

Adoptogén gyógynövények génmegőrzése in vitro módszerekkel

Adaptogenic herbs gene preservation in vitro methods

Készítette: Baranyai Andrea

Szolnoki Főiskola

Gazdasági és vidékfejlesztési agrármérnök szak

IV. évfolyam

Témavezető: Dr. Dencső István

Kandidátus, főiskolai docens

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	1. oldal
1.1 Növénytermesztési biotechnológia.....	2. oldal
1.2 A biotechnológia alkalmazása a növényi szaporítóanyag előállításában.....	3. oldal
1.3 Sejt és szövettenyésztési technológiák	4. oldal
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6. oldal
2.1 A som.....	6. oldal
2.2 A som felhasználása	7. oldal
2.3 A homoktövis.....	8. oldal
2.4 A homoktövis jelentősége.....	9. oldal
2.5 A homoktövis szaporítása	10. oldal
3. CÉLKITŰZÉSEK	12. oldal
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	13. oldal
4.1 Kiinduló alapanyag.....	13. oldal
4.2 Tenyészetek létrehozása, a mikroszaporítás szakaszai	13. oldal
4.3 Som (Cornus mas) steril kultúra létrehozása	14. oldal
4.4 Felszaporítási fázis	17. oldal
4.5 Gyökereztetés.....	21. oldal
4.6 Homoktövis steril kultúra létrehozása.....	24. oldal
4.7 Felszaporítási fázis	26. oldal
4.8 Gyökereztetés.....	29. oldal
5. EREDMÉNYEK.....	31. oldal
6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	32. oldal
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	33. oldal

Táblázat- és ábrajegyzék

Táblázatjegyzék

1. táblázat: Vadsom merisztémák megindulási aránya kipreparált merisztémák %-ban (20db/kísérlet)14. oldal
2. táblázat: Somfajták kipreparált merisztémáinak differenciálódásának aránya (4x15).....
.....14. oldal
3. táblázat: Vadsom szaporítási rátája DCR táptalajon különböző BAP CC. mellett (4X25 növény)17. oldal
4. táblázat: Somfajták szaporítási rátája 21 napos tenyésztési periódusban (4X25 hajtás) ..
.....17. oldal
5. táblázat: Somhajtások gyökeresedése /letett növények százalékában az inkubáció 28. napján.....21. oldal
6. táblázat: A *Hippophae rhamnoides* var.*carpatica* merisztémák hajtássá fejlődési aránya a letett merisztémák %-ában különböző táptalajokon (20 kipreparált merisztéma)
..... 24. oldal
7. táblázat: Homoktövis fajták merisztéma megindulása 21.nap (4x15 növény átlaga)
.....24. oldal
8. táblázat: A homoktövis szaporodási rátája különböző táptalajokon (4X25 növény)
.....26. oldal
9. táblázat: Homoktövis fajták szaporítási rátája 21 nap, 4X20 növény átlaga.....28. oldal
10. táblázat: Homoktövis hajtások gyökeresedése a letett növények százalékában az inkubáció 28. napján.....29. oldal

Képjegyzék

1. kép: Merisztémából differenciálódott rügy	15. oldal
2. kép: Megindult hajtáscsúcskultúrák	16. oldal
3. kép: Differenciálódott macrocarpa merisztéma	16. oldal
4. kép: Járulékos és axilláris rügyek kihajtása in vitro tenyésztett somon	18. oldal
5. kép: Meghosszabbított somhajtások	18. oldal
6. kép: Szaporodó vad som Erlenmayer lombikban az optimális táptalajon.....	19. oldal
7. kép: Szaporodó bolgártűz	19. oldal
8. kép: MS+KIN tartalmú táptalajon lévő gyengébben fejlődő vad somhajtások.....	20. oldal
9. kép: IVS-en legyökeresedett oldalhajtás	22. oldal
10. kép: A 3 különböző auxint tartalmazó táptalajra letett főhajtás	22. oldal
11. A 3 különböző auxin tartalmazó táptalajra letett legyökeresedett oldalhajtás.....	23. oldal
12. Két akklimatizált somhajtás	23. oldal
13. kép: Hippophae rhamnoides var. carpatica hajtáscsúcs	25. oldal
14. kép: Jantarnaja fajta kipreparált merisztéma	25. oldal
15. kép: Szaporodó carpatica fajta	26. oldal
16. kép: Alapi kalluszból fejlődő növények	27. oldal
17. kép: Szaporodó német porzós növények	27. oldal
18. kép: Gyökérprimordiumok a carpatikán.....	30. oldal
19. kép: Kifejlődött gyökerek	30. oldal

1. Bevezetés

Napjainkban az élet több eltérő területéről értesülhetünk a biotechnológiáról, ami a legtöbb ember számára ismeretlen fogalom vagy e szó hallatán gyakran jellemzően a génmódosított élelmiszerekre, a bioüzemanyagokra vagy éppen a klónozásra gondol. Ennek oka az lehet, hogy nagyrészt ezek kaptak szerepet a médiában. Ám ennek az újonnan jelentős tudománynak ennél sokkal fontosabb és hasznosabb dolgokat köszönhetünk, hiszen ma már a modern gyógyszerek előállításában, a veszélyes hulladékok feldolgozásában és a bűnüldözésben is igen nagy szerepet tölt be ez a tudomány.

A biotechnológia nem egy egyszerűen és jól definiálható szakterület, mivel nagyszámú tudományágat átfogó tudományterület. Számos meghatározása létezik, de talán az a legmegfelelőbb, ami szerint biotechnológiának nevezik azt az eljárást, amikor élő szervezetek segítségével állítanak elő új termékeket vagy szolgáltatásokat. Magyar vonatkozású különlegesség az, hogy magát ez a kifejezés első alkalommal egy hazai tudós, Ereky Károly használta 1919-ben.

Ahogy már szóba kerül a biotechnológia több tudományágból összetevődő diszciplína. Ezek közül az ágak közül legtöbbször három kap jelentős szerepet. Az első ilyen a piros biotechnológia, ami az orvostudományban fordul elő. Ugyanis piros biotechnológiának azokat a terápiás vagy diagnosztikai módszereket, amik biotechnológiai eljárásokon alapulnak, mint például az őssejt-terápia. A második említésre méltó ágazat az ipar és környezetvédelem kérdéseivel foglalkozó fehér biotechnológia. A kutatók itt élő sejteket, organizmusokat vagy enzimeket használnak a termékek előállításában. A harmadik számunkra a legfontosabb ágazat a zöld biotechnológia, ami a mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban használt mikroorganizmusok, növények és állatok szaporodásának, valamint genetikai programjának megváltoztatását és az így kialakult új adottságok technológiai alkalmazását jelentik. Ezen a területen hasznosítják a molekuláris genetika és molekuláris biológia által felhasznált *in vitro* sejt és szövettenyésztési, valamint az ebben közreműködő reprodukciós technikákat.

Ezzel a technológiával szerepet vállalhatunk a fenntartható fejlődésben számos probléma megoldásával. Például jelentős előrelépés lehet a harmadik világban fennálló élelmiszerhiány megoldásában a minőségi élelmiszerek növekedése. Ennek megoldás olyan növényfajok létrehozása, amik jól viselik az adott éghajlattal járó időjárási viszonyokat és nagyobb terméshozamot biztosítanak.

1.1 Növénytermesztési biotechnológia

A növényi biotechnológia a zöld biotechnológia egyik gazdasági alkalmazása. Ez azokat a technológiai eljárásokat foglalja magába, melyek növényélettani, biokémiai és genetikai ismereteket használnak fel. A jellemző biotechnológiai eljárások közé tartozik a sejt és szövettenyésztés, és az erre alapozott mikroszaporítás és a nemesítési anyagok előállítása.

A növényi biotechnológia jelentős ága az idegen növényfajok közti géntranszfer, amely által új, kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező kultúrnövényeket állíthatunk elő. Ezek a módszerek kiterjednek a hagyományos növény-nemesítés határaitra is, ugyanis ezen, módszerekkel olyan növényi gének lehetnek addíció tárgyai, amelyeket a klasszikus növény-nemesítési módszerekkel nem lehet átvinni egyik növényből a másikba.

A növénytermesztési biotechnológia négy fő területből áll:

1. a marker asszisztált szelekcióból,
2. a mikroszaporításból,
3. a genetikai módosításból, és
4. az agromikrobiológiából.

A marker asszisztált szelekció a molekuláris markerek széleskörű hasznosítását jelenti, ami közismert a növény-nemesítés területén.

A mikroszaporítás a sejt és szövettenyésztési technológiát jelent, ami a növények in vitro aszexuális szaporítása. A módszernek köszönhetően lehetőség van a kiválasztott genotípus számtalan mennyiségben való szaporítására, de ez nagyban függ a szaporításra szánt növények fajtáitól.

A genetikai módosítás azt a módszert jelenti, amellyel a korábbi nemesített növényekből gyorsabban, hatékonyabban lehet előállítani, olyan tulajdonságú fajokat, amik hagyományosan nem hozhatók létre.

1.2 A biotechnológia alkalmazása a növényi szaporítóanyag előállításában

Az, hogy mesterséges táptalajokon, steril tenyészetekben tudunk létrehozni növényi merisztémák szöveteiből új növényeket a biotechnológia fejlesztését teszi lehetővé. A merisztémacsúcsokból felnevelt növények fertőzésmentesek, ezért a szaporító anyag értéke sokkal nagyobb, mint a hagyományos szaporítóanyagoké. Ennek a technológiának azoknál a növényeknél van nagyobb jelentősége, amelyeket magról nem szaporíthatunk.

A haploid növények igen előnyös genetikai konstrukciót jelentenek számos növénynemesítési cél elérésében. Eredményesebbé válhat a vírus szaporítóanyagok létrehozása. A mikrospóra (pollen) eredetű szövetekből vagy embriókból ma már nagy hatékonysággal lehet felnevelni haploid növényeket.

Azok a kutatások, amelyek során izolált petesejtek mesterséges megtermékenyítését követően teljes értékű növényeket nevelnek fel, jelenleg még kezdeti fázisban vannak.

Az *in vitro* szövettenyésztéssel létrehozott növényfelnevelés, akár sejtekből, akár szövetrészekből, kikerülhetetlen lépés a növények transzformálását célzó módszerek alkalmazása során is.

A vegetatív mikroszaporításra specializálódott üzemi biotechnológiai laboratóriumok száma gyorsan növekszik. A steril vegetatív mikroszaporítás vagy gyors klónozás főleg a dísnövények tekintetében olyan területe a növény-biotechnológiának, amelyet üzemi méreteket igényelhet. Napjainkban már komplett laboratóriumok is megvásárolhatók, amik teljes felszereltek.

Az *in vitro* mikroszaporítási biotechnológia fő lépései:

- a táptalaj adagolás,
- a növényi anyag izolálása,
- a tenyésztés
- a steril átoltás

Ezek előre meghatározott műveletek, amiket időközönként meg kell ismételni.

1.3 Sejt és szövettenyésztési technikák

Ahogy a fentiekben már említettem a sejt és szövettenyésztési technológia, vagy mikroszaporítás a növények in vitro aszexuális szaporítása. Ez a módszer azokon a területeken terjedt el, ahol gazdaságosabb és valamilyen szempont szerint előnyösebb, mint a megszokott szaporítási módszerek. Lényegi előnye a gyors növény regeneráció, a helytakarékoság, az utódok közötti nagymértékű azonosság, és kórokozó mentesség. Ezen felül alapanyagot biztosít a genetikai transzformációhoz

A legtöbb mikroszaporító laboratórium általában csak nagy mennyiségű, kereskedelmi célokra alkalmas növényeket hoz létre. Ezekben a laboratóriumokban megszokott módszereket használnak, amik ezt a tömeges gyarapodás elősegítik. Ezzel szemben van néhány laboratórium, ami a fejlesztésekre koncentrál, így újabb növényfajokra és explantumokra hozva létre módszereket. Európa szerte a legelterjedtebb a technológia dísznövényeken való alkalmazás, csak ez után következnek a zöldségek és a gyümölcsök. Egy kilencvenes évek második felében végzett felmérés szerint Európa szerte mintegy 193 mikroszaporító laboratóriumot található, melyek nagy része Hollandiában, Németországban, az Egyesült Királyságban, Belgiumban és Olaszországban működik, de nagy a valószínűsége annak, hogy ennél több labor is üzemel.

A módszert elsősorban azokra a növény fajokra irányul, melyek piaci értékesíthetősége nagymértékű (pl. orchideák), így a laboratóriumok nagyrészt ezeknek a fajoknak szaporítására koncentrál. Ezért az ágazatra nagy hatást gyakorol a piac folyamatos alakulása. Hazánkban a Magyar Növény-Mikroszaporítók Egyesülete adatai alapján tíz cég tagja ennek az egyesületnek. Tevékenységük alapján elsődlegesen kertészeti növények szaporításával foglalkoznak, ezt követik a gyümölcsök és erdészeti növények.

Gabonafélék esetén dihaploid fajta előállítás folyik, de ennek nagysága nem tud vetekedni a hagyományos nemesítési módokkal előállított fajták mellett. Magyarországon sokkal kiegyensúlyozottabbak az egyes alkalmazási területek, mint az Európai Unióban bár itthon is ez az ágazat képviseli a zöld biotechnológiai vállalatok többségét. A laboratóriumok többségében rutin szaporító munka folyik, kevés a kutató fejlesztő intézmény.

A terület fejlődése az elmúlt években megtorpant. Ennek oka az ágazat piactól való függése, mivel közvetlenül a piacra folyik a termelés ezért annak változása gyorsan érvényesül. A mikroszaporítás a biotechnológia többi területéhez képest kevésbé tőkeigényes. Legnagyobb költséget a magasan képzett munkaerő, mely a költségek 60%-át teszi ki.

A nagy vállalatok mellett a közép és kis vállalkozások is érvényesülni tudnak ezen a területen. Mivel a technológiának nagy a munkaigénye a kisebb vállalatok is piacképesek lehetnek a nagyobb versenytársaikkal szemben. Elsődleges szempont a speciális növény fajok termesztésének a kidolgozása, mivel ezzel kevesen foglalkoznak. Ezért számos kutató és oktató intézményben folynak in vitro technikákkal kapcsolatos kutatások.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Som

Lassú növekedésű és igen hosszú életű az 50-120 éves kort is megérő, 3-6 méterre növő cserje vagy kisebb fa. Eredendően vad, erdei gyümölcs, amely napjainkban is napsütötte erdőségeken gyakori. Beljebb, az árnyékos erdőben nem vagy alig hoz termést. A régi időkben, hazánkban nemcsak gyűjtötték savanykás-édes, fanyar ízű termését, hanem ültették is az udvarházak kertjeibe. Számos földrajzi nevünk, mint a Somló-hegy, Szársomló, Csíksomlyó őrzi a nevét, illetve jelzi jellegzetes előfordulási helyét. Napjainkban a szatmári, zalai, somogyi és baranyai területeken a leggyakoribb, valamint a Csallóközben és Erdélyben.

A nemzetség legelterjedtebb képviselője a húsos som, amely elsősorban száraz cserjésekben és erdőségeken gyakori. Fája igen kemény, ugyanakkor rugalmas, szerszámnyélnek kitűnő. Vesszői szürkék, sárgászöld árnyalattal. Jellegzetes sárga virágernyői már kora tavasszal, lombfakadás előtt nyílnak. Az első mézelő növények egyike. Piros, tojásdad formájú termését szeptemberben érleli, amely frissen is fogyasztható. Gyümölcse egyben kiváló madárcsemege is.

A húsos som igénytelen, könnyen nevelhető cserje. Szereti a fényt és a meleget, jól tűri a szárazságot, és a meszes talajokat részesíti előnyben. Trágyázni sem igazán szükséges, de a kisebb mennyiségben adott szerves trágyát meghálálja, amelyet ősszel vagy kora tavasszal kell szétteríteni és beásni a koronacsurgóban. Mivel kártevője szinte nincs is, permetezni sem kell. Gondozást is alig igényel, legfőljebb idős korban a korona ritkítását. Ekkor elsősorban az idős, sérült, keresztben álló koronarészeket távolítsuk el, mégpedig mindjárt a tél végén, még a virágok nyílása előtt, nehogy a munka során megsértsük a leendő termés alapjait.

A som magról is nevelhető, ez azonban nehézkes mivel a mag nehezen csírázik, egy évig rétegezni kell. Sokkal célszerűbb tősarjról szaporítani, kinézni egy különösen szép és nagy gyümölcsöt termő bokrot, és arról (kora tavasszal vagy ősszel) leválasztani a sarjnövényt.

2.2 A som felhasználása

A som termését leggyakrabban, akkor használják fel mikor teljesen érett lett. Íze ilyenkor savanykás, illata fűszeres aromájú. A som termésének C-vitamin tartalma tízszer több mint a citromnak. Ezen kívül, még cukrot, almasavat, pektint illetve illat- és festékanyagokat tartalmaz. A som termését ezért már régóta használják a háztartásokban főleg C-vitamin pótlására.

Elkészíthető lekvár, szörp és kompót formájában, de bor és pálinka is készíthető belőle.

Régen a som megszáritott csonthéját megpörkölték, megőrölték és kávépótlóként használták. Ezen kívül olajt is nyertek ki a terméséből, ami az olivaolajhoz hasonló minőségű.

Természetes lázcsillapító hatású, de ezen felül használták hurutos betegségek, hasmenés, bélhurut és vérhas kezelésére is. Csipkebogyóval keverve vese- és húgyúti bántalmak ellen javasolt.

A somvirág jelentős nektárt és pollent tartalmaz, olyan időszakban mikor, más mézelő növények ritkák, bár a som méze tisztán nem ismert.

2.3 Homoktövis

A homoktövis (*Hippophaë rhamnoides* L.) az ezüsfafélék családjába (*Eleagnaceae*) tartozó, lombhullató ágas-bogas cserje, amely sarjtelepes sűrű bozótokat alkot. A cserjék általában 1,5-3 m magaságúak, de 8-10 méteresre is megnőnek. Mélyre hatoló főgyökere van, melynek oldalgyökerei a talaj felső rétegében messzire elnyúlnak. A törzs kérge hosszant repedezett. Ágait sűrűn elhelyezkedő ezüstösen csillogó, pikkelyszerű szőrök és tövisek borítják. Levelei 4-6 cm hosszúságúak, 0,5-1 cm szélesek ép szélű lándzsa alakúak, fonákjuk ezüstösen csillog. Hazánkban a Duna mentén, a Dráva-síkságon, a folyó menti hordalékon fordul elő. Laza, mérsékelt nedves, meszes talajt, párás klímát igényel (Tóth I., 1969), de sovány futóhomokon is megél. Alárendelt jelentőségénél fogva, hazánkban eddig csak parkokban, fásításokba ültették, díszítő céllal.

Kétlaki, szélmegporzású cserje. A porzós egyedeken a rügyek a hajtás csúcsán tömöttebben állnak és nagyobbak, mint a termős egyedeken (G. Krüssmann, 1978). A természetes populációban a termős és porzós egyedek kb. fele-fele arányban találhatók. Apró, jelentéktelen csöves virágai áprilisban, lombfakadás előtt nyílnak. A termős virágok a vesszők felső harmadán tömött fürtökben helyezkedik el, míg a porzós virágok az évi hajtások töve körül ülnek, csoportosan. Termése narancssárga színű, tojásdad alakú, 7-8 mm átmérőjű, egymagvú álbugyó. Gyümölcse általában szeptember végén érik és egész télen az ágakon marad. Magjának ezermagtömege a nemesített fajtáknál 18-20 g.

Kísérleteink során egy német (40-61-1876 jelű) porzós és három altáji (orosz) fajtát nevezetesen a Csujszkaját, a Obilnaját és a Jantarnaját is kísérletbe állítottunk. Ezek a fajták eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek.

A Csujszkaja bogyói édes ízűek, hosszúkás, ovális alakúak, nagyok 0,5-0,7 grammok. Bogyói korán augusztus közepétől érnek, ritka állása miatt jól szedhető. C-vitamin-tartalma 0,1-0,15%. Az általunk vizsgált fajták közül a legkorábbi érésű.

Az Obilnaja gyümölcse a Csujszkajához hasonló. Fája erőteljes növekedésű, bő termő. Ritkán álló bogyói könnyen szedhetők. Gyümölcsében a mag aránya a legkisebb. Kellemes ízű, friss fogyasztásra alkalmas. C-vitamin-tartalma megegyezik a Csujszkajával.

A Jantarnaja bogyói is ritkán állnak, narancssárga színűek, hasonlóan a Csujszkajához hosszúkásak, oválisak, 0,5-0,7 grammok. Kemény húsú, ezért hűtőházi tartósításra is alkalmas. Nagyon jól szedhető, naponta 25-30 kg bogyó is leszüretelhető.

2.4 A homoktövis jelentősége

A homoktövis jelentőségére a gyógyszerészet hívta fel a figyelmet. Termése a tőlünk északabbra fekvő országokban (Németország, Lengyelország, a volt Szovjetunió, Mongólia) jelentős C-vitaminforrás. A legbehatóbban talán Mongóliában foglalkoznak vele, ahol 1967-ben külön kísérleti telepet szerveztek, mintegy 400 ha ültetvény létesítésére. Igen alapos vizsgálatot végeztek a termés bértartalmának meghatározására. Megállapították, hogy a termés húsa kg-onként 140-250 mg aszkorbinsavat, 3-4 mg karotint, ezen kívül többek között B1- és B2-vitamint tartalmaz. Cukortartalma 3-6% között változik. A gyümölcsléből olajt is készítenek, amely hámszövettápláló és fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Megelőző szerként használják a bőr sugársérülésekor, a tápcsatorna és gyomor nyálkahártyájának. kóros elváltozásakor is. Használják a sugárterápiában és nőgyógyászaiban is. Az olajnak nincs toxikus hatása, jól tárolható (*B. Laagan-E. Titov*).

Baranyai Aurél figyelmét, egy pécsi gyógyszerész hívta fel, 1973-ban. Ültetési anyag iránt érdeklődött, majd a Debreceni Agrártudományi Egyetem szegedi osztálya kereste meg 1974-ben, és ültetvény létesítésének gondolatát vetette fel. 1980-ban indultak lényeges előrehaladások az ügy érdekében.

Technológiai útmutatók alapján az ültetvény létesítése meg is történt, a továbbfejlesztéshez a szükséges csemeték rendelkezésre álltak. A homoktövis terméséből házilag is kiváló szörp készíthető, amely téli időszakban kellemes, üdítő italként fontos C-vitaminforrás.

2.5 A homoktövis szaporítása

A homoktövis erőteljes oldalgyökérzetet képez és jól sarjad. Így kedvező körülmények között gyorsan terjed. Mesterséges szaporítása végezhető mind generatív, mind vegetatív úton. A generatív szaporítás nehézsége, hogy magja átfekvő. Vegetatív szaporításra több lehetőség van a már említett gyökérsarjakon kívül. Elég jól gyökeresedik fás és gyökérdugványról. Eddig legbiztosabb eredményt a zöld- és fás dugvány adta (R. B., 1979).

A homoktövis magjának átfekvési ideje rövid. Augusztus végén, szeptember elején érik. Akkor kell szedni, mikor az ágak ütogetésével könnyen lehullik. Szedés után halomba rakva, rövid ideig rothasztani kell, majd húsos burkától megtisztítani, mivel a termés burkának csírázás gátló hatása van (Papp L., 1957). A megszikkasztott magot száraz, fagymentes helyen kell tárolni. Vetés előtt, amely március végén esedékes 30 nappal, rétegezni kell 3-5 °C hőmérsékleten. A magvakat 8 cm széles barázdába kell vetni, fm-enként 80-100 szemet. A takaró föld 1-1,5 cm vastag legyen. A kibújó csíranövény igen kényes, könnyen törik. Ezért az esetleges kérgesedést meg kell szüntetni. Vetés után szükség lehet csapadékpótló öntözésre. Az egyéb munka azonos az általános csemetekerti munkákkal.

Növényvédelem a csemetedőlés, a homoktövis légy és levéltetű ellen szükséges, a szokásos vegyszerekkel. Az ültetvények létesítése a termős egyedek elszaporítását igényli, s csak annyi porzós egyedre van szükség, amennyi a biztonságos beporzáshoz feltétlenül szükséges (Krüssmann, 1978). Ezt az arányt 1:6-hoz állapították meg. Magcsemete elkülönítése csak a 3-4. évben lehetséges külső jelek alapján. Ez túl késő, hiszen kiültetésre az 1-2 éves csemete a legalkalmasabb. A probléma vegetatív szaporítás módszerének kidolgozását hozta előtérbe. Az ide vonatkozó kísérleteket 1974-ben kezdték. Sem a gyökér- sem a fás dugványozás nem vezetett kellő eredményre. Ezért a hangsúlyt a félfás és zölldugványozásra fektették.

A dugványozást elkezdtek május végén, június elején, a növényházban még ősszel is dugványoztak. A legkülönbözőbb gyökereztetési módszerekkel próbálkoztak. Gyakran 100%-os, de volt 1-2%-os eredmény is. A kísérleti sorozatok gyökeresedési átlaga az 1. táblázatban látható.

Legeredményesebbnek az idei módszer mutatkozott, amely üzemileg is jól kivitelezhető. Jó humuszos homokon, fóliasátrat állítottak fel. A fólia felhúzása után három, esetleg négy rétegben műanyag hálóval árnyalták. Finom porlasztású szórófejeket szereltek fel. A finoman előkészített talajt 2%-os *Orthocid*- oldattal fertőtlenítették. Júniusi első felében 10-12 cm hosszú hajtásvégeket gyűjtöttek, s párolgástól védve szállítottak a fóliaház alá, ahol a vágáslapot 1-2 cm mélyen serkentőanyagba mártották, és 2-3 cm mélyen a talajba szúrták.

A serkentőanyag lehet naphtyl-ecetsav, indolecetsav, indolvajsav. A siker záloga a fóliaház állandó, gondos kezelése. A hajtásokat közvetlen napsugárzás nem érheti. Nem lehet úgy szellőztetni, hogy a hajtásokat huzat érje. A légnedvesség 80% alá, a léghőmérséklet 40 °C fölé tartósan nem szállhat. A talaj csak üde állapotban lehet, hogy a hajtások el ne rothadjanak.

A som és a homoktövis a legfontosabb adaptogén gyógynövények közé tartozik. 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 (Kelly,2003). Az adaptogén hatású gyógynövények a szervezet nem specifikus ellenállóképességét fokozzák, növelik a fizikai és pszichikai teljesítőképességet.

3. Célkitűzés

Figyelmünk azért fordult a roboráló növények (a som és a homoktövis) felé mert ezzel a területtel hazánkban nagyon kevesen foglalkoznak.

A rendelkezésre álló külföldi irodalom is elég kevés, csak néhány fajjal foglalkoznak (*Arnica montana*, *Menta* fajok, *Echinaceae*, stb.).

A som a nehezen szaporítható fajok közé tartozik. A homoktövissel már többen foglalkoztak, de elsősorban filogenetikai vonatkozásban (Sun, K, 2002) illetve, csak részleges eredményt értek el. (Kovács E., 1989).

Kiinduló pontként figyelembe vettünk néhány fontosabb gyógynövényt, amelyeket in vitro tenyésztésbe vittek:

- *Arnica montana*, (Cassels, A. C. 1999),
- *Valeriana jatamansi* (Kaur. 1999)

Mivel sem a som sem a homoktövis mikroszaporításával kapcsolatban nem találtunk számottevő szakirodalmat célul tűztük ki, hogy megoldjuk mindkét faj in vitro tenyésztését.

A som dugványról és magról is nehezen szaporítható ezért itt nemcsak a fajták és szelektált klónok felszaporítása volt a cél, hanem hogy egyáltalán megfelelő mennyiségű szaporítóanyagot tudjunk előállítani.

A homoktövis dugványok elég jól gyökeresednek, itt a fajták és klónok felszaporítása volt a cél.

Ezeknek, mint adaptogén növényeknek nagyon fontos a roboráló szerepük, és mint termesztésbe vont növények, a mikroszaporításnak gyakorlati jelentősége is van.

4. Anyag és módszer

4.1 Kiinduló alapanyag

Kísérleteinket 2011 szeptemberében kezdtük, tehát a legkedvezőtlenebb időpontban, mert ilyenkor megváltozik a fás szárú növények endogén hormonszintje. (Tudjuk, hogy a fás szárú növények ilyenkor már készülnek nyugalmi állapotba vonulni, kultúrába vitelük optimális időpontja a tél vége, tavasz eleje lett volna, mikor a mélynyugalmi állapotuk vége felé járnak, és csak kényszer nyugalmi állapotba vannak.)

A kiinduló szaporítóanyagot Kozák Antal rákóczipfalvai kertész biztosította számunkra. A somnál a kiinduló alapanyag a kertjében található vadsom volt, homoktövisnél a kiinduló alapanyag a *Hippophae rhamnoides* var. *carpatica* kétéves gyökeres dugványa. 2012 januárjában a som és a homoktövis esetében már fajtákat indítottunk, ezek a növények már ekkorra átestek a nyugalmi állapotba. A som esetében 3 fajtát állítottunk be a kísérletbe: a bolgár tűz, a jolico, és a macrocarpa fajtákat (homoktövisnél több orosz fajtát ill. német porzós és termős fajtákat a homoktövis kétlakisága miatt).

4.2 Tenyészetek létrehozása, a mikroszaporítás szakaszai

A rügykultúrák fertőtlenítési menete: négyszeres hígítású hypo 5 percig, előtte 30 mp 70 %-os alkoholos oldat, majd 4x5 perces steril vizes kimosás. A fertőtlenítés után mikroszkóp alatt leszedtük a rügypikkelyeket és minden esetben merisztémát (0.1-0.3 mm) helyeztünk el az alaptáptalajra. 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 C°-on, 16 órás megvilágítás, és 8 órás sötét periódus mellett.

4.3 Som (Cornus mas) steril kultúra létrehozása

A somnál a rügypikkelyek eltávolítása után a csúcsrügyből és az oldalrügyeiből vegyesen preparáltuk ki a merisztémát. Fontos volt, hogy a rügypikkelyek eltávolítása után a merisztémát körbevevő seprűszerű képleteket is eltávolítsuk, mert ezek hajtást gátló anyagot tartalmaznak. A vadsomnál és a fajtáknál is fontos volt ezt a műveletet elvégeznünk.

A fertőtlenített rügök 70%-a steril maradt. Az alaptáptalajokhoz különböző hormonokat adtunk, benzyladenint, illetve gibberellint a nyugalmi állapot megtörésére. Mint az eredményekből kiderült a somnál az alacsonyabb sótartalmú táptalaj vált be (DCR) és az alkalmazott hormonok közül egyedül a gibberellin volt hatásos, citokinin tartalmú táptalajon a merisztémák nem indultak meg, nem fejlődtek hajtássá. (1. táblázat)

Alkalmazott táptalaj	Differenciálódott merisztémák aránya %
MS+BA 0.2 mg/l	20
MS+GA 1 mg/l	35
DCR+BA 0.2 mg/l	22
DCR+ GA 1mg/l	80

1. táblázat: Vadsom merisztémák megindulási aránya kipreparált merisztémák %-ban (20db/kísérlet)

A következő kísérletben már a hideghatáson átesett fajtákat indítottuk, de itt már a tapasztalatok alapján csak a DCR+GA 1 mg/l tartalmú táptalajra tettük le a merisztémákat. A fertőtlenítés fajtától függően 80-90%-os sterilitást biztosított. A megindult merisztémák arányát a letett merisztémákhoz viszonyítva a 2.táblázat tartalmazza.

Fajta neve	Gyümölcs színe	Differenciálódott merisztémák aránya (%)
Bolgár tűz	piros	87.5
Jolico	lila	75
Macrocarpa	kék	100

2. táblázat: Somfajták kipreparált merisztémáinak differenciálódásának aránya (4x15)

A letett fajták közül a macrocarpa reagált legjobban, a táptalajon ennek a fajtának voltak a legszebb, legjobban megindult merisztémái.

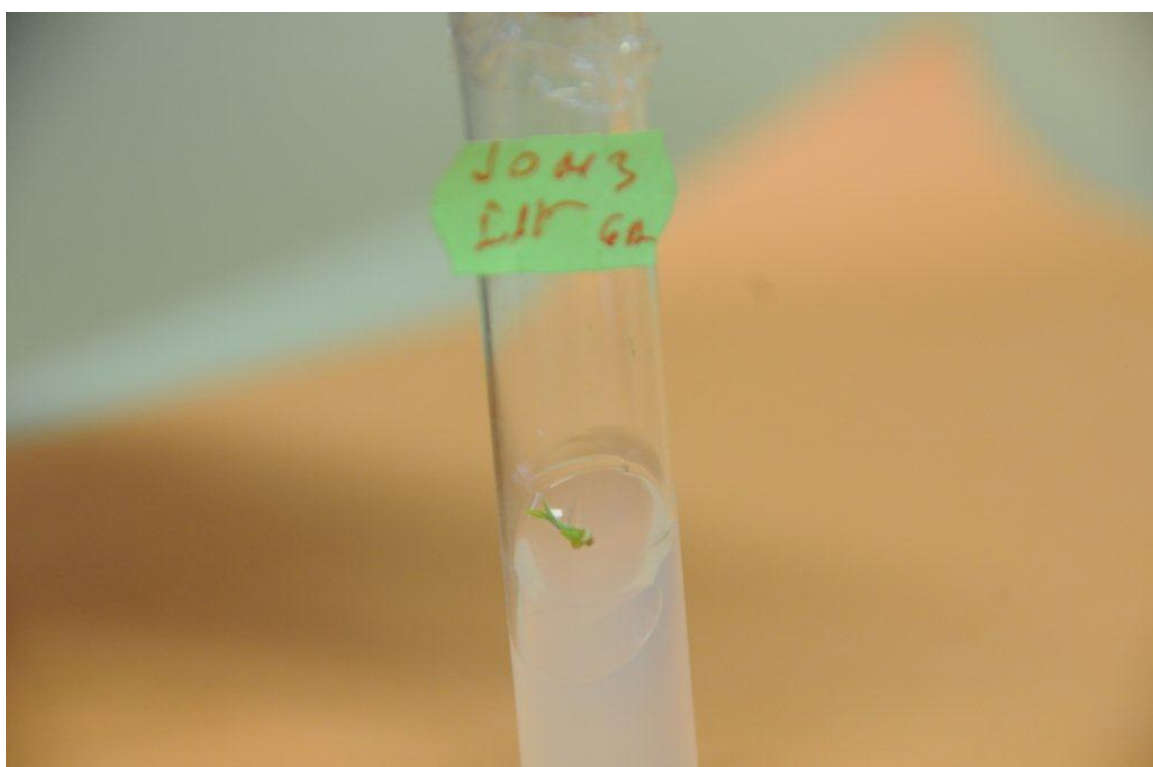
A kísérletekből egyértelműen kiderült, hogy a DCR jobb táptalaj a somnál, mint az MS. Érdekes, hogy próbáltuk a BTM-et is mint alaptáptalajt (ez összetételében hasonlít a DCR-hez), de egyértelműen a DCR volt a jobb. Az 1-2-3 számú fényképeken a kipreparált és letett merisztémákat látjuk.



1. kép: Merisztémából differenciálódott rügy



2. kép: Megindult hajtáscsúcskultúrák



3. kép Differenciálódott macrocarpa merisztéma

4.4 Felszaporítási fázis

A szaporító táptalajt ennek megfelelően választottuk ki, az alaptáptalaj a DCR volt, az alkalmazott hormon a benzylaminopurin 0.2-0.6 mg/l cc.-ban. A kísérletek során kiderült, hogy az alacsonyabb cc. a jó, magasabb BA üvegesedést eredményezett, és ha MS volt az alaptáptalaj a növények kisebbek voltak, nem fejlődtek úgy, mint a DCR táptalajon.

Alkalmazott táptalaj	BA 0.2 mg/l	BA 0.6mg/l
DCR	3.8	1.4
MS	1.5	1.2

3. táblázat: Vadsom szaporodási rátája DCR táptalajon különböző BAP cc. mellett (4x25 növény)

A 4. táblázatban a különböző fajták szaporodási rátáját látjuk, de most már csak az optimális 0.2mg/l BAP-t tartalmazó DCR táptalajon.

Fajta neve	Szaporodási ráta
Bolgár tűz	1.7
Jolico	2.1
Macrocarpa	2.5

4. táblázat: Somfajták szaporodási rátája 21 napos tenyésztési periódusban (4x25 hajtás)

A fajták szaporodási rátája egyértelműen alacsonyabb volt, mint a vadsomé, ez utóbbi esetében volt olyan lombik ahol 3 növényről 18 db oldalhajtást tudtunk leszedni. Hozzá kell tennem, hogy a kiindulási táptalaj után (DCR+ 1mg/l GA) még egyszer ugyanerre a táptalajra kell tenni a növényeket, amennyiben rögtön BAP-t tartalmazó táptalajra tesszük, a növények rosszul reagálnak, kell még egy elongációs fázis a gibberellint tartalmazó táptalajon, hogy további szubkultúrálásra alkalmas növényeket kapjunk.

Amennyiben kevés auxint (0.01 mg/l) NES-t illetve IVS-t adtunk a táptalajhoz a növények felüvegesedtek.

A 4-5 -6 számú fényképeken szépen szaporodó vadsom növényeket látunk.

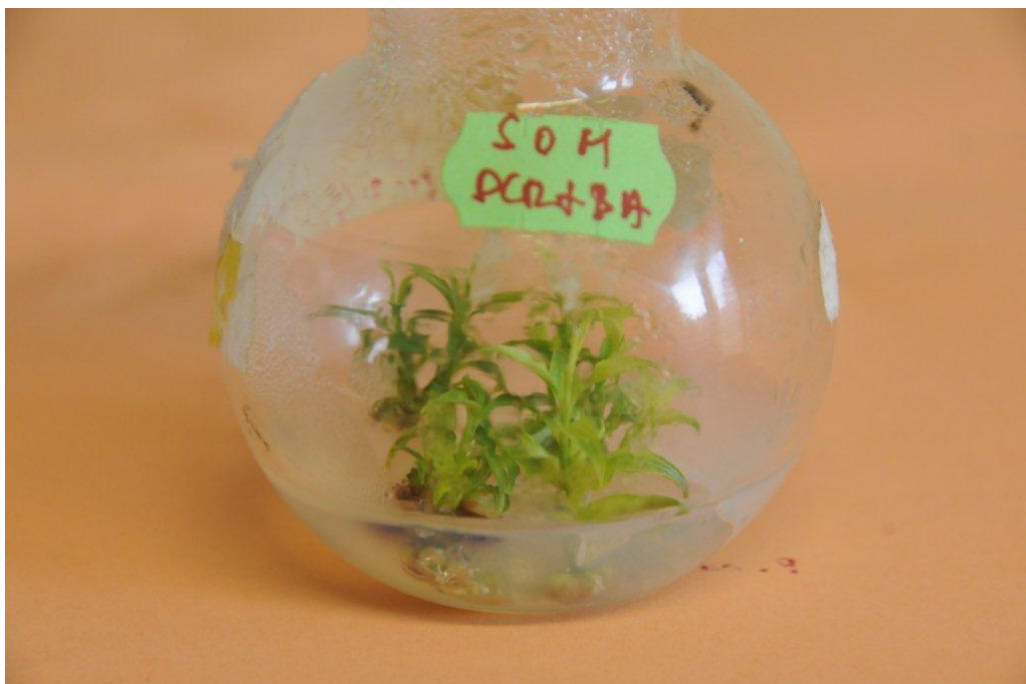
A somnál nemcsak de novo képződtek hajtások, hanem egyrészt a főhajtáson lévő alvó rügyek is kihajtottak, másrészt, amint a 4. számú képen is látható, hogy a kis növényen képződött oldalhajtások oldalrügyei is kihajtanak. Ezeket úgynevezett nyugtató táptalajra tesszük DCR+GA 0.1mg/l, ahol megnyúlnak, így alkalmasakká válnak további passzálásra.(5. kép)



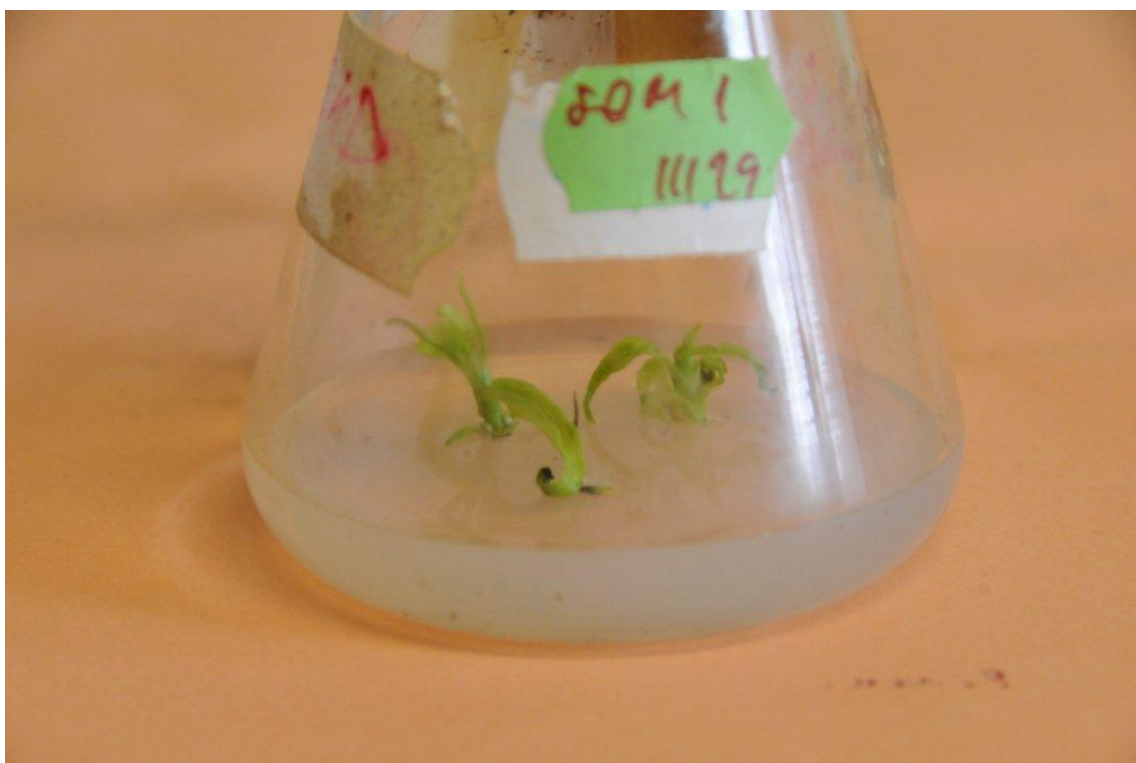
4. kép: Járulékos és axilláris rügyek kihajtása in vitro tenyésztett somon



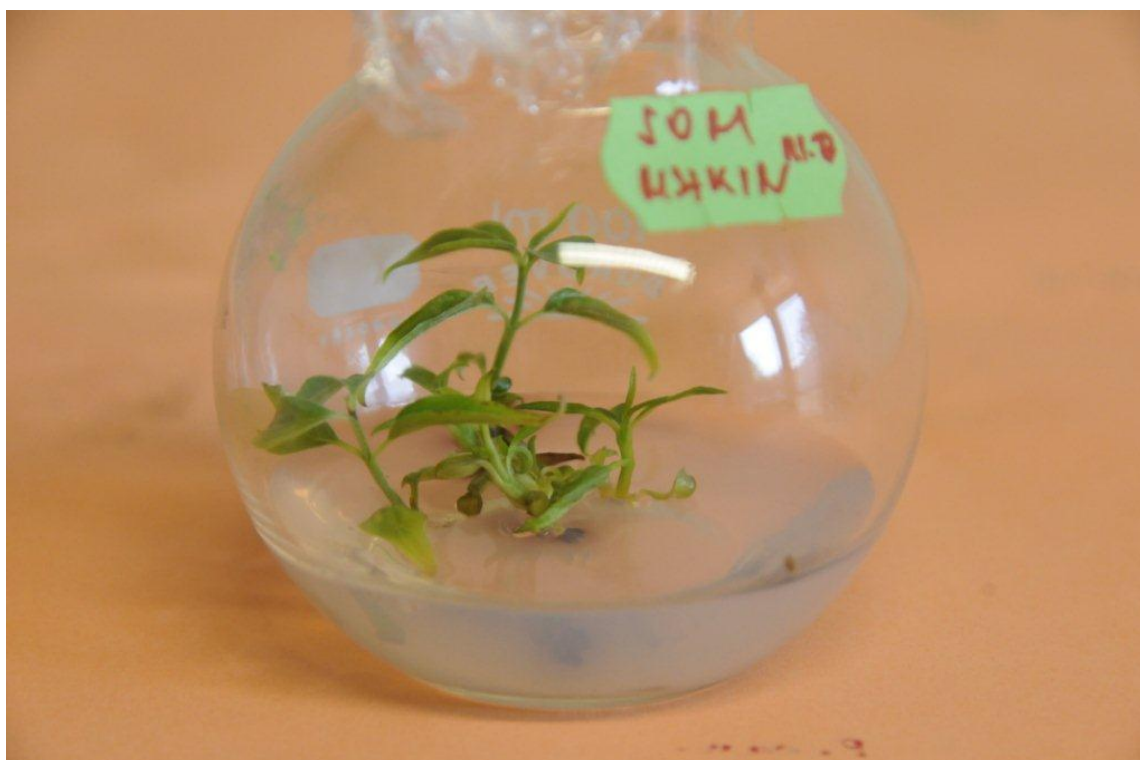
5. kép: Meghosszabbított somhajtások



6. kép: Szaporodó vad som Erlenmayer lombikban az optimális táptalajon



7. kép: Szaporodó bolgártűz



8. kép: MS+KIN tartalmú táptalajon lévő gyengébben fejlődő vad somhajtások

4.5 Gyökereztetés

A gyökereztetést nehezen tudtuk megoldani. A kísérletek során a szakmában eddig használt összes gyökereztetési eljárást kipróbáltuk. A makro- és mikroelemeket felére, háromnegyedére csökkentése, cukor csökkentése 1%-ra, auxinok alkalmazása IVS, IES, NES/0.01-0.5mg/l, aktív szén, pH levitele 4.8-ra, eddig mind eredménytelen volt. (A som dugványról is nehezen gyökeresedik)

Az úgynevezett pulse kezelés sem vezetett eredményre. (Nagy adag auxin tartalmú táptalajon 2-3 napos inkubálás, majd hormonmentes táptalajra történő letétel.)

2012 márciusában Marks, T és Simpson, S /2000/ kísérletei alapján új módszert próbáltunk ki. A gyökereztetésre letett növényeket 3 csoportba osztottuk, úgy mind a gyökereztetésre letett osztódó növény főhajtásának felső 2-2.5 cm-es része, a levágott főhajtás alsó része, a harmadik csoportba az oldalhajtásokat tettük le gyökereztető táptalajra.

Három különböző gyökereztető táptalajt használtunk,:

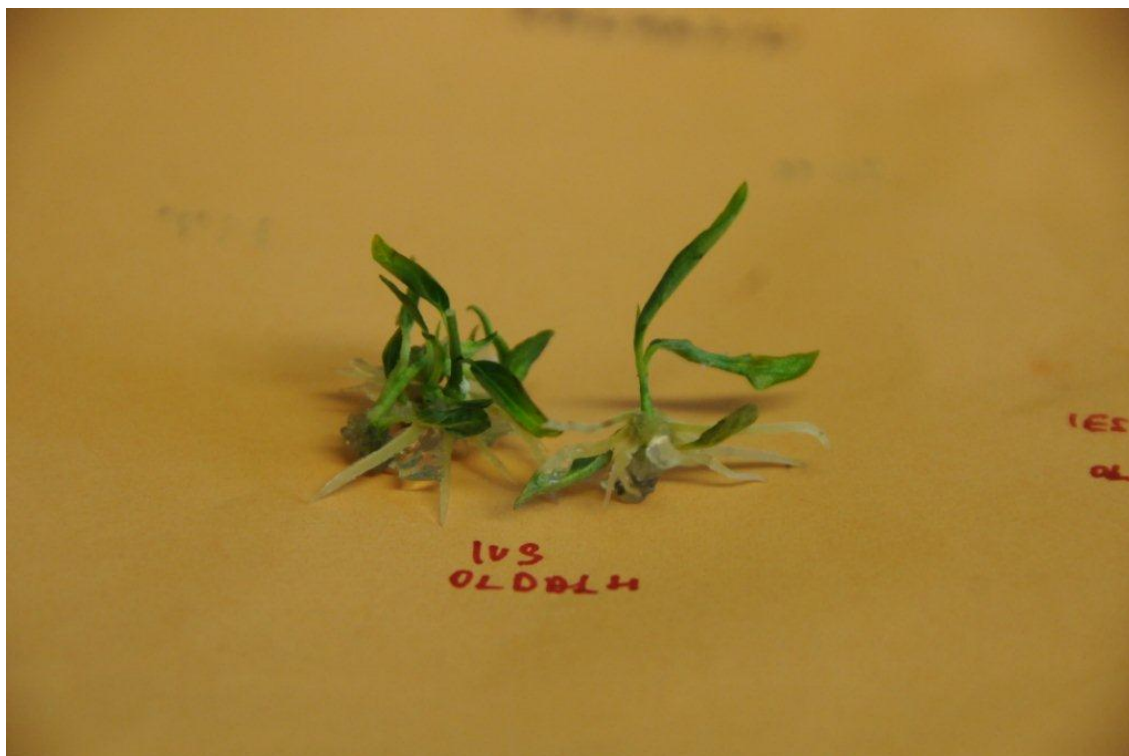
- a) 10mg/l NES,
- b) 10mg/l IVS, ill.
- c) IVS+IES+NES 3+3+3 mg/l kombinációja.

A hormontartalmú táptalajokon 1 hétig voltak a növények, majd hormonmentes DCR alaptáptalajra tettük őket. A gyökereztetést a 28. napon néztük. /alaptáptalajra történő áttétel után/ Az eredményeket az 5. számú táblázat tartalmazza.

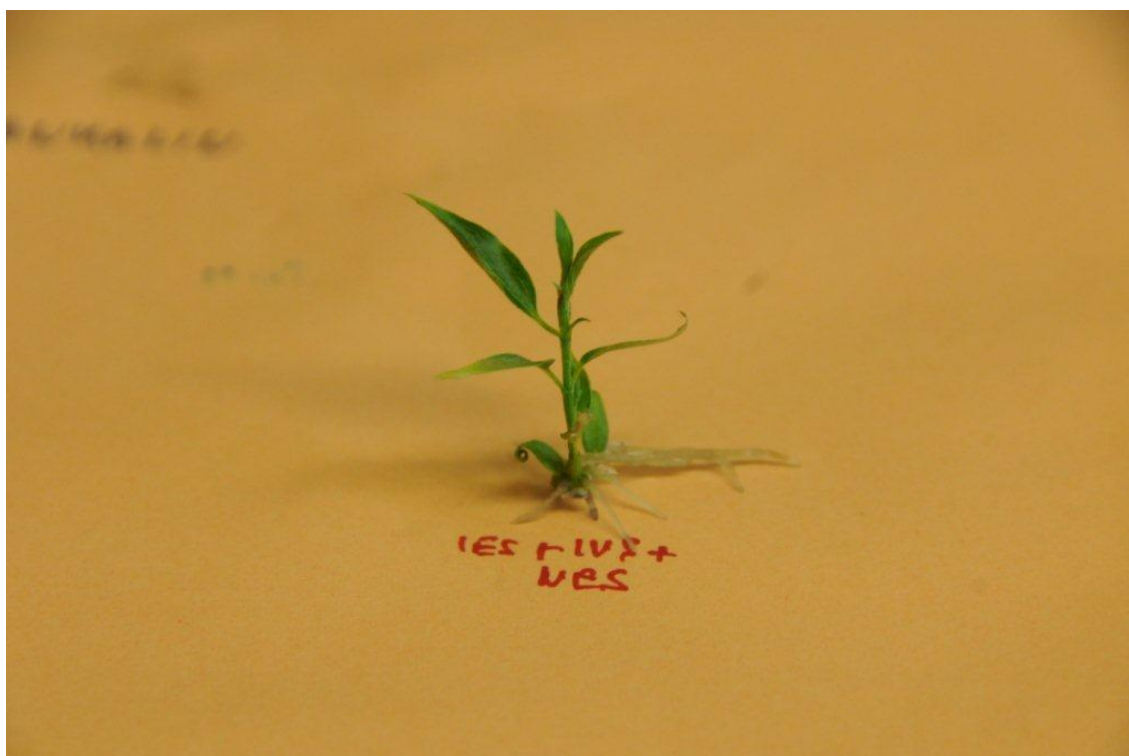
Hormon típusa mg/l	Főhajtás felső része	Főhajtás alsó része	Oldalhajtás
10 mg/l NES	0	75	25
10 mg/l IVS	37	23	63
NES+IES+IVS3+3+3	20	30	60

5. táblázat: Somhajtások gyökeresedése /letett növények százalékában az inkubáció 28. napján

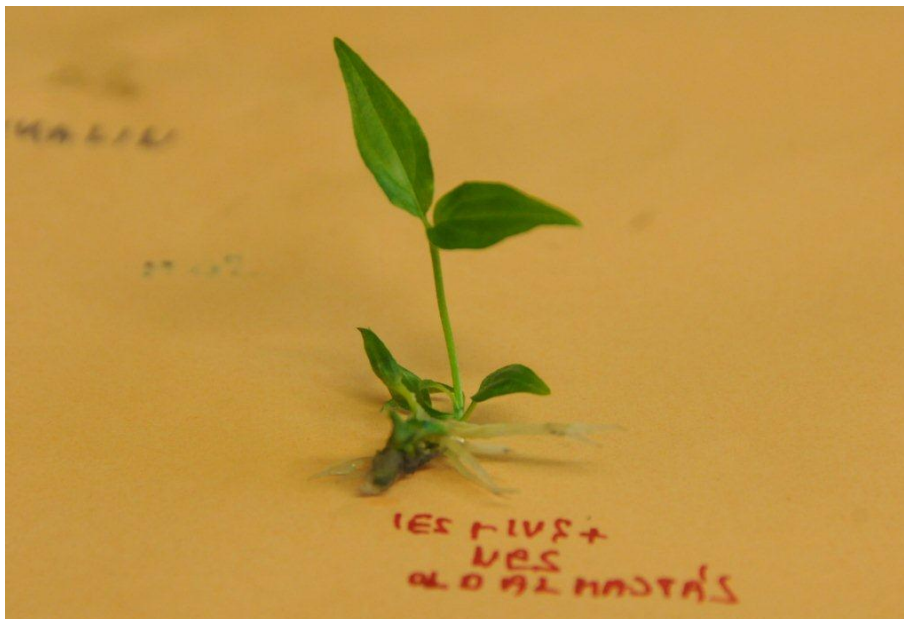
A leggyökeresedett növényeket vizuálisan értékelve egyértelműen az auxin kombináció volt a legjobb, ezen a táptalajon igazi gyökerek fejlődtek, a másik két táptalajon az erősen elkalluszosodott alapból eredtek az úgynevezett léggyökerek, ezeket a növényeket nem is lehetett akklimatizálni. A NES-en lévő növények kallusza egyébként fehér volt, az IVS-en lévőké pedig zöld. A leggyökeresedett növényeket aztán sikeresen akklimatizáltuk.



9. kép: IVS-en legyökeresedett oldalhajtás



10. kép: A 3 különböző auxint tartalmazó táptalajra letett főhajtás.



11. kép: A 3 különböző auxin tartalmazó táptalajra letett legyökeresedett oldalhajtás



12. kép: Két akklimatizált somhajtás

A gyökereztetési kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a legeredményesebb kezelés, ha 3 különböző auxint tartalmazó táptalajra tesszük le a szaporodó som oldalhajtásait, illetve a főhajtást, egyhetes inkubáció után hormonmentes alaptáptalajra visszatéve kb. 3 héten belül szépen legyökeresedett somhajtásokat kapunk, amelyeket sikeresen akklimatizálhatunk.

4.6 Homoktövis steril kultúra létrehozása

A homoktövisnél a kísérletek a *carpatica* alfajjal indultak meg, ezeket jól sikerült fertőtleníteni, a letett explantok 80%-a steril maradt.

Az indító táptalajnak itt a BTM bizonyult a legjobbnak, szintén GA kiegészítésével, a BA itt sem eredményezte a letett merisztémák hajtássá történő fejlődését

Alkalmazott táptalaj	Hajtássá fejlődött %-ban
MS+BA 0.2 mg/l	12
MS+GA 1mg/l	23
BTM+BA 0.2mg/l	37
BTM+GA 1mg/l	86

6. táblázat: A *Hippophae rhamnoides* var. *carpatica* merisztémák hajtássá fejlődési aránya a letett merisztémák %-ában különböző táptalajokon (20 kipreparált merisztéma)

A következő kísérletsorozatban már fajtákat vontunk be, nevezetesen a Jantarnaja, Obilnaja, Csunszkaja nevű orosz fajtákat, ill. egy német porzós és termős fajtát. Ezeket már csak a BTM+1mg/l GA-t tartalmazó táptalajra tettük.

Fajta neve	Merisztémák hajtássá fejlődése (%)
Jantarnaja	73
Obilnaja	65
Csunszkaja	74
Német porzós	82
Német termős	79

7. táblázat: Homoktövis fajták merisztéma megindulása 21.nap (4x15 növény átlaga)

Ha az alaptáptalajokhoz auxint adtunk kis mennyiségben/0.001mg/l/ ez is üvegesedést okozott, ha a BTM helyett DCR-t alkalmaztunk az sem volt jobb, a homoktövis számára az optimális táptalaj a BTM. A *carpatica* mellett az orosz fajtákat ill. a német porzós és termős fajtákat is ezen a táptalajon indítottuk.



13. kép *Hippophae rhamnoides* var. *carpatica* hajtáscsúcs



14. kép: Jantarnaja fajta kipreparált merisztéma

A következő fázisban még egyszer BTM+1mg/l GA-t tartalmazó táptalajra kell tenni a növényeket, utána jöhet a szaporító táptalaj BAP hozzáadásával.

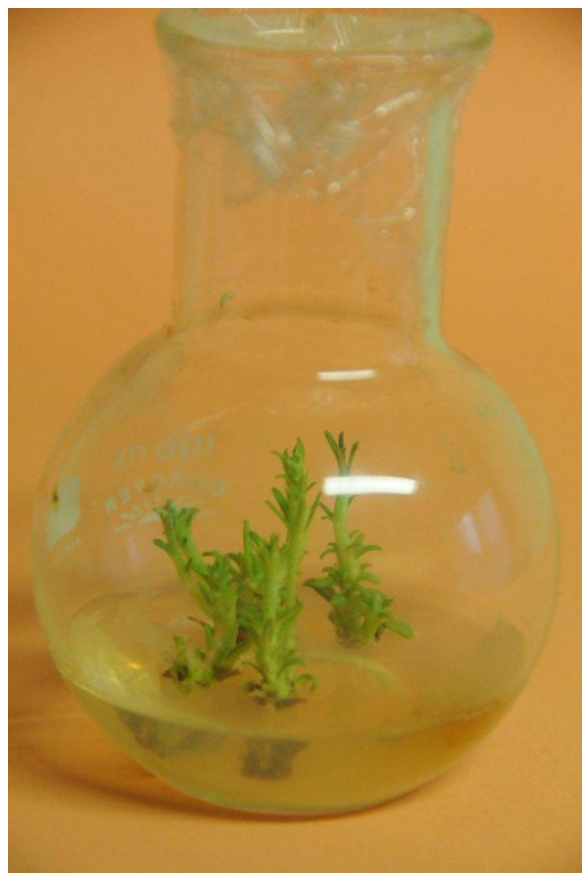
4.7 Felszaporítási fázis

A homoktövis felszaporítását a BTM+0.2mg/l BAP tartalmú táptalajon végeztük, ha növeltük az alkalmazott BAP szintet, vagy alacsonyabb cc.-ju auxinnal egészítettük ki (0.001mg/l NES vagy IVS), vagy alaptáptalajt változtattunk (MS,DCR) a szaporodási ráta lecsökkent, a növények nem fejlődtek

Alkalmazott táptalaj	BAP 0.2 mg/l	BAP 0.6 mg/l
BTM	2.7	1.8
MS	1.1	0.9

8. táblázat: A homoktövis szaporodási rátája különböző táptalajokon (4x25 növény)

Volt olyan lombik ahol 14 növényről 40 oldalhajtást szedtünk le, itt hozzáteszem, hogy vertikálisan is lehet osztani a növényeket, ill. az alapi kalluszt levágva és szaporító táptalajra téve újabb hajtásokat nyerünk.



15. kép: Szaporodó carpatica fajta



16. kép: Alapi kalluszból fejlődő növények



17. kép: Szaporodó német porzós növények

MS tartalmú táptalajon a növények kisebbek voltak, ha megemeltük a BAP szintjét, bármelyik táptalajnál erős kalluszosodás indult meg. A homoktövisnél BTM+0.2 mg/l táptalaj tökéletes a klónok felszaporítására.

Az orosz fajtáknál nem tudtunk olyan szaporodási arányt elérni, mint a carpaticánál.

Fajta	Szaporodási ráta
Jantarnaja	2.1
Obilnaja	2.4
Csunszkaja	2.0
Német porzós	1.8
Német termős	2.2

9. táblázat Homoktövis fajták szaporodási rátája 21. nap 4x20 növény átlaga

A fajták szaporodása között nem találtunk szignifikáns különbséget, egyedül a német fajtáknál a termős növény egyértelműen nagyobb szaporodást ért el, mint a porzós.

4.8 Gyökereztetés

A somhoz hasonlóan itt is még megoldásra váró probléma a gyökereztetés. A növények annyira érzékenyek hogy AC (aktív szén) illetve 0.5 mg/l IVS-t tartalmazó táptalajon el is haltak a növények, a táptalaj bármilyen megváltoztatására a növények deformálódtak, vagy nem gyökeresedtek le. 10 mg/l IES alkalmazása után gyökérprimódiumok, gyökerek jelentek meg a homoktövis hajtásokon.

A somhoz hasonlóan itt is kipróbáltuk az úgynevezett pulse kezelést, vagyis nagy koncentrációjú auxin tartalmú táptalajon tartottuk a növényeket egy hétig, majd hormonmentes alaptáptalajra tettük vissza őket, és a 28. napon értékeltük a gyökeresedést.

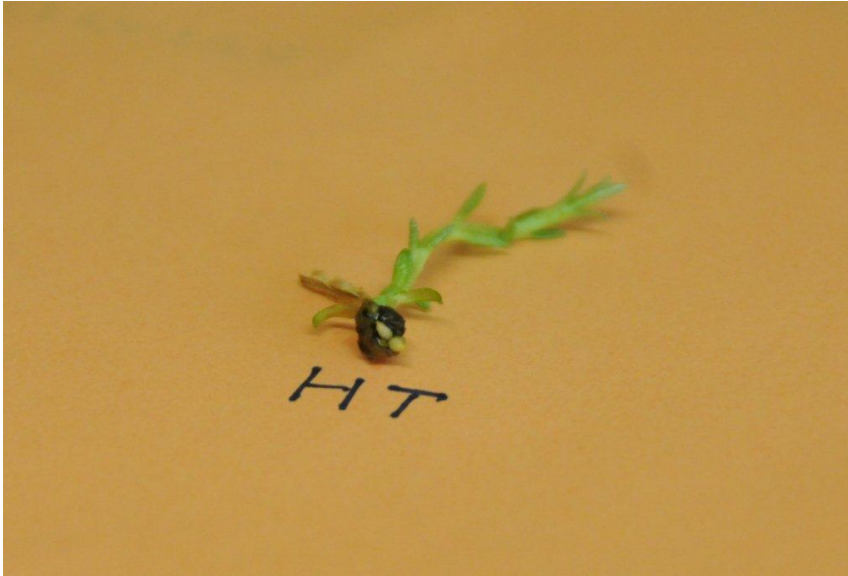
A kezelések a következők voltak:

- a) BTM+ 10mg/l NES,
- b) 10 mg/l IES,
- c) NES+IVS+IES 3+3+3 mg/l.

Itt csak a fő és oldalhajtásokat tettük le. Az eredményeket a 10. táblázat tartalmazza.

Hormon típusa mg/l	főhajtás	oldalhajtás
NES 10mg/l	30	10
IES 10mg/l	0	0
IVS+IES+NES 3+3+3	0	0

10. táblázat Homoktövis hajtások gyökeresedése a letett növények százalékában az inkubáció 28. napján



18. kép: Gyökérprimordiumok a carpaticán



19. kép: Kifejlődött gyökerek

5. Eredmények

A homoktövisnél, és a somnál sikerült kidolgoznunk az indító- és a felszaporító táptalajt mind a vad, mind a kultúrfajok esetében. Az alkalmazott alaptáptalajok az egyes növényeknél nagyon eltérőek voltak (MS, DCR, BTM) az alkalmazott hormonszint (GA, BA) tekintetében már nem adódtak nagy különbségek. A gyökereztetésnél nehezebb volt eredményt elérnünk, mert a som és a homoktövis a szokásos gyökereztetési eljárásokra nem reagált.

A somnál az indító táptalaj DCR+1mg/l GA, a felszaporító a DCR+0.2 mg/l BAP. A leggyökeresedett növényeket vizuálisan értékelve egyértelműen az auxin kombináció volt a legjobb, ezen a táptalajon igazi gyökerek fejlődtek, a másik két táptalajon az erősen elkalluszosodott alpból eredtek az úgynevezett léggyökerek, ezeket a növényeket nem is lehetett akklimatizálni.

A homoktövisnél az indító a BTM+1mg/l GA, a szaporító a BTM+0.2mg/l BAP. 10 mg/l IES alkalmazása után gyökérprimódiumok, gyökerek jelentek meg a homoktövis hajtásokon.

Bármilyen változtatás akár az alaptáptalajnál akár az alkalmazott hormontípusban illetve annak mennyiségben rontja a növények vigorát és szaporodási rátáját. A gyökereztetés megoldása után lehetővé válik, hogy ezeknél a fontos adaptogén növényeknél a nemesítő által szelektált klónokat gyorsan, rövid idő alatt nagy mennyiségben átadjuk a termesztésnek, ill. a som esetében lehetővé tesszük /mivel dugványról és magról is nehezen szaporítható/, hogy nagyobb arányban vonják be a termesztésbe.

6. Rövidítések jegyzéke

AC: aktív-szén

BA: benzil-adenin

BM: Jámborné dr. Benczúr Erzsébet és Márta Kálmánné (1990) által kidolgozott makroelemösszetételű táptalaj

BTM: Chalupa táptalaj (1981)

DCR: Gupta – Durzan táptalaj (1985)

IES: indol-ecetsav

IVS: indol-vajsav

KIN: kinetin

MS: Murashige és Skoog táptalaj (1962) teljes só koncentráció

NES: naftil-ecetsav

7. Felhasznált irodalom

1. Chalupa V. (1981), Clonal propagation of broadleaved forest trees. Comm. Inst. For. Res. Cech.
2. Fodorpataki L., Szigyártó L., (2008): A növények szaporodása és a meserséges növényeszaporítás biotechnológiai alkalmazása. Kolozsvári Egyetemi Kiadó
3. Gupta P. K.- Durzan D. J. (1985), Shoot multiplicattion from mature Douglas fir. Pl. Cell. Report
4. Kaur R. et. al (1999), In vitro propagation of Valeriana jatamansii Plant Cell, Tissue and Organ culture
5. Kovács Ervin (1989), Homoktövis in vitro és in vivo szaporítása, Diploma dolgozat, Kertészeti Egyetem
6. Murashige T.-Skoog. F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant
7. Sun K. et. al (2002), Molecular phylogenetics of Hippophae L. based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nr DNA. Plant Syst. Evol.