

SZOLNOKI FŐISKOLA

**A rózsagyökér /*Rhodiola rosae* L./ és a tavaszi kankalin /*Primula veris* Huds/
mikroszaporítása**

TDK dolgozat

Kádár Orsolya
III. Évfolyam

Témavezető:

Dr. Dencső István
főiskolai docens

Készült a Szolnoki Főiskola Agrár és Vidékfejlesztési Tanszékén

Szolnok

2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	3
1.1. A biodiverzitás hasznosítása a gyógynövény introdukció - domesztikáció formájában	3
1.2. Az in vitro mikroszaporítás hasznosítása a biodiverzitás ex situ megőrzésében	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1. A növénybiotechnológia gazdasági alkalmazásának lehetőségei.....	5
2.2. Alkalmazási lehetőségek a növénynemesítésben	5
2.3. A mikroszaporítás és szakaszai	11
2.3.1. Sokszorozás	11
2.3.2. In vitro gyökeresítés.....	12
2.3.3. Akklimatizálás	13
2.4. A táptalaj összetétele.....	13
2.4.1. Szénhidrátok.....	14
2.4.2. Növekedésszabályozó anyagok	14
2.4.3. Egyéb szerves kiegészítők.....	15
2.4.4. Aminosavak.....	15
2.4.5. Gázok	16
3. RÓZSAGYÖKÉR (<i>Rhodiola rosae</i> L.).....	17
3.1. A rózsagyökér gyógyászati hatásai.....	17
3.2. Termesztéssel kapcsolatos kísérletek.....	17
3.3. In vitro kísérletek	18
4. TAVASZI KANKALIN (<i>Primula veris</i> Huds)	19
5. KÍSÉRLETEK CÉLJA.....	20
6. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	21
6.1. Kiinduló alapanyag	21
6.2. Tenyészetek létrehozása, a mikroszaporítás szakaszai	21
6.3. <i>Rhodiola rosae</i> steril kultúra létrehozása	21
6.4. Tavaszi kankalin steril kultúra létrehozása	25
6.4.1. Felszaporítási fázis.....	27
7. ERDEMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	31
IRODALOMJEGYZÉK.....	32
TÁBLÁZATJEGYZÉK	34
ÁBRAJEGYZÉK.....	35

1. BEVEZETÉS

A Szolnoki Főiskola növény-biotechnológiai laborja 2011 szeptemberében alakult, azóta folynak a kísérletek. Figyelmünk azért fordult a gyógynövények felé, mert ezzel a területtel hazánkban nagyon kevesen foglalkoznak és a rendelkezésre álló szakirodalom is kevés. A *Primula veris*-sel kapcsolatban nem is találtunk szakirodalmat, a *Rhodiola rosae*-val viszont már többen kísérleteztek, például Furmanowa M. (1999) és Ézsiás Anikó (2006).

Fontos megjegyezni, hogy az utóbbi évtizedekben, a világ más országaihoz hasonlóan, Magyarországon is fokozottan előtérbe került a biológiai értékek védelme. E feladat jelentőségére utal az a tény is, hogy jelenleg a latin névvel jelölt, ismert növény- és állatfajok számát kb. 1,4 millióra becsülik. A téma rendkívül nagy tudományos és gazdasági jelentőségét mutatja, hogy az 1992-es 'Rio- i Konferencia' Biológiai Diverzitásról szóló egyezménye kiemelt figyelmet szentel a genetikai tartalékok védelmének és hasznosításának. A Biológiai Diverzitás Védelméről szóló részprogram hangsúlyozza: „nemzeti és nemzetközi szinten egyaránt szükséges bővíteni a biológiai diverzitás felmérését, tanulmányozását, szisztematikus megfigyelését és értékelését megvalósító kapacitásokat”.

Célkitűzésünk az volt, hogy első lépésként oldjuk meg a fentebb említett fajok in vitro tenyésztését. A tavaszi kankalin, mint modell növény szolgálhat a szártalan kankalin (*Primula vulgaris*) (védett növény) in vitro tenyésztésének kidolgozásához, a rózsagyökérnél pedig a sejt kultúrák létrehozásához vezető út első lépése az in vitro csíráztatás és szaporítás megoldása volt.

1.1. A biodiverzitás hasznosítása a gyógynövény introdukció - domesztikáció formájában

A biológiailag aktív anyagokat tartalmazó gyógynövények kutatása, életközösségeinek jellemzése, hasznosítása - mind a vadon termő növények gyűjtése, mind szántóföldi termesztése révén - Magyarországot nemzetközileg is elismert rangra emelte. Napjainkban, az élelmiszer-, a gyógyszer- és a kozmetikai-ipar nyersanyagszükséglete, a megbízható és folyamatos ellátás a vadon termő növények gyűjtése útján csak korlátozott mértékben biztosítható. Ezeknek a fajoknak egy jelentős része ma már természetvédelem alatt áll, ami a gyűjtés lehetőségeinek korlátozását is jelenti. A gyógyszeripari hasznosítás, a jó drogminőség és a hatóanyagtartalom standardizálás iránti kereslet fokozza az ismert eredetű homogén nyersanyag előállítására tett törekvéseket. A kiváló drogminőség, pl. biológiai tisztaság biztosításának egyik lehetséges fontos módja a termesztés. A gyógynövények diverzitásának felmérése, a genetikai tartalékokból való mintavétel, illetve a gyűjtés viszont sok tekintetben eltér a termesztett növények egyéb csoportjainál alkalmazott módszerektől. A 60.000-re becsült, gyógyászati értékkel bíró, növény – taxon felkutatása és vizsgálata érdekében szükség van megfelelő módszertanra.

1.2. Az *in vitro* mikroszaporítás hasznosítása a biodiverzitás *ex situ* megőrzésében

A biodiverzitás megőrzésének igénye csaknem egyidős a biológiai rendszerek működéséről nyert ismereteink növekedésével. A Rio- i csúcstalálkozó is megfogalmazta: „módszereket és technológiákat kell kidolgozni a biológiai diverzitás megőrzésére és a biológiai erőforrások önfenntartó felhasználása érdekében“. Az utóbbi évtizedekben a biotechnológia és ezen belül is az *in vitro* mikroszaporítás, visszafordíthatatlanul a biodiverzitás géntartalékai *ex situ* megőrzésének egyik eszközévé vált, mind a vadon termő (pl. gyógynövények), mind a termesztett kertészeti növények esetében. Az *in vitro* szaporított növények alacsony hőmérsékletű tárolása a világ legfontosabb génbankjaiban már rutinszerűen alkalmazott módszer. Mindezekre tekintettel, vizsgálataim fontos célkitűzése volt a *gyógynövények in vitro* morfogenezisének tanulmányozása, jellemzése és az így nyert adatok felhasználása, mikroszaporítási módszerek kidolgozása révén hozzájárulni a biodiverzitás megőrzéséhez. A steril körülmények között végzett vegetatív mikroszaporítás a növényi biotechnológiának az a területe, amelyet jelenleg a legszélesebb körben alkalmaznak a gyakorlatban, illetve az üzemi technológiák részévé vált.

A hagyományos *in situ* technikákkal ellentétben az *in vitro* szaporításra felhasznált inokulumok olyan kicsik, hogy csak steril körülmények között tarthatók életben, kívülről pótolta tápanyagok és fejlődést szabályozó vegyületek segítségével. A vegetatív mikroszaporítás két fő technikáját a *merisztématenyészet* és a *hajtáskultúra* jelenti. E módszerekkel korlátlan mennyiségű (pl. milliárdos nagyságrendű) szaporulat érhető el évente, és ennek minősége pontosan ellenőrizhető. Az *in vitro* merisztématenyészetek kiváló feltételeket teremtenek a vírusmentesítés módszereinek felhasználásához, valamint a kórokozómentesített tenyészetek tartós tárolásához génbankokban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A növénybiotechnológia gazdasági alkalmazásának lehetőségei

Ma még korai lenne a növénybiotechnológia széles körű üzemi alkalmazásáról beszélni, mert a biotechnológiának is, mint minden szintáttörést jelentő gazdasági lehetőségnek, évekre, sőt akár egyes esetekben évtizedekre van szüksége ahhoz, hogy általánosan elterjedt felhasználást nyerjen.

A növénybiotechnológia alkalmazásának mérföldkövei:

- 1954: Merisztématenyésztéses mikroszaporításra alapozott vírusmentesítési kutatások kezdete (Franciaország)
- 1956: Növényi sejtek általi fermentációs termelési első szabadalom (USA)
- 1966: A vegetatív mikroszaporítást alkalmazó első kereskedelmi laboratóriumok létesítése
- 1975: Haploidia útján előállított első rizsfajta (Kína) és első dohányfajta (Japán) mezőgazdasági minősítése
- 1979: Szabadalom a növényi sejtek immobilizációjára termelési folyamatban (Németország)
- 1982: Szabadalom a szomatikus embriók kapszulázására, vagyis a mesterséges mag előállítására (USA)
- 1983: Az első üzemi sejtfermentációval előállított növényi termék (a sikonin) megjelenése a világpiacon (Japán)
- 1984: Az első növényi gén szabadalmaztatása (USA)
- 1986: Az első búzafajta minősítése, amelynek előállítása során az androgenézis módszerét alkalmazták (Franciaország)
- 1986: Az első minősített növényfajta (egy káposztafajta), amelynek előállítása során a protoplasztfúzió módszerét alkalmazták (Japán)
- 1988: Transzgénikus növények először szántóföldi kipróbálása

Jelenleg a növénybiotechnológia fő alkalmazási lehetőségei a növénynemesítésben, a biológiai növényvédelemben, a vegetatív szaporítóanyag előállításában és a növényi produkció feljavításában lelhetők fel. (Fodorpataki, L., Szigyártó, L. [2008])

2.2. Alkalmazási lehetőségek a növénynemesítésben

A növénybiotechnológia alkalmazásának legnagyobb gazdasági hasznot hozó területe a növénynemesítés, annak ellenére, hogy a mezőgazdaságban csakis olyan új fajtákat lehet

termeszteni, amelyek az állami fajtaminősítés 3-5 éves kísérleteiben megfelelő eredményt nyújtottak.

A biotechnológiának a növénynevelésben alkalmazott legfontosabb módszerei és célkitűzései:

a) Merisztématenyésztés:

- vegetatív szervek élettani manipulációja mesterséges körülmények között
- kórokozómentesítés (vírus, baktérium, gombafertőzés teljes hiánya)
- üzemi méretű vegetatív mikroszaporítás
- génbank létrehozása korlátlan időre való megőrzésre
- értékes fajtajelöltek gyors felszaporítása

b) Embriótenyésztés, magkezdeménykultúra, *in vitro* megtermékenyítés:

- csírányugalom mesterséges megszüntetése
- nemzedékváltás gyorsítása
- öninkompatibilitás kiküszöbölése beltenyésztéskor
- nemzetség- és fajhibridek előállítása a keresztezési inkompatibilitás kiküszöbölésével
- haploidok előállítása

c) Androgenézis és ginogenézis:

- teljes homozigóták (izogén vonalak) előállítása
- gametoklonális variabilitás előidézése
- mutánsok szelekciója
- heterózisnemesítés idejének csökkentése
- recesszív tulajdonságok vizsgálata, kiválogatása és felhasználása a nemesítésben

d) Kalluszkultúra és sejtenyésztés:

- másodlagos anyagcseretermékek bioszintézise
- üzemi sejtfermentáció
- sejtszintű mutánsizolálás (szárazság-, hideg-, vegyszer-, kártevő-, korokozó- és egyéb stressz-rezisztencia kialakítására)
- alapanyag létrehozása protoplasztizációhoz
- génbank mélyfagyasztott sejtek gyűjteménye által
- szomaklonális variabilitás kiváltása

- mesterséges mag előállítása
- e) Protoplasztok izolációja és szomatikus sejthibridizációs fúziója:
- paraszexuális faj- és nemzetséghibridek előállítása által távoli rokon növények hasznos tulajdonságainak egyesítése
 - gének, kromoszómák átvitele fajok és fajták között aszimmetrikus hibridizációval
 - poliploidok gyors és irányított előállítása
- f) Cibridizáció:
- új sejtmag - mitokondrium - kloroplasztisz kombinációjú sejtek létrehozása
 - hímsterilitás átvitele különböző fajokba
 - herbicidrezisztencia átvitele szenzitív fajokba
 - a fotoszintézis és a légzés hatékonyságának
- g) Növényi génszétválasztás:
- vírus-, baktérium-, gomba-, rovar-, állat-, és emberi gének bevitele növényekbe
 - stresszrezisztencia átjuttatása szenzitív fajtákba
 - speciális termékek (főleg számunkra hasznos fehérjék) termeltetése szántóföldön, új céllal termesztett növényfajok megjelenése

A növényvilág örökletes változatosságának a megőrzése és a génerózió megelőzése céljából a természetes növényzet illetve a kultúrfióra különböző fajainak a fellelhető populációiból az egész világon mintákat vesznek, melyek in vitro génbankokban vagy csíraplazmabankokban őrizhetők meg az utókor számára. A megőrzés a minták fenntartását és tartós tárolását jelenti. Ennek leggyakoribb módja a generatív úton szaporított növényeknél a magként való tárolás 6-10 %-os légköri nedvességtartalom és 5-20°C-os hőmérséklet körülményei között. A vegetatív úton szaporított növényfajok esetében erre nincs lehetőség, ezért ezek számára a növénybiotechnológia két megoldási lehetőséget kínál: a genetikai tartalékok in vitro tenyészetekben való megőrzését, vagy a növényi sejtek, szövetek (főleg merisztémák) és szervek speciális körülmények közti fagyasztását.

A növénynemesítési biotechnológiák keretében a legfontosabb előrelépést a *molekuláris módszerek* bevezetése hozta, ami által a gének szintjén történő szelektálás valósulhat meg. Az utóbbi években a molekuláris biológiai módszerek fejlődésének köszönhetően a restrikciós

enzimekre és az izolált DNS-szakaszokra, valamint a polimeráz láncreakció (PCR) módszerére alapozva a genetikai polimorfizmus új formái váltak elérhetővé a nemesítők számára:

- A DNS restrikciós-fragmentum hossz-polimorfizmusa (RFLP)
- A random amplifikált polimorf DNS-szekvenciák (RAPD)
- A miniszatellit szekvenciák és az amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus (AFLP).

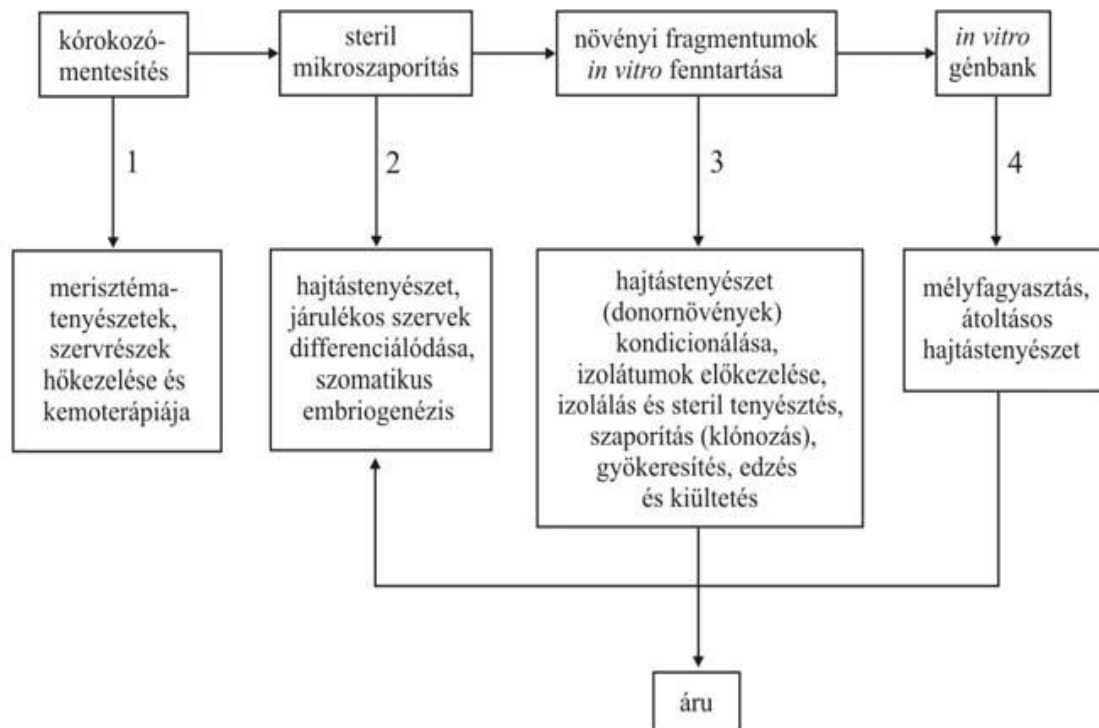
Ezek a DNS szintű markerek ideálisak jól használható genetikai térképek elkészítésére, melyek segítségével a nemesítési szempontból értékes génnel szorosan kapcsolt molekuláris jelzők viszonylag egyszerűen azonosíthatók. A *molekuláris markerek* előnye, hogy segítségükkel nemcsak egyedi gének által kódolt jellegeket, hanem kvantitatív, poligénes tulajdonságokat is (pl. termés hozamot, környezeti stressz-adaptációs képességet, növekedési sebességet stb.) kezelhetünk, ugyanis ezek felbonthatók a markerek segítségével mendeli módon öröklődő egyedi genetikai komponenseikre, amelyek száma és az adott tulajdonsághoz való hozzájárulási mértéke meghatározható.

A molekuláris növénybiotechnológiai módszerek keretében jelenleg a gének azonosítása és a DNS-szekvenciájuk meghatározása mellett nagy erőfeszítések történnek a gének funkciójának megállapítására. Konkrét választ a gének a növényben betöltött szerepére csak a gén mutációs megváltozása adhat, és ennek érdekében a legcélravezetőbb megközelítésnek tűnik a növényi gének módosítása genetikai transzformáció segítségével. A fentiekkel kapcsolatosan megemlíthetjük, hogy egyes vélemények szerint a *növényi genomprogramok* sikerének az elkövetkező száz évben nagyobb jelentősége lesz az emberiség jövőjének tekintetében, mint az emberi genom teljes megszekvenálásának, figyelembe véve a növekvő élelmezési és környezeti, valamint a megújuló természeti erőforrásokkal kapcsolatos problémákat.

Az *in vitro* szövettenyésztéssel megvalósított növényfelnevelés, akár sejtekből, akár szövetrészekből, kikerülhetetlen lépés a növények transzformálását célzó módszerek alkalmazása során is. A növényi szövettenyésztési kutatás egy fontos alapját teremtette meg a genetikai transzformációnak és ezzel integráns elemévé vált a biotechnológiai fejlesztéseknek.

Mióta Morel felfedezte a járulékos merisztémasejt - csoportokból (protokormokból) való vegetatív szaporítás módszerét az orchideáknál, a világon évente több mint 300 millió palántát állítanak elő steril klónozással. A vegetatív mikroszaporításra specializálódott üzemi biotechnológiai laboratóriumok száma rohamosan nő. Az európai országok közül Anglia, Franciaország, Belgium és Olaszország rendelkezik a legnagyobb kapacitású cégekkel. A steril vegetatív mikroszaporítás vagy gyors klónozás ma már olyan területe a növénybiotechnológiának, amelyet üzemi mértékben alkalmaznak (főleg a dísnövények előállításában), a többmilliós

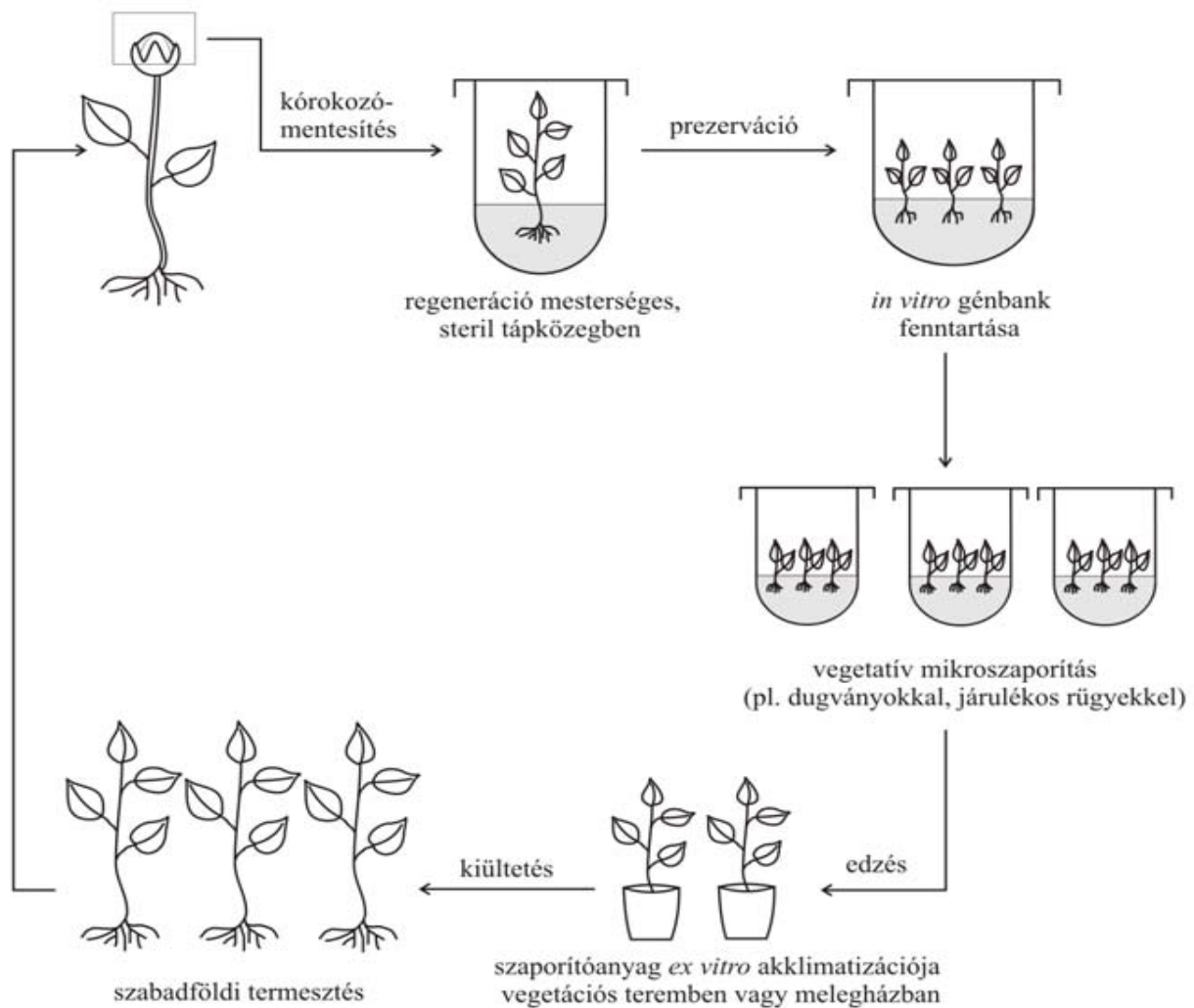
nagyságrendű termelés pedig már nemzetközi piacutatót és az előállítási folyamat automatizálását igényli.



Forrás: Fodorpataki, L., Szigyártó, L. [2008] nyomán

1. ábra: A kórokozómentes növényi szaporítóanyag előállításának fontosabb technológiai egységei és alkalmazott módszerei

A steril körülmények között végzett vegetatív mikroszaporítás a növényi biotechnológiának az a területe, amit jelenleg a legszélesebb körben alkalmaznak a gyakorlatban, illetve az üzemi technológiák részévé vált. A hagyományos in situ technikákkal ellentétben az in vitro szaporításra felhasznált inokulumok olyan kicsik, hogy csak steril körülmények között tarthatók életben, kívülről pótolta tápanyagok és fejlődést szabályozó vegyületek segítségével. A *vegetatív mikroszaporítás* két fő technikáját a *merisztématenyészet* és a *hajtáskultúra* jelenti. E módszerekkel korlátlan mennyiségű (pl. milliárdos nagyságrendű) szaporulat érhető el évente, és ennek minősége pontosan ellenőrizhető. Az *in vitro* merisztématenyészetek kiváló feltételeket teremtenek a vírusmentesítés módszereinek felhasználásához, valamint a kórokozómentesített tenyészetek tartós tárolásához génbankokban. (Fodorpataki, L., Szigyártó, L. [2008])



Forrás: Fodorpataki, L., Szigyártó, L. [2008] nyomán

2. ábra: Növényi szaporítóanyag mesterséges előállításának fő lépései

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 növekedésszabályzó 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

2.3. 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 Heszký [1990], Deberg és Read [1991]).

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

- I. Steril kultúra létrehozása
- II. A tenyészetek felszaporítása
- III. A növények előkészítése a talajba ültetéshez

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. Hagymás és gumós növényeknél leggyakrabban a hagymát vagy a gumót használjuk kiindulási anyagként (Matsuo et al. [1989], Jámborné [1993]) indításánál. Előáztatáshoz gombaölő szerek kis koncentrációjú oldatait használjuk, vagy tiszta vizet. Mosáshoz folyó csapvizet és felületi feszültség 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. a Predentál.

2.3.1. 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 Heszký [1990]):

- Hajtástenyészetek
- Járulékos szervtenyészetek

- Szomatikus embriogenezis

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. Bár 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 kevésbé járható út. A sokszorozási szakasz fontos leíró paramétere a szaporodási ráta. Ezt nagymértékben befolyásolják az alkalmazott szénhidrátforrások (összetétel és mennyiség), a citokinin 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 (Szafián Zs. [2010]).

2.3.2. *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 paramétere mellett (gyökérszám, gyökérhossz) 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. A gyökeresítő táptalajok általában csökkentett makro- és mikroelem koncentrációjúak, sok esetben még auxinokat sem tartalmaznak. A szerves kiegészítők (aminosavak, vitaminok) fajonként serkenthetik, vagy éppen gátolhatják a gyökerezést. A gyökereztető szakaszt megkérdőjelezi néhány kutató, akik azt tapasztalták, hogy az *in vitro* képződött gyökerek az akklimatizálás során elpusztulnak, illetve funkcióképtelenné válnak. A gyökeresítő táptalajra helyezés költségét csökkentendő, többen próbálkoztak e szakasz kihagyásával és a kapott hajtások mikrodugványként való kezelésével és *ex vitro* gyökeresítésével (Szafián Zs. [2010]).

2.3.3. 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. 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 (Szafián Zs. [2010]).

2.4. 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. 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 Co és az Al szükségességéről megoszlanak a vélemények. 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]). Általunk is tapasztalt jelenség, hogy a tisztítatlan, szálas agar használatakor kevésbé lép fel a vitrifikáció (hiperhidratáció) jelensége, valamint a tenyészetek állapota jobb lesz. Ez szinte nem is mérhető, számszerűsíthető jellemző, inkább csak vizuális megfigyelés.

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 (pl. polifenolok). A táptalaj a változások következtében nem marad homogén, az ásványi anyagok nem egyenletes eloszlását mutatta ki (Szafián Zs. [2010]).

2.4.1. Szénhidrátok

A korábbi kutatásokkal szemben, melyek csak néhány sejtenyészet autotrófiáját bizonyították az *in vitro* tenyésztés során, az újabb kutatások beszámolnak autotróf tenyészetekről is. 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. 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. Autoklavozás során a szacharóz fruktózzá és glükózzá hidrolizál. 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. 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. (Szafián Zs. [2010]).

2.4.2. Növekedésszabályozó anyagok

Az *in vitro* tenyésztés kulcsfontosságú elemei a növekedésszabályozó anyagok. Ezek részben a növényben természetes módon megtalálhatók, részben e 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. 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 növekedésszabályzók az autoklávozás és a táptalaj tárolása során milyen mértékben bomlanak le. A közelmúltban előtérbe kerültek a különböző növekedésgátló anyagok alkalmazásai is. Hatásuk általában a vitrifikáció mértékének a csökkentése, valamint a levélnövekedés csökkentése, és a hajtásszám növelése folyékony kultúráknál. Leggyakrabban alkalmazott képviselőik az ancymidol és a paclobutrazol. A gyökeresítő táptalajhoz adott paclobutrazol segíti a növények kiültetését követő akklimatizációt. (Szafián Zs. [2010]).

2.4.3. Egyéb szerves kiegészítők

Főként a korai kutatások során alkalmazott táptalajok nagyon sok meghatározhatatlan összetételű kiegészítőt tartalmaztak. 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. A vitaminok kis mennyiségben minden élő szervezet, tehát 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 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 lévőnél nagyobb mennyiségben igénylik azokat. (Szafián Zs. [2010]).

2.4.4. 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. A glicint általában 2 mg/l

koncentrációban alkalmazzák. 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 szervetlen 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. 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. (Szafián Zs. [2010]).

A tápoldatokat gélesítő anyagokkal gélekké alakítjuk. A különböző agar márkák azonban eltérő minőségűek, s ezzel gyakran megmagyarázható a különböző laboratóriumok által megismételt kísérletek eltérő eredményei. Több szerző beszámol a kultúrák különböző növekedéséről az eltérő tisztaságú agargéleken (Singha et al. [1985], Davis et al. [1977]). 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 (vitrifikáció) léphet fel. Az agar mellett gyakran használt anyag a Gelrite is. Ennek a polymernek jó tulajdonságai közé tartozik az átlátszósága, hidegen készíthetősége, és a vitrifikációt csökkentő képessége. Nem ritka a két anyag keverése sem (Szafián Zs. [2010]).

2.4.5. 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 CO_2 szintje nagy befolyással van a lezárt tenyészedényekben kialakuló CO_2 szintre (Kozai et al. [1987]). A folyékony táptalajok levegőztetését különböző megoldásokkal tudjuk biztosítani, úgymint forgatás, rázatás vagy steril levegő befúvása.

3. RÓZSAGYÖKÉR (*Rhodiola rosae* L.)

A *Rhodiola* nemzetség a Himalájából és Észak- Nyugat Kínából származtatjuk, a rizoma és a gyökér sok gyógyászatilag aktív, különböző kémiai csoportokba sorolható másodlagos anyagcseretermékeket halmoz fel. Kurkin és munkatársai (1983) megvizsgálták a rózsagyökér flavonoid összetételét, a rizómából elsőként a rodionint, a rodiosint, és a rodiolint izolálták, majd később az acetilrodalint. Hét flavonoid összetevőt azonosítottak és később leírták ezek vegyületek szerkezetét is (Zapesochnaya et.al.[1986]).

3.1. A rózsagyökér gyógyászati hatásai

A rózsagyökeret az orosz kutatók számos stresszorral szembeni rezisztencia növelése alapján adaptogén hatásúnak nyilvánították. 1947-ben Lazarev definiálta először a kifejezést: az adaptogén egy olyan ágens, amely lehetővé teszi, hogy a szervezet ellensúlyozza az őt érő ártalmas fizikai, kémiai vagy biológiai stresszorokat egy általános rezisztencia létrehozásával. Az adaptogén hatású gyógynövények a szervezet nem specifikus ellenállóképességét fokozzák, növelik a fizikai és pszichikai teljesítőképességet. Patkányoknál megfigyelték, hogy a rózsagyökérrel való kezelés mérsékli a stressz-indukált szív és érrendszeri zavarokat. Patkányoknál kezelés hatására megállt a tüdőkarcinóma, csökkent a máj metasztázisa.

Humán kísérletekben egy záróvizsga előtt álló diákokat kezeltek rózsagyökér kivonattal. Ennek hatására emelkedett a diákok fizikai és mentális teljesítőképessége illetve közérzetük is jobb volt a placebót szedőknél (Ramazanov et.al [2003]). A rózsagyökérnek nagyon alacsony a toxicitása, embernél az LD50 235mg/kg, nagyon kevés a mellékhatása, az orvosi kísérletek folyamatosan zajlanak (Ézsiás A. [2006]).

3.2. Termesztéssel kapcsolatos kísérletek

A rózsagyökér az erőteljes gyűjtés miatt a veszélyeztetett növények körébe került. Számos kísérletet hajtottak végre termesztésbe vonására irányulóan. A kísérletekből levonható következtetések alapján (Galambosi és munkatársai [1994]) a növény sikeresen termesztethető gyökeréért Finnországban, de termesztésbevonás előtt meg kell vizsgálni az egyes ökotípusok kémiai tulajdonságait. Mivel igen hosszú idő szükséges a magas hatóanyagtartalom eléréséhez természetes körülmények között, csak a legmagasabb hatóanyagtartalmú típusokat érdemes így hasznosítani.

3.3. In vitro kísérletek

Aleksandrova és munkatársai (1981) közzétettek egy módszert a rózsagyökér kalluszból történő gyökérregenerációjára, viszont nem írtak le kalluszindukcióról információkat. Kurkin és munkatársai (1991) 12 kémiai komponenst izoláltak kalluszból HPLC segítségével. Furmanova et.al (1995) fertőtlenített magokat csíráztattak petricsészében, majd a levelekből kalluszt indukáltak. György et.al (2004)-ben kompakt kalluszkulturát létesítettek, fahéjalkohol hozzáadásával fahéjglikozidok termelését indukálták, rozin termelődött, szalidroizid csak nyomokba, ha szaharóz mellé még glükózt is adtak megkétszereződött a termelt fahéjglikozidok mennyisége. Furmanova et.al (1999) szerint ha fahéjglikozidokat adtak rodiola sejt kulturákhoz, a sejtek a fahéjalkohol 90%-át azonosítatlan termékekké alakították át. Ézsiás A. (2006) a *Rhodiola rosae* in vitro transzformációjának megalapozásáról írt dolgozatot, amelyben sikeres kalluszkultúra indukcióról és ennek fenntartásáról számol be.

4. TAVASZI KANKALIN (*Primula veris* Huds)

A Primulales (kankalinvirágúak) rendjébe tartozik, szinonim neve a *P. officinalis* L.

A többi vadon termő kankalin:

- Lisztes kankalin, (*P. farinosa* L)
- Cifra kankalin (*P. auricola* L)
- Szártalan kankalin (*P. vulgaris* L)
- Sugárkankalin, (*P. elatior* L)

A vadon termő kankalinok védettek, nem gyűjthetők. Drogja a levele, a virágja és a gyökere, ez utóbbi a *Primula radix et rhizoma* az ESCOP monográfiákban is szerepel *Primula root* néven. Hatóanyaga triterpén vázas flavonoidokat tartalmaz (primulasav-komplexek) és fenolglükozidokat (primverin, primulaverin). A gyökértörzs szaponintartalma legalább 8%. A virágban kevesebb a szaponin de flavonoidok, karotinok és némi illóolaj is található benne. A levélben jelentős a C-vitamin, szaponintartalma viszont csak 2%. Farmakológiai hatása köptető, felhasználják légcsőhurut, hörghurut kezelésére (gyökértörzs főzete). A népi gyógyászatban vizelethajtónak és idegnyugtatónak is használják. Termesztése megoldható, bár a szántóföldi körülményeket nem kedveli. Tőosztással vagy palántaneveléssel szaporítható (Bernáth Jenő [2000]).

A *Primula veris* szövettenyésztésével kapcsolatban nem találtunk szakirodalmat. Itt kell megjegyeznünk, hogy egyes gyógynövények in vitro kultúrában is termelnek növényi alkaloidokat, mások azonban nem.

Néhány fontosabb gyógynövény, amelyeket in vitro tenyésztésbe vittek:

- *Arnica montana*, (Cassels, A. C., et. al [1999])
- *Valeriana jatamansii* (Kaur et.al.[1999])

5. KÍSÉRLETEK CÉLJA

A rózsagyökér esetében célul tűztük ki, hogy mivel csak mag állt rendelkezésre a kísérletek folytatására lehetőség szerint steril csíráztatás, majd in vitro tenyésztés kidolgozásával elegendő növényt kapjunk ezek további felneveléséhez és kiültetéséhez. Ezután már el lehet kezdeni a klónokból történő mikroszaporítás technológiájának kidolgozását, ami lehetővé teszi, hogy a később nagy hatóanyagra szelektált klónokat ezzel a módszerrel gyorsan felszaporítsuk. A következő lépés a gyökérkultúra illetve sejtkultúrák létesítése az in vitro történő hatóanyag termelés vizsgálata céljából.

A *Primula* esetében a cél – mivel semmilyen előzetes szakirodalom nem állt rendelkezésünkre szövettenyésztésével kapcsolatban – az alapvető szövettenyésztési eljárások fázisainak kidolgozása (indítás - felszaporítás - gyökeresítés - kiültetés) volt. Ez lehetővé teszi, hogy az igazi célnövény, a védett szártalan kankalin (*Primula vulgaris* L) szövettenyészetbe vitelét, technológia kidolgozását. Nagymértékű szaporítóanyag előállítása után, esetleg ha lehetséges szántóföldi termesztés kidolgozása, illetve in vitro módszerek kidolgozása génbanki megőrzésre. Továbbiakban célul tűztük ki gyökérkultúrák létesítését (mivel ezek termelik a hatóanyagokat) ezek esetleges in vitro termelésének vizsgálatát gyökértenyészetekben.

6. ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1. Kiinduló alapanyag

A rózsagyökér magjait Dr. György Zsuzsa (Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar), a tavaszi kankalin felszedett hajtásait László Bencsik Ábel (Gyógynövény Kutató Intézet) volt szíves rendelkezésemre bocsájtani.

A tavaszi kankalin, mint modell növény szolgálhat a szártalan kankalin (*Primula vulgaris* L) - védett növény - in vitro tenyésztésének kidolgozásához, a rózsagyökérnél pedig a sejt kultúrák létrehozásához vezető út első lépése az in vitro csíráztatás és szaporítás megoldása.

6.2. Tenyészetek létrehozása, a mikroszaporítás szakaszai

A rügycultúrák fertőtlenítési menete: 4x-es hígítású hypo 5 percig, előtte 30 mp 70 %-os alkoholos oldat, majd 4x5 perces steril vizes kimosás. Ugyanezt használtuk a rózsagyökér magvainál, de ott nem volt előzetes alkohol oldatos áztatás.

A fertőtlenítés után mikroszkóp alatt leszedtük a rügypikkelyeket és minden esetben merisztémát (0.1-0.3 mm) helyeztünk el az alaptáptalajra. A *Primula* esetében ez nehezebb volt, mivel jórészt virágrügök differenciálódtak, ezért több esetben nagyobb hajtáscsúcsokat tettünk le, de ahol tisztán látható merisztéma volt, ott azt preparáltuk ki.

Az alkalmazott alaptáptalajok MS, (Murashige-Skoog [1962]), DCR (Gupta–Durzan, [1985]) és BTM (Chalupa [1981]) valamint, ezek különböző hígításai voltak. A tenyészeteket fényszobában tartottuk, 23 fokon, 16 órás megvilágítás, és 8 órás sötét periódus mellett. A rózsagyökérnél a gyökeres hajtásokat Jiffy pogácsákba ültettük.

6.3. *Rhodiola rosae* steril kultúra létrehozása

Steril csíráztatást végeztünk, ahol a DCR+ 1mg/l GA- t tartalmazó táptalajon közel 100%-os csírázást kaptunk. (1. táblázat)

Rózsagyökér magok csírázása 21 napos inkubáció után (4x25 mag átlaga)

1. táblázat

Táptalaj típusa	Csírázási százalék (%)	Csíramagasság (mm)
DCR+1mg/l GA	98	12

Forrás: Saját munka



3. ábra: Rhodiola magok steril csíráztatása

A rózsagyökér esetében további szubkulturálás volt szükséges DCR+1mg/l GA tartalmú táptalajon, amennyiben rögtön 0.1mg/l BAP- t tartalmazó táptalajra tettük, a növények nem fejlődtek. Tehát két szubkulturálás kell gibberellint tartalmazó táptalajon, utána alkalmazhatjuk a BAP- t tartalmazó táptalajt.

A rózsagyökér esetében a további in vitro felszaporításhoz a legmegfelelőbb az MS táptalaj volt, BAP 0.2mg/l hozzáadásával. Ezen a táptalajon a növények számos oldalhajtást képeztek.

Rózsagyökér szaporodása 4 hetes inkubáció után (4x25 embrió átlaga)

2. táblázat

Táptalaj	Szaporodási ráta	Növénymagasság (mm)
MS+BAP 0.2mg/l	6.8	4.2
MS+BAP 0.6 mg/l	4.7	2.6

Forrás: Saját munka



4. ábra: Szaporodó Rhodiola növények MS+BA 0.2 mg/l táptalajon



5. ábra: 700 ml-es lombikban már tömegméretekben szaporított Rhodiola növényeket

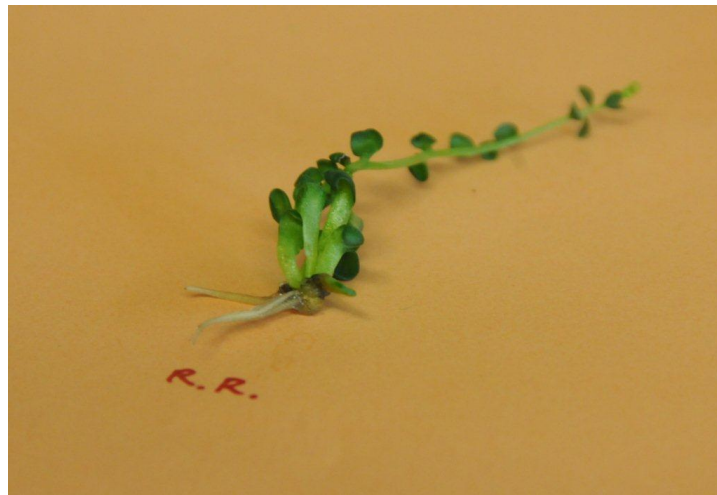
Ezeket a növényeket hormonmentes táptalajon legyökerezettük, majd kiültettük Jiffy pogácsákba, ahol szépen akklimatizálódtak, majd fejlődésnek indultak. Amennyiben a táptalajhoz 0.5mg/l IVS- t adtunk erőteljesebb gyökérszet fejlődött.

Rózsagyökér gyökeresedése különböző táptalajokon 21 nap után (4x25 növény átlaga)

3. táblázat

Táptalaj	Gyökeresedési százalék (%)	Gyökérhossz (mm)
MS hormon nélkül	85	25
MS+0.5 mg/l IVS	98	34

Forrás: Saját munka



6. ábra: Gyökeres *Rhodiola rosae*



7. ábra: Akklimatizált *Rhodiola* növények

Elkezdtek a kalluszosítási kísérleteket is.

2.4-D illetve kinetin segítségével, a kipróbált táptalajok a következők voltak:

1. N-7 táptalaj +2.4-D 2mg/l+ KIN 0.5mg/l kazein nélkül
2. N-7 táptalaj+ NES 2mg/l+KIN0.5 mg/l kazein nélkül

A steril növények leveleiből vágunk le mintegy 3-4 mm- es szeletkéket és ezeket tettük a különböző táptalajokra, a kalluszosodást vizuálisan értékeltük. A NES- t tartalmazó táptalajon a kallusz színe piros volt, még a 2.4-D-t tartalmazón zöld. Egyelőre ott tartunk, hogy a rózsagyökér esetében a 2.4-D+KIN nem megfelelő táptalaj a kalluszosításra, és a NES- t tartalmazó táptalaj sem. A kísérleteket folytatjuk.

6.4. Tavaszi kankalin steril kultúra létrehozása

Tavaszi kankalin esetében nehéz volt hajtásmerisztémát találni, mivel a fejlődésnek indult növényekben már elsősorban virágrügyek differenciálódtak. A fertőtlenítés 80-90%-ban eredményes volt, annak ellenére, hogy földalatti részekből kellett a merisztémát kipreparálni.



8. ábra: 2012 januárjában begyűjtött Primula növény

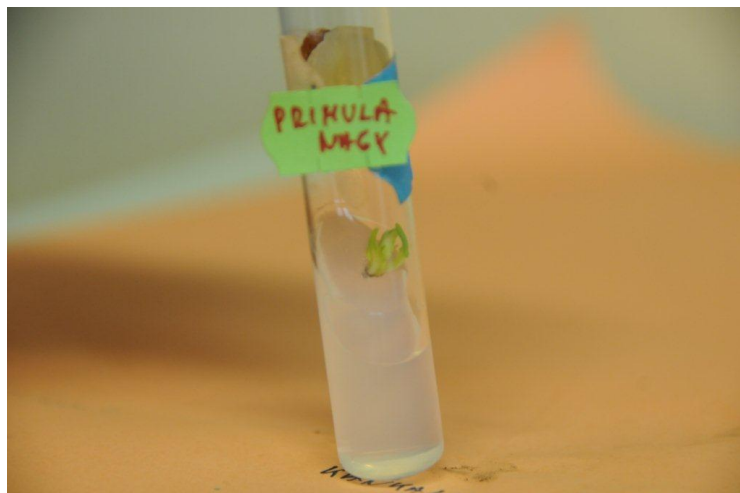
A fertőtlenítés 4x-es hígítású hypo segítségével történt, utána leszedtük a rügypikkelyeket, amíg meg nem találtuk a merisztémát. Különböző táptalajokat próbáltunk ki.

Primula hajtáscsúcsok eredési százaléka különböző táptalajokon (4x10 hajtás átlaga)

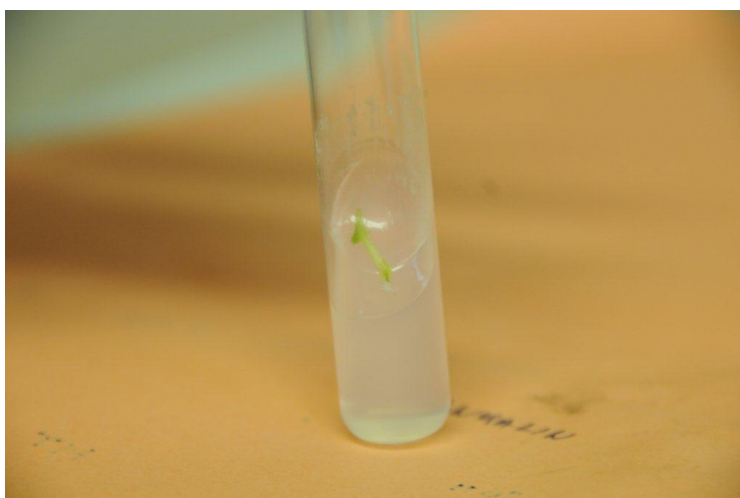
4. táblázat

Alkalmazott táptalaj	Eredési százalék (%)
DCR+BA 0.2 mg/l	72
DCR+GA 1mg/l	89
MS+BA 0.2mg/l	81

Forrás: Saját munka



9. ábra: Kipreparált nagyobb primula hajtáscsúcs



10. ábra: Kipreparált Primula merisztéma

A kipreparált Primula merisztémák, és hajtáscsúcsok minden táptalajon jól megindultak, de a legszebbek a DCR+GA 1mg/l tartalmú táptalajon fejlődtek. A felszaporítási fázisban ezek után a DCR illetve MS tartalmú táptalajokat is kipróbáltuk BAP hozzáadásával.

6.4.1. Felszaporítási fázis

A Primulánál most folynak a kísérletek a szaporító táptalaj kidolgozásával, az MS és a DCR táptalaj is megfelelőnek látszik 0.2mg/l BAP hozzáadásával.



11. ábra: Szaporodó Primula növények a tenyésztés elején



12. ábra: Szaporodó Primula növény DCR+BAP 0.2 mg/l tenyésztés 21. napján

Egyértelműen a DCR táptalaj a megfelelőbb.

Primula veris szaporodási rátája 21 napos tenyésztés után (4x25 növény)

5. táblázat

Táptalaj	Szaporodási ráta	Növénymagasság (cm)
DCR+BAP 0.2mg/l	3.2	3.8
MS+BAP 0.2mg/l	2.4	3.2

Forrás: Saját munka



13. ábra: Kankalin gyökeresedése auxint tartalmazó táptalajon

A tavaszi kankalin hormonmentes táptalajon is legyökeresedett de auxinok hozzáadása (IES vagy IVS 0.2 mg/l) javította a gyökeresedést.

Primula gyökeresedése kül. táptalajokon 21. nap (4x25növény átlaga)

6. táblázat

Táptalaj	Gyökeresedési (%)	Gyökérhossz (cm)
DCR+IES 0.2mg/l	97	2.7
DCR+IVS 0.2mg/l	93	2.5

Forrás: Saját munka



14. ábra: Kankalin gyökeresedése hormonmentes DCR alaptáptalajon



15. ábra: Leggyökeresedett kankalin növény kiültetésre kész állapotban



16. ábra: Két akklimatizált kankalin

7. ERDEMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A kankalinnál az indító táptalaj a DCR+1mg/l GA a szaporító az MS vagy DCR+0.2mg/l BAP. A *Rhodiola rosae* esetében sikerült az in vitro csíráztatott magvakból kiültetett növényeket nevelnünk. Mivel a kísérletek még csak fél éve folynak, remény van arra, hogy belátható időn belül a köztermesztés számára megfelelő és hatékony technológiát dolgozzunk ki.

Kísérleteinkben sikerült megoldani a tavaszi kankalin (*Primula veris*) hajtáscsúcs kultúrából történő in vitro szaporításának teljes folyamatát, illetve a rózsagyökér (*Rhodiola rosae*) in vitro csíráztatásából nyert növények felszaporítását és felnevelését. Az alkalmazott alaptáptalajok az egyes növényeknél nagyon eltérőek voltak (MS, DCR) az alkalmazott hormonszint (GA, BA) tekintetében már nem adódtak nagy különbségek. A kultúrák indítását, felszaporítását és gyökereztetését is sikerült megoldanunk.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Bernáth Jenő (szerk.) [2000]: Gyógy- és aromanövények, Mezőgazda Kiadó
2. Cassels,A.C.et.al [1999] Establishment of plantation fro micropropagated Arnica chamissionis a pharmaceutical substitute for the endangared A.montana. Plant Cell, Tissue and Organ culture vol.56 No.2 139-144 o.
3. Chalupa,V.[1981] Clonal propagation of broadleaved forest trees. Comm.Inst.For.Res.Cech. 12 255-271 o.
4. Davis, M.J., Baker, R. ,Hanan, J.J. 1977: Clonal propagation of carnation by micropropagation. J. Am. Soc. Hort. Sci. 102: p.48-53
5. 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
6. Dudits, D., Heszky, L. [1990]: Növénybiotechnológia. Bp. Mezőgazdasági Kiadó
7. Ézsiás A. [2006] A rhodiola rosae in vitro transzformációjának megalapozása Diploma dolgozat, Kertészeti Egyetem
8. Fodorpataki, L., Szigyártó, L. [2008]: A növények szaporodása és a mesterséges növénysszaporítás biotechnológiai alkalmazásai. Kolozsvári Egyetemi Kiadó
9. Furmanowa M.et.al.[1999] Rosavin as a product by Rhodiola rosa cell culture.Plant Cell Tissue and Organ culture 56 2 105-110 o.
10. Gupta, P.K-Durzan, D.J.[1985] Shoot multiplicattion from mature Douglas fir. Pl.Cell.Report
11. Jámborné Benczúr E (szerk.) [1993]: Dísznövények mikroszaporítása. Egyetemi jegyzet. KÉE, Budapest

12. Jámborné Benczúr E. [1986]: Szövettenyésztés a dísznövénytermesztésben. In: Nagy B. (szerk.): Növényházi dísznövények termesztése és hajtatása. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó
13. Jámborné Benczúr E. [1991]: Néhány fontos *Philodendron* és *Syngonium* faj mikroszaporítása. Kandidátusi Értekezés. KÉE., Bp.
14. Kaur,R.et.al [1999] In vitro propagation of *Valeriana jatamansii* Plant Cell, Tissue and Organ culture 59 3 227-229 o.
15. Matsuo, E., Matsuzawa, M., Sakata, Y. & Arisumi, K. 1989: Asexual propagation of variegated *Lilium longiflorum* 'Chataro'. *Scientia Horticulturae*. 39: p. 349-354
16. Murashige T., Skoog F. [1962]: A revised medium for rapid growth ang bioassays with tobacco tissue cultures. *Phisol Plant*, 15: 473-497 o.
17. Murashige,T-Skoog,F. [1962] A revised medium for rapid growth and bioassays with tobocco tissue culture. *Physiol. Plant* 15 473-479 o.
18. Nwankwo, B.A., Krikorian, A.D. [1983]: Morphogeneitc potential of embryo and seedling derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var *pisium*. *Bacc. Ann. Bot.* 51: p.65-76
19. Sun,K.et.al [2002] Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. based on the internal transcribed spacer /ITS/ sequences of nrDNA. *Plant Syst.Evol.* 235 121-134 o.
20. Szafián Zs. [2010] *Hosta* fajták mikroszaporításának biológiai és technológiai összefüggései. Diploma dolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem 31-38 o.

TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat: Rózsagyökér magok csírázása 21 napos inkubáció után	21
2. táblázat: Rózsagyökér szaporodása 4 hetes inkubáció	22
3. táblázat: Rózsagyökér gyökeresedése különböző táptalajokon 21 nap után	23
4. táblázat: Primula hajtáscsúcsok eredési százaléka különböző táptalajokon.....	25
5. táblázat: Primula veris szaporodási rátája 21 napos tenyésztés után	28
6. táblázat: Primula gyökeresedése különböző táptalajokon 21. nap	28

ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: A kórokozómentes növényi szaporítóanyag előállításának fontosabb technológiai egységei és alkalmazott módszerei	9
2. ábra: Növényi szaporítóanyag mesterséges előállításának fő lépései	10
3. ábra: Rhodiola magok steril csíráztatása	22
4. ábra: Szaporodó Rhodiola növények MS+BA 0.2 mg/l táptalajon	23
5. ábra: 700 ml-es lombikban már tömegméretekben szaporított Rhodiola növényeket...	23
6. ábra: Gyökeres Rhodiola rosae	24
7. ábra: Akklimatizált Rhodiola növények	24
8. ábra: 2012 januárjában begyűjtött Primula növény	25
9. ábra: Kipreparált nagyobb primula hajtáscsúcs	26
10. ábra: Kipreparált Primula merisztéma	26
11. ábra: Szaporodó Primula növények a tenyésztés elején	27
12. ábra: Szaporodó Primula növény DCR+BAP 0.2 mg/l tenyésztés 21. napján	27
13. ábra: Kankalin gyökeresedése auxint tartalmazó táptalajon	28
14. ábra: Kankalin gyökeresedése hormonmentes DCR alaptáptalajon	29
15. ábra: Legyökeresedett kankalin növény kiültetésre kész állapotban	29
16. ábra: Két akklimatizált kankalin	30