a tarkaság típusainak elkülönítését, valamint hiányzik belőle a kialakulását okozó tényezők meghatározása (Sombrero, 1996).

Dolgozatomban tarka növényen értem azokat a növényeket, melyek levelén valamilyen, a levéllemez nagyobb részétől eltérő színű mintázat jelenik meg.

A tarkaság okait kutatva leggyakrabban hat okot sorolnak fel (Sombrero, 1996).

1. Természetes pigmentáció

Természetes mintázatok sok, elsősorban trópusi eredetű növényen, így szobanövényeink egy részénél is megfigyelhetők, de hazai fajok körében is előfordulnak (*Trifolium repens*, *Rumex sanguineus*). Ezek a minták a különböző pigmenteknek - klorofill (zöld), karotinoidok és xantofilek (sárga), antocianinok (piros, ibolya és kék) - köszönhetőek. Mennyiségüktől függően egyazon növény különböző levelei között is nagy eltérések lehetnek a minták alakjában, tónusában.

2. Változékony gének

Néhány növénynél, mint például a sarkantyú (*Tropeolum majus* 'Alaska'), a fekete peszterce (*Ballota nigra* 'Archer1's Variegated'), a korai juhar (*Acer pseudoplatanus* 'Leopoldii' (3. ábra) esetében a levelek előre meghatározhatatlan mintázottságát az ugráló gének (transposonok)

okozzák. A minta annak függvényében alakul, hogy a pigmentációért felelős gének be- vagy kikapcsolt állapotban vannak-e.

A kloroplaszt saját génjei szintén felelőssé tehetők bizonyos tarkaságok kialakulásáért, de a pontos mechanizmus még nem teljesen feltárt (Kirk és Tilney-Bassett, 1978).



3. ábra Az *Acer pseudoplatanus* 'Leopoldii' leveleinek tarkaságát az ugráló gének okozzák

3. Vírusok

A növények tarkaságáért elsősorban a vírusokat tették felelőssé. A levéllemezen mutatkozó szabálytalan sárga foltokért még ma is gyakran -tévesen- a vírusokat okolják. Meglepő, hogy a valóságban milyen kevés tarka növény köszönheti létrejöttét vírusfertőzésnek. Az oxfordi egyetem botanikus kertjében megvizsgált 400 tarka növényből mindössze 12 bizonyult vírusfertőzöttnek (Burra, 1967).

Mivel a vírusok többsége a növény növekedésére is káros hatással van, nem meglepő, hogy a természetben csekély számban fordulnak elő. A teljesség kedvéért, megemlítenék néhányat a kertészeti jelentőséggel bíró növények közül: *Viola odorata* 'Variegata', *Lonicera japonica* 'Aureoreticulata' (4. ábra), *Vinca major* 'Reticulata', *Abutilon pictum* fajták.



4. ábra A *Lonicera japonica* 'Aureoreticulata' leveleinek sárga erezetét vírusok okozzák

A vírusok kétféle tarkaságot idéznek elő: mozaikosság és értarkulás. Mindkét forma a klorofilltartalom csökkenésével magyarázható, melyet többféle módon tudnak a vírusok előidézni. A csökkenés keletkezhet a zöld színtestek lebontásával, a kloroplasztiszok fejlődésének meggátolásával vagy a klorofillszintézis gátlásával. Az ezek eredményeként kialakuló sárga erek vagy foltok a szövetekben kisebb károsodást szenvedő karotinoidoknak és xantofileknek köszönhető (Burras, 1967).

4. Légbuborékok

A növények levelein megjelenő ezüstös, fehér mintákat az epidermisz alatt kialakuló üregeknek köszönhetjük. Ezek kialakulása az epidermisz alatti sejtek összeolvadásával magyarázható (Vaughn and Wilson, 1981). Néhány ismert példa az ilyen típusú tarkaságra: *Pilea cardierei*, *Sylibum marianum*, *Lamium maculatum* 'Florentinum' (5. ábra). A mintázottság fajra jellemző határozóbélyeg, mely a magról fejlődő utódokon is megjelenik.



5. ábra A *Lamium maculatum* 'Florentinum' levelei tarkaságukat a légbuborékoknak köszönhetik

5. Fejlődési fázishoz, évszakhoz kötődő tarkaság

Az úgynevezett "fejlődési tarkaság" (Huxley, 1992) a növények bizonyos életkorához, fenológiai fázisához vagy évszakhoz kötötten megjelenő tarkaság. Jellemző példája az ismert kúszónövény, az *Actinidia kolomikta* példája, miszerint a tavasszal kihajtó levelek csúcsi részei fehérek, majd rózsaszínesek lesznek. Továbbhaladva az időben ez a rózsaszín árnyalat is folyamatosan zöldre vált és eltűnik a levelek mintázottsága. Oka nem tisztázott, de valószínűleg a hőmérséklet is hatással van a rózsaszín árnyalatok megjelenésére, melyek az alacsony hőmérsékleten kialakuló antociánoknak köszönhetőek. Hasonló jelenség - de más ok -figyelhető meg, néhány sárgás levelű növény a hőmérséklet emelkedésével tapasztalható zöldüléskor (*Hosta fortunei* 'Albopicta') (Grenfell, 1981, Schmid, 1991).

6. Kimérák

Eredetileg a *Chimaera* nevet a görög mitológia tűzokádó szörnye kapta. A szörny testének első fele oroszláné volt, a test középső része kecskéé, míg a hátsó része sárkányé (Neilson-Jones, 1969). Később ettől a jelentésétől eltérve, a kiméra szót sokszor alkalmazták olyan esetekre, mikor

valami szokatlan, durva vagy egymáshoz nem illő dolgok, részek egymás mellé helyezésével, keverékével találkoztak. A biológia tudománya is átvette ezt a nevet, de először a zoológiában jelent meg, a porcos halak egy csoportjának megnevezéseként (chimaera formában). A botanikában először Hans Winkler (1907) alkalmazta az általa előállított növényre, mely *Solanum* és *Lycopersicum* egymásra oltásánál, az oltási pontból tört elő, s mindkét "szülő" szöveteit hordozta. Mivel a zoológusok napjainkig használják a chimaera megnevezést, a botanikában -a félreértések elkerülése végett - a chimera - illetve kiméraként írva alkalmazzák. Gyakran azonban helytelenül alkalmazzák a kiméra megnevezést, s minden olyan esetet így neveznek, melyben nem homogén genetikai állományú szövetek szerepelnek (Tillney-Basett, 1986). A kimérák között sok a tarka levelű növény. Hogy pontosan meg tudjuk magyarázni az ilyen tarkaság okát, először meg kell ismerkednünk a kimérák típusaival, szövettani felépítésükkel.

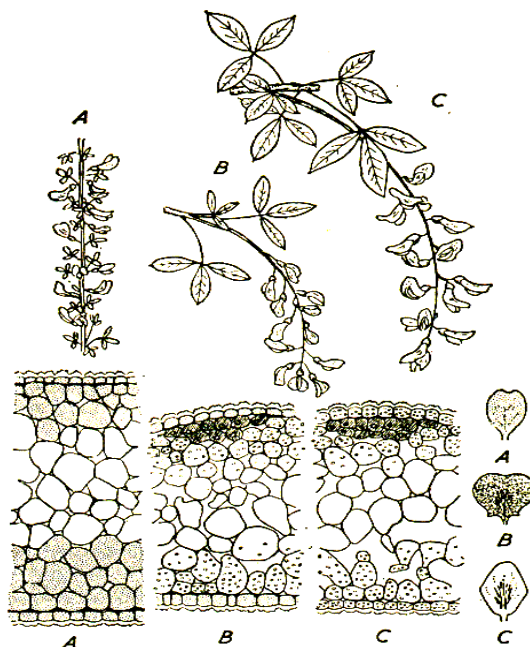
Faiskolások időről időre találkoznak olyan esetekkel, amikor is az oltással szaporított fákon "abnormális" hajtások törnek elő az alany és a nemes forradásának pontjából. Ezeket a hajtásokat minden további érdeklődés és vizsgálat nélkül, rendszerint eltávolítják. Az ilyen típusú hajtásokat nevezzük "oltási hibrideknek", noha semmi nem támasztja alá, hogy tényleges hibridizáció zajlott volna le (Tillney-Basett, 1986). Néhány ilyen érdekesség, azonban szerencsére fennmaradt, s egyesek kertészeti jelentőséggel is bírnak. Álljon itt példaként néhány ismertebb növény:

Az első leírás ilyen kimérákról - természetesen a kiméra volta felismerése nélkül - 1667-ből a Transactions of the Royal Society II. kötetében maradt fenn. Ez beszámol egy firenzei kertben álló fáról, melyen különleges termések fejlődnek, melyeknek egyik oldala citrom, míg a másik narancs. Ez a bizzaria-narancs nevet kapta. Eredetére is fény derült. 1664-ben egy firenzei kertben termett az első gyümölcs ezen a fán, mely eredetileg egy *Citrus medica* alanyra oltott *Citrus aurantium* volt. Az oltás után a nemes látszólag elpusztult, de az oltásforradás helyéről egy hajtás tört ki, s fejlődött fává. Erről származott a különleges gyümölcs. A fát későbbiekben oltással szaporították, s terjedt el széles körben. A jelenség magyarázatával sokan próbálkoztak. Daniel (1904) oltási hibridnek vélte, Cramer (1907) a normál hibrid vegetatív szegregációjával, Strasburger

(1909) hiperkiméra létrejöttével, míg Baur (1909) periklinális kiméra képződésével magyarázta. Tanaka (1927) vizsgálatai alapján a ma is elfogadott magyarázat az, hogy itt egy periklinális kimérával állunk szemben, ahol a citrom szöveteit a keserű narancs epidermisze borítja.

+*Laburnocytisus adamii* - Ezt a növényt egy Adam nevű francia kertész állította elő, a Párizs melletti Vitry-ben, 1825-ben. A növény úgy keletkezett, hogy *Laburnum vulgare* alanyra oltott egy *Cytisus purpureus*. Az oltás nem sikerült, de a forradás megtörtént és a forradás helyéből egy hajtás tört elő, melynek levelei a két "szülő" közti átmeneti formát mutatták.

A *L. adamii* megjelenése a *Laburnum vulgare*ra emlékeztet, kistermetű fa. Levelei a *Laburnum*éhoz hasonlóak, csak kisebbek és a fonákuk nem szőrös (6. ábra). Virágzata is az előző fajéhoz hasonló, és a *C. purpureus*-szal ellentétben a virágok tövében nincsenek levelei (6. ábra). A virágok színe bronzos-pirosas, fertilis magot nem hoz. Több kutató vizsgálta a *L. adamii* szövettani felépítését Macfarlane (1892); Buder, (1910); Keeble és Armstrong, (1912); Sneath (1968), s a mai elfogadott álláspont az, hogy itt is egy periklinális kimérával állunk szemben.

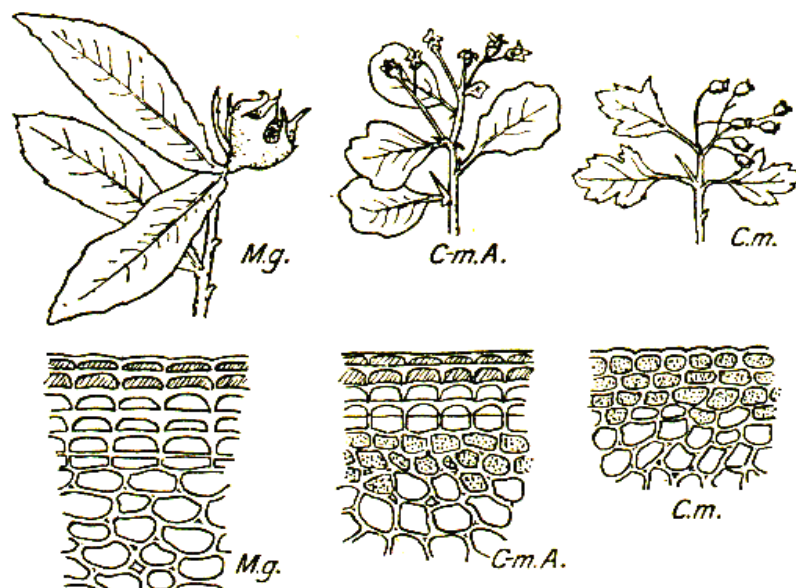


6. ábra A virágzat, a vitorla és a vitorla keresztmetszete. A, *Cytisus purpureus*; B, +*Laburnocytisus adamii*; C, *Laburnum vulgare*. (A keresztmetszeten a bordó sejtnedvet tartalmazó sejteket pontozással, a barna „méhvezetőket” alkotó sejteket satírozással jelöltük, a plasztiszokat apró körök jelzik (Buder, 1910 nyomán).)

Másik ismert növény a *Crataegus monogyna* és a *Mespilus germanica* "keresztkezéséből" származó *+Crataego-mespilus asnieresii* és *C-m. dardari*. Ez a két faj a Metz melletti Bronvaux-ban álló öreg naspolyafán fejlődött két hajtás vegetatív szaporításából ered (1899). Mindkét faj ugyanúgy a nemes naspolya és az alanyául szolgáló galagonya oltási helyéből tört elő.

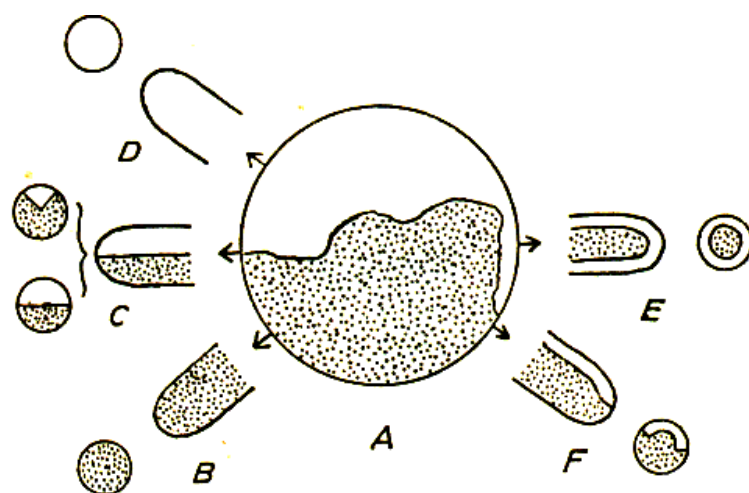
A 7. ábrán láthatjuk a jellemző levélalakokat, a virágzatok és a gyümölcsök szöveti felépítését. Mindkét faj gyakran "visszaüt" a szülőfajok valamelyikére, s a növényen mind naspolya, mind galagonyahajtások megjelennek.

Ismert még a *+Pyrocydonia Danieli* is (Daniel, 1904). Ez egy Rennes-i kertben álló birs alanyú körtefa oltási helyet érintő visszavágásánál előtörő hajtásokból kiválasztott "oltási hibrid". Daniel leírása szerint a visszavágott fán számos hajtás tört elő, melyek a körte, a birs vagy a kettő közti átmeneti formát mutatták. A *+Pyrocydonia Danieli* Daniel később elő is tudta állítani úgy, hogy körtét oltott birsre, majd az oltásforradás után az oltványt az oltási helyen keresztbe vágta. A megjelenő hajtások közt a *+Pyrocydonia Danieli*vel megegyező hajtások is fejlődtek. Ez a módszer lényegében megegyezik a Winkler által a későbbiekben periklinális *Solanum-Lycopersicum* kimérák előállítására alkalmazott eljárással.



7. ábra Levelek, termések és a termések külső rétegének keresztmetszete a *Mespilus germanica* (*M.g.*), a *Crataegus monogyna* (*C.m.*) és a *+Crataego-mespilus asnieresii* (*C-m.A.*) esetében (Buder (1910) nyomán). Megfigyelhető a *Mespilus* termésre jellemző megvastagodott kéreg a *+Crataego-mespilus* termésén is.

A kimérák szövettani felépítésért először Baur (1909) vizsgálta kellő tudományos alaposággal. Érdeklődése a *Pelargonium* nemzetség tarka levelű fajtái felé fordult, s kereste a különböző mintájú tarka fajták megjelenésének okait, s a különleges viselkedésük magyarázatát. Megfigyelte, hogy a *Pelargonium zonale var albomarginata hort.* magoncai között vannak tarka sziklevelű egyedek, melyek később tiszta zöld, fehér vagy tarka lombú növényekké fejlődnek. Ezek megtartják jellemzőiket további életük során és dugványozás után is. A fehér dugványok illetve egyedek természetesen elpusztulnak. A tarka növényeken fejlődnek tarka, zöld és fehér hajtások is. Ezek megjelenésében bizonyos rendszer megfigyelhető. A zöld hajtások a szár zöld részein, míg a fehér hajtások a szár fehér részein fejlődő rügyekből képződnek. A két típusú szárrész találkozásánál fejlődő rügyekből tarka hajtások keletkeznek. Ha a szárat keresztben elmetsszük, a 8. ábrán látható elrendeződést láthatjuk. A kétféle szövettípus szektoriálisan rendeződik el, az oldalhajtások milyensége a megjelenési helytől függ. Az A ponton megjelenő hajtás teljesen zöld, a C pontból eredő szintelen, míg a kétféle szövettípus szektoriális elrendeződést mutat, megjelenése tarka. A két szövet aránya függ a kiindulási helynél található arányoktól, így az oldalhajtás lehet fele-fele részben zöld és fehér, vagy egy keskeny fehér sáv a zöld levélen, vagy éppen fordítva, keskeny zöld sáv a fehér levéllemezen (8. ábra).

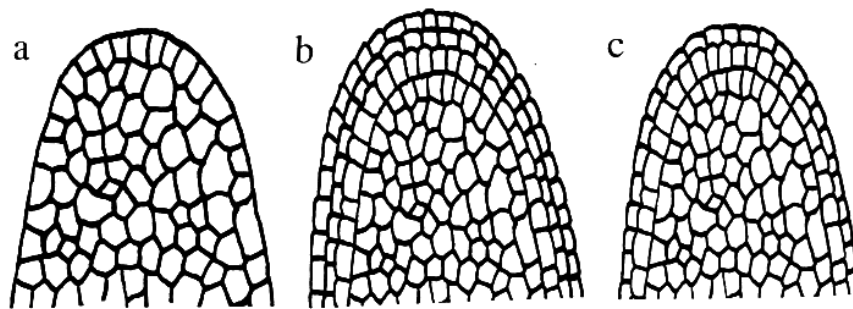


8. ábra Egy szektoriális kiméra szárának keresztmetszete.

Különösen érdekes az új oldalhajtás kialakulásának szempontjából az a rész, ahol a két szövetrész úgy válik el, hogy az egyik csupán egy vékony rétegben fedi a másikat. Az itt kialakuló oldalhajtás tökéletes "periklinális" elrendeződést mutat, (8/D) pl. fehér epidermisz a zöld bélrészen, vagy ha a zöld rész fedi át a fehéret, akkor a hajtás epidermisze zöld lesz, és a bélrész fehér.

Ha az átfedés nem tökéletes a kiindulási pontnál, a kapott oldalhajtás oldalán fehér vagy zöld sáv húzódik (8/E). Az ilyen, nem teljesen periklinális elrendeződést meriklinálisnak nevezzük (Jorgensen és Crane, 1927). Ez a típus könnyen összetéveszthető a szektoriális elrendeződéssel, ahol a genetikailag különböző szövet a hajtás teljes keresztmetszetét kitölti.

A szektoriális kimérák rendkívül változékonyak, gyakran jelennek meg rajtuk csak az egyik szövettípus alkotta hajtások, vagy az említett periklinális vagy meriklinális elrendeződésű hajtások. A fejlődő hajtások milyenségét tehát már a hajtáscsúcs felépítése meghatározza. A hajtáscsúcsok felépítése jellemző az egyes növénytorzsekre, illetve osztályokra. Ezek szerkezete meghatározza a kimérák képződésének lehetőségét illetve gyakoriságát. A 9. ábrán a különböző növényekre jellemző hajtáscsúcs felépítést láthatjuk (Haraszty, 1990).



9. ábra A különböző növényekre jellemző hajtáscsúcsok hosszmetsete. (Haraszty nyomán)

- a.: a páfrányokra jellemző szerkezet nélküli hajtáscsúcs. Ez a jellemző a zárvatermők gyökércsúcsaira is.
- b, a zárvatermőkre jellemző 3-rétegű felépítés
- c, néhány *Juniperus* és *Chamaecyparis* fajra jellemző 2-rétegű felépítés

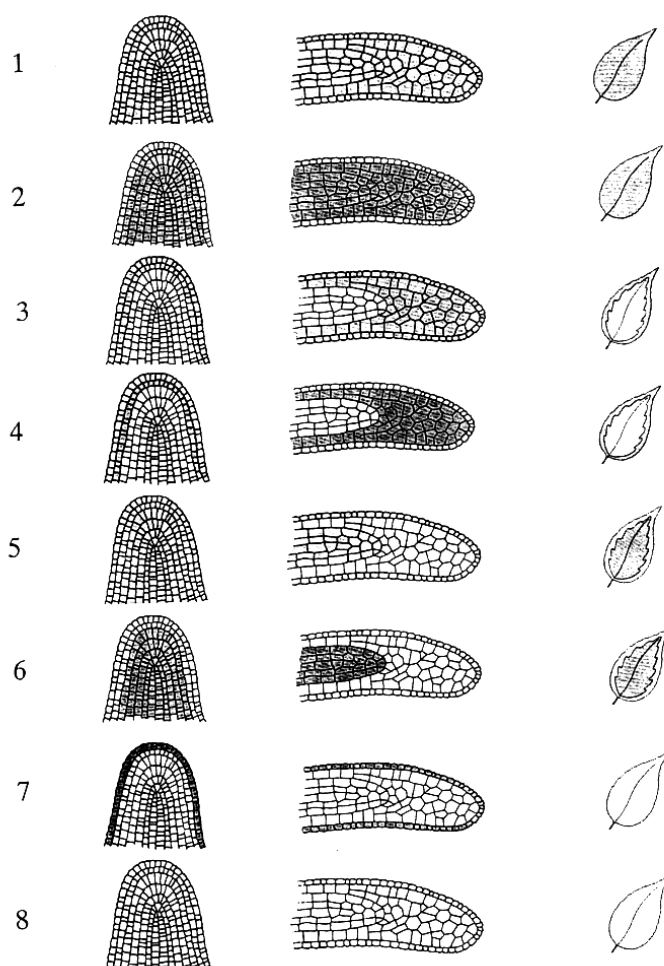
Páfrányok: A páfrányok képtelenek kimérák képzésére, mert a hajtáscsúcsuk nem tagolódik rétegekre. A mégis megjelenő tarka levelű változatok ugráló gének jelenlétére vezethetők vissza, aligha nevezhetők kiméráknak.

Nyitvatermők: A fenyőknél is ritkábban jelennek meg tarka változatok, részben a hajtáscsúcs felépítésével magyarázhatóan. A fenyők hajtáscsúcsánál sem találunk tunica réteget, így az csak két rétegből épül fel. Ennek ellenére azért találunk kimérákat, elsősorban a *Chamaecyparis*, *Thuja* és *Juniperus* nemzetségekben. A lombozat fehér, krémszínű vagy sárga részei a megváltozott epidermisz egyenlőtlen eloszlása következtében alakulnak ki. Sajnos az ilyen hajtások nagy része klorofilhiány miatt elpusztul. A nyitvatermőknél megfigyelt tarka fajták igen változékonyak, gyakran jelennek meg az egyszínű "anyanövényre" jellemző hajtások. (Taffler, 1989).

Zárvatermők:

Kétszikűek: Néhány kivételtől eltekintve a kétszikű növények hajtáscsúcsa három rétegből épül fel. Ezek kívülről befele haladva a következők: a két (estenként egy vagy több) rétegű tunika és az alattuk elhelyezkedő korpusz. A tunika a tenyészőcsúcs felületi része, melynek sejtjei kizárólag antiklinálisan (felületre merőleges falakkal) osztódnak, s így a felületi növekedést biztosítják. Belőlük differenciálódik a protoderma, mint elsődleges merisztéma, majd később ebből a bőrszövetrendszer (Haraszty, 1990). A korpusz a hajtáscsúcs tunika rétegekkel fedett belső része, melynek sejtjei antiklinális, periklinális és ferde osztófalakkal egyaránt osztódnak. Az így kialakult sejtek nem homogének, bizonyos zonáció figyelhető meg a korpuszban. Ezekből differenciálódnak az alap- és szállítószövet képző elsődleges merisztémák, illetve ezekből az elsődleges kéreg és a sztele valamennyi szövete.

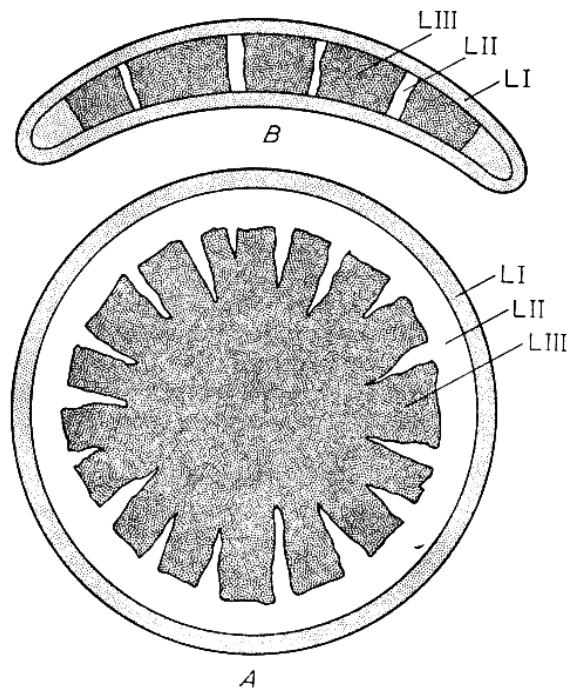
A hajtáscsúcs három rétegének tulajdonságai meghatározzák a belőle fejlődő hajtás megjelenését és tulajdonságait. Ha a három réteg mindegyike lehet klorofill tartalmú illetve klorofillt nem tartalmazó is, akkor ezek elrendeződése nyolc különféle esetet mutathat, s ez a kialakuló hajtások levelein is jelentkezik ld. (10. ábra). A legtöbb elrendeződés stabil, de vannak instabilak is, melyek következtében a tarka növények egyes képviselői gyakran visszaütnek teljesen zöld formáikra (Sombbrero, 1996).



10. ábra A zöld és fehér sejtrétegek elhelyezkedésének 8 lehetősége a hajtáscsúcsban. A hajtáscsúcs hosszmetezete, a belőle fejlődő levél keresztmetezete és a tarkaság típusa (Neilson-Jones, 1969 alapján).

Egyszikűek: Az egyszikűeknél megfigyelhető tarka levélzetű növényeknél a levelek legtöbbször hosszanti fehér vagy sárga csíkozásúak. Ezek a csíkok jól magyarázhatók a különböző csíkokat alkotó szövetek eltérő klorofiltartalmával. A csíkok kialakulását a hajtáscsúcs felépítését tanulmányozva könnyen megérthetjük. A 11. ábrán a hajtáscsúcs és a belőle fejlődött levél keresztmetzetét láthatjuk. A LI és a LII réteg színtelen, míg a LIII genetikailag zöld. A levél fejlődésének korai fázisában ez a zöld szövet alkotta korpuszt a másik két rétegből fejlődött szövetek felosztják és így alakulnak ki a zöld és fehér csíkok.

Az egyszikűeknél a három réteg gyakran két rétegre redukálódik és ez módosítja a kialakuló kimérák szöveti felépítését (pl. *Hosta plantaginea*, *Tradescantia albiflora* 'Albovittata') (Neilson-Jones, 1969, Tilney-Bassett, 1986).



11. ábra A., A hajtás keresztmetszete a hajtáscsúcs alatt, egy tarka egyszikű esetében.

B, A levél keresztmetszete (Neilson-Jones, 1969 nyomán).

2.7.2. A tarka növények szaporítása

Ivaros szaporítás:

A tarkázottság csupán néhány típusa tartja meg tarkaságát ha ivaros úton, magról szaporítjuk a növényeket. A természetes mintázottságot mutató fajok magoncai mindig változatlanok maradnak, s a génmutáció vagy instabil (ugráló) gének okozta tarkaság is megmarad az utódokban (Sombrero, 1996).

A gének által meghatározott tarkaság öröklődése a Mendeli szabályokat követi, így előre meghatározható, hogy az utódok milyen arányban mutatják a tarkaságot (Harding, 1991).

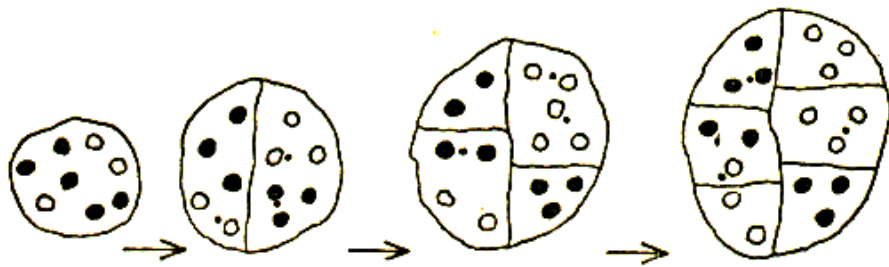
A kimérák magoncai között azonban mindkét szövettípust külön-külön hordozó, így pl. tiszta zöld, tiszta sárga, sőt a két szövettípust egyaránt hordozó, tarka utódokat is találunk. Ezt a

kérdést többen is vizsgálták, s több növényfajra vonatkozóan is érdekes eredményeket kaptak. Baur (1909) a tarka *Pelargonium*ok ivaros szaporítását is alaposan áttanulmányozta. Kísérletei során azt tapasztalta, hogy a tarka levelű muskátli növényeken megjelenő teljesen zöld hajtások virágait saját virágporukkal beporozva az utódok mind zöldek lesznek. A teljesen fehér hajtások virágainak önbeporzásakor ugyanezt tapasztalta annyi különbséggel, hogy itt az utódok egyöntetűen fehérek, azaz klorofillhiányosak lettek. A kétféle hajtáson fejlődött virágok keresztporzásával kapott magoncok között megtalálhatók a teljesen zöldek, fehérek és a mozaikmintázatot mutatók is. A kísérleteket több tarka *Pelargonium* fajtaival megismételve, Tilney-Basett (1965) hasonló eredményeket kapott. Az egyes fajták azonban nagy különbségeket mutattak a tarka utódok megjelenésének gyakoriságában illetve mintázottságukban. Baur (1909) a magoncok viselkedése alapján a következő magyarázattal szolgál:

I. A szintestek kétfélék, azok melyek tudnak klorofillt termelni és zöldekké válnak, s azok, melyek nem termelnek klorofillt és színtelenek maradnak.

II. Mindkét típusú szintest csak a már meglévők osztódásával keletkezhet, nem keletkezhet *de novo* a protoplazmából.

III. Mind a hím, mind a női ivarsejtek hordozzák a szintesteket. Így az azonos növény két formájának (fehér és zöld) bármely keresztezésével az egyik ivarsejt a potenciálisan zöld szintestet, míg a másik ivarsejt a potenciálisan fehér szintestet hordozza, így a megtermékenyített petesejt mindkét típusú szintestet tartalmazza. A sejtosztódások során a szintestek felszaporodnak és a növekvő számú osztódás során kialakulhatnak olyan sejtek, melyek csak az egyik típusú szintestet tartalmazzák. Ezen sejtek további osztódásával már csak az anyasejttel megegyező tulajdonságú sejtek keletkezhetnek, így homogén szövetrészek alakulnak ki (12. ábra).



12. ábra A potenciálisan zöld és színtelen színtestek szegregációja a sejtosztódás során. Az újonnan keletkezett sejteket fekete ponttal jelöltük azon az oldalán mely afelé a plasztisz felé néz, melyből kialakult. (Neilson-Jones, 1969. nyomán)

A plasztiszokhoz kötött öröklődés természete miatt a zöld színt érintő mutációk vagy az anyai ágon vagy mindkét szülő útján továbbadhatnak. A legtöbb virágos növény esetében a plasztiszok az anyai vonalon öröklődnek. Ha az a szövet, melyből a magház fejlődik nem tartalmaz normális plasztiszokat, az összes magonc fehér vagy sárga lesz (Harding, 1991).

A tarkaság öröklődésének részletei azonban nem képezik ennek a dolgozatnak témáját, erről sok átfogó művet találhatunk (Kirk és Tilney-Basset, 1978; Tilney-Basset, 1991).

Ivartalan szaporítás:

A tarkázottság bármely típusát mutató növények hajtásdugványozással történő szaporításakor a kapott utódok megtartják az anyanövény tulajdonságait. Ez az eljárás a leggyakrabban használt módszer a tarka növények szaporításakor, és sok esetben az egyetlen járható út.

Kimérák esetében gyökérdugványokról nem kapunk tarka utódokat, mert a gyökerek szövetei egységesek, így a belőlük fejlődő hajtások vagy tiszta zöldek, vagy tiszta fehérek lesznek (Sombrero, 1996).

A kimérák levéldugványaiból kapott hajtások nem mutatják az anyanövény tarkaságát, az utódok egységesen zöldek pl. *Sansaviera trifasciata* 'Laurentii'. A nem kiméra eredetű tarka növények esetében mint pl. a *Begonia rex* fajták, az utódok a fajtára jellemző mintázottságot mutatnak. A *Peperomia obtusifolia* levéldugványai esetében mind zöld, mind fehér és ritkán tarka hajtások is fejlődnek (Tilney-Bassett, 1986).

Tarka levelű liliomok hagymapikkelyekről történő szaporításakor az utódok közt előfordulnak mind a tarkák mind az egységes zöldek és fehérek, az arányok fajtánként változnak. Matsuo et al. (1989) szerint az arányokat befolyásolja a hagymapikkelyek hagymán belüli helyzete is. A külső részen elhelyezkedő pikkelyekből kevesebb tarka utódot kapunk.

Mikroszaporítással több tarka növény szaporítását megoldották (Hartmann et al., 1990), melyek között több kiméra eredetű fajta is megtalálható (Pogany és Lineberger, 1991). Már régóta ismert tény, hogy a periklinális kimérák a mikroszaporítás során hasadnak (Hacket és Anderson, 1967). Noha a mikroszaporítók abban érdekeltek, hogy az ilyen változásokat elkerüljék a szaporítás során, ez a nemesítők számára akár hasznos jelenség is lehet, mellyel új szöveti átrendeződést is el lehet érni bizonyos növények esetében (Preil, 1986). *Begonia x hiemalis* fajták mikroszaporítása során kiindulási anyagként levél- és virágkocsány darabokat használtak fel, melyeken közvetlenül regeneráltatták a hajtásokat. Az 'Aphrodite Pink' fajta esetében csak kis mértékű eltéréseket találtak az utódok között, a 'Shwabenland Red' fajta esetében azonban az utódok közel 45%-a mutatott fenotípusos eltérést a három passzálás után (Westerhof et al., 1984). Ez valószínűleg abból adódhat, hogy az átrakások során felhasználják azokat a kis hajtásokat is, melyek adventív eredetűek és csupán az egyik típusú szövetet tartalmazzák. Bigot (1981) azonban a 'Rieger' és 'Scwabenland' fajták esetében nem figyelt meg változásokat. Pierik és Steegmans (1983) arról számol be, hogy *Yucca elephantipes* sárga levélszélű fajtájának mikroszaporításakor zöld hajtásokat kaptak, ha a BA szint magas volt. Zilis et al. (1979) ezzel szemben az alacsony citokinin szint esetében számol be eltérő fenotípusú utódok megjelenéséről *Ajuga reptans* szaporításakor. Ugyan ezen növényfaj

'Burgundy Glow' fajtájának szaporításakor Lineberger és Wanstreet (1983) nem talált különbséget két citokinin hatása között, minden esetben 30% körül volt az eltérő fenotípusú utódok száma.

Tekintettel a kimérák szöveteinek réteges elrendeződésére az explantátumnak tartalmaznia kell mind a zöld, mind a fehér vagy sárga szöveteket. Ez azt jelenti, hogy csak a hajtáscsúcsok illetve a rügyek jöhetnek szóba kiindulási alapanyagként. A táptalajon kedvező körülmények között igen nagy a szaporodási ráta, sok hajtás fejlődik egyetlen explantátumból. Az *in vitro* szaporítás során nemcsak az oldalrügyek hajtanak ki, hanem járulékos rügyek is differenciálódnak, melyek már nem hordozzák a kimérák réteges felépítését. Ezeknek a rügyeknek köszönhetően a tenyészetekben megjelennek a csak egyik szövettípus tulajdonságait hordozó növénykéik, sőt újabb, másféle elrendezésű kimérák is felbukkanhatnak. A kimérák mikroszaporításánál tehát először meg kell határozni a legkedvezőbb táptalaj-összetételt, a hormonok fajtáját és mennyiségét, a szénhidrátforrás fajtáját és minőségét, a tápanyagok mennyiségét (Pogany és Lineberger, 1991).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Az anyanövények származása és előkezelése

Vizsgálataimat 1993-ban kezdtem el a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszékén. Ekkor a *Hosta fortunei* 'Albopicta' fajtájával végeztem előkísérleteket. Az anyanövény a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Budai Arborétumában található, származása ismeretlen. Az itt szerzett tapasztalatokat és az erre a növényre kidolgozott szaporítástechnológiát vettem a további taxonok szaporításánál kiindulási alapnak (Szafián et al. 1995, 1996, 1997).

1995 tavaszán újabb taxonokat szereztem be Hollandiából, Marco Fransen Ter Are-i *Hosta*-kertészetéből. A fajtákat sorszámmal láttam el az alábbiak szerint:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1. <i>Hosta fortunei</i> 'Hyacinthina' | 19. <i>Hosta</i> 'Drummer Boy' |
| 6. <i>Hosta tardiana</i> 'Blue Moon' | 20. <i>Hosta</i> 'Gold Drop' |
| 7. <i>Hosta tardiana</i> 'Devon Green' | 21. <i>Hosta</i> 'Gold Haze' |
| 8. <i>Hosta tardiana</i> 'Halcyon' | 30. <i>Hosta</i> 'Samurai' |
| 10. <i>Hosta tokudama</i> | 31. <i>Hosta</i> 'Sum and Substance' |
| 12. <i>Hosta</i> 'Blue Cadet' | 38. <i>Hosta fortunei</i> 'Aurea' |
| 18. <i>Hosta</i> 'Dew Drop' | |

A sorszámozás folyamatos volt, de nem minden taxon került be a kísérletekbe, a kimaradtak nem szerepelnek a felsorolásban. A továbbiakban a könnyebb áttekinthetőség végett a fenti sorszámmal szerepeltettem a fajtákat.

A kísérletek indításánál a felsorolt fajták mindegyikét *in vitro* kultúrába vittem, de a tényleges vizsgálatokat csak a 7, 12, 18, 20, 21 és 30-as fajtákkal végeztem el. A többi fajtát az ezeken szerzett tapasztalatok felhasználásával neveltem tovább. Így azok szaporítása is megoldott, csupán nem rendelkezem olyan részletes adatokkal az *in vitro* szaporításukról, mint a kiválasztott

fajták esetében. A kiválasztás elsősorban a jó szaporodási ráta és a kedvező növekedési erély alapján történt, de természetesen a vizsgálatok egyik irányát képző kiméra fajtáknak (18,30) is bele kellett kerülni a szélesebb körű vizsgálatokba.

A fajták indítás előtti hidegkezelésére nem volt szükség, mert a szabadban teleltetett növények természetes úton kapták meg a kihajtásukhoz szükséges hideghatást.

3.2 *In vitro* tenyészetek létesítése

A talajból kiemelt rizómákról a gyökereket éles késsel eltávolítottam, majd a rátapadt talajszemcséket folyó vízben erős vízszugár segítségével lemostam. Kiindulási anyagként a rizómákon található fejlett rügyeket használtam. Ezeket úgy vágtam le, hogy az alapi részüknél maradjon egy darabka a rizómából. Az így leválasztott rügyeket főzőpohárba helyeztem, majd néhány csepp Tween 80-at cseppentettem a rügyekre és a pohár száját gézlappal lezártam. Ezek után a rügyeket egy óra hosszáig folyó csapvízben mostam. A továbbiakban kétfelé osztottam, és kétféle fertőtlenítési eljárást próbáltam ki. A *Hosta fortunei* 'Albopicta' indítása során alkalmazott eljárás hatékonynak bizonyult, ezért ezt választottam egyiknek, míg a másiknak egy kevésbé roncsoló hatású eljárást próbáltam ki.

Az I. eljárás: -10 perces áztatás 0,5 %-os HgCl₂ oldatban
 -10 perces áztatás 70 %-os etil-alkohol oldatban
 -háromszori öblítés steril desztillált vízben.

A II. eljárás: -10 perces áztatás kétszeresére hígított Clorox
 oldatban (NaOCl tartalma kb. 2,5%)
 -5 perces áztatás 70 %-os etil-alkohol oldatban
 - háromszori öblítés steril desztillált vízben.

A fenti kezeléseket a lamináris boxban végeztem el. Az utolsó öblítővízből kivett rügyeket steril petricsészébe raktam, és hagytam, hogy a légáram leszártsa őket. A rügyekről eltávolítottam a külső 2-3 rügpikkelyt, majd friss metszlapot vágva levágtam a rajta maradt rizómarészt. Az így előkészített rügyeket hormonmentes táptalajra helyeztem.

A fertőzésmentes rügyeket 1 hét után a *Hosta fortunei* 'Albopicta' esetében legjobbnak bizonyult, 6 mg/l benzil-adenint tartalmazó táptalajra; 3 mg/l benzil-adenint tartalmazó táptalajra illetve 6 mg/l kinetint tartalmazó táptalajra helyeztem és ezen végeztem el a felszaporítást (Szafián et. al, 1995). Fajtánként és táptalajonként 12 db rügyet tudtam felhasználni a rendelkezésemre álló anyanövények kis száma miatt. A sokszorozás során az axilláris rügyekből fejlődött sarjhajtásokat osztottam és raktam át friss táptalajra.

A szaporítási szakaszban az átrakásokat 6 hetenként végeztem. A kellő nagyságú egyedszám elérésekor tudtam beállítani a szénhidrátok szaporodásra kifejtett hatásának vizsgálatát célzó kísérleteket. Ezeket a kísérleteket 3 ismételtsben, ismételtsenként 12 mintával végeztem.

3.3. Táptalajok és kiegészítők

Kísérleteimben az alap táptalaj minden esetben a Murashige és Skoog (1962) által kidolgozott MS táptalaj volt. Ez Skirvin (1980) besorolása szerint, mely a táptalajokat sókoncentrációjuk alapján 3 csoportba sorolja, a magas sókoncentrációjú táptalajok közé tartozik. Mivel az előkísérletek során a sókoncentráció magasnak bizonyult, a makroelemeket megfelelő koncentrációban adagoltam a táptalajhoz. A mikroelemek koncentrációja változatlan maradt, a vitaminok koncentrációját az eredeti receptúrában szereplő érték kétszeresére emeltem, a tiamin kivételével, melynek koncentrációját tízszeresére emeltem. Kiegészítésként még 80 mg/l mennyiségben adenin-szulfátot és 100 mg/l mio-inositol adagoltam a táptalajokhoz.

A kísérletek során több mint 40 féle táptalajt használtam fel. A dolgozatban megtartottam a kísérletek során használt eredeti jelzéseket, így a fényképeken is mindig ezek szerepelnek. A

számozás esetleges következetlenségét az okozza, hogy a dolgozatban nem szerepel az összes táptalajon szerzett vizsgálati eredmény.

A táptalajokban a citokininek közül kinetin (KIN) és benzil-adenin (BA), az auxinok közül naftil-ecetsav (NES) került alkalmazásra. A vizsgálatok kiterjedtek a különböző koncentrációban alkalmazott cukrok – szacharóz, fruktóz és glükóz – hatására is. A gyökeresítéshez hormonmentes táptalajt, illetve különböző kiegészítőket (K-humát, fulvosav, aktív szén és NES) használtam. Elongációs táptalajt nem alkalmaztam.

Az alkalmazott táptalajok összetételét a 1-4 táblázatok tartalmazzák.

1. táblázat Az indukció és a felszaporítás során a táptalajokban felhasznált növekedésszabályzók

Táptalaj jelzése	Citokinin	Mennyiség (mg/l)	Auxin	Mennyiség (mg/l)
LB2	BA	2	NES	0,1
LB3	BA	3	NES	0,1
LB6	BA	6	NES	0,1
LK6	KIN	6	NES	0,1

2. táblázat A szacharózmennyiség hatásának vizsgálata során alkalmazott növekedésszabályzók

Táptalaj jelzése	Szacharóz mennyiség (g/l)	Citokinin	Mennyiség (mg/l)	Auxin	Mennyiség (mg/l)
LS0	0	BA	2	NES	0,1
LS1	5	BA	2	NES	0,1
LS2	10	BA	2	NES	0,1
LS3	15	BA	2	NES	0,1
LS4	20	BA	2	NES	0,1
LS5	25	BA	2	NES	0,1
LS6	30	BA	2	NES	0,1
LS7	35	BA	2	NES	0,1
LS8	40	BA	2	NES	0,1

3. táblázat A különböző szénhidrátok hatásának vizsgálata során alkalmazott táptalajokban alkalmazott szénhidrátok és növekedésszabályzók mennyisége

Táptalaj jelzése	Szénhidrát	Mennyiség (g/l)	Citokinin	Mennyiség (mg/l)	Auxin	Mennyiség (mg/l)
CG1	glükóz	0	BA	2	NES	0,1
CG2	glükóz	5	BA	2	NES	0,1
CG3	glükóz	10	BA	2	NES	0,1
CG4	glükóz	20	BA	2	NES	0,1
CG5	glükóz	30	BA	2	NES	0,1
CG6	glükóz	40	BA	2	NES	0,1
CG7	glükóz	50	BA	2	NES	0,1
CF1	fruktóz	0	BA	2	NES	0,1
CF2	fruktóz	5	BA	2	NES	0,1
CF3	fruktóz	10	BA	2	NES	0,1
CF4	fruktóz	20	BA	2	NES	0,1
CF5	fruktóz	30	BA	2	NES	0,1
CF6	fruktóz	40	BA	2	NES	0,1
CF7	fruktóz	50	BA	2	NES	0,1
CS1	szacharóz	0	BA	2	NES	0,1
CS2	szacharóz	5	BA	2	NES	0,1
CS3	szacharóz	10	BA	2	NES	0,1
CS4	szacharóz	20	BA	2	NES	0,1
CS5	szacharóz	30	BA	2	NES	0,1
CS6	szacharóz	40	BA	2	NES	0,1
CS7	szacharóz	50	BA	2	NES	0,1

4. táblázat A gyökeresítés során használt táptalajkiegészítők

Táptalaj jelzése	NES (mg/l)	Aktív szén (g/l)	K-humát (g/l)	Fulvosav (ml/l)	Alaptáptalaj
LG1	0	0	0	0	fMS
LG2	0,1	0	0	0	fMS
LG3	0,1	1	0	0	fMS
LG4	0,1	0	0,2	0	fMS
LG5	0,1	0	0	20	fMS

A táptalajok szilárdítására agar III-t (Reanal) használtam 7 g/l mennyiségben. A táptalaj pH értékét KOH hozzáadásával, autoklávozás előtt 5,8-re állítottam be. A táptalajokat 120°C-on, 10^5 Pa nyomáson 35 percig autoklávoztam. A kész táptalajokat 1 hét inkubációs idő elteltével használtam fel.

A szilárd táptalajok mellett folyékony táptalajokat is kipróbáltam, de a kísérletek még korai fázisban tartanak. Több probléma is felvetődött, melyek a továbbiakban megoldásra várnak. Ezért ezek eredményeiről még csak részlegesen tudok beszámolni. A folyékony táptalajokhoz paclobutrazolt (Cultar) is használtam 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 és 2,5 mg/l koncentrációban.

3.4. Az *in vitro* tenyésztés körülményei

A kísérleteket 1993-ban a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszékének laboratóriumában kezdtem és ott is folytattam azokat. A fajták üzemi szaporítását a Szombathelyi Erdészeti Rt. Biotechnológiai Laboratóriumában végzik, üzemi eredményeim onnan származnak.

A kultúrák indításához (I. fázis) 100 ml-es Erlenmeyer lombikokat használtam, majd a II. és III. szakaszban 220 ml-es befőttesüvegek használatára tértem át. Az üzemi szaporítás Vegbox márkájú műanyag dobozokban folyik. Autoklávozáskor a lombikokat alufóliával, a befőttesüvegeket alufóliával és a hozzájuk tartozó alumínium tetővel zártam le. A tenyészedenyeket 3 rétegű Ongrofol fóliával zártuk le. Ez a zárás viszonylag nagy mértékű légcserét enged meg.

A fényszoba klimatizálása nem teljesen megoldott. Bár klímaberendezés hűti, a hőingás igen nagy. Az átlagos hőmérséklet 25 °C. A megvilágítást 30 W-os, 1:1 arányban elhelyezett F7-es és F31-es fénycsövek biztosítják. A fénycsövek a tenyészetek fölött helyezkednek el. A megvilágítás erőssége $20 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$, a fotoperiódus 16/8 óra.

A folyékony kultúrák nevelésére a Sasad Rt. által gyártott rotort, illetve rázóasztalt használtam.

A szacharóz mennyiségének hatását vizsgáló kísérletek során az egyes fajtákból 0-40 g/l szacharózt tartalmazó, azonos növekedésszabályzó anyagot, azonos koncentrációban (2 mg/l BA) tartalmazó táptalajra 120 növényt (10 üveg, üvegenként 4 explantátumot) helyeztem három ismétlésben. Ebben a kísérletben csak a 18, 20 és a 21 fajták szerepeltek. A kísérlet időtartama 4 átrakás (6 hónap) volt. Értékelésre a 6. hónap végén került sor, mikor számoltam a sarjszámot, mértem a legkisebb és legnagyobb levélhosszúságot, és a tarka fajta (18) esetében vizsgáltam a tenyészetekben a fajtától eltérő mintázatú sarjak arányát.

3.5. Az *in vivo* tenyésztés körülményei

A kísérletek során meggyökeresedett növényeket elsősorban a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Budai Arborétumában lévő üvegházban, talpfűtéssel ellátott fóliaalagútban akklimatizáltam, de egy részük a Soroksári Kísérleti Üzem természetes magasárnyékoló alatt lévő fóliasátraiban került akklimatizálásra.

Az akklimatizálandó növényeket 104 lyukú sejttálcába ültettem, balti tőzeg és perlit 2:1 arányú keverékébe. Az akklimatizálódott növényeket 5,5-es műanyag cserepekbe ültettem és ebben neveltem tovább. A végső cserepük 10-es cserép volt. A nevelés közege balti tőzeg, hahóti tőzeg és alginit 6:3:1 arányú keveréke volt. A tápanyagutánpótlásra Osmocote tartós hatású műtrágyát (4,5 kg/m³) és Kristalon vízzoldható műtrágyát (1,5 g/l) használtam.

3.6. Az üzemi szaporítás és nevelés körülményei

A fajták üzemi szaporítása 1998 őszén kezdődött meg a Szombathelyi Erdészeti Rt. Biotecnológiai Laboratóriumában. A fajtákat újraindítottuk, a már kidolgozott módszer szerint. A szaporítás itt nem üvegekben, hanem Vegbox típusú műanyag dobozokban folyik. A szaporítás során semmiféle káros jelenséget nem tapasztaltunk.

A fajtákat év közben többszöri átrakással tartják fenn, s a felszaporítást úgy végzik, hogy februárra elegendő mennyiségű sarj legyen a gyökereztetéshez. A gyökerezítés is az említett műanyag dobozokban történik. A gyökeres sarjakat Jiffy tőzegpogácsába tűzdelik. Az akklimatizáció kedvezőbb lehetőségek hiányában az épületben található, mesterséges megvilágítással ellátott nevelőszobában történik. A tőzegpogácsába tűzdelt növényeket hagyományos szaporítótálákba helyezik és ezeket műanyag doboztetővel zárják le. A ládákat polcokra helyezik. Az akklimatizáció alatt rendszeresen szellőztetik a növényeket.

Az akklimatizálódott növénykéket a Prenor Kft telephelyén egy hónap üvegházi nevelés után 8×8-as cserepekbe ültetjük. Értékesíthető áruvá nevelésük 2 literes konténerben történik.

A cserepezéshez és konténerezéshez 60% balti tőzegből, 30% pötrétei tőzegből és 10% alginitből álló keveréket használunk, melynek pH értéke 6,5-6,8 közötti.

A tápanyagutánpótlás 4,5 kg/m³ Osmocote Exact Standard, 8-9 hónap hatástartamú műtrágyával történik.

3.7. Az anatómiai vizsgálatok módszerei

Az egyes kezelések értékelésénél megszámloltam a fejlődött sarjakat, a gyökerek számát, megmértem a levelek hosszát és szélességét, és a gyökerek hosszát. A méréshez fertőtlenített fém vonalzót használtam. Az egységesség és a tarkaság csak vizuálisan értékelhető tulajdonság. Egységességen a tenyészetekben lévő egyforma egyedek arányát, míg a tarkaságon a leveleken belüli klorofillhiányos rész nagyságát értem.

Az anatómiai vizsgálatokat részben fénymikroszkóppal, részben scanning elektronmikroszkóppal végeztem. A szöveti felépítés tanulmányozásához a mikroszaporítás különböző szakaszaiban, az akklimatizálás során és a szabadföldön nevelt növényekről is vettem mintákat. A vizsgálatokhoz az egyes hajtások 3. legfiatalabb levelét használtuk fel. A sokszorozási szakaszban a mintákat azonos táptalajon (2 mg/l BA) fejlődő növényekről vettük. Az

akklimatizálásra kiültetett növényekről és az akklimatizáció végén, a már begyökeresedett, de még üvegházi körülmények között fejlődő növényekről is vettünk mintákat.

A fény- és scanning elektronmikroszkópos vizsgálatokat a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Központi Laboratóriumában végeztem.

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a mintákat toluidinkékkel festettük meg, műgyantába ágyasztuk és mikrotonnal készítettünk belőlük metszeteket. A mikroszkópos munkák közben a metszetekről Canon típusú fényképezőgéppel készítettünk felvételeket.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a mintákat a következőképpen készítettük elő:

- A mintát az élő sejtszerkezet megőrzése végett fixálni kell. Ehhez 5%-os glutáraldehidet (foszfátpufferrel 7.2 pH-ra állítva) használtunk, mellyel a mintákat 2-3 óráig kezeltük, majd azokat 1-2 óráig 1%-os ozmium-tetroxidban tartottuk.
- A minta mosását 7.2 pH-jú foszfátpufferrel végeztük háromszor egymás után, hogy a fixálóanyagot eltávolítsuk.
- Ezt követte a dehidráció, melyet fokozatosan egyre töményebb, majd végül abszolút acetonnal végeztünk.
- A következő lépés a minta szárítása kritikus ponton, melyhez CPD 020 Blazers típusú berendezést használtunk.
- Ezután a mintát CPD 040 típusú katódporlasztóban körülbelül 30 nm vastagságú aranyréteggel vontuk be azért, hogy felületét vezetőképpé tegyük.

Ezt követően a mintákat elektronmikroszkóp alatt értékeltük, s a legjellemzőbb helyekről fényképfelvételeket készítettünk. A vizsgálatokhoz BS 300 típusú pásztázó (scanning) elektronmikroszkópot használtunk.

3.8. Az adatok kiértékelésének módszerei

Az adatok kiértékelését egy- és kéttényezős varianciaanalízissel (Sváb, 1973.) végeztem, melyhez Statgraf 3.0, Excel 5.0 programokat használtam. Az eredményeket grafikonokon ábrázoltam.

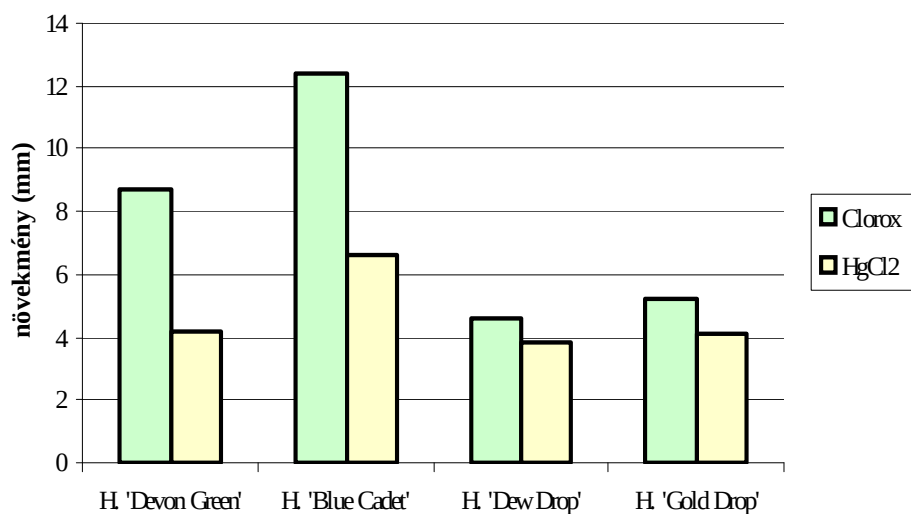
4. EREDMÉNYEK

A *Hosta* taxonok mikroszaporítása során kapott eredményeimet az alkalmazott technológiai sorrendben, az egyes mikroszaporítási szakaszokhoz kapcsolódóan mutatom be.

4.1. A kultúra indítása, fertőtlenítési eljárások vizsgálata

Az Anyag és módszer c. fejezetben ismertetett kétféle fertőtlenítési eljárást minden fajta esetében kipróbáltam. Mindkét eljárás esetében a szabadföldből kiemelt rizómák rügeit használtam fel. Az indítás ideje április 2. volt. Az I. eljárás hatékonysága nagyon magas volt, a fertőzésmentes inokulumok aránya több mint 85 % volt. A II. eljárás valamivel gyengébb hatékonyságú volt, itt az inokulumok 70%-a bizonyult fertőzésmentesnek.

A fertőzött tenyészetekben a fertőzés típusát vizsgálva megállapítható volt, hogy a higany-kloridos kezelés esetében a fertőzéseket majdnem teljes egészében gombák okozták, míg a Clorox esetében ez az arány 50 % volt. A növények fertőtlenítése minden esetben sokkot okoz. Ezért az indítást követő 3. héten értékeltem, hogy a rügek fejlődésére milyen hatással van a fertőtlenítő eljárás. Azt tapasztaltam, hogy a Clorox kevésbé okoz káros utóhatást, a növények gyorsabban és erőteljesebben indulnak fejlődésnek. (13 ábra).



13. ábra A rügyek kihajtásának alakulása a fertőtlenítést követően az egyes fajták esetében.

Az indításhoz a *Hosta fortunei* 'Albopicta' esetében bevált 6 mg/l BA és 0,1 mg/l NES táptalaj mellett kipróbáltam a 6 mg/l kinetin és 3 mg/l BA-t tartalmazó táptalajt is, 0,1 mg/l NES kiegészítéssel. A hat fajta viselkedését a táptalajokon az 5. táblázatban foglaltam össze. Az értékelésre az indítást követő 10. héten, a második átrakáskor került sor.

5. táblázat A *Hosta* taxonok szaporodási rátája az indító táptalajokon

Táptalaj megnevezése		Fajta neve,sorszama					
		'Devon Green' (7)	'Blue Cadet' (12)	'Dew Drop' (18)	'Gold Drop' (20)	'Gold Haze' (21)	'Samurai' (30)
LB6	Sarjszám (db)	1,84 (a)*	1,88 (a)	1,82 (ab)	1,96 (ab)	1,86 (ab)	1,92 (a)
LK6		1,06 (b)*	1,14 (b)	1,73 (a)	1,81 (a)	1,69 (a)	1,27 (b)
LB3		1,67 (ab)*	1,51 (ab)	2,11 (b)	2,34 (b)	2,26 (b)	1,41 (ab)

* a és b szignifikánsan különböző értékek, az adott fajta különböző táptalajokon vizsgálva

Érdekes tény, hogy a vizsgált hat fajta fele a 6 mg/l BA-t tartalmazó táptalajon, míg a másik fele a 3 mg/l BA-t tartalmazó táptalajon hozta a legtöbb sarjat. A kinetin bár minden fajtánál

rosszabb eredményt mutatott, mint a BA bármely koncentrációja, két fajtánál (18, 20) nem tért el sokban a második legjobbtól.

A hajtások hosszában és a fejlődött levelek szélességében ekkor nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni.

Az indító szakasz után a növények felszaporítását a *Hosta fortunei* 'Albopicta' esetében legjobbnak bizonyult 2 mg/l BA-t tartalmazó táptalajon végeztem mindaddig, míg a további kísérletekhez elegendő számú növény állt rendelkezésemre.

A felszaporítás alatt vizsgáltam a különböző fajták szaporodási rátáját is. Ez igen eltérőnek bizonyult, de a rokonságot mutató fajták esetében hasonlóságot figyeltem meg. A kapott eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat A különböző fajták szaporodási rátája az LB2 táptalajon. Átrakások: 6 hetente.

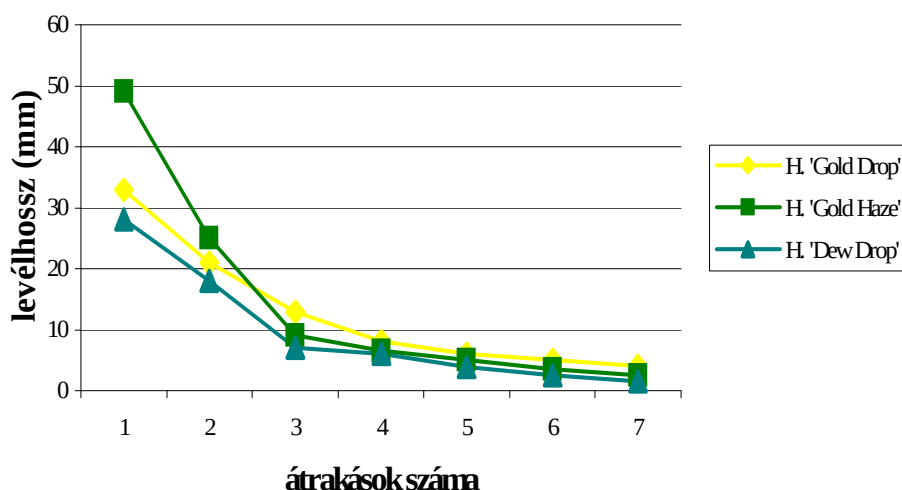
Fajta	Átrakások száma					
	1	2	3	4	5	6
	Szaporodási ráta					
'Devon Green' (7)	1,7	1,8	2,1	2,2	2,4	2,6
'Blue Cadet' (12)	1,8	2,0	2,3	2,4	2,7	2,9
'Dew Drop' (18)	2,0	2,4	2,9	2,9	3,1	3,3
'Gold Drop' (20)	2,0	2,3	2,7	3,0	3,3	3,5
'Gold Haze' (21)	1,9	2,1	2,3	2,4	2,6	2,7
'Samurai' (30)	1,4	1,4	1,6	1,9	2,1	2,4

Az első átrakás időpontjában csak a 30-as fajta szaporodási rátája (1,4 db) mutat szignifikáns különbséget a többi fajtaétól. Ez a különbség végig megmaradt a vizsgált átrakások során. A hatodik átrakás eredményeit vizsgálva megállapítható, hogy a 18-as és a 20-as fajta gyors ütemben szaporodik. Szaporodási rátájuk szignifikánsan különbözik a többi fajtaétól. A 21-es, 7-es és a 12-es fajta lassabb ütemben szaporodik, s a szaporodási rátájuk szignifikánsan különbözik mind

a 18-as és 20-as, mind a 30-as fajta szaporodási rátájától. A 30-as fajta lassan szaporodik, szaporodási rátája szignifikánsan alacsonyabb a többi fajtánál.

A szaporodási ráta változása mellett mértem a levéllemez hosszúságának és szélességének, valamint a kettő arányának alakulását is.

Megfigyelhető, hogy nemcsak a levéllemez hossza és szélessége csökken az átrakások során, de az arányuk is változik (14. ábra). Általánosan megállapítható, hogy a mikroszaporítás folyamán a levelek kerekdedebbé válnak, az egyes fajták elveszítik a fajtára jellemző levélalakot, és egymáshoz nagyon hasonlóvá válnak.



14. ábra Az egyes fajták levéllemez hosszúságának változása az átrakások során

4.2. A különböző szénhidrátok hatása a fajták szaporodására és a fajtaazonosságra

A megfelelő sarjszám elérésekor a következő kísérleteket állítottam be:

- I. A szacharóz mennyiségének hatása a szaporodásra
- II. A különböző cukrok hatása a szaporodásra és a fajták állandóságára.

4.2.1.A szacharóz mennyiségének hatása a szaporodásra

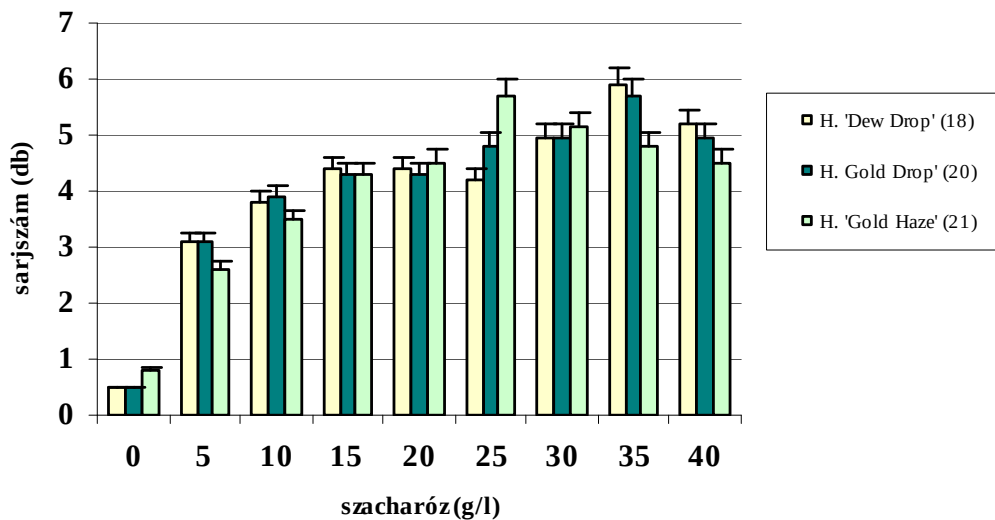
Samyn (1995) kísérletei alapján választ kerestem arra a kérdésre, hogy a szacharóz mennyisége milyen mértékben befolyásolja a szaporodási rátát a különböző *Hosta* taxonok estében. A kapott eredményekről a 7. táblázat ad összefoglalást.

7. táblázat A 18, 20 és 21-es fajták sarjszámának és sarjhosszának alakulása különböző szacharózkoncentrációk alkalmazásakor

A táptalaj jelzése	'Dew Drop' (18)		'Gold Drop' (20)		'Gold Haze' (21)	
	Sarjszám (db)	sarjhossz (mm)	sarjszám (db)	sarjhossz (mm)	Sarjszám (db)	sarjhossz (mm)
LS0	0,6 (a)	11,8 (a)	0,5 (a)	12,3 (a)	0,8 (a)	13,6 (a)
LS1	3,1 (b)	21,5 (b)	3,1 (b)	25,4 (b)	2,7 (b)	20,4 (b)
LS2	3,7 (bc)	34,2 (c)	3,8 (b)	32,0 (c)	3,5(bc)	25,6 (b)
LS3	4,3 (c)	39,0 (c)	4,2 (c)	34,9 (cd)	4,2(c)	32,2(bc)
LS4	4,3 (c)	39,1 (c)	4,2 (c)	37,0 (d)	4,4(c)	38,4 (c)
LS5	4,2(c)	38,6 (c)	4,7 (cd)	37,5 (d)	5,6(d)	44,6 (d)
LS6	4,9 (cd)	33,3 (c)	4,9 (cd)	38,9 (d)	5,1(d)	43,0 (d)
LS7	5,8 (d)	27,6(bc)	5,5(d)	34,6	4,7(cd)	37,6 (c)
LS8	5,2(d)	24,0 (b)	4,9 (cd)	31,4 (c)	4,4(c)	33,4 (c)

a,b,c,d szignifikánsan különböző értékek, az adott fajta adott tulajdonságát különböző táptalajokon vizsgálva

A 15. ábrán látható a három *Hosta* taxon sarjszámának alakulása. A szacharózmentes táptalajon mindhárom fajta igen gyengén fejlődött, az átlagos sarjszám 1 alatt volt. Már 5 g/l szacharóz adagolása látványos eredményt hozott mindhárom fajta esetében. A 18-as és 20-as fajta esetében a legjobbnak a 35 g/l szacharózt tartalmazó táptalaj, míg a 21-es fajtánál a 25 g/l szacharózt tartalmazó táptalaj bizonyult a legmegfelelőbbnek. A 40 g/l szacharózt tartalmazó táptalajon már kedvezőtlenebb a növekedés, a sarjszám csökken. A 21-es fajtánál a leghosszabb hajtások szintén a 25 g/l szacharóz tartalmú táptalajon fejlődtek. A 18-as és 20-as fajtáknál a sarjszám szempontjából legkedvezőbb táptalajon a hajtások hossza kisebb, a 18-as fajta esetében szignifikánsan kisebb volt mint a legnagyobb hajtáshossz, melyet a 20 g/l (18-as fajta) illetve a 30 g/l (20-as fajta) szacharózt tartalmazó táptalajon tapasztaltunk.



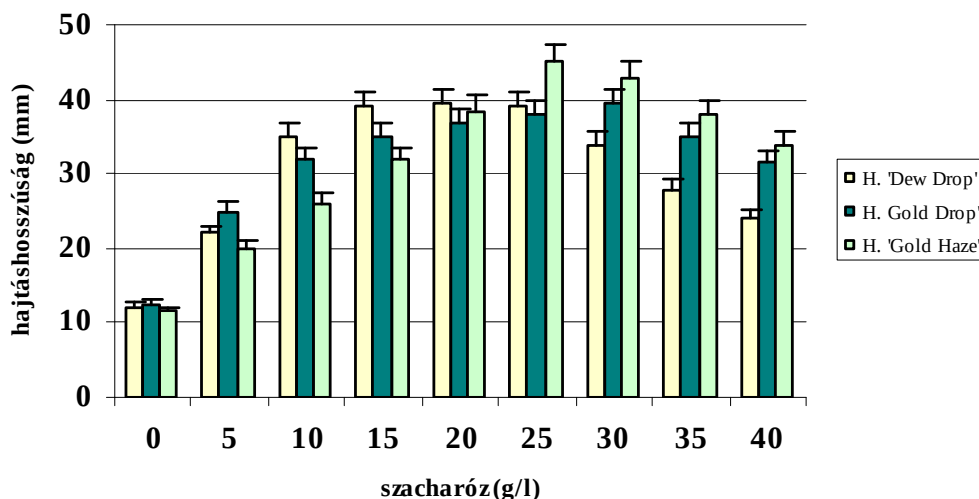
15. ábra Az egyes fajták sarjszámainak alakulása különböző mennyiségű szacharóz hatására

Az eredményekből kitűnik, hogy a szacharóz mennyiségének alapvető hatása van a tenyészetek fejlődésére. Ez a 18-as fajta esetében a legszembetűnőbb, mikor ez a tényező a tarkaság mértékét, és a szemmel azonnal látható fajtaazonosságot is befolyásolja (16. ábra).



16. ábra A 18-as számú *Hosta* 'Dew Drop' tenyészetek 15 g/l (balra) és 35 g/l (jobbra) szacharózt tartalmazó táptalajokon

A hajtások hosszúságát is befolyásolja a táptalaj szacharóztartalma. Alacsony és magas szacharózkoncentráció mellett a hajtások rövidek maradnak, a sarjszám szempontjából optimális szacharóz mennyiség körül fejlődnek a leghosszabb hajtások. Az egyes fajták között azonban eltéréseket tapasztalhatunk. A rövid hajtások megnehezítik a sarjak szétválasztását és a kiültetés során is nehezebb a növényeket kezelni. A hajtáshosszúságok alakulását a 17. ábrán láthatjuk.



17. ábra Az egyes fajták hajtáshosszainak alakulása különböző mennyiségű szacharóz hatására

4.2.2. A különböző cukrok hatásának vizsgálata a fajták szaporodására és állandóságára

Mint az irodalmi áttekintésben ismertettem, néhány kultúra esetében kedvezőbb hatású lehet a szacharóznál a glükóz vagy a fruktóz alkalmazása. Annak vizsgálatára, hogy ez hogyan alakul a *Hosta* taxonok esetében, összehasonlító kísérleteket állítottam be a 7, 12, 18, 30 számú fajtákkal. Ebben 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 g/l szacharózt, fruktózt és glükózt tartalmazó táptalajokra helyeztem a növényeket.

A sarjszámok alakulását tekintve a 4 fajta nagyon eltérően viselkedett. Míg a 12, 18 és 30-as fajták esetében a legnagyobb sarjszámot valamely szacharóz tartalmú táptalajon kaptam, addig a 7-es fajta esetében mind a fruktóz, mind a glükóz jobbnak bizonyult a szacharóznál.

A 7-es fajta a 10 g/l fruktózt tartalmazó táptalajon hozta a legtöbb sarjat (5,6 db), és a glükózt tartalmazó táptalajok közül is ez a koncentráció bizonyult a legkedvezőbbnek (4,8 db). A szacharóz 30 g/l koncentrációban adta a legkedvezőbb eredményt (4,2 db), de ez szignifikánsan

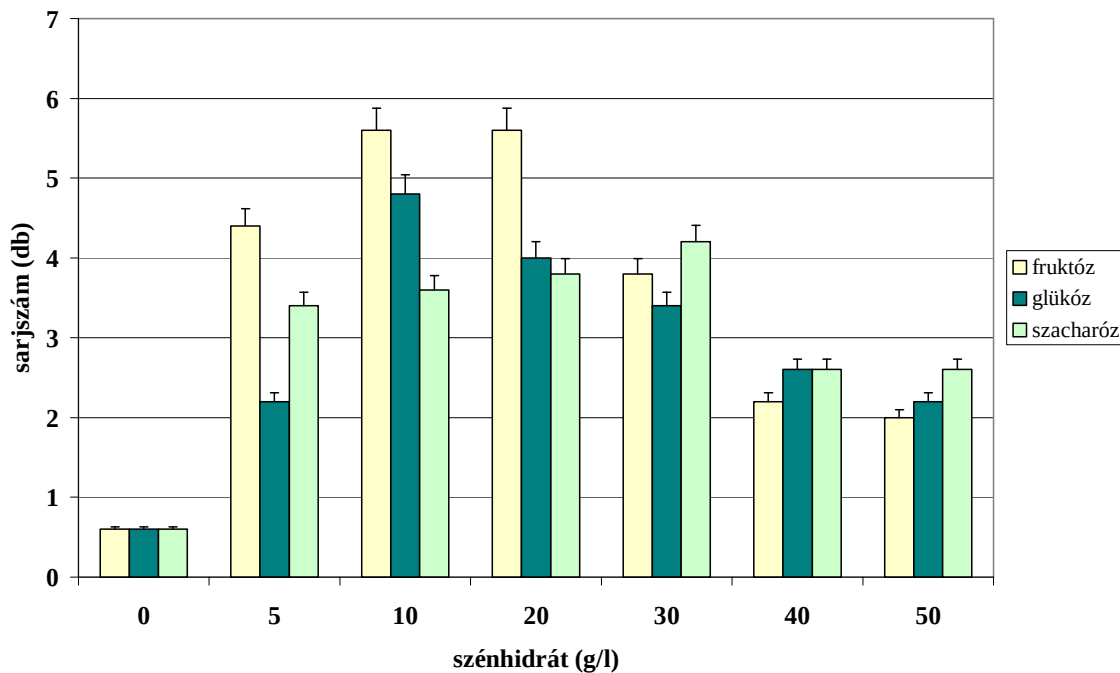
csak a 10 g/l fruktózon kapott eredménytől különbözik. A fajta nagyon érzékeny a túl magas cukorkoncentrációra, melyre gyors sarjszám-csökkenéssel reagál. A hajtások hosszát vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a glükóz tartalmú táptalajokon a hajtások nagyon rövidek voltak, a tenyészetek kompakt sarjcsokrokból álltak. A leghosszabb hajtások 20 g/l szacharóz (25,4 mm) illetve 30 g/l fruktóz (24,8 mm) mellett fejlődtek (18. és 19. ábra).

A 12-es fajtánál mindhárom szénhidrát esetében a 20 g/l töménység bizonyult legkedvezőbbnek, itt kaptam a legtöbb sarjat. A három szénhidrát közül a szacharóz volt a legjobb (7,2 db), ezen szignifikánsan több sarj fejlődött mint a fruktózon (5,2 db) vagy a glükózon (5,6 db). A két utóbbi hatása azonban nem különböztethető meg egymástól. A hajtáshossz tekintetében érdekes eredmény, hogy ennél a fajtánál a szacharóz hatására fejlődtek a legrövidebb hajtások. A fruktóz és a glükóz esetében általában egyforma hosszúságúak voltak a hajtások. A leghosszabb hajtások (41,6 mm) a 10 g/l fruktózt tartalmazó táptalajon fejlődtek, de ez az érték szignifikánsan sem az 5g/l, sem a 20 g/l fruktóznál kapott hajtáshosszaktól nem tér el (20. és 21. ábra).

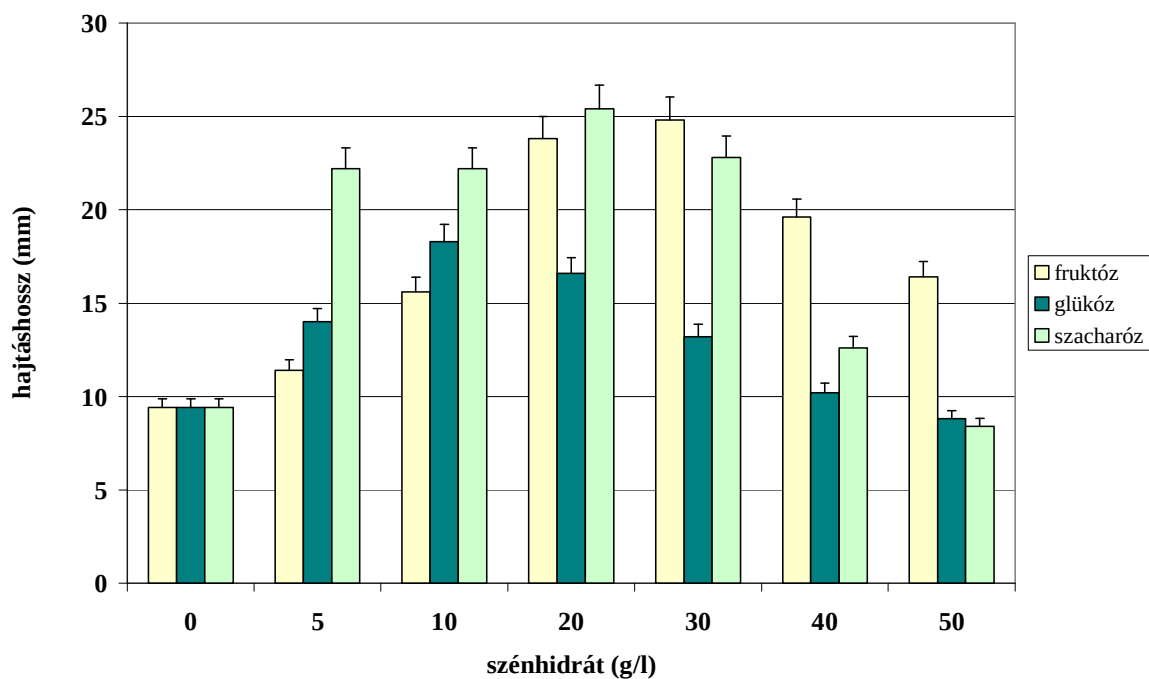
A 18-as fajta esetében a legtöbb sarj a 40 g/l szacharózt tartalmazó táptalajon fejlődött (5,2 db). A fruktózt és a glükózt tartalmazó táptalajok közül egyaránt a 20 g/l volt a legjobb (4,8 db). A fajtaival végzett előző kísérletsorozatban a 35 g/l szacharóz jobbnak bizonyult (5,8 db), mint az itt legjobb eredményt mutató 40 g/l, de ez azzal magyarázható, hogy az az optimális koncentráció, de ez az érték most nem szerepelt a kezelések között. Érdekes, hogy a fruktóz koncentrációjának optimálison túli emelése milyen hirtelen romlást jelent a sarjszám tekintetében. A 18-as fajtánál a legrövidebb hajtások a glükóz tartalmú táptalajokon fejlődtek. Az optimális koncentráció feletti glükóz mennyiség hatására a hajtáshosszak gyorsan csökkentek. A szacharóz és a fruktóz közel egyforma hajtáshosszakat eredményezett. A leghosszabb hajtások (39,1 mm) a 20 g/l szacharózt tartalmazó táptalajon fejlődtek (22. és 23. ábra).

A 30-as fajta az előzőkhöz hasonlóan viselkedett. A legtöbb sarjat a 30 g/l szacharózt tartalmazó táptalajon hozta (4,8 db), míg a fruktóz és a glükóz optimális koncentrációja 20 g/l (4,2 illetve 4,3 db). A fruktóz mennyiségének növelése itt is hirtelen sarjszám-csökkenést idézett elő. A 30-as fajta esetében a hajtáshossz és a sarjszám alakulása egyforma lefutású görbét mutatott. Nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni a három szénhidrát hajtáshosszra gyakorolt hatása

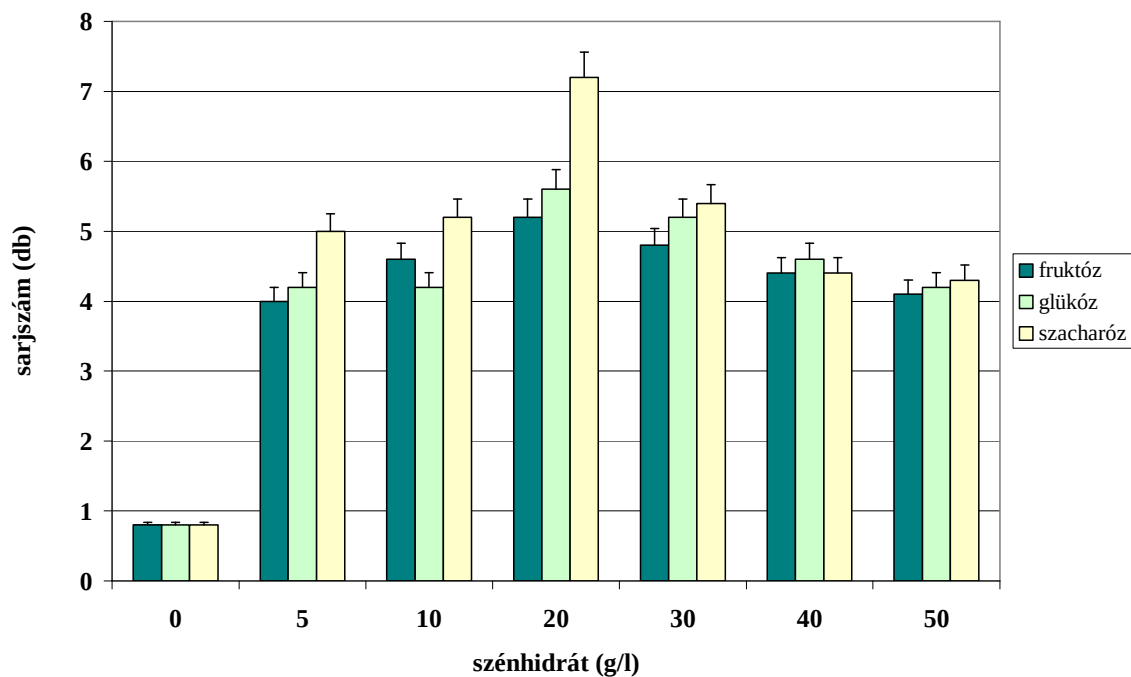
között. Míg a sarjszám a fruktóz magasabb koncentrációin hirtelen lecsökkent, a hajtáshossz nem reagált ugyanígy (24. és 25. ábra).



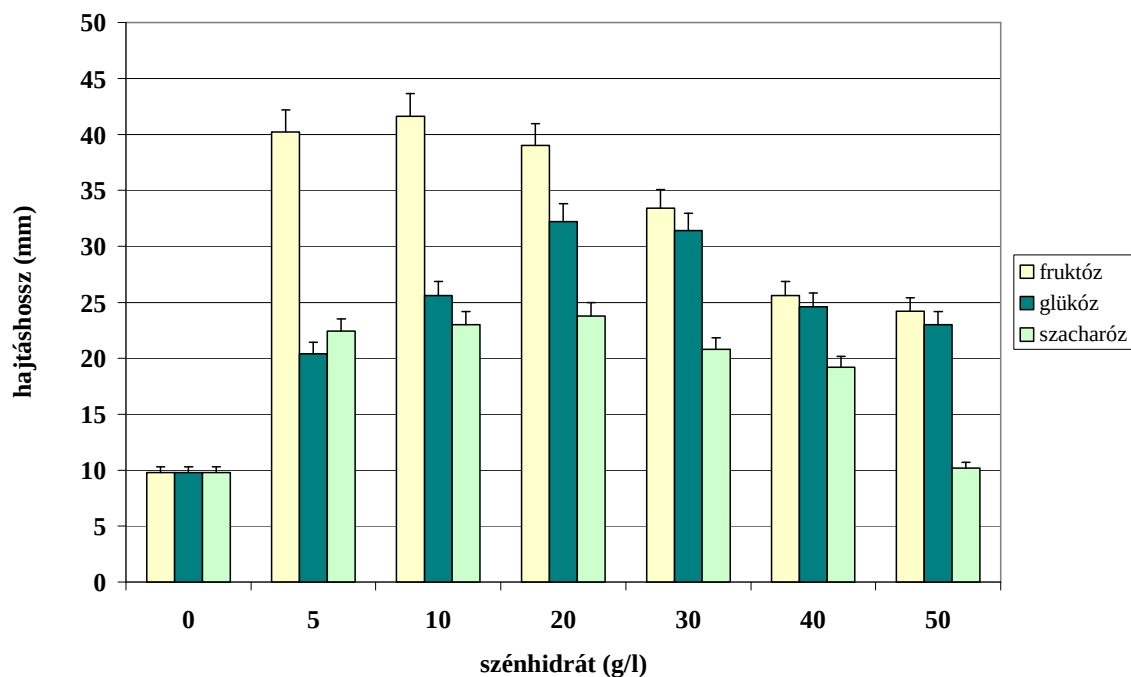
18. ábra A H. 'Devon Green' (7) fajta sarjszámának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



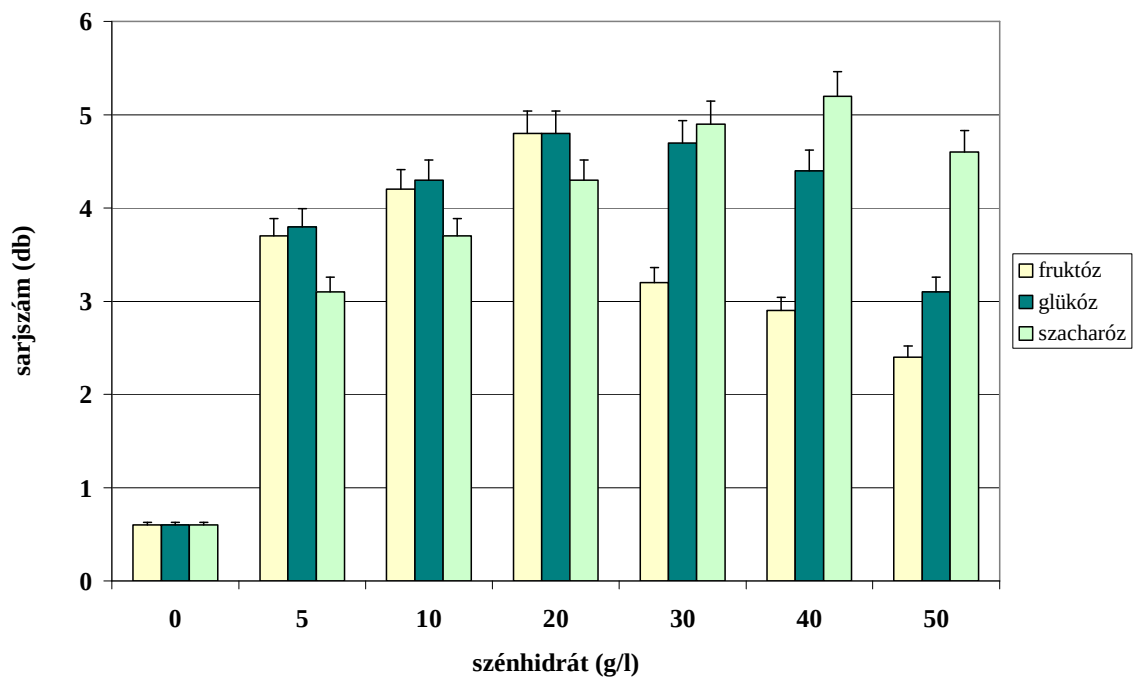
19. ábra A H. 'Devon Green' (7) fajta hajtáshosszúságának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



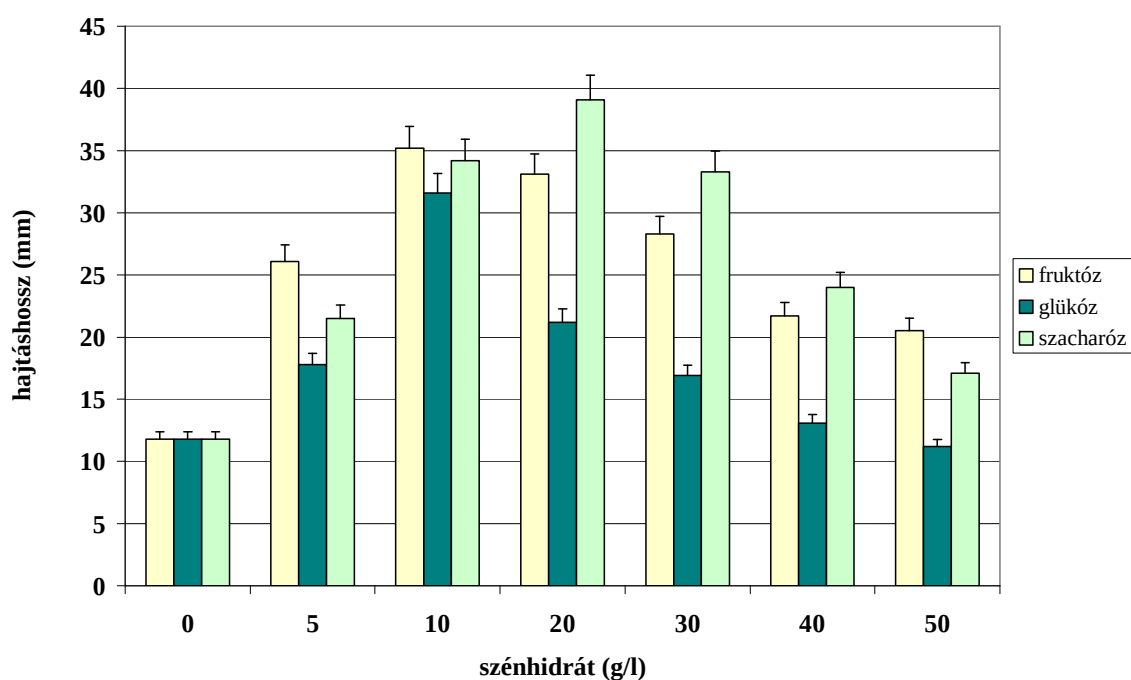
20. ábra A *H. 'Blue Cadet'* (12) fajta sarjszámának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



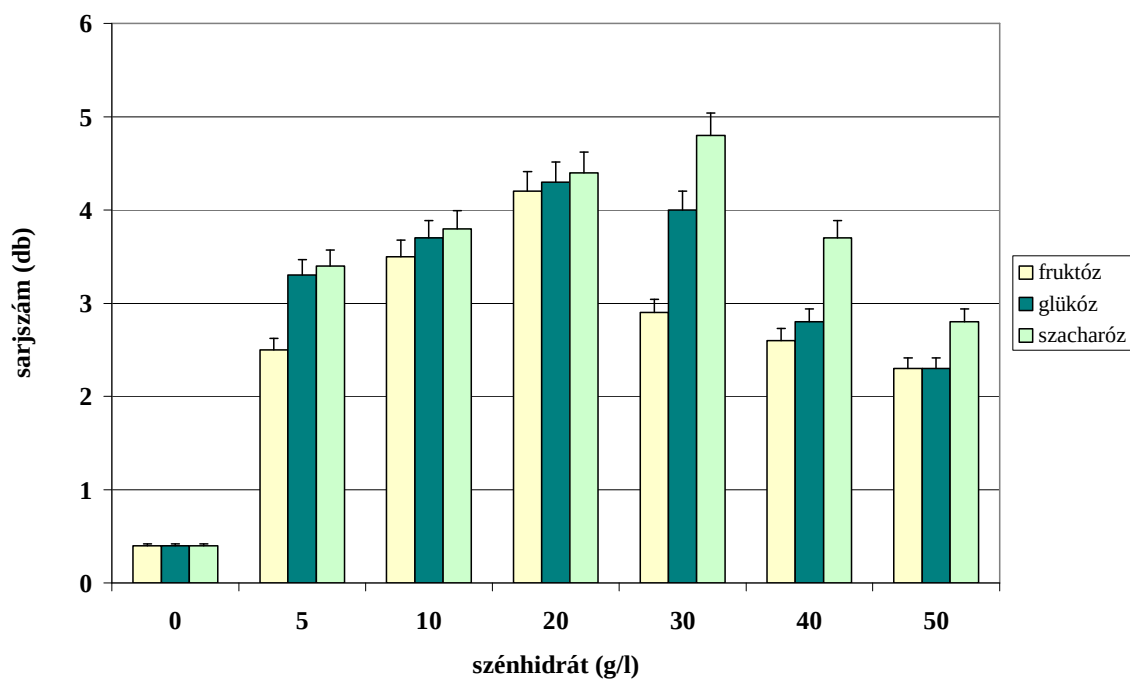
21. ábra A *H. 'Blue Cadet'* (12) fajta hajtáshosszúságának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



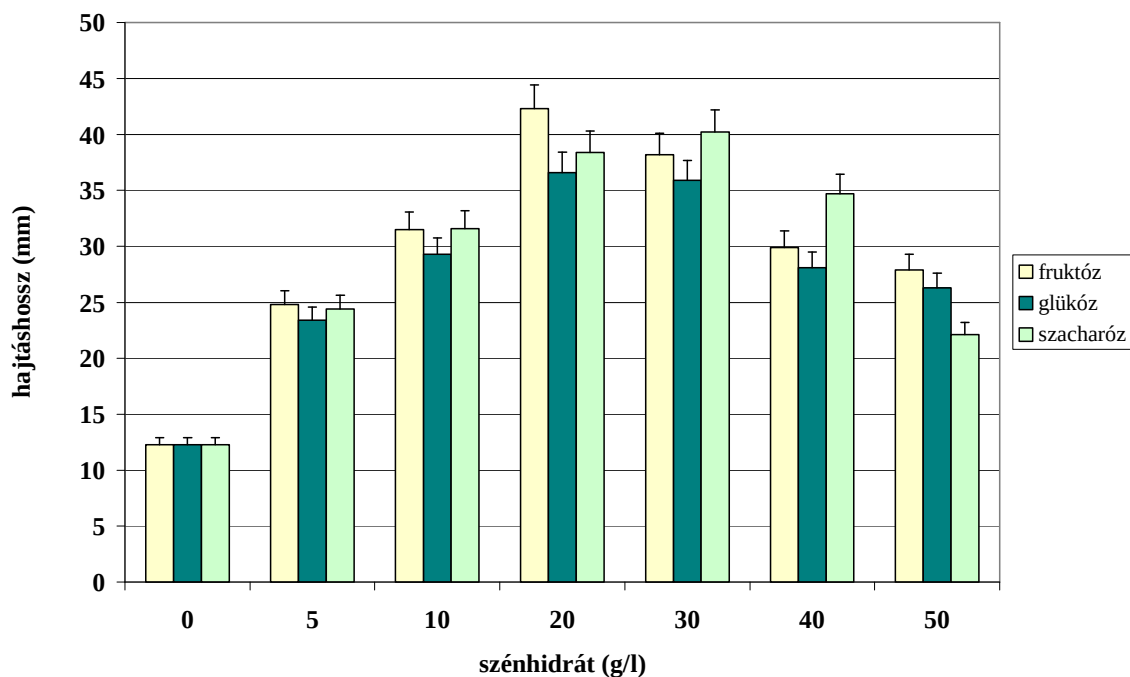
22. ábra A *H. 'Dew Drop'* (18) fajta sarjszámának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



23. ábra A *H. 'Dew Drop'* (18) fajta hajtáshosszúságának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



24. ábra A H. 'Samurai' (30) fajta sarjszámának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon



25. ábra A H. 'Samurai' (30) fajta hajtáshosszúságának alakulása különböző szénhidrátok adott koncentrációit tartalmazó táptalajokon

A 18-as fajta tenyészeinek egységességét vizsgálva érdekes megfigyeléseket tehetünk. Míg a glükóz és szacharóz tartalmú táptalajokon a levelek szegélyének színe fehér, a fruktóz hatására ez sárgássá vált. A cukorkoncentráció növekedésével a mintázat határozottabbá, a fehér szegély szélesebbé vált (26. ábra). A tenyészetek egységesebbek lettek, több fajtaazonos sarj keletkezett, a zöld sarjak száma csökkent.



26. ábra H. 'Dew Drop' levelek (10, 15, 25 és 50 g/l szacharózt tartalmazó táptalajokról)

A 30-as fajta tenyszeire is elmondható, hogy a mintázat jobban megjelenik a magasabb cukorkoncentráció esetében, de ez leginkább a szacharóz esetében igaz. Itt a fajtaazonos utódok elkülönítését nehezíti, hogy a sárga szegély zöldes árnyalatú lesz, s a halványzöld levéllemeztől nehezen válik el. Ezért a tarka és a teljesen sárga utódok egy része biztosan csak az akklimatizáció után választható külön.

Érdekes tény, hogy a 18-as fajtánál a tenyészetek tarka, teljesen fehér és teljesen zöld utódokra hasadnak, ellentétben a 30-as fajtával, ahol az utódok tarkák és sárgák lettek (27. és 28. ábra).



27. ábra In vitro fejlődött *H. 'Dew Drop'* teljesen fehér, fajtaazonos tarka és teljesen zöld hajtások



28. ábra Akklimatizálódott *H. 'Samurai'* növényké. Fajtaazonos tarka (balra) és különböző mértékben hasadt tarka (középen) és teljesen sárga (jobbra) utódok.

4.3. A növekedésszabályzó anyagok és természetes kiegészítők hatása a *Hosta* taxonok gyökeresedésére

A szaporítási fázisban kapott sarjakat különböző gyökeresítő táptalajokra helyeztem. Itt a NES mellett aktív szén, kálium-humátot és fulvosavat adagoltam a táptalajhoz.

A vizsgálatok azt mutatták, hogy a növények minden kipróbált táptalajon meggyökeresedtek, de a fejlődött gyökerek minőségében nagy eltérések voltak kimutathatók. A NES hatására a gyökerek rövidebbekké, vastagabbakká váltak. Az aktív szén tartalmazó táptalajokon a gyökerek megjelenése gyorsabb volt, de a képződő gyökerek vékonyak és gyengék voltak. A kálium-humát és a NES együttes hatására a gyökerek minősége javult, a fulvosav azonban nem kedvező a gyökeresedésre. A kísérlet eredményét a 8. táblázatban és a 29. ábrán láthatjuk.

8. táblázat *Hosta* fajták legnagyobb gyökérhosszúságai a gyökeresítő táptalajokon

Táptalaj	Fajták megnevezése, sorszáma					
	'Devon Green' (7)	'Blue Cadet' (12)	'Dew Drop' (18)	'Gold Drop' (20)	'Gold Haze' (21)	'Samurai' (30)
	Gyökérhosszúság					
LG1	19,4	18,3	31,2	29,7	21,5	19,8
LG2	18,4	20,8	33,5	32,6	14,8	13,7
LG3	73,2	81,1	94,6	93,8	75,9	72,6
LG4	19,1	16,6	32,4	30,6	24,3	21,2
LG5	15,4	10,4	19,3	21,7	19,4	16,8



29. ábra A különböző táptalajokon fejlődött gyökeres *Hosta* 'Blue Cadet' növények.

(1.= hormonmentes fMs táptalaj; 2.= fMs + 0.1 mg/l NES; 3.= fMs + 0.1 mg/l NES + 1 g/l AC;

4.= fMs + 0.1 mg/l NES + 0.2 g/l K-humát; 5.= fMs + 0.1 mg/l NES + 20 ml/l fulvosav)

A gyökeresítés során a *H. 'Dew Drop'* és a *H. 'Gold Drop'* fajták gyökeresedési hajlama mutatkozott a legnagyobbak. Ezeknél a fajtáknál már a sokszorozási szakaszban is megjelentek gyökerek, melyeket az átrakáskor el kellett távolítani. A fejlődött gyökértömeg is ezeknél a fajtáknál a legnagyobb. A leghosszabb gyökereket a 'Dew Drop' fajtánál mértem, ezek hossza azonban az LG3 táptalajon szignifikánsan csak a 'Samurai' fajtáénál kisebbek. Az LG3 táptalajon fejlődött gyökerek hosszúsága minden fajta esetében szignifikánsan különbözik a többi táptalajon mért hosszúságoktól. A legrövidebb gyökereket a 'Blue Cadet' fajtánál, LG5 jelű táptalajon mértem.

A *H. 'Blue Cadet'* és a *H. 'Devon Green'* fajták közeli rokonsága a gyökereztetésnél is felismerhetővé vált. A gyökerek megjelenési üteme és kinézete is hasonló. A 'Blue Cadet' fajtánál a legrövidebb gyökerek az LG5 táptalajon fejlődtek, s ez szignifikánsan különbözik a fajta többi táptalajon mért gyökérhosszúságaitól. A 'Devon Green' fajtánál is az LG5 táptalajon fejlődtek a legrövidebb gyökerek, ezek hossza azonban szignifikánsan csak az LG3 jelű táptalajon fejlődött gyökerek hosszától különbözik.

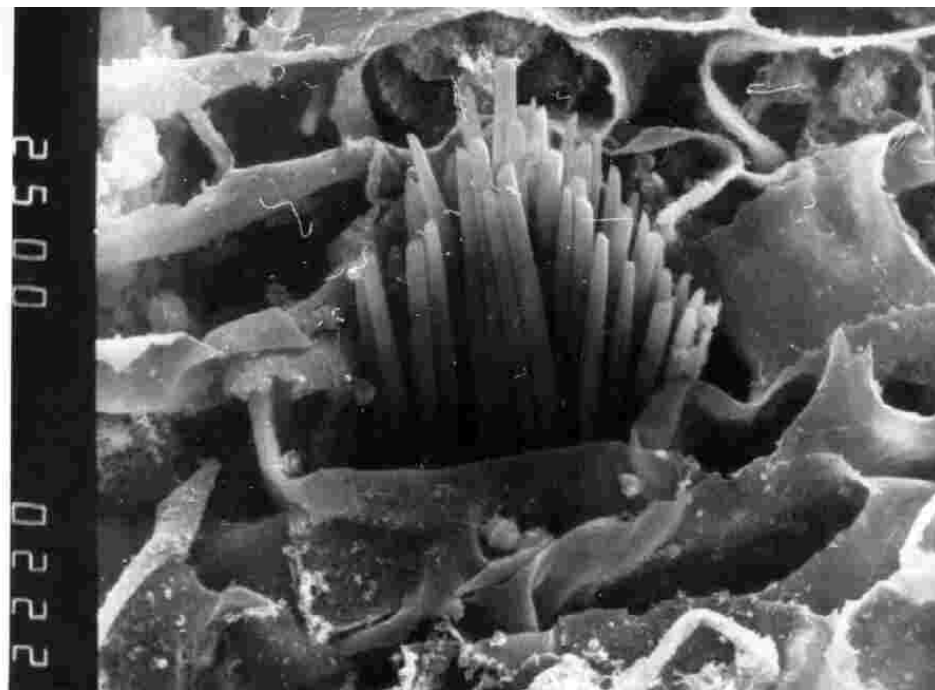
4.4. Szövettani változások a *Hosta* taxonok mikroszaporítása és akklimatizációja során

A *Hosta* taxonokra a dorziventrális levél a jellemző. A színi epidermisz alatt egy- vagy kétrétegű oszlopos parenchima, a levél fonáka felé a sejtközzötti járatokat tartalmazó szivacsos parenchima helyezkedik el.

A *Hosta* nemzetségre jellemző a hiposztomatikus levél, mely azt jelenti, hogy sztómákat csak a fonáki epidermiszen találhatunk.

A *Hosta* taxonokra jellemző, hogy a színi epidermisz sejtjei kifelé boltozatosak. A levél színi és fonáki oldalán is vastag kutikula és viaszcsoportok találhatók, melynek köszönhetik a kék levelű fajták a különleges színüket.

A levéllemez mezofillumában rafid kristálycsoportok előfordulhatnak (30. ábra).



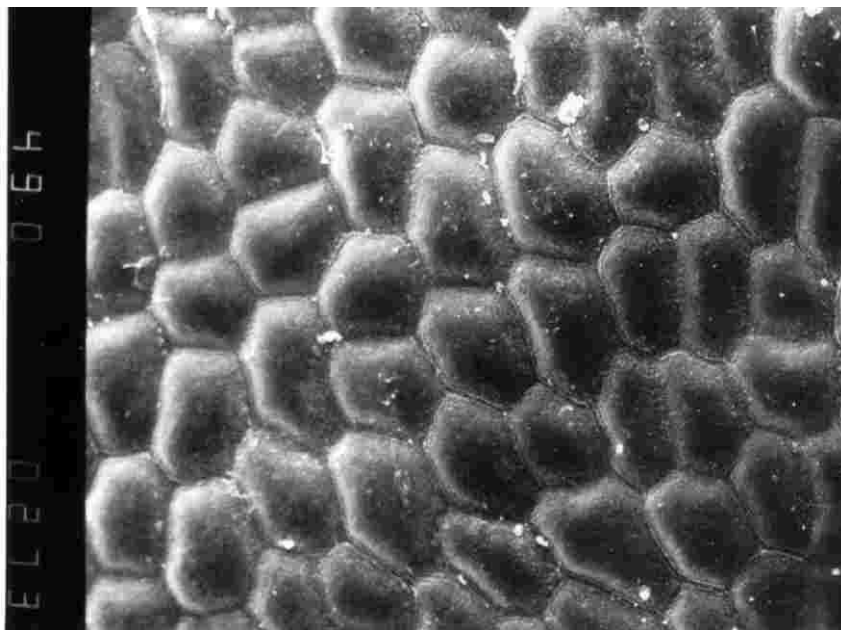
30. ábra A levéllemez szövetében előforduló rafid kristályok. (SEM felvétel, 2500x nagyítás).

4.4.1. A szabadföldi növény levélszöveteinek jellemzői

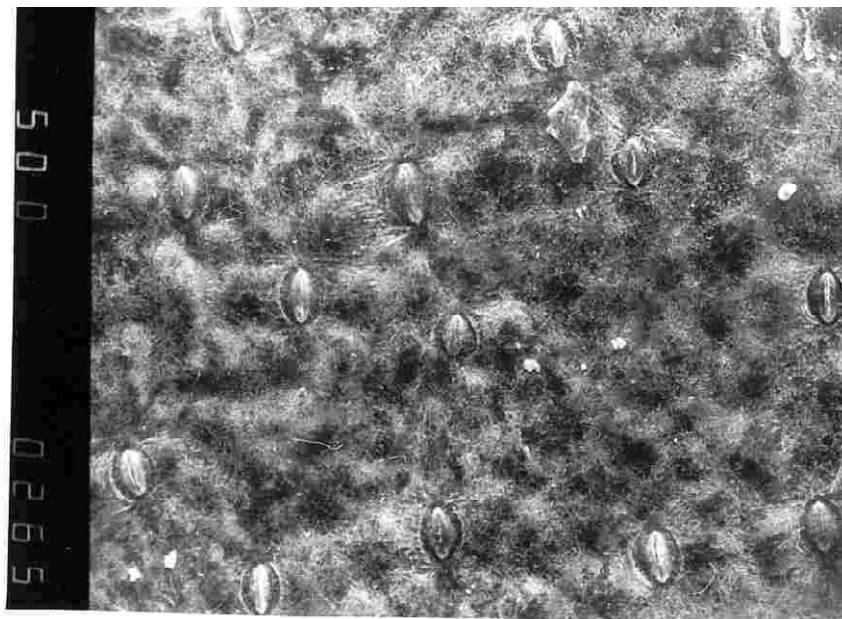
A színi epidermisz egy sejtrétegű, sejtjei izodiametrikusak vagy egyirányban kissé megnyúltak, szabálytalan alakúak, egymáshoz szorosan illeszkedők. A sejtek külső fala vastagabb, kifelé boltozatos. Az epidermiszt kutikula és vastag viaszcsoport fedeti (31. ábra).

A fonáki epidermisz sejtjei megnyúltak, körvonaluk hullámos. Sztómákat csak itt találhatunk. A gázcserenyílások kissé besüllyedőek, szabálytalanul elszórva helyezkednek el (32. ábra).

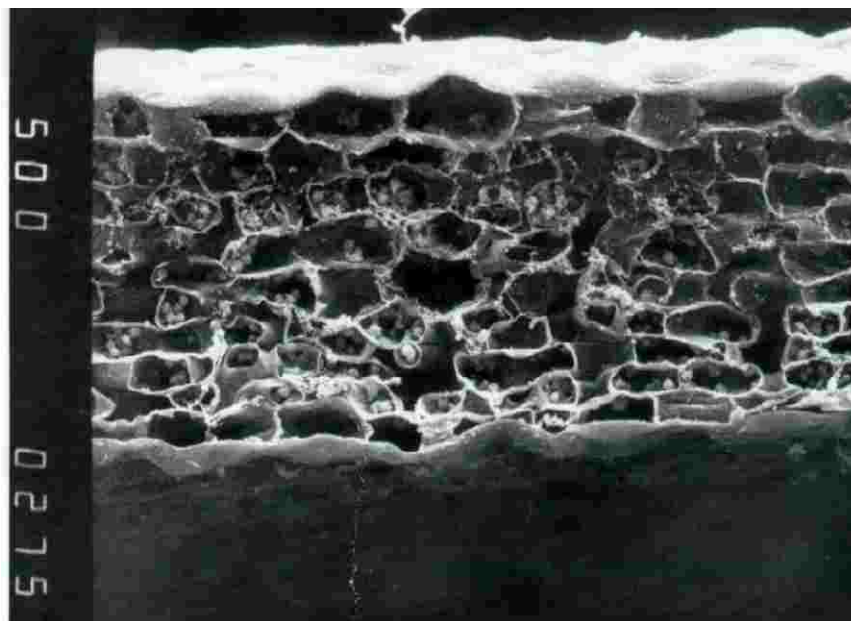
A mezofillum két sejtrétegű paliszád parenchimából és szivacsos parenchimából áll (33. ábra).



31. ábra Szabadföldön fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelének színi epidermisze (SEM felvétel, 490x nagyítás).



32. ábra Szabadföldön fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelének fonáki epidermisze (SEM felvétel, 500x nagyítás).



33. ábra Szabadföldön fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelének keresztmetszete (SEM felvétel, 500x nagyítás).

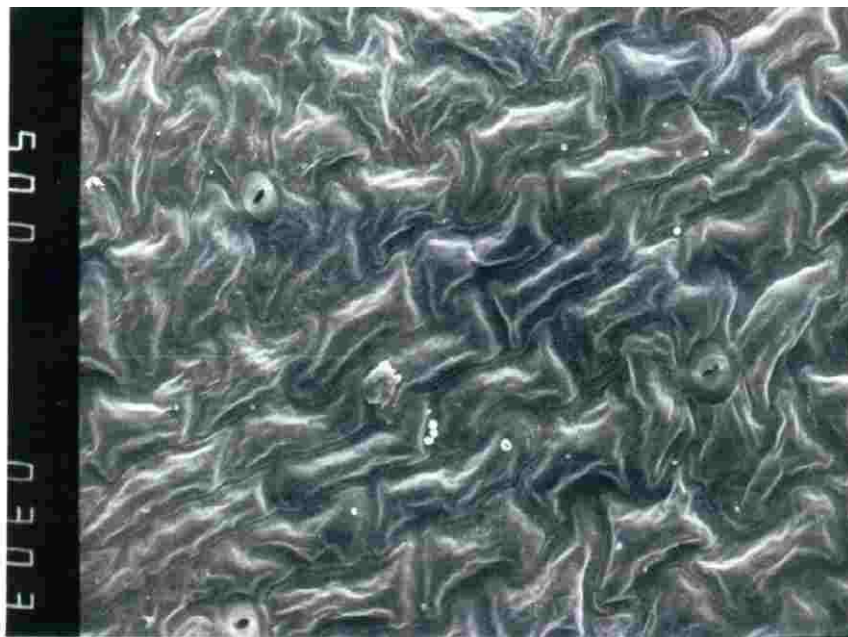
4.4.2. Szöveti változások az *in vitro* kultúrában és az akklimatizáció során

Az *in vitro* szaporítás során bekövetkező változásokat több vizsgált fajta esetében is nyomon követtem.

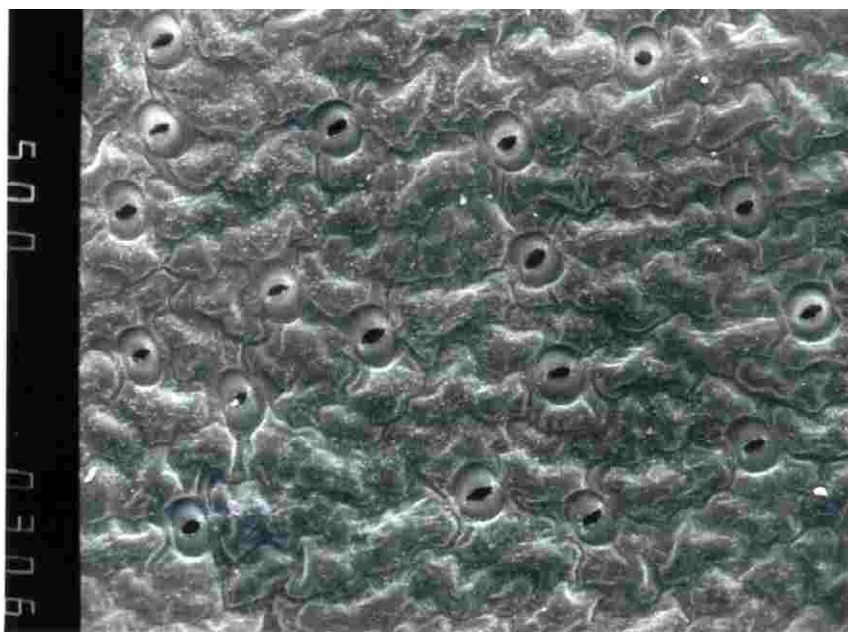
A mikroszkópos felvételek alapján megállapítható, hogy a levél színi epidermiszének sejtjei az *in vitro* tenyésztés során elvesztik kerekded formájukat, szélük erősen hullámossá válik (34. ábra). A sejtek jobban kiemelkedők, nem illeszkednek olyan szorosan mint a szabadföldi növény esetében. A kutikula elvékonyodik, a viaszréteg nem, vagy csak igen kis mértékben található meg a leveleken. Sztómákat a színi epidermiszben is találhatunk. A fonáki epidermisz sejtjei kisebbek, faluk hullámosabb (35. ábra).

A sztómák méretében kismértékű különbségek mutatkoznak, az *in vitro* növényeknél a sztómák valamelyest nagyobbak mint a szabadföldi növények esetében. *In vitro* körülmények között a sztómák nyitott állapotúak.

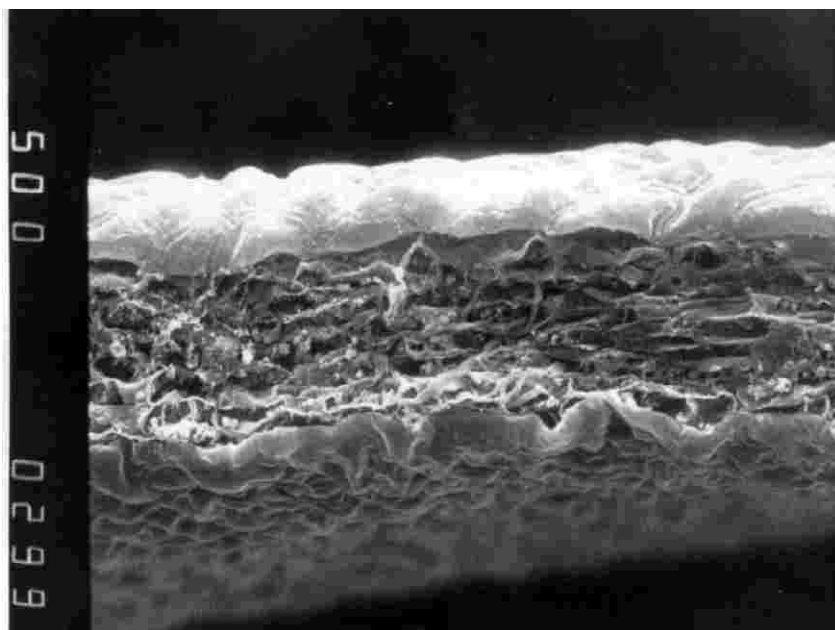
A levéllemez vastagságát vizsgálva megállapíthatjuk, hogy mind az oszlopos, mind a szivacsos parenchima elvékonyodik. A szivacsos parenchima aránya megnő a szabadföldi növényekéhez képest (36. ábra).



34. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelének színi epidermisze (SEM felvétel, 500x nagyítás).

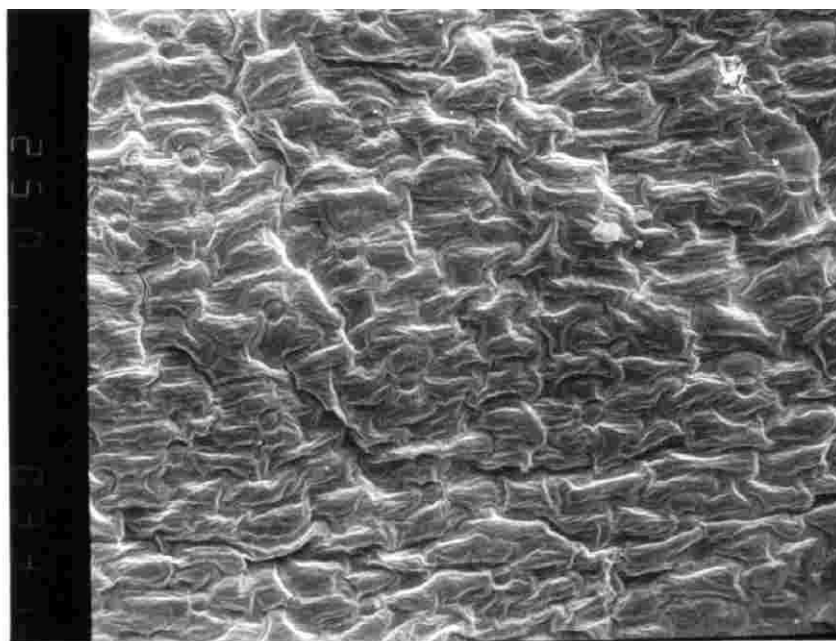


35. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelének fonáki epidermisze (SEM felvétel, 500x nagyítás).



36. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelének keresztmetszete (SEM felvétel, 500x nagyítás).

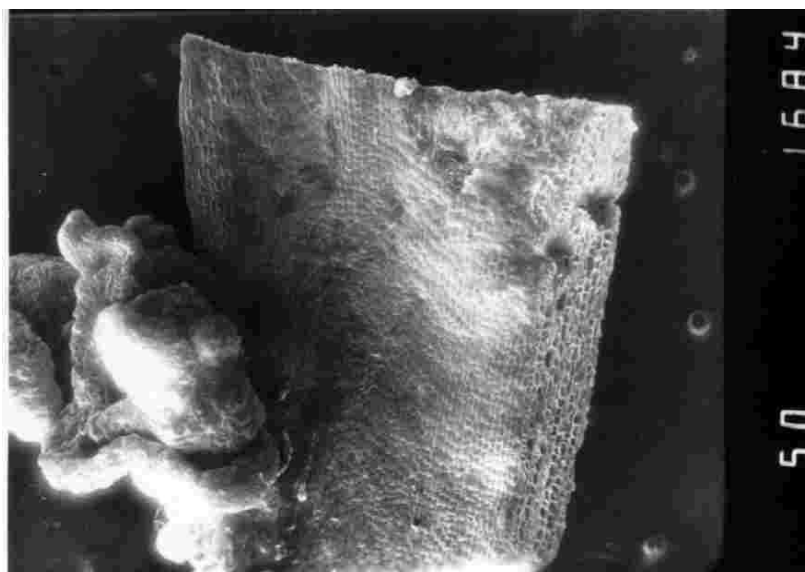
Az akklimatizáció során a sztómák száma fokozatosan csökken. Kiültetéskor a növény az *in vitro* körülményekre jellemző sztómákkal rendelkezik, melyek az *ex vitro* körülményekre nehezen reagálnak. A sztómák záródása hosszú folyamat, a kiültetés utáni 3. napon még mindig csak 50%-osan záródtak a sztómák. A 10. nap körül megjelenő első új levelek sztómái már jól működnek, bár számuk még mindig magasabb a szabadföldi növényekénél (37. ábra).



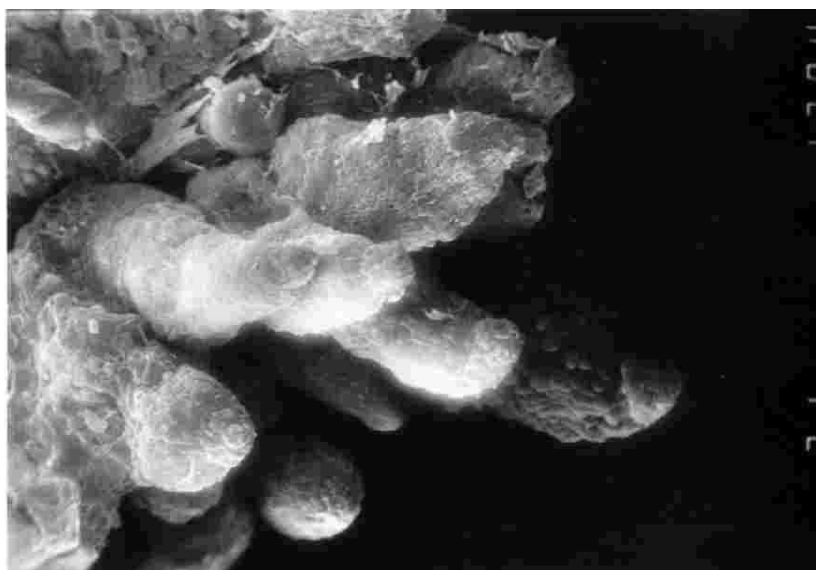
37. ábra Az akklimatizálódó *H. 'Samurai'* növény levelének színi epidermisze (SEM felvétel, 250x nagyítás).

4.4.3. Sarjdifferenciálódás *in vitro* kultúrában

A tenyészetek indításához a rhizómán található rügyeket használtam fel. A szaporító szakaszba az ezekből kihajtó hajtásokat, és azok levélhónaljából fejlődő oldalhajtásokat használtam. Esetenként azonban a leválasztott hajtások alapi részén illetve a megsérült levélnyeleken járulékos rügyek differenciálódtak. Ezek fejlődését a 38. ábra szemlélteti. A járulékos rügy csúcsát a levelek csak részben takarják. Megfigyelhető, hogy a járulékos rügyek mellett gyökerek is fejlődnek (39. ábra).



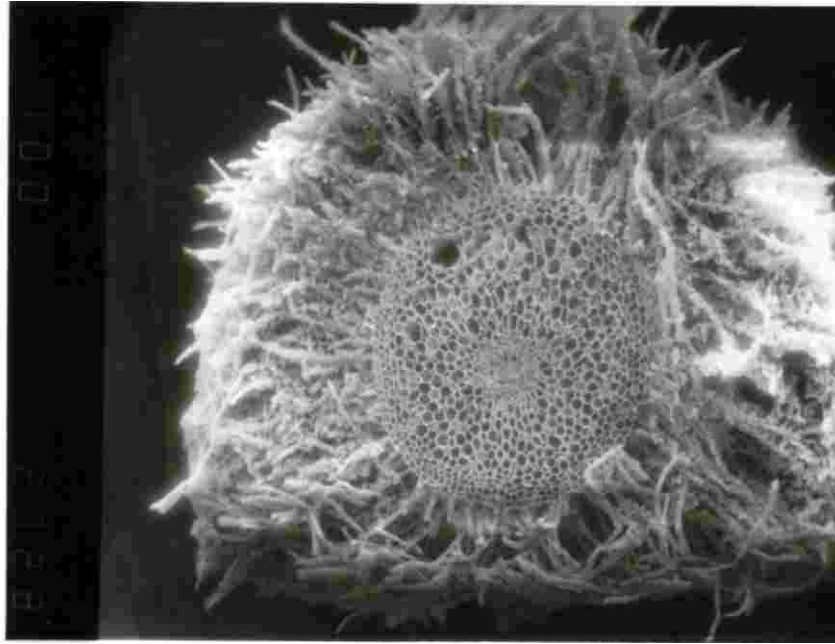
38. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelnyelén differenciálódó járulékos rügyek (SEM felvétel, 50x nagyítás).



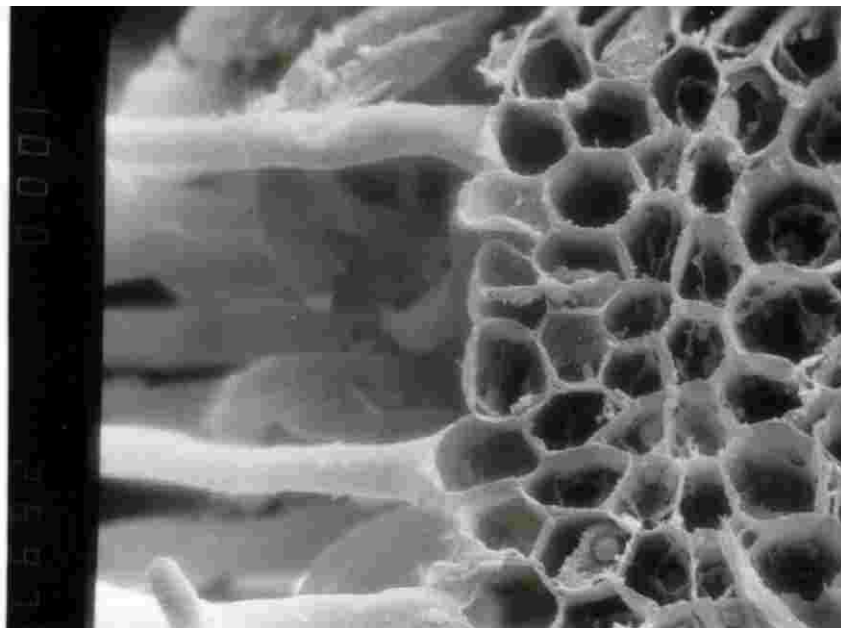
39. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény levelnyelén differenciálódó gyökerek (SEM felvétel, 71x nagyítás).

4.4.4. Az *in vitro* tenyésztés során fejlődő gyökerek

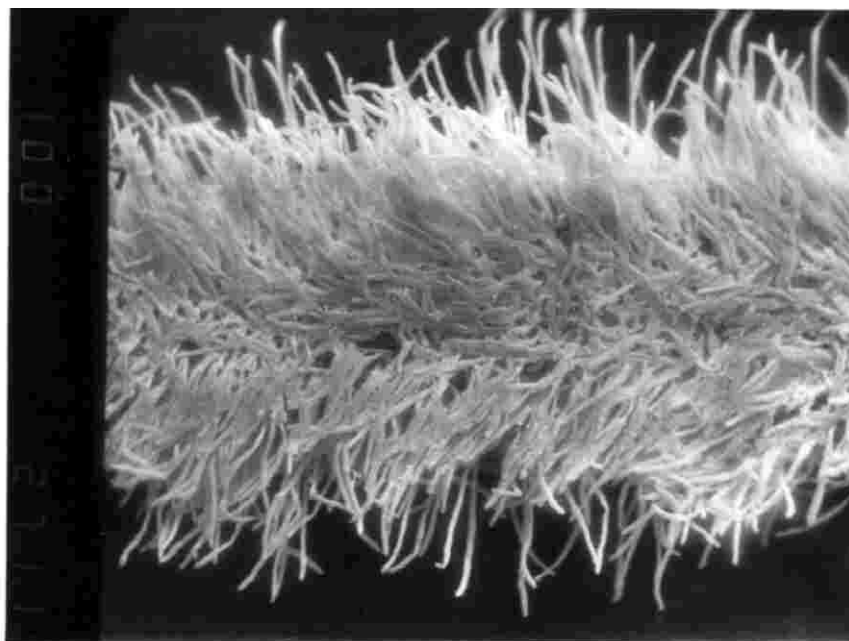
Az elsődleges kéreg jól fejlett parenchima sejtekből áll. A központi henger kis átmérőjű, hancs és fanyalábjai még kialakulóban vannak (40. és 41. ábra). Az *in vitro* képződött gyökér rhizodermiszének sejtjei nagyok, belőlük sok gyökérszőr fejlődött. A gyökércsúcshoz egészen közel is megjelennek a gyökérszőrök (42. és 43. ábra).



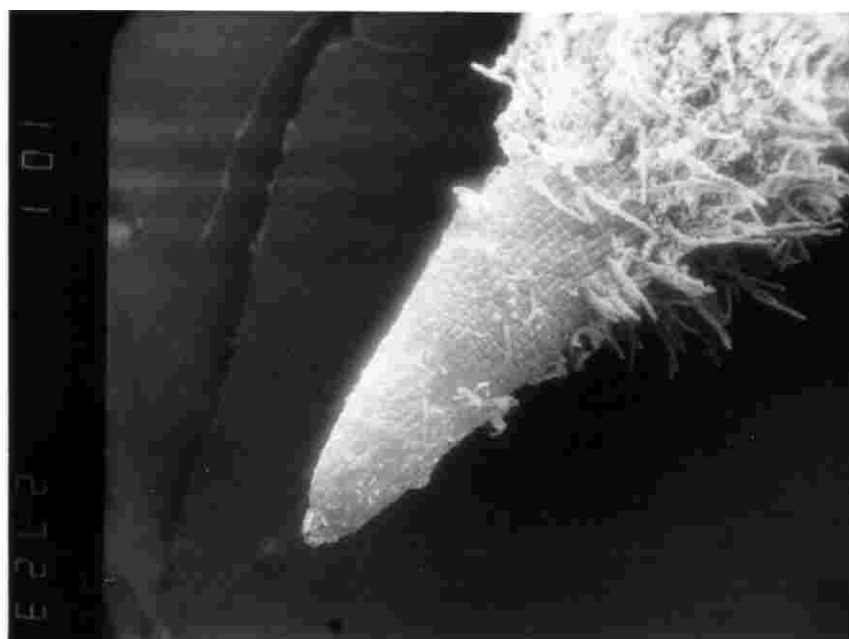
40 ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény gyökerének keresztmetszete (SEM felvétel, 100x nagyítás).



41. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény gyökerének keresztmetszete (SEM felvétel, 1000x nagyítás).



42. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény gyökere (SEM felvétel, 100x nagyítás).



43. ábra *In vitro* fejlődött *H. 'Samurai'* növény gyökércsúcsa (SEM felvétel, 100x nagyítás).

4.5. Az üzemi szaporítás eredményei

A fajták üzemi szaporítása 1998-tól a Szombathelyi Erdészeti Rt. Biotecnológiai Laboratóriumában történik. A fajták újraindítása miatt, ahhoz, hogy gyorsan elegendő növényt kapjunk a konténeres neveléshez, a sokszorozást egész évben folytattuk. Amint elegendő növény állt rendelkezésre, megkezdődött az akklimatizálásuk. Tapasztalataink szerint a június után akklimatizálódott növényeknek nincs elég idejük a cserepezést követően kellően begyökeresedni és megerősödni a fagyok beálltaig. A második évtől kezdve a szaporítás és az akklimatizálás is szakaszos. A legkésőbb áprilisban elkezdett, 1 hónapos akklimatizálás eredménye, az egyöntetű, jól begyökeresedett növény állomány (44. ábra).

A Prenor Kft telephelyén, a növények további nevelése során nem tapasztaltunk problémákat. A természetes árnyék alatt - idős lucfenyők csoportja alatt kialakított ágyásokban - nevelt növények jól fejlődnek, a télre megfelelően megerősödnek (45. ábra).



44. ábra Akklimatizálódott *Hosta* 'Devon Green' növénykéek cserepezés előtt



45. ábra Nevelés alatt álló cserepes *Hosta* 'Gold Drop' (előtérben) és 'Blue Cadet' (háttérben) növények

A cserepes növényeket kora tavasszal 2 literes konténerbe ültetve még ugyanazon év második felére értékesítésre alkalmas növényekké fejlődnek (46. ábra).



46. ábra Nevelés alatt álló különböző fajtájú, konténeres *Hosta* állományok

A Prenor Kft kínálatában 2000 év őszén jelentek meg az árnyékliliomok. Akkor a következő kilenc taxont ajánlottuk vásárlóink figyelmébe: *Hosta* 'Blue Boy', *H.* 'Blue Cadet', *H.* 'Devon Green', *H.* 'Dew Drop', *H.* 'Drummer Boy', *H.* 'Gold Drop', *H.* 'Gold Haze', *H.* 'Halcyon' és *H. tokudama*. A vásárlók véleményét részben a szombathelyi telephelyünkön, részben budapesti árudáinkban is megkérdeztük a fajtákról. A vélemények alapján a kínálatból két, gyenge növekedésű, kis termetű fajtát vontunk ki. Ezek a *H.* 'Dew Drop' és a *H.* 'Blue Boy' fajták voltak. Ezzel sajnálatos módon a kínálatunkból hiányzott a tarka levelű fajta. Ezért még ez évben elkezdtük a *H.* 'Samurai' fajta szaporítását. A *H.* 'Halcyon' és *H. tokudama* rossz szaporíthatósága miatt került ki a választékunkból.

Ritka jelenséget is megfigyeltem a *H.* 'Samurai' fajta mikroszaporításakor. Az eredetileg sárga szegélyű levelekkel rendelkező fajta utódai között megjelent egy fordított mintázatot mutató egyed is (47. ábra).



47. ábra A *Hosta* 'Samurai' levele (fent), alatta a tiszta sárga, a tiszta zöld és a fordított mintázatú egyedek levelei

4.6. Mikroszaporítási technológia különböző *Hosta* taxonok szaporításához

A kísérleteim során kapott eredményeket összefoglalva, vázlatos formában elkészítettem a vizsgált fajtákra vonatkozó szaporítástechnológiákat. Ezek lépései az alábbiak:

1. Anyanövények kiválasztása

A kultúra indításához kiválasztott, jó növekedési erejű, kórokozótól és kártevőktől mentes növényeket már az indítást megelőző vegetációs periódusban tartjuk rendszeres megfigyelés alatt. Győződjünk meg róla, hogy minden fenológiai fázisban mutatja az adott fajtára jellemző tulajdonságokat. Az anyanövényeket a tavaszi indításig tartjuk szabadban, hogy a természetes hideghatást megkaphassák.

2. A kultúra indítása

A kiválasztott anyanövények gyökérzetéről mossuk le a természetközéget és távolítsuk el a rizómáról a gyökereket. A rizómákat alaposan súroljuk meg és egy órán keresztül mossuk folyó vezetékes víz alatt. Ekkor válasszuk le a rügyeket a rizómákról úgy, hogy a talépi részükön maradjon egy kis rizómadarab. Tisztítsuk meg a rügyeket, egy-két külső rügypikkelyt is el kell távolítanunk róluk. Az így előkészített rügyeket helyezzük főzőpohárba, majd néhány csepp Tween 80-at adjunk hozzá és zárjuk le a pohár száját gézlappal. Ezek után a rügyeket egy óra hosszáig mossuk folyó csapvízben. A megtisztított rügyeket sterilizzük az alábbi módon:

- 10 perces áztatás kétszeresére hígított Clorox oldatban
(NaOCl tartalma kb. 2,5%)
- 5 perces áztatás 70 %-os etil-alkohol oldatban
- háromszori öblítés steril desztillált vízben.

Az így előkészített rügyeket helyezzük hormonmentes MS táptalajra. A fertőzésmentes rügyeket 1 hét múlva rakjuk át indító táptalajra.

Az indító táptalaj összetétele:

- MS makroelemek 50%-os koncentrációban
- MS mikroelemek változatlan koncentrációban
- vitaminok kétszeres koncentrációban, thiamin négyszeres koncentrációban
- adenin-szulfát: 80 mg/l és mio-inositol: 100 mg/l
- 3 mg/l BA és 0,1 mg/l NES 'Devon Green', 'Blue Cadet', 'Samurai' fajtáknál
- 6 mg/l BA és 0,1 mg/l NES 'Dew Drop', 'Gold Drop', 'Gold Haze' fajtáknál

3. Szaporító szakasz

Átrakás ideje: 4-5 hetenként

Szaporító táptalaj:

- MS makroelemek 50%-os koncentrációban
- MS mikroelemek változatlan koncentrációban
- vitaminok kétszeres koncentrációban, thiamin négyszeres koncentrációban
- adenin-szulfát: 80 mg/l és mio-inositol: 100 mg/l
- 2 mg/l BA és 0,1 mg/l NES

A javasolt szénhidrátforrást és az optimális mennyiséget a 9. táblázatban foglalom össze.

9. táblázat Különféle Hosta fajták szaporításához ajánlott szénhidrátok és azok mennyisége

Fajta neve	Szénhidrát neve	Ajánlott mennyiség (g/l)
Blue Cadet	szacharóz	20
Devon Green	fruktóz	10
Dew Drop	szacharóz	35
Gold Drop	szacharóz	35
Gold Haze	szacharóz	25
Samurai	szacharóz	30

4. Gyökeresítő szakasz

A vizsgált fajták gyökeresedése problémamentesnek bizonyult a kipróbált táptalajokon. A gyökerek minőségét alapul véve azonban az alábbi táptalajösszetételt javaslom az *in vitro* gyökeresítéshez:

- MS makroelemek 50%-os koncentrációban
- MS mikroelemek változatlan koncentrációban
- vitaminok kétszeres koncentrációban, thiamin négyszeres koncentrációban
- adenin-szulfát: 80 mg/l és mio-inositol: 100 mg/l
- 0,1 mg/l NES
- Kálium-humát 0,2 g/l koncentrációban

5. Akklimatizáció

A gyökeres növények akklimatizációja az általánosan használt akklimatizációs eljárások alkalmazásával a vizsgált fajták esetében problémamentes. Ez várható a további fajták esetében is. A teljes akklimatizáció 12-20 napot vesz igénybe, az akklimatizáció időpontjától függően.

6. Szabadföldi továbbnevelés

Az akklimatizálódott növények továbbnevelése során általában nem adódnak problémák. Tapasztalataink szerint a június után akklimatizálódott növényeknek nincs elég idejük a cserepezést követően kellően begyökeresedni és megerősödni a fagyok beálltaig, ezért a növények akklimatizációját legkésőbb május második felében kezdjük meg. A növények jól fejlődnek bármely tőzeg alapú termesztőközegben, melynek pH értéke 6-7 között mozog. A közeghez javaslom 4,5 g/l mennyiségben, valamely szabályozott tápanyagleadású műtrágya adagolását.

4.7. Új tudományos eredmények

1, A kísérletek alapján sikerült 13 fajta számára hatékony fertőtlenítő eljárást kidolgozni, melynek használatával csökkenthető a növényeket érő stressz, gyorsabb ütemű további fejlődést lehet elérni a mikroszaporítás során.

2, A kísérletekbe vont 13 fajtának sikerült nagy hatékonyságú indító táptalaj összetételt meghatározni.

3, A felszaporítási szakaszban meghatároztam a citokininek koncentrációját, mely nagy hatékonysággal biztosítja a jó minőségű sarjak fejlődését.

4, Meghatároztam a mikroszaporítás sokszorozó szakasz során alkalmazott különböző szénhidrátok optimális koncentrációját.

5, Meghatároztam a fajták gyökeresítésére alkalmas, hatékony táptalaj összetételét.

6, Az *in vitro* körülmények között nevelt növények összehasonlító szövettani vizsgálatainak eredménye további adatokkal járult hozzá a mikroszaporítás anatómiai hatásainak megismeréséhez.

7, Ezen fajták *in vitro* tenyésztésbe vett steril tenyészetei alkalmasak piaci értékesítésre kerülő növényanyag előállítására. A kapott eredmények alapján megvalósult a dolgozatban említett 6 fajta, valamint további 3 fajta üzemi méretű szaporítása. A technológia alapján szaporított konténeres növények több éve folyamatosan a faiskolai kínálat részét képezik. A kidolgozott szaporítástechnológiák hozzájárulnak a további *Hosta* taxonok hazai tömegtermesztésének megvalósításához.

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

5.1. A mikroszaporítás eredményei

A *Hosta* taxonok mikroszaporítási technológiáját ismertető publikáció az utóbbi években nem jelent meg. A kísérletek beállításánál Papachatzi et al. (1981), Lubomski (1989a,b), és Leifert et al. (1992 a,b) eredményeire támaszkodtam, valamint a *Hosta fortunei* '*Albopicta*' fajtával végzett kísérleteink (Szafián, 1995, 1996) eredményei jelentettek támpontot a többi fajta esetében is.

A kultúra indítása előtt előkezelés – mesterséges hűtés vagy BA-permetezés - alkalmazása nem szükséges, a természetes hideghatás elegendő a rügyek kihajtásához. A témával foglalkozó kutatók egyike sem ajánl előkezelést, még eltérő kiindulási növényi részek esetében sem. A korábban általunk ajánlott (Szafián et al., 1995) módszer a rhizómák rügyeinek felhasználásával, minden fajtánál bevált. A módszerrel nem kerül sor az explantátum kalluszosítására, majd az abból történő regenerációra, mely a kiméra fajták hasadásához vezetne.

Az eddig megjelent publikációk szerzői nem minden esetben számolnak be az explantátumok fertőtlenítésére alkalmazott eljárások eredményességéről, így az általam kapott eredményeket nem lehet teljeskörűen összehasonlítani. Korábbi kísérleteim alapján (Szafián et al., 1995) HgCl_2 alkalmazását javasoltam, de a jelen dolgozat tárgyát képző vizsgálatok eredményei alapján nátrium-hipoklorit (Clorox) és az etil-alkohol kombinációja kedvezőbb utóhatású mint a szublimáté. A fenti hatóanyagok kombinációjával 70%-os fertőzésmentességet értem el, ami igaz, hogy kisebb mint a HgCl_2 alkalmazásakor elért sterilitás (85%), de a növényeket érő stresszhatás kisebb, a növények további fejlődése gyorsabb.

Az indító táptalajok növekedésszabályzó-anyag tartalmát a kinetin és a benzil-adenin több koncentrációját tartalmazó táptalajokkal végzett kísérletek alapján állapítottam meg. A legjobb eredményt 3 fajtánál (*H. 'Devon Green'*, *H. 'Blue Cadet'*, *H. 'Samurai'*) a 6 mg/l BA tartalmú táptalaj szolgáltatta, míg a másik 3 fajta esetében (*H. 'Dew Drop'*, *H. 'Gold Drop'*, *H. 'Gold Haze'*) a 3 mg/l BA-t tartalmazó táptalaj volt a legjobb. Ez a töménység magasabb mint a Papachatzi és

munkatársai által alkalmazott (2 mg/l BA) koncentráció. Ez a táptalaj azonban csak a kultúra indításához alkalmazható, mert a hosszabb ideig ezen tartott tenyészetek állapota romlik, sárgulni kezdenek.

A kinetin alkalmazása indító táptalajokban 6 fajta átlaga alapján gyengébb hatású (1,45 db), mint a benzil-adeniné (1,88 db). Az egyes fajtákat vizsgálva megállapítható, hogy a *H. 'Dew Drop'*, *H. 'Gold Drop'*, és *H. 'Gold Haze'* fajták esetében a 6 mg/l kinetin hatása statisztikailag megegyezik a 3 mg/l benzil-adenin hatásával.

A sokszorozó táptalajok hormonkoncentrációját a más *Hosta* taxonokkal folytatott előző kísérletek alapján –melyek nem képzik ezen dolgozat témáját- állapítottuk meg.

Az első kísérletsorozatban a szacharóz optimális koncentrációját kívántam meghatározni. Az alkalmazott 0-40 g/l szacharóz koncentrációk közül a *H. 'Dew Drop'* és *H. 'Gold Drop'* fajta esetében az optimális koncentráció 35 g/l volt (5,8 illetve 5,5 sarj). Az egybeesés magyarázható a két fajta közeli rokoni kapcsolatával. A *H. 'Gold Haze'* fajta esetében nem volt ilyen magas az optimális koncentráció, itt a 25 g/l szacharóz bizonyult a legjobbnak (5,6 sarj).

Egyes szerzők kedvező hatásról számolnak be glükóz vagy fruktóz alkalmazásakor (Ernst, 1967; Chavin és Salesses, 1988). Ezeknek a *Hosta* taxonok esetében történő felhasználását és hatását vizsgáltuk a második kísérletsorozatban. A *H. 'Devon Green'* fajta esetében a szacharóznál (4,2 sarj) kedvezőbb sarjszámot értünk el fruktóz alkalmazásával. A fajtáról kiderült, hogy nagyon érzékeny a magas cukorkoncentrációra, a fruktózból is elegendő volt 10 g/l a legkedvezőbb sarjszám eléréséhez (5,6 sarj).

A *H. 'Blue Cadet'* fajta esetében a három szénhidrát közül a szacharóz alkalmazása adta a legjobb eredményt, 20 g/l mennyiségben (7,2 sarj).

A *H. 'Dew Drop'* fajta ezekben a kísérletekben is szerepelt, hogy meg tudjuk állapítani, hogy van-e hatása a különböző szénhidrátoknak a kimérák hasadására. A legtöbb sarj ebben a kísérletsorozatban a 40 g/l szacharózt tartalmazó táptalajon fejlődött. Ez az érték (5,2 sarj) azonban

kisebb mint az előző sorozat 35 g/l szacharózon kapott értéke (5,8 sarj), tehát nem célszerű azt tovább emelni.

A 30-as fajta esetében a 30 g/l szacharóz bizonyult a legjobbnak (4,8 sarj), a fruktóz és a glükóz optimális koncentrációja alacsonyabb, 10 g/l fruktóz (4,2 sarj) illetve 20 g/l glükóz (4,3 sarj).

A kísérletek alapján elmondható, hogy a fajták a szénhidrátok koncentrációjának, különös tekintettel a fruktóz és a glükóz optimálison túli emelésére érzékenyen, a sarjszám gyors csökkenésével reagálnak.

A két kísérletsorozatból kitűnik, hogy egyes fajták esetében az általunk (Szafián et al. 1995) és más szerzők által (Papachatzi et al., 1981; Lubomski, 1989a; Leifert et al. 1992b) eddig javasolt 20 g/l szacharóznál magasabb koncentráció –azaz 30 illetve 35 g/l –az optimális. Fajtatól függően azonban a szacharózt helyettesíteni kell fruktózzal a jobb eredmények elérése érdekében.

5.2. A különböző szénhidrátok és töménységeik hatása a fajtaazonosságra

A fenti kísérletsorozatba bevont két tarka, kiméra eredetű fajta szaporítási eredményei mellett figyelemmel kísértem az utódok fajtaazonosságát is. A *H. 'Dew Drop'* fajta esetében mindhárom szénhidrátforrás alkalmazásakor elmondható, hogy a magasabb koncentrációkon a tenyészetek egységesebbé váltak. 15 g/l szacharóz koncentráción az utódok 84 %-a fajtaazonos, míg 35 g/l szacharóz tartalom esetén több mint 97 %-ban kapunk fajtaazonos utódokat. Az egységesség mellett megfigyelhető, hogy a levelek nagyobb részben mutatják a tarkaságot. A levélszegély határozottabbá és szélesebbé vált. A fruktóz adagolása a fajta levélszegélyének színváltozásával járt. Az *in vitro* tenyészetben eredetileg fehér levélszegély sárga árnyalatúvá vált.

A *H. 'Samurai'* fajta kevésbé stabil mint a *H. 'Dew Drop'*. Tenyészeiben gyakoribb a fajtára nem jellemző egyedek megjelenése. Itt nehezíti az utódok elkülönítését, hogy a tenyészetek világos zöldek, a szegélyek nagyon halványan látszanak. A magasabb cukorkoncentrációkon a szegély jobban látható, a tenyészetek is egységesebbek, csökken a nem fajtaazonos egyedek száma.

A 20 g/l szacharózt tartalmazó táptalajon az utódok 48 %-a fajtaazonos, míg ez az arány 30 g/l szacharóz esetében 79%-ra növekszik.

Ezek a megfigyelések részben fedik a Samyn (1995) által tapasztaltakat, mely szerint a magasabb szacharóz koncentráció hatására a *Cordyline* tenyészetek egységesebbé válnak és nő a fajtaazonos utódok száma. A magas szacharóz koncentráció azonban erőteljes sarjszám csökkenést okoz. Ez a vizsgált *Hosta* taxonok esetében azonban nem volt az általa leírt mértékű. Ez az árnyékliliomok eltérő igényeivel és tűrőképességével magyarázható.

5.3. Az anatómiai vizsgálatok eredményei

A mikroszaporítás során bekövetkező anatómiai változásokat az *in vitro* fejlődött, az akklimatizálódó és a szabadföldi növények levelein vizsgáltam.

Ezek során azokkal a tapasztalatokkal találtam egyezőséget, melyek szerint a mikroszaporítás folyamán a növények külső epidermiszt borító kutikula és viaszréteg vékonyabb, mint a szabadföldi növényeké (Grout és Aston, 1977; Sutter és Langhans, 1982). Erre irányuló konkrét méréseket nem végeztem, de ez a tény a Scanning elektronmikroszkópos felvételek összehasonlításával megállapítható.

A kutikula mintázottsága a szabadföldi növények esetében jól látható, csíkozott. A viaszréteg pókháló-szerűen borítja be mind a színi, mind a fonáki epidermiszt. Az *in vitro* nevelt növényeken viaszréteg nem figyelhető meg, a kutikula mintázottsága nem határozott.

Az *in vitro* nevelt *Hosta* növények epidermisz sejtjei méretben nem mutatnak szembetűnő eltérést a szabadföldi növények sejtjeihez képest. Az epidermisz sejtjeinek külső fala a szabadföldi növények esetében boltozatos, felülete sima. Az *in vitro* tenyészetekben a levelek sejtjeinek külső fala redőzöttebb, még inkább boltozatos, a sejtek jobban kiemelkednek. A sejtek kevésbé illeszkednek szorosan egymáshoz. Ezek hozzájárulnak ahhoz, hogy a perisztómás transpiráció nagyobb mértékben megy végbe.

A *Hosta* taxonoknál sztómákat szabadföldi növények esetében csak a levél fonáki részén találhatunk, de az *in vitro* növények esetében megjelennek a színi epidermiszen is. Wetzstein és Sommer (1983), Blanke és Belcher (1989) több sztómát, míg Brainerd és munkatársai (1981a) kevesebb sztómát találtak az *in vitro* fejlődött növények levelein, mint a szabadföldi növényeken. Az általam vizsgált esetekben a sztómaszám az *in vitro* fejlődött leveleken több volt, de nem olyan mértékben mint pl. a *Hydrangea sp.* esetében (Kissné, 1994).

A sztómák az *in vitro* fejlődött leveleken fejletlenebbek, általában nyitottak, a külvilág ingereire nehezebben reagálnak. Az akklimatizáció során is csak nehezen záródnak, a 3. napon még közel 50 %-uk nyitva van. Ez a tény megnehezíti az akklimatizálás folyamatát. A sztómák zárósejtjeit megvizsgálva Blanke és Belcher (1989) és Capellades és munkatársai (1990) megállapításaival megegyezően megállapítható, hogy az *in vitro* nevelt növények, így a *Hosta* taxonok zárósejtjei is kiemelkedőbbek, mint a normál fejlődésű sztómák zárósejtjei.

Az *in vitro* nevelt növény fiatal gyökereiről megállapítottam, hogy kismértékben differenciálódott, a rhizodermisz sejtjeiből nagyszámú gyökérszőr fejlődött.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikroszaporítás az elmúlt 20 évben üzemi gyakorlattá vált és a vágott virágok (szegfű, gerbera, orchideák) és cserepes levéldísznövények mellett az évelő dísznövények szaporítóanyag-előállításában is egyre nagyobb teret foglal el. A módszer előnye az előállítható egységes és nagy mennyiségű szaporítóanyag. A *Hosta* (árnyékliliom) taxonok mikroszaporítására vonatkozó irodalom nem elég részletes, hazánkban még nincs kidolgozott technológiája az üzemi szaporításnak. Az árnyéki évelők, kifejezetten az árnyékliliomok iránt a piaci kereslet – angolszász, amerikai, holland és német hatásra – évről-évre dinamikusan növekszik. Divatos növényé váltak ezek a változatos levéldísz adó évelők.

Munkámat, melynek céljával a *Hosta* taxonok mikroszaporítástechnológiájának kidolgozását illetve az ennek során adódó problémák megoldását tűztem ki, 1993-ban kezdtem a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszékén. Kísérleteimben a *Hosta* nemzetség 13 fajtáját vizsgáltam, ezekből részletesebben 6 fajtát. Munkám eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

1. Az irodalomban közölt növényi részek (bimbó, virágszár, levéldarab) kiindulási anyagként való felhasználását és a kallusz állapot beiktatását a szaporítástechnológiába nem javaslom, különösen a kiméra eredetű fajtáknál nem. A rizóma rügyei jól felhasználhatók, ezekkel kedvező eredményeket értem el.

2. A jó fertőzésmentességet biztosító HgCl_2 alkalmazását steril tenyészetek létrehozására nem javaslom, mert a kultúrák indításakor visszaveti azok kezdeti fejlődését. Kísérleteim alapján a NaOCl oldat és a 70%-os etanol kombinációjának alkalmazását javaslom.

3. A kultúra indításához a 6 mg/l BA-t és 0,1 mg/l NES-t tartalmazó táptalajt javaslok. A BA ebben a koncentrációban segíti elő a legtöbb sarj fejlődését. A szaporító szakaszban javaslok a 2 mg/l BA-t és 0,1 mg/l NES-t tartalmazó táptalaj alkalmazását.

4. A sokszorozó táptalajok szénhidráttartalmát vizsgálva megállapítottam, hogy az egyes fajták eltérően viselkednek a szénhidrátok koncentrációjának változására. Az általánosan használt 20 g/l szacharóz mennyiségét megemelve (35 g/l) több fajtánál is jobb eredményeket értem el a szaporítási szakaszban.

5. A szacharózt glükózzal és fruktózzal helyettesítve a *H. 'Devon Green'* (7) fajtánál jelentős szaporulatnövekedést értem el.

6. Megállapítottam, hogy a szénhidrátok fajtájának és mennyiségének változása hatással van a kiméra eredetű tarka fajták szaporodási rátájára és a kapott utódok egységességére.

7. Az *in vitro* kultúrában kialakuló szövettani eltéréseket elemezve megállapítottam, hogy a szabadföldi növényekhez viszonyítva az *in vitro* növények:

- epidermisz-sejtjei vékonyabbak, jobban kiemelkednek, kutikularétegük vékonyabb
- levélfonákán a sztómák egységnyi felületre jutó mennyisége több, azonban közülük kevés a kifejlett sztóma
- a levelek színi epidermiszén is megjelennek a sztómák
- a sztómák kiemelkedőbbek, légrésük nyitottabb

8. Az akklimatizálás folyamán a növények szövettani vizsgálataikor a következőket állapítottam meg:

- az akklimatizálódó növények kifejlett sztómáinak száma több, mint a szabadföldi és az *in vitro* növényeké
- a sztómák itt is kiemelkedőek, azonban az *in vitro* és a szabadföldi növények sztómái közötti méretűek

9. Az anatómiai vizsgálatok alapján az *in vitro* szaporítású növények leveleinek megváltozott szöveti felépítése, az epidermisz és a sztómák morfológiájának megváltozása fokozottabb sztómás és perisztómás transpirációra enged következtetni

10. Kidolgoztam 13 *Hosta* fajta szaporítástechnológiáját. Ezek közül kilencnek megoldottam az üzemi szaporítását és magyarországi forgalomba hozatalát. Számos *Hosta* fajtát hoztam be az országba, amelyek a későbbi fajtaválaszték bővítésének alapjait képezhetik.

Summary

In the last 20 years the micropropagation has become a valid commercial method in the production of propagation material of cut flowers (carnation, gerbera and orchids) and foliage pot plants. It is also gaining ground in propagation of perennial plants. The advantage of this method is that uniform propagation material can be produced in big quantity.

Micropropagation of *Hosta* (plantain lily) is not discussed in the literature in proper details. In Hungary there is no full technology for the commercial propagation of *Hosta*.. The demand for the shade tolerant plants, especially for plantain lily – due to English, American, Dutch and German landscaping – is increasing dynamically. *Hostas* of varied foliage have become a kind of „fashion perennials”.

I started my research work in 1993 at the Department of Dendrology and Floriculture of the University of Horticulture and Food Industry. Thirteen taxons of the genus *Hosta* were studied, six of them in details. The results of the research are summarised below:

- 1., Use of plant parts proposed in the literature (flower buds, flower scape, part of the leaf) as an inoculum, and involvement of the callus stage to the propagation technology are not recommended, especially not in the case of varieties of chimera origin. The buds of rhizomes are suitable inocula, good results have been achieved with them.
- 2., Use of HgCl_2 as disinfectant is not recommended, because it retards the initial development of cultures. Based on the experiments the use of a combination of 70% ethanol and 2,5 % NaOCl solutions is proposed.
- 3., For starter medium of *Hosta* culture a medium containing 6 mg/l BA and 0,1 mg/l NAA is recommended. The BA in this concentration results in the development of the largest number of shoots at the initiation stage. During the proliferation stage a medium containing 2 mg/l BA and 0,1 mg/l NAA is recommended.
- 4., Experiments with the carbohydrate content of proliferation media revealed that the studied varieties reacted differently to changes carbohydrate concentration. By increasing the 20 g/l saccharose content to 35 g/l, better results were achieved during the proliferation stage.
- 5., With the change of glucose to fructose in the case of *H. 'Devon Green'* (7), a considerable shoot increasing has been achieved.
- 6., It is revealed that changes in type and concentration of carbohydrates affect the proliferation rate and the uniformity of offsprings of chimera origin varieties.

7., Analysis of the histological changes during *in vitro* propagation revealed that the *in vitro* developed plants as compared to *ex vitro* developed plants:

- have a thinner cuticula, and epidermal cells. The epidermal cells are better raised.
- have higher stomata frequency on the lower side of leaves, but the stomata are poorly developed.
- have stomata on the upper side of their leaves.
- the position of stomata is a bit raised and the respiration cavity is open.

8., Analysis of the histological changes during the acclimatization revealed that:

- the plants during the acclimatization have higher stomata frequency than *in vitro* or *ex vitro* developed plants
- the stomata are in a raised position, and their size is between *in vitro* and *ex vitro* developed stomata.

9., Anatomical studies suggest that the changed histological structure and morphology of stomata and epidermis of the *in vitro* propagated plants result in higher stomatal and peristomatal transpiration.

10., A propagation technology for thirteen *Hosta* varieties has been worked out. Commercial scale propagation of nine of them has been organised, and these varieties have already been put into circulation in Hungary. Several *Hosta* varieties have been imported, establishing a good base for an enlarged selection.

IRODALOMJEGYZÉK

Aden, P. (szerk.) 1990: The Hosta Book, Timber Press, Portland , Oregon

Apostolo, N.M., Brutti, C.B., Llorente, B.E (2005): Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In vitro Cellular And Developmental Biology - Plant* 41(3): pp.307-313.

Arrillaga, I., Marzo, T., Segura, I. 1991: Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: p. 341-348.

Bailey, L.H. 1930: Hosta, the plantain lilies. *Gentes Herbarum* 2, 3:117-142.

Bailey, D.A., Seckinger, G.R. ,Hammer, P.A. 1986: *In vitro* propagation of florists 'Hydrangea' *Hort. Sci.* 21: p. 525-526.

Ball, E. 1953: Hydrolysis of sucrose by autoclaving media an unneglected aspect in the culture of plant tissues. *Torrey Bot. Club.* 80: p.409-411.

Baur, E. 1909: Das Wesen und die Erblchkeitsverhältnisse der Var. *Albomarginatae* hort. Von *Pelargonium zonale*. *Zeit für ind. Abstammungs- und Vererb.*,

Bigot, C. 1981. Multiplication vegetative *in vitro* de *Begonia x hiemalis* ('Rieger' et 'Schwabenland'). II. - Conforme des plantes elevees en serre. *Agronomie* 1 (6): 441-447.

Blanke, M.M., Belcher, A.R. 1989: Stomata of apple leares cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* 19: p.85-89.

Bonner, J. 1937: Vitamine B₁, a growth factor for higher plants. *Science* 85: p.183-184.

Bonner, J. 1940: Specificity of nicotinic acid as growth factor for isolated pea roots. *Plant Physiol.* 15: p.865-868.

Bonner, J.,Devirian, P.S. 1939: Growth factor requirements of four species of isolated roots. *Am. J. Both.* 26: p.661-665.

Borhidi A. (1995): A zárvatermők fejlődéstörténeti rendszertana. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.

- Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H. 1981a: Acclimatizations of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: p. 515-518.
- Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H. 1981b: Leaf anatomy and stomatal functioning in the acclimatization of tissue cultured apples and plums. New Horizons: p.24-26.
- Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H., Kwiatkowski, S., Clark, C.S. 1981: Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. Hort. Sci. 16:173-175.
- Buder, J. 1910: Studien an Laburnum Adami I'. Ber.d.deutsch.bot.Ges.
- Burras, J.K. 1967: Variegated plants, past and present. Cardeners Chronicle. May 24, 1967: p.16-17.
- Candolle, A.P. de. 1810:saussurea. Ann. Mus. Hist. Natl. 15:156, 196.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., Debergh, P., 1990: Enviroments influences anatomy of stomata and epidremal cells in tissue-cultured Rosa multiflora. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: p.141-145.
- Chandler M.T., Marsac, T. D., Kouchkovsky, Y. De., 1972: Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. Can. J. Bot. 50: p.2265-2270.
- Chang, T.Y. 1978: Clonal propagation of woody species throught tissue culture techniques. Com. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 28: p.139-155.
- Chavin, J.E. , Saleses, G. 1988: Advances in chesnut micropropagation (Castanea sp.) Acta. Hort 227: p.340-345.
- Churikova, O. A. 2008: Microclonal Propagation and Some Regularities of Morphogenesis of Daylily and Hosta *in vitro*. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2008, Vol. 63, No. 2, pp. 89-94.
- Cramer, P.J.S., 1907: Kritische Übersicht der bekannten Fälle von Knospenvariation, Haarlem,Loosjes
- Dami, I., Hughes, H.G., 1997: Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* hardening of 'Valiant' grape. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 47, Number 2
- Daniel, L. 1904: Sur un hybride de greffe entre poirier et cognasier. Rev. Générale de Bot.

- Davis, M.J., Baker, R., Hanan, J.J. 1977: Clonal propagation of carnation by micropropagation. J. Am. Soc. Hort. Sci. 102: p.48-53.
- Dawson D. 1995: Foliar variegation in higher plants; a reference list.
- Debergh, P.C, Maene, L.J. 1981: A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort 14: p. 335-345.
- Debergh, P.C. 1983: Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59: p.270-276.
- Debergh, P.C., De Wael, J. 1977: Mass propagation of *Ficus lyrata*. Acta Hort. 78: p. 361-364.
- Debergh, P.C., Harbouei, Y., Lemeur, R. 1981: Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. 53: p.181-187.
- Debergh, P.C., Read, P.E. 1991: Micropropagation. In: Debergh, P.C., Zimmermann, R. H.: Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 1-13.
- Dencső, I. 1987: Factors influencing vitrification of carnations and conifers. Acta Hort. 212. p. 167-176
- Dobránszki, J., Jámbor-Benczúr, E., Reményi M.L., Magyar-Tábori K., Hudák, I., Kiss E., Galli, Z. 2005. Effects of aromatic cytokinins on structural characteristics of leaves and their post- effects on subsequent shoot regeneration from *in vitro* apple leaves of 'Royal Gala' Int. J. of Hort. Sci. 11. (1) 41-46.
- Donatelly, D.J., Vidaver, W.E., Lee, K.Y. 1985: The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell and Organ Culture 4:43-50.
- Donatelly, D.J., Skelton, F.E., Nelles, J.E. 1987: Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:566-569.
- Donatelly, D.J. Skelton, F.E. 1987: Hydathode structure of micropropagated plantlets and greenhouse-grown 'Totem' strawberry plants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112: p.755-759.
- Dudits, D., Heszky, L. 1990: Növénybiotechnológia. Bp. Mezőgazdasági Kiadó.

- Economou, A.S., Read, P.E. 1982: Effect of NAA on shoot production *in vitro* from BA-pretreated petunia leaf explants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104: p.504-506.
- Ernst, R. 1967: Effects of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. Am. Orchid. Soc. Bull. 36: p.1068-1073.
- Evani, M. 1989: The history of research on white-green variegated plants. The Botanical Review. 55: p.106-139.
- Fabbri, A., Sutter, E., Dunston, S.K. 1986: Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. Sci. Hort. 28:331-337.
- Falstad, C.H., 1988: Propagation by tissue culture. The Hosta Journal. Vol.19. No.2. p. 29
- Falstad, C.H., 1998: American Hosta Society glossary of terms. Hosta J. Vol. 29 (1): 25-28
- Fransen, M., 2009: Hostacatalogus. Ter Aar, The netherlands
- Fujita, N. 1976: The genus *Hosta* (Liliaceae) in Japan. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 27, 3/4:66-96. Reprinted in The American Society Bulletin 10:14-43.
- Garner, J.M., Keever, G.J., Eakes, D.J., Kessler, J.R. 1997. BA-induced offset formation in hosta dependent on cultivar. HortScience 32:91-93.
- Gautheret, R.J. 1942: Manuel Technique de Culture des Tissue Végéteux. Masson et Eie, Paris.
- Gautheret, R.J. 1945: Une voie nouvelle en biologie végétale: la culture des tissus. Gallimard, Paris.
- George, E.F., Pattodock, D.J.M., George, H.J. 1988: Plant culture media Vol. 2. Exegetics Ltd., Westbury, England.
- Gollagunta,V, Adelberg, J.W., Rieck, J.,Rajapakse, N. (2004) Sucrose in storage media and cultivar affects post-storage regrowth of *in vitro* Hosta propagules. Plant Cell, Tissue and Organ Culture Volume 80, Number 2 pp. 191-199
- Grenfell, D. 1981: A survey of the Genus *Hosta* and its availability in commerce. The Plantsman, 3:p. 20-44.
- Grenfell, D. 1996: The gardener's guide to growing Hostas. David and Charles Book, London

- Grimes, H.D., Hodges, T.K. 1990: The inorganic $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oryza sativa* L.). J. Plant. Physiol. 136: p.362-367.
- Grout, B.W.W., Aston, M.J. 1977: Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort. Res. 17: p. 1-7.
- Hackett, W.P., Anderson, J.M. 1967: Aseptic multiplication and maintenance of differentiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 90: 365-369.
- Hakkaart, F.A., Verkijs, J.M.A. 1983: Some factor affecting plasmodesmata in carnation meristem tip cultures. Neth. J. Plant Path. 89: p.47-53.
- Harding, J. (eds.) 1991: Genetics of variegation and maternal inheritance in ornamentals. In: Harding, J.: Genetics and breeding of ornamental species, pp. 225-249. Kluwer Academic Publisher
- Hammer, P.A. 1976: Tissue culture propagation of *Hosta decorata* Bailey. HortScience 11: p.309 (Abstr.)
- Haraszty Á. 1990: Növény szerkezettan és növényélettan. Bp. Tankönyvkiadó
- Hartmann, H.T., Kester, D. E., Davies, F.T. 1990: Plant Propagation; principles and practices. 5th edition. Prentice-Hall.
- Heide, O. M. 1968: Auxin level and regeneration of *Begonia* leaves. Planta 81: p.153-159.
- Heller, R., Gautheret, R.J. 1949a: Sur l'emploi d'un ruban de verre comme support pour les cultures des tissus végétaux. Cog. Rend. Seance Soc. Biol., Paris 141: p.662-665.
- Heller, R., Gautheret, R.J. 1949b: Sur l'emploi de filtre sans cendres comme support pour les cultures des tissus végétaux. Comp. Rend. Seance Soc. Biol., Paris 143: p.225-337
- Hessayon, D.G. 1985: The indoor plant spotter. pbi.
- Hill, R.A. ; Tuskan, G.A., Boe A.A. 1989: *In vitro* propagation of *Hosta sieboldiana* using excised ovaries from immature florets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 17:71-75.
- Hirokyu, S., Masaru, N. 2002: Plant regeneration from suspension cultures of *Hosta sieboldiana* (Lodd.) Engl. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: p.23-28.

Hoover, M. P., J. B. London, W. B. Miller, G. Legnani, R. T. Fernandez. 1998. Benzyladenine induces branching in eleven new hosta cultivars. SNA Res. Conf. Proc. 43:303-305.

Huxley, A. (ed.) 1992.: The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening. Volume 4. Royal Horticultural Society.

Hylander, N. 1954.: The genus Hosta in Swedish gardens. Acta Horti Bergiani 16, 11:331-420.

Jámborné Benczúr E. 1986: Szövettenyésztés a dísnövénytermesztésben. In: Nagy B. (szerk.): Növényházi dísnövények termesztése és hajtatása. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó

Jámborné Benczúr E., Márta Kálmánné 1990: *In vitro* propagation of Philodendron tuxlanum bunting with BA. Acta Agronomica 39: p. 341-348.

Jámborné Benczúr E. 1991: Néhány fontos Philodendron és Syngonium faj mikroszaporítása. Kandidátusi Értekezés. KÉE., Bp.

Jámborné Benczúr E (szerk.) 1993: Dísnövények mikroszaporítása. Egyetemi jegyzet. KÉE , Budapest

Jámbor-Benczúr, E., Fábián, M., Gyöngyi, G. 1999a: Multiplication and *in vitro* rooting of Prunus x davidopersica 'Piroska. Abstract of COST Working Group 1 Meeting October 7-10 Krakow, Poland, p. 35-36.

Jámborné Benczúr E., Kiss I., Fábián M., Gazdag Gy., Ónadi K., 1999b: The *in vitro* and in vivo anatomical structure of laeves of Prunus x davidopersica 'Piroska' and of Sorbus rotundifolia L. 'Bükk szépe'. International Journal of Horticultural Science 1-2., 92-95.

Jeffs, R.A., Northcote, D.H. 1967: The influence of IAA and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture. J. Cell. Sci. 2: p.77-88.

Johansson,M.,Kronstedt-Obards,E.C.,Robards,E.C.,1992:Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. Protoplasma, 166,165–176.

Jorgensen, C.A., Crane, M.B. 1927: Formation and morphology of Solanum chimeras. Journ. Ge.

Kaempfer, E., 1712: Amoenitatum exoticarum politico-physico-mediciarum. Fascicula 5, quibus continentur variae relationes, observationes et descriptiones Rerum Persicarum et Ulterioris Asiae. Meyer-Lemgo. 5:863.

- Kamada, H., Harada, H. 1979: Influence of several growth regulators and amino acids on *in vitro* organogenesis of *Torenia fournieri* Lind. J. Exp.Bot. 30 (114): p.27-36.
- Keeble, F., Armstrong, E.F. 1912: The oxydases of *Cytisus Adami*. Proc.Roy.Soc. London.
- Keever, G.J. 1994. BA-induced offset formation in *hosta*. J. Environ. Hort. 12:36-39.
- Keever, G.J., D.J. Eakes, Gilliam, C.H., 1995: Offset stage of development affects *hosta* propagation by stem cuttings. J. Environ. Hort. 13:4-5.
- Kirk, J.T.O, Tilney-Bassett, R.A.E. 1978: The Plastids; their chemistry, structure, growth and inheritance. Elsevier.
- Kiss I., Jámborné, B.E., Fehér T., Csillag F., 1994: Anatomical characteristics of leaf surface and stomata of *Hydrangea* plant grown *in vitro*, in-vivo and transplanted. Horticultural Science 26 (2) p. 98-100.
- Kiss Istvánné 1994: Biológiai aktív anyagok hatása és a vegetatív szervek anatómiai változása a *Hydrangea macrophylla* mikroszaporítása során. Kandidátusi Értekezés KÉE. Főiskolai Kar, Kecskemét
- Kiss, I., Fábián, M., Gazdag, Gy., Jámbor-Benczúr, E., Ónadi, K., 1999: The *in vitro* and in vivo anatomical structure of leaves *Prunus x davidiopersica* 'Piroska' and *Sorbus rotundifolia* L. 'Bükk Szépe'. HortScience 5(1-2): p.92-95.
- Kozai, T. 1989: Autotropic (sugar-free) micropropagation for a significant reduction in production cost. Chronica Hort. 29: p.19-20.
- Kozai, T. 1991: Micropropagation under photoautotropic conditions p.447-469 in Deberg & Zimmermann (eds.) 1991.
- Kozai, T., Wanami, Y., Fujiwara, K. 1987: Effects of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. Plant. Colt. Lett. 4,m (1) p.22-26.
- Kromer, K., Kukulczanka, K. 1985: *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* L. Acta Hort. 167: p.279-285.
- László, Gy. 1995: A fontosabb élő dísznövények leírása és az élő dísznövények felhasználása. In. Nagy, B. Komiszár, L., László, Gy.: Élő dísznövények termesztése és felhasználása. Kertészeti és élelmiszeripari Egyetem, Budapest

Leifert, C., Camotta, H., Waites, W.M. 1992a: Effect of combinations of antibiotics on micropropagated Clematis, Delphinium, Hosta, Iris and Photinia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: p.153-160.

Leifert, C., Pryce, S., Lumdsen, P.J., Waites, W.M. 1992b: Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: p.171-179.

Li, Y.X., Zhang, Y. C., Guo, T.T., Goun, H.S., Hao, Y., Yu, B. 2006: Synthesis of the cytotoxic gitogenin 3 beta-O[2-O-(alpha-L-rhamnopyranosyl)-beta-D-galactopyranoside] and its congeners. Synthesis Stuttgart (5): 775-782.

Lineberger, R.D., A. Wanstreet. 1983. Micropropagation of *Ajuga reptans* 'Burgundy Glow'. OARDC Res. Circ. 274, pp. 19-22.

Linsmaier, E.M., Skoog, F. 1965: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: p.100-127.

Lubomski, M. 1989a: Shoot multiplication and rooting of *Hosta sieboldiana* cv. Gold Standard using cultured shoot tips. Acta horticulturae No.251:223-228.

Lubomski, M. 1989b: *In vitro* shoot regeneration from different explants of *Hosta sieboldiana* cv. Gold Standard. Acta horticulturae No.251:229-233.

Macfarlane, J.M. 1892: A comparison of the minute structure of plant hybrids with that of their parents and its bearing on biological problems. Trans. Roy. Soc. Edinburgh.

Maekawa, F. 1940: The genus *Hosta*. J. of the Faculty of Science, Imperial University Tokyo, Section 3 Botany, 5:317-425. Reprinted in The American Hosta Society Bulletin 4 (1972):12-64, 5 (1973):12-59

Mathew, B., 1988: Hostaceae, a new name for the invalid Funkiaceae. Kew Bulletin 43, 2:302.

Matsuo, E., Matsuzawa, M., Sakata, Y. & Arisumi, K. 1989: Asexual propagation of variegated *Lilium longiflorum* 'Chataro'. Scientia Horticulturae. 39: p.349-354.

Mándy, A., Stefanovics-Bányai, É., Szafián, Zs. 2000: Egyes *Hosta* fajták stressztolerancia vizsgálata az akklimatizálás során. Lippay János-Vass Károly Tudományos Ülésszak, 2000 November 6-7, pp. 120-121

Márton, P., 2004: Hosta- élő dísznövények jegyzéke. Nyíregyháza, magánkiadás

Mc Clelland, M.T., 1989: Effects of proliferation and rooting microelements on micropropagated woody plants. MS Thesis, University of Illinois, Urbana

Mc Comb, J.A., Newton, S. 1981: Propagation of kangaroo paws using tissue culture. J. Hort. Sci. 56: p.181-183.

Mendoza, A.B., Hattori, K., Nishimura, T., Futsuhara, Y. 1993: Histological and scanning electron microscopic observations on plant regeneration in mungbean cotyledon (*Vigna radiata* (L.) Wilzek) cultured *in vitro*. Plant Cell. Tissue Org. Cult. 32: p.137-143.

Meyer, M.M. 1976: Propagation of Hosta by *in vitro* techniques. HortScience 11:p.309 (Abstr.)

Meyer, M.M. 1980: *In vitro* propagation of Hosta sieboldiana. HortScience 15(6): p.737-738.

Mészáros A., Kálai, K., Domonkos-Szabolcsy, É. Fári, M.G., Halász, K. 2006: An efficient micropropagation system: 3R Bioreactor. Acta Horticulturae 725 (1):p.621-624

Miller, P.D és Wilson, K.G. 1981: Protoplast Fusion and Organ Culture in the Genus Hosta. Encvir. Exp. Bot. 21: p.431-432.

Mimaki Y, Kanmoto T, Kuroda M, Sashida Y, Nishino A, Satomi Y, Nishino H. 1995: Steroidal saponins from the underground parts of Hosta longipes and their inhibitory activity on tumor promoter-induced phospholipid metabolism. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1995 Jul;43(7):1190-6.

Mimaki, Y, Kameyama, A., Kuroda, M., Sashida, Y, Hirano, T., Oka, K., Koike, K. and Nikaido, T. 1997: Steroidal glycosides from the underground parts of Hosta plantaginea var. japonica and their cytostatic activity on leukaemia HL-60 cells. Phytochemistry, Volume 44, Issue 2, January 1997, Pages 305-310

Molgaard, J.P., Roulund, N. 1991: *In vitro* multiplication of Saintpaulia ionantha wendl. by homogenization of tissue cultures. Sci. Hort. 487: p.285-292.

Murashige, T. 1974: Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: p.135-166.

Murashige, T., Skoog, F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: p.473-497.

Nagy B., László Gy., Komiszár L. 1988: Évelő dísznövények termesztése és felhasználása. Bp. KÉE, Termesztési Kar.

Neilson-Jones, W. 1969: Plant chimeras. 2nd edition. Methuen.

Nissen, S.J., Sutter, E.G. 1991: Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. HortScience 25: p.800-802.

Noe, N., Bonini, L., 1996: Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to ex vitro conditions. Biologia Plantarum Prague 38(1): 19-25. Inst. Arboriculture, Univ. Milan, Milan I-20133, Italy

Nwankwo, B.A., Krikorian, A.D. 1983: Morphogenetic potential of embryo and seedling derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var *pisium*. Bacc. Ann. Bot. 51: p.65-76.

Ohki, S. 1994: Scanning electron microscopy of shoot differentiation *in vitro* from leaf explants of the African violet. Plant Tissue Org. Cult. 36: p.157-162.

Papachatz, M., Hammer, P.A., Hasegawa, P.M. 1980: *In vitro* Propagation of *Hosta plantaginea*. HortScience. 15(4): p.506-507.

Papachatz, Marietta; Hammer, Allen; and Hasegawa, Paul M. 1981. *In vitro* propagation of *Hosta decorata* 'Thomas Hogg' using Cultured Shoot Tips. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(2):232-236.

Pierik, R.L.M. 1987: *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. Acta Hort. 226: p.25-40.

Pierik, R.L.M., Jensen, J.L.M., Maasdam, A., Binnendijk, C.M. 1975: Optimization of gerbera plant production from excised capitulum explants. Sci. Hort. 3: p.351-357.

Pierik, R.L.M., Sprengers, P.A., van der Harst, B., Meys, Q.g. 1988: Seed germination and further development of plantlets of *Phaiopedilum ciliolare* Pfiz. *In vitro*. ScientiaHort. 34: p.139-153.

Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. 1976: Vegetative propagation of *Anthurium scerzerianum* shoot through callus cultures. Sci. Hort. 4: p.291-292.

Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. 1983: Vegetative propagation of a chimerical *Yucca elephantipes* Regel *in vitro*. Sci. Hort. 21: 267-272.

Pogany, M.F., Lineberger, R.D. 1991: Considerations for micropropagation of plant chimeras. The International Plant Propagator's Society Combined Proceedings 40: p.576-580.

Preece, J.E., Sutter, E.G. 1991: Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: Debergh, P.C. és Zimmerman, R.H. (szerk.): Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. p.71-93.

Preil, W. 1986: *In vitro* propagation and breeding of ornamental plants: advantages and disadvantages of variability. In W. Horn, C.J. Jensen, W. Odenback, Schieder, O. (eds), Genetic Manipulation in Plant Breeding, proceedings of an international symposium organized by EUCARPIA, Sept. 8-13, 1985, Berlin (West), Germany, pp. 377-403. Walter de Gruyter & Co., N.Y.

Ranchillach, M., Nourrisseau, J.G., Navatel, J.C., Roudeillac, P. 1987: Influence de la multiplication *in vitro* sur la comportement du plant de fraisier en France. In: Boxus, P., Larvor, P. (Eds) *In vitro* culture of strawberry plants: p.55-73. CEC Directorate General, Report EUR 10871.

Read, P.E., Yang, Q. 1985: Novel plant growth regulator delivery system for *in vitro* culture of horticultural crops. Acta. Hort. 212: p.55-59.

Robbins, W.J., Bartley, M.A. 1937: Vitamin B₁ and the growth of excised tomato roots. Science 85: p.246-247.

Romberger, J.A., Tabor, C.A. 1971: The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. Am. J. Bot. 58: p.131-140.

Sallanon, H., Tort, M., Coudret, A. 1993: The ultrastructure of micropropagated and green-house rose plant stomata. Plant Cell Tissue Org. Cult. 32: p.227-233.

Samyn, G.: 1995: influence of the sucrose concentration in the growth medium on the adventitious and axillary shoot production and on the stability of the chimeral *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. cultivar 'Rosa'. Bull. Rech. Agron. Gembloux 30 (1-2): p. 67-75.

Schmid, W.G. 1991: The Genus *Hosta*. B.T. Batsford Ltd. London

Schmidt, G., Waldenmaier, S. 1993: Histological studies on *in vitro* and *ex vitro* leaves during the adaptation phase of *Rhododendron* 'Pink Pearl'. Acta Agronomica Hungarica, 42(1-2): p.11-21.

- Singha, S., Townsend, A.C. and Oberley, G.H. 1985: Agar induced variations in the nutritional composition of pear and craopple shoots *in vitro* p.351. in Henke et al. (eds.). Tissue culture in Forestry and Agriculture.
- Singha, S. 1982: Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* 'Almey'; and *Pyrus communis* 'Seckel'. J. Am. Soc. Hort. Sci. 107: p.657-660.
- Skirvin, R.M. 1980: Fruit crops. In: Conger, B.V.: Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press. Inc. Boca. Raton. Florida. p.51-139.
- Skoog, F., Miller, C.O. 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: p.118-131.
- Smith, E.F., Roberts, A.V., Mottley, J. 1990: The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 2. Improved resistance to desiccation conferred by paclobutrazol. Plant Cell. Tissue Org. Cult. 21: p.133-140.
- Sneath, P.H.A. 1968: Numerical taxonomic study of the graft chimera +*Laburnocytisus adamii*. Proc. Linn. Soc. London.
- Sombrero, C. 1996: Enigma of variegations. The new plantsman 9: p.158-169
- Stolz, L.P. 1984: *In vitro* propagation and growth of *Hydrangea*. Hort. Sci. 19: p.717-719.
- Strasburger, E. 1909: Meine Stellungnahme zur Fraga der Pfropfbastarde. *Ber. deutsch. bot.Ges.*
- Sutter, E.G., Langhans, R.W. 1982: Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip. Culture. Can. J. Bot 60: p.2896-2902.
- Sváb J. 1973: Biometriai módszerek a kutatásban. Bp. Mezőgazdasági Kiadó
- Szafián, Zs., 2001: Új lehetőség a *Hosta* szaporításában. Kertészet és Szőlészet 50 (8): p. 9-10.
- Szafián, Zs., Jámbor-Benczúr, E., Ferenczy, A. 1995: *In vitro* propagation of *Hosta fortunei* I. HortScience, 27. (1-2):p.16-19
- Szafián, Zs., Jámbor-Benczúr, E., Ferenczy, A. 1996: *In vitro* propagation of *Hosta fortunei* II. HortScience, 28. (1-2):p.8-10

Szafián, Zs., Jámbor-Benczúr, E., Csillag, A. 1997: *In vitro* propagation and study of the epidermis of *Hosta fortunei*. Hort. Biotech. *In vitro* cult. And Breeding, Eds: A. Altman, M. Ziv in : Acta Hort. 447 ISHS

Szafián, Zs., Jámborné-Benczúr, E., Tillyné-Mándy, A. 1998a: A szacharóz hatása a különböző *Hosta* fajták szaporodására és klorofill tartalmára. Lippay János-Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak.IX.

Szafián, Zs., Jámborné-Benczúr, E., Tillyné-Mándy, A., Komiszár, L. 1998b: Influence of the carbohydrate concentration on shoot production of different *Hosta* cultivars. International Congress on Plant Tissue and Cell culture (Abst.). Jerusalem, Israel, 1998. VI.

Taffler, S. 1989: Variegated plants The Hardy Plant. 11: p.99-106.

Tanaka, M., Hirano T., Goi, M., Higashiura, T., Sasahara, H., Murasaki, K. 1991: Practical application of a novel disposable film culture vessel in micropropagation. Acta Hort. 300: p.77-84.

Tanaka, T. 1927: Bizzarria – a clear case of periclinal chimera. Journ. Gen.

Terpó A. (szerk.) 1987: Növényrendszertan az ökonómbotanika alapjaival I.-II. Bp. Mezőgazdasági Kiadó

Terres, K.C. 1988: Tissue culture techniques for horticultural crops. A.V.I. New York.

Thunberg, C.P., 1784: Flora Japonica Lipsiæ, Germany. 142.

Tilney-Bassett, R.A.E. 1965: Genetics and plastid physiology in *Pelargonium* II. Heredity.

Tilney-Bassett, R.A.E. 1986: Plant chimeras. Edward Arnold.

Tilney-Bassett, R.A.E. 1991: Genetics of variegation and maternal inheritance in ornamentals. In Harding, J. at al. (eds.) Genetics and breeding of ornamental species, pp. 225-249. Kluwer Academic Publishers.

Tsvelev, N.N., 2000: Opredelitelí sosudistyxh rastenii severo-zapadnoi Rossii (Key to Vascular Plants of the North-Western Russia), Ed. Takhtadzhyan, A.L., Moscow, S.-Petersburg

Vaughn, K.C., Wilson K.G. 1981: Development of air blisters in *Pilea cadierei* Gagnep. & Guillaumin. Annals of Botany 48: p.467-472.

Végvári Gy., 1996: Alma alanyok (*Malus sp. L.*) *in vitro* szaporítása során lejátszódó fiziológiai és morfológiai változások vizsgálata. Doktori (Ph.D.) értekezés. MTA.

Wardle, K., Short, K.C. 1983: Stomatal response of *in vitro* cultured plantlets I. Responses of epidermal strips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. *Biochem Physiol Pflannem* 178: p.619-624.

Westerhof, J., F.A. Hakkaart, and J.M.A. Versluijs. 1984. Variation in two *Begonia x hiemalis* clones after *in vitro* propagation. *Sci. Hort.* 24: 67-74.

Wetzstein , H.Y., Sommer, H.E. 1983: Scanning Electron Microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108(3): p.475-480.

White, P.R. 1937: Separation from years of materials essential for growth of excised tomato roots. *Plant Physiol.* 12: p.777-791

White, P.R. 1943: Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth* 7: p.53-65.

Williams, D.J., Al-Juboory, K.H., Skirvin, R.M., 1998: Adventitious shoot regeneration from ovaries of *Hosta* 'Golden Scepter'. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, Volume 34, Number 4, pp. 289-292

Winkler, H. 1907: Über Pfropfbastarde und pflanzliche Chimaeren. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*

Yang, G., Read, P.E. 1993: *In vitro* culture of *Vanhoutte's spiraea* explants from 'secondary cultures' and dormant stems forced in solutions containing plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: p.25-30.

Zhizní rastenii (Life of Plants), Moscow, 1982, vol. 6.

Zilis, M., D. Zwagerman, D. Lamberts, Kurtz, L., 1979: Commercial propagation of herbaceous perennials by tissue culture. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* 29: 404-413.

Zillis, M.R. 1981: Tissue propagation of *Hosta*. *The American Hosta Society-Society Bulletin* 12. P.19

Zillis, M.R. 2000: *The Hosta handbook*. Q & Z Nursery, Inc. Rochelle, Illinois

Zimmerman, R.H., Fordham, I. 1985: Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. J.A. Soc. Hort. Sci. 110: p.34-38.

Ziv, M., 1989. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured *Gladiolus* buds by growth retardants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 17, pp. 101–110.

Ziv, M. 1991a: Quality of micropropagated plants – vitrification. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 278: p.64-69.

Ziv, M. 1991b: Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. Publishers, Dordrecht, Boston, London, p.45-69.

Ziv, M., Ariel, T. 1988: The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation *in vitro*. In: Proc. Intl. Soc. Plant Molecular Biol. Congress. Jerusalem: 425.

Ziv, M. , Ariel T., 1991: Bud proliferation and plant regeneration in liquid-cultured *Philodendron* treated with ancymidol and paclobutrazol. Plant Growth Regul. 10:53–57.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS