

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

In vitro szőlő regeneráció hatékonyságának fejlesztése sejtszintű genetikai
variabilitás hasznosításához

Suller Barnabás

Kertészmérnök, IV. évfolyam

Konzulensek: Dr. Oláh Róbert egyetemi docens

Forgács István PhD hallgató

Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	5
3. CÉLKITŰZÉS	7
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
4.1. Történeti áttekintés.....	8
4.2. Növény-sejt-növény rendszer.....	9
4.3. Szőlő embriogén kallusz indukció, növényregeneráció szilárd táptalajon	12
4.4. Növényregeneráció folyékony táptalajon	14
4.5. <i>In vitro</i> mutáció és szelekció.....	15
5. ANYAG és MÓDSZER	19
5.1. Embriogén kallusz indukció	19
5.2. Eltérő összetételű táptalajok hatása a sejtuszuspenziók friss tömeg gyarapodására	20
5.3. Eltérő pH-jú táptalajok hatása a sejt kultúrák friss tömeg gyarapodására, valamint a kultúrák pH-jára	21
5.4. Táptalajcsere optimalizálása, sejtaggregátum típusok azonosítása.....	21
5.5. Fajta összehasonlító kísérlet.....	23
5.6. Szomatikus embriogenezis indukciója.....	23
5.7. <i>In vitro</i> mutagenesis	25
5.8. <i>In vitro</i> szelekció	26
6. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	28
6.1. Embriogén kallusz indukció	28
6.2. Eltérő összetételű táptalajok hatása a sejtuszuspenziók friss tömeg gyarapodására	29
6.3. Eltérő pH-jú táptalajok hatása a sejt kultúrák friss tömeg gyarapodására, valamint a kultúrák pH-jára	30
6.4. Táptalajcsere optimalizálása, sejtaggregátum típusok azonosítása.....	31

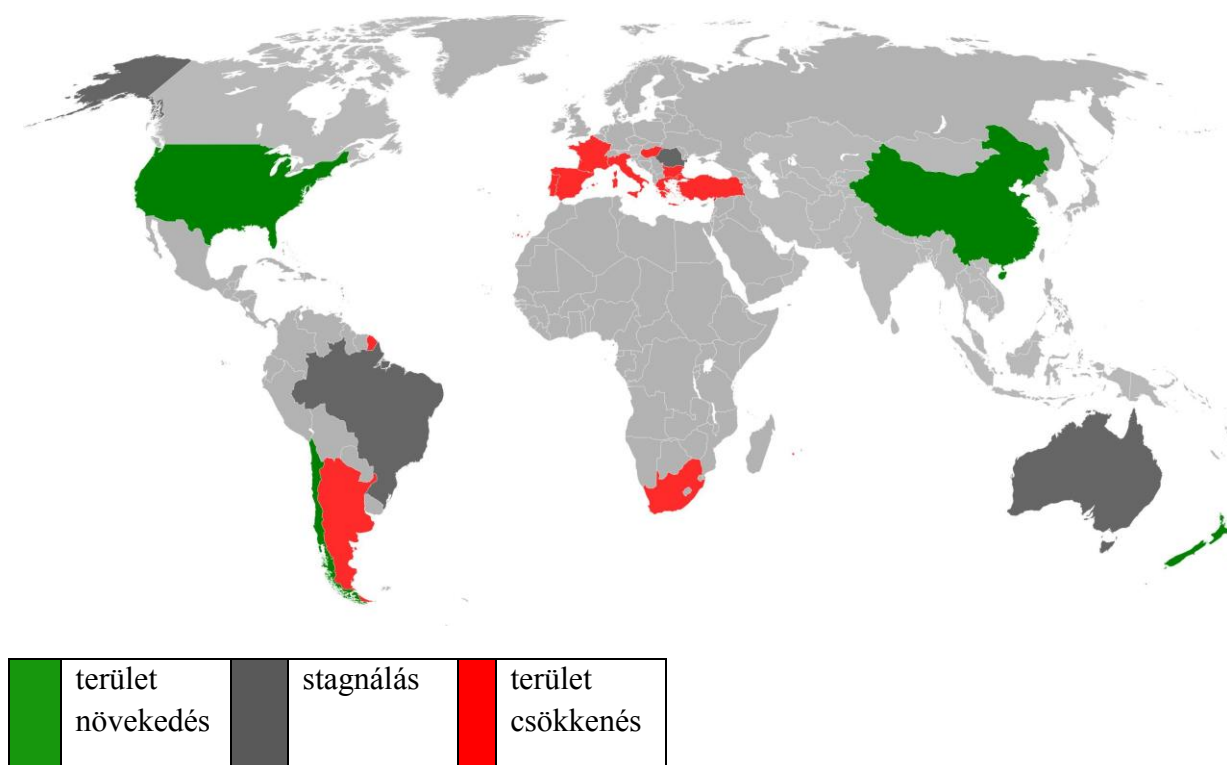
6.5. Fajta összehasonlító kísérlet.....	37
6.6. Szomatikus embriogenezis indukciója.....	38
6.7. <i>In vitro</i> mutagenesis	43
6.8. <i>In vitro</i> szelekció	44
7. Összefoglalás	46
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	47
9. IRODALOMJEGYZÉK	48

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
BAP	6-benzil-amino-purin
IAA	3-indolil-ecetsav
NOA	2-naphtoxy-ecetsav
DNS	dezoxiribonukleinsav
PEG	polietilén-glikol
MES	2-(N-Morholino)-etán-szulfonsav
EI	etilén-imin
NEK	nitrozo-etil-karbamid
EMK	etil-metán-karbamid
5BU	5-bromouracil
2AP	2-aminopurin
EMS	etil-metán-szulfonát
ICR191	6-kloro-9-[3-(2-kloroetilamino)-propilamino]-2-metoxiakridin- dihidroklorid

2. BEVEZETÉS

A szőlő, mint növény, jelentős szerepet játszik az emberek életében. Tájékozató elem, évezredek óta része az emberi kultúrának, sokak számára biztosít megélhetést. Felgyorsuló, globalizált világunkban változás figyelhető meg ebben az ágazatban is. A világ szőlőtermő területére az összes területét tekintve folyamatos csökkenés jellemző. Az elmúlt 10 év alatt közel 300000 ha területtel lett kisebb a termőfelület. Ez a folyamat nem jelenti azt, hogy veszített volna a szőlő gazdasági súlyából. A négy fő európai országot tekintve (Franciaország, Spanyolország, Portugália, Olaszország) csökkenő tendencia figyelhető meg. 2000-ben a négy ország 3290000 ha szőlő területtel bírt, 2010-re ez 2939000 ha esett vissza. Ezzel ellentétes tendencia figyelhető meg Ázsiában, a déli féltekén és az USA-ban. Ázsiát tekintve 3 jelentős országban (Kína, Irán, Törökország) folyamatos területgyarapodás figyelhető meg. 2000-ben a 3 ország 1167000 ha területtel rendelkezett, míg 2010-re 1342000 ha szőlő termőterületük volt. A déli féltekét (Argentína, Chile, Új-Zéland, Ausztrália, Dél-Afrika) és USA, tekintve elmondhatjuk, hogy 2000-ben 1065000 ha területtel rendelkeztek, ami 2010-re 1172000 ha-ra bővült (1.ábra).



1.ábra A világ szőlő termőterületének dinamikai változása az elmúlt 10 évben.

A terület csökkenése ellenére egy folyamatos termésmennyiségbeli növekedés figyelhető meg. A termésmennyiségen belül jelentős és folyamatosan felfutó mennyiséget mutat a friss fogyasztásra előállított szőlő. 2000-ben 15,2 millió tonna volt a megtermelt mennyiség és ez 2010-re ez elérte 22,2 millió tonnát. Az öt legnagyobb friss fogyasztásra termelő ország Kína, India, Törökország, Olaszország és Irán. Törökország és Irán jelentős mazsolatermesztők is 3 másik ország -Chile, Dél-Afrika, USA- mellett. 2000-ben 1282100 tonna termelt a világon mazsolából. 2010-ben 1231600 tonna volt a termésmennyiség, ami az ágazat stagnálását mutatja. A világ bortermelésében egy enyhe csökkenés figyelhető meg. 2000-ben 280 millió hl bort állítottak elő a világon. Ez a mennyiség 2010-re 265 millió hl-re csökkent. Nem beszélhetünk lineáris csökkenésről, inkább az évjáráthatás a döntő a megtermelt mennyiség szempontjából. A világ 10 legjelentősebb bortermelő országa: Franciaország, Olaszország, Spanyolország, USA, Argentína, Kína, Ausztrália, Chile, Dél-Afrika és Németország. Ezek közül Franciaország az élvonalas a maga 50000000 hl mennyiségével. A sereghajtó pedig Németország 7000000 hl bor előállításával. A bortermeléssel ellentétes folyamatot mutat a felhasználás. Míg 2000-ben 225665000 hl bort fogyasztottunk, addig ez 2010-re elérte a 241808000 hl-t. A világ 10 legnagyobb borfogyasztói között találhatóak a nagy termelők is. De további országok, mint az Egyesült Királyság és az Orosz Föderáció is a nagy fogyasztókhoz tartoznak (International Organization of Vine and Wine, 2012)

A hagyományos nemesítés nem vagy csak nagyon lassan tud reagálni a felmerülő igényekre és termesztési nehézségekre. A hagyományos keresztezéses nemesítésben közel 20 évet vesz igénybe egy-egy új fajta előállítása. De hiába a fajta előállítás, ha az új fajta nem tud magának teret nyerni a felhasználásban. Felvetődik a kérdés: miért kell egyáltalán új fajtát előállítani? Miért nem jók a régi bevált fajták, amikből a ma divatos „borok” készülnek. Azért van szükség új fajták előállítására, mert nincs tökéletes fajta. Mindig van mit javítani vagy egy különlegességet, újdonságot belevinni a fajtaszerkezetbe. A konzervatív fajtahasználat nyomásának engedve mégis van lehetőség a fajták javítására új klónok szelekciójával vagy előállításával. Talán az egyik módja lehetne a genetikai transzformáció. Itt elviekben elérhető egy-egy fajta egyes tulajdonságainak számunkra hasznos megváltoztatása úgy, hogy a fajta más tulajdonságaiban nem változik. Itt elsősorban agronómiai tulajdonságokra lehet gondolni. Mint a vírus és gombarezisztencia, agrobaktérium rezisztencia, nagyobb fokú szárazságtűrés. A világ azonban még nem fogadja el széles körben a genetikai transzformációval előállított növényeket. Főként Európa zárkózik el a GMO-k termesztésbe vonásától.

Ugyanakkor új klónok előállítására nyújt egy alternatív lehetőséget az *in vitro* mutációs és szelekciós eljárás. Ez az eljárás természetesen nem olyan szigorúan szabályozott, mint a GM technológia, így nemesítési jelentősége is lehet ha sikerül a céloknak megfelelő egyedeket (klónokat) szelektálni. Számos eljárás, mely eltér a hagyományos nemesítéstől, *in vitro* előállított növényanyagra támaszkodik. A növényregeneráció egyik lehetősége az indirekt szomatikus embriogenezis, mely során a szomatikus (testi) sejtekből fejlődő differenciálatlan sejtekből (kallusz) alakulnak ki a szőlő embriók, lehetőséget adva hatékony szelekciós eljárások alkalmazásához a spontán és indukált mutációk azonosításához.

3. CÉLKITŰZÉS

A piac konzervativizmusa miatt (új fajták elutasítása), valamint a transzgénikus növényekkel szembeni ellenállás miatt kell keresnünk más hatékony eljárásokat a meglévő szőlő fajták 1-1 tulajdonságának javítására, módosítására. Az általunk választott módszer az *in vitro* mutánsizolálás, mert nem olyan időigényes, mint a keresztezéses nemesítés és elvi lehetőség van olyan genotípus szelekciójára, amely olyan új fajtát (klónt) eredményezhet, mely csak egy-egy tulajdonságban tér el a mutagén kezelésnek kitett fajtától, klóntól. Ezáltal lehetővé válhat a konzervatív fajtahasználat jobb klónokkal való ellátása. A mutációs és szelekciós eljáráshoz szükségünk volt egy hatékonyan működő regenerációs rendszerre. A Genetika és Növénynemesítés Tanszéken alkalmazott szőlő embriogén kallusz indukciós eljárás megfelelő alapot jelentett a munkánkhoz. Célul tűztük ki egy a meglévő regenerációs módszer hatékonyságát meghaladó folyadékalapú rendszer kidolgozását, mely biztos alapot nyújthat a további kísérletekhez. Célul tűztük ki továbbá az embriogén kallusz felszaporítás hatékonyságának növelését és a szomatikus embriók fejlődésének szinkronizálását. A hatékony regenerációs rendszer fejlesztése után célunk volt az *in vitro* mutációs és szelekciós munkák megalapozása.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Történeti áttekintés

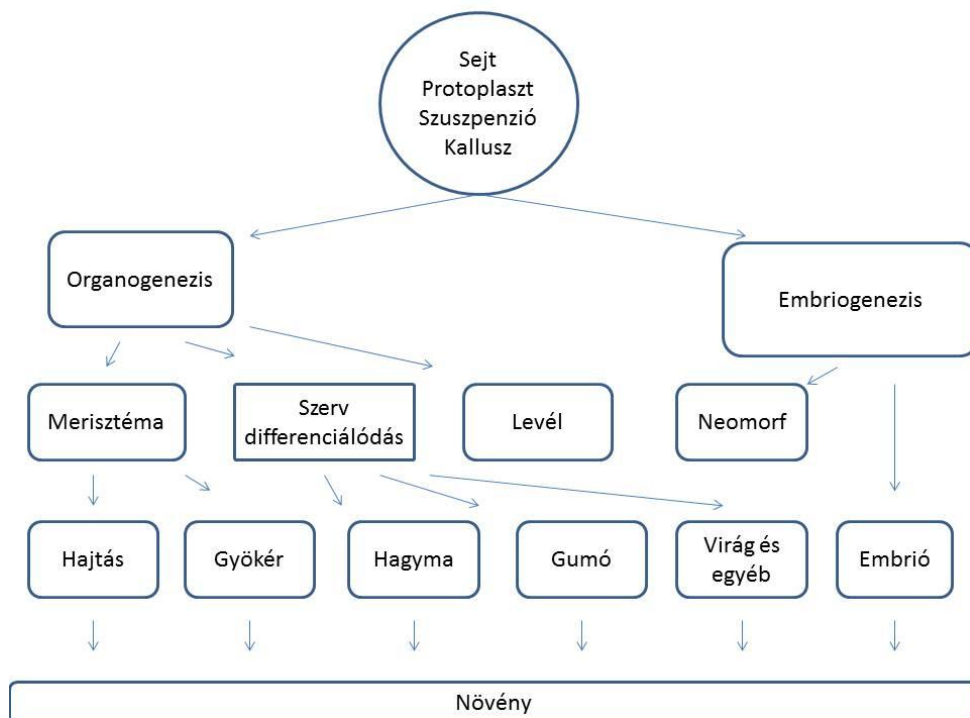
A múlt század elején, 1902-ben Haberlandt (Dudits és Heszky, 2003) felvetésével indult el a növényi sejtek és különböző szövetek tenyésztése *in vitro* kultúrákban. Az akkori technológiai színvonalon azonban nem sikerült a felvetés -a növényi szomatikus (testi) sejtek totipotenciáljának - bizonyítása. Erre 1958-ig, Steward kutatócsoportjának sikeréig kellett várni (Steward et al. 1958). Az 1900-as évek elejétől az 50-es évekig az alapvető technikák tökéletesítésén dolgoztak a kutatók. White 1932-ben sikeresen vont tenyésztésbe ovulumokat, 1934-ben pedig paradicsom gyökércsúcsból indított gyökertenyészetet folyékony táptalajon (Dudits és Heszky, 2003). Ezen munkák teremtették meg a későbbiekben a szervtenyészetek (levél, hajtás, virág) kialakításának lehetőségét. Gauchet kidolgozott módszere lehetővé tette folyamatosan osztódó kalluszkultúrák létesítését és fenntartását sárgarépből (Gautheret, 1959). A táptalajt már agar-agarral szilárdították és tartalmazott különböző növekedésszabályozó vegyületeket (például auxinokat). Overbeek, Conklin és Steward (Dudits és Heszky, 2003) kókuszdiótejjel és szintetikus auxinnal kallusz (dedifferenciált növényi sejtek tömege) fejlődését indukálták már differenciált sejtekből. Skoog és Miller (Skoog és Miller, 1957) sikerrel izolálta és azonosította a növekedésszabályozók egy újabb csoportját, aminek első képviselőjét kinetinnek nevezett el. Murashige és Skoog 1962-ben dolgozta ki dohány kalluszon az azóta széles körben elterjedt MS-alaptáptalajt (Murashige és Skoog, 1962). 1959-ben Melchers és Bergmann (Dudits és Heszky, 2003) tökéletesítette a szuszpenziós kultúrát. 1958-ban (Dudits és Heszky, 2003) felfedezték a differenciálódás egy újabb lehetséges útját, a szomatikus embriogenezist (testi sejtekből növényi embriók fejlődésének indukálása). Az eddigi szomatikus sejtek manipulációja mellett, 1964-ben sikerült először *Datura sp.* portokkultúrából mikrspóra eredetű haploid növényeket regenerálni (Sipra és Maheshwari, 1964) Az eredményüket 1968-ban sikeresen ismételte meg Nitsch dohányon valamint Ono rizsen (Dudits és Heszky, 2003). 1960-as évek végére érkezett a technológia arra a fejlettségi szintre, hogy alkalmazása a gyakorlatba is bekerüljön. A modell fajok, mint például dohány, rizs, sárgarépa stb. esetében a növény-sejt-növény regenerációs rendszer ekkorra már kidolgozásra került. Innentől fogva az egyedszintű genetikai és élettani kutatások sejtszintre is kiterjedtek. Először Cocking (Dudits és Heszky, 2003) állított elő sejtfaluktól megfosztott növényi sejteket (protoplasztokat) paradicsom gyökércsúcsi sejteiből. Növényt csak majd tíz évvel később, 1971-ben sikerült regenerálni Nagatanak és Takebenek (Dudits és Heszky, 2003) ezekből a kultúrákból. Ezt követte az első protoplasztfúzió

1972-ben. Carlson a *Nicotiana glauca* és a *Nicotiana langsdorffii* protoplasztjait fúzionáltatta és sikeresen regenerált növényeket. 1978-ban állították elő az első szomatikus nemzetséghibridet. Melchers és munkatársai (Dudits és Heszky, 2003) *Solanum tuberosum* és *Lycopersicon lycopersicon* protoplasztjait fúzionáltatták. 1982-ben (Dudits, 1982) állították elő az első aszimmetrikus hibridet. Az aszimmetrikus hibrideknél az egyik partner genomja szinte teljes mértékben eliminálódik, csak extra kromoszóma marad meg. A protoplasztfúzió felgyorsította a mutáns sejtvonalak *in vitro* izolálását. Kiemelkedő eredményt Maliga et al. értek el az 1970-es években a sztreptomycin rezisztens dohány (Maliga et al. 1979). A protoplasztfúzióra alapozott eljárás vezetett a cibridek - a donor sejt adja a citoplazmát és vele a plasztiszokat az akceptor pedig a sejtmagot - előállításához. A 70-es évek közepén Galun és Maliga (Dudits és Heszky, 2003) munkásságának eredményeként fellendült az ún. extrakromoszómális genetika ami sikeres kloroplasztisz és mitokondrium transzferhez, valamint rekombinációhoz vezetett. A sejt-fúzióra alapozott genetikai információ átvitel tökéletesítését jelentette az izolált organellumok átvitele. Potrykus 1973-ban izolált sejtmagot, Davey és munkatársai kloroplasztiszokat, Szabados és munkatársai 1981-ben kromoszómákat voltak képesek célzottan protoplasztokba átvinni (Dudits és Heszky, 2003.). A fejlődés előrehaladtával létrehozták az első növényi sejtekre alapozott ipari méretű termelési rendszert. Az 1980-as (Dudits és Heszky, 2003) években Japánban elindult az első sejtfermentációs rendszer mely sikonint állított elő *Lithospermum erythrorhizon* tenyésztésével. A következő lépésre nem is kellett sokáig várni. 1983-ban és 84-ben egyidejűleg több kutatócsoport (Fraley et al.; Horsch et al.; De Block et al.) is beszámolt az első mesterségesen előállított transzgénikus dohány növényekről. 1986-ban a Science és a Nature hasábjain szinte egyidőben számoltak be vírus, rovar és herbicidrezisztens GM növények sikeres előállításáról. A 80-as évek végén az USA-ban és Európában elindultak az első szántóföldi kísérletek az új GM fajtákkal. Az első transzgénikus növény 1994-ben került közforgalomba és az új fajták előállítása azóta is folyamatos (Dudits és Heszky, 2003).

4.2. Növény-sejt-növény rendszer

A növényeknél *in vitro* kultúrákban két, egymástól igen eltérő fejlődési irányt sikerült indukálni és fenntartani: a szomatikus embriogenezist és az organogenezist. Az organogenezisen belül járható két fő út: a merisztéma differenciálódás, majd ebből hajtás vagy gyökér és végül a növény fejlődésének indukálása, valamint a szervdifferenciálódás. A szervdifferenciálódás során

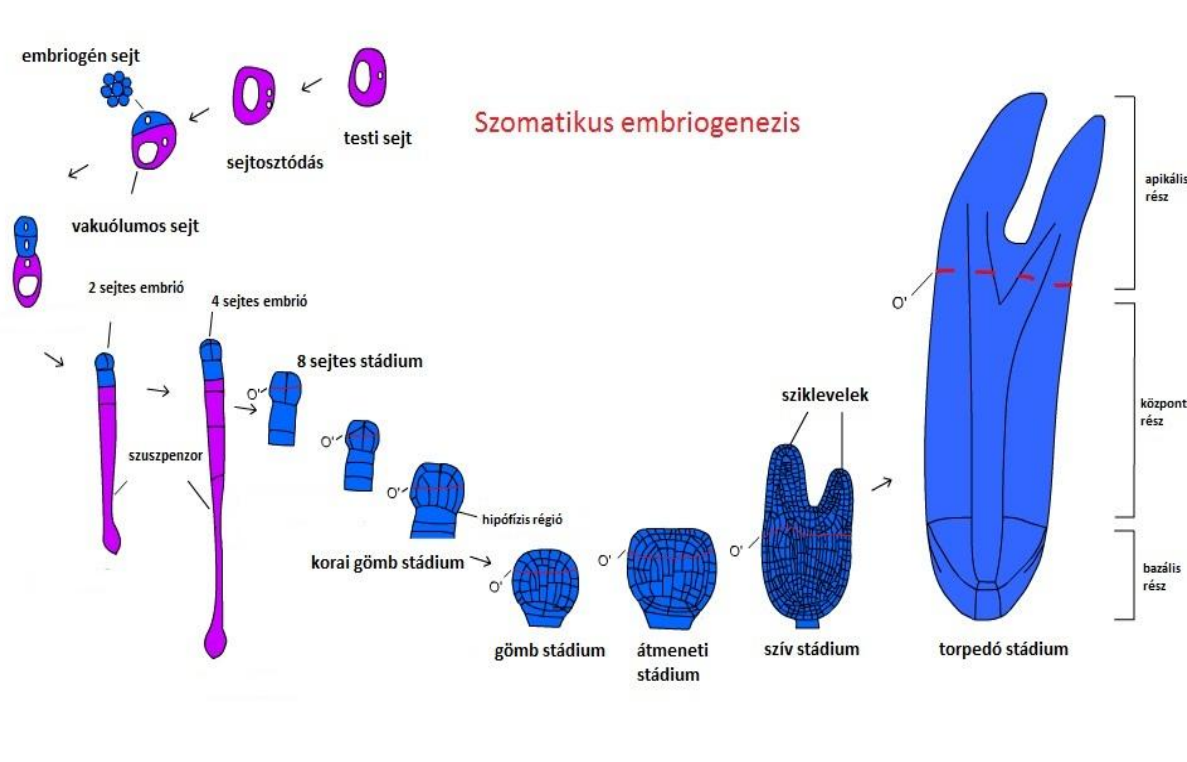
nem közvetlenül kalluszsejtek differenciálódnak, hanem a tenyészetben már differenciálódott sejtek (merisztéma, gyökér, szár) további morfogenezisének az eredménye (2. ábra).



2.ábra A morfogenezis alternatív útjai a magasabb rendű növények sejt és szövettenyésztéseiben (Dudits és Heszky, 2003).

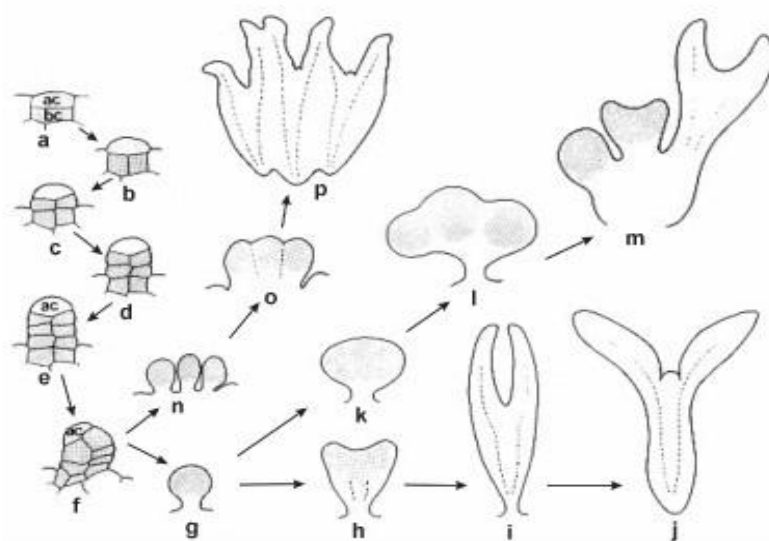
A szomatikus embriogenezis, mely során differenciálatlan testi sejtekből (kallusz) normál fejlődésű embriók, majd teljes növények regenerálhatóak, egyedülálló az élővilágban és jelen tudásunk szerint csak a növényekre jellemző. A szomatikus embriogenezist először sárgarépa kalluszon indukáltak, azóta számos növényfajnál alkalmazzák rutinszerűen. Az embriogenezis első lépése a merisztematikus központok kialakulása, mely hasonló az organogenezishez. A merisztematikus központok felületi sejtjeiből indul a differenciálódás (Dudits és Heszky, 2003). A fejlődés során már a néhány sejttes proembrió elkülönül a többi sejtől. Felszínén nem lehet plazmodezmákat megfigyelni. Az embrionálissá vált sejtek először transzverzálisan osztódnak, létrehozva így a kétsejttes proembriót. Az apikális sejt longitudinálisan osztódva létrehozza a három sejttes T alakú proembriót. A két terminális sejt osztódása során először kvadránst majd oktánst hoz létre. Ez alatt a szuszpenzor sejt is osztódik. A továbbiakban az embriókezdemény sejtjei periklinálisan osztódnak, melynek eredményeképpen kialakul a centrális periferiális merisztématáj.

Az *in vivo* embriogenezishez hasonlóan a hipofízissejt is osztódik. A fejlődés során fokozatosan következnek az *in vivo* megfigyelhető embrióalakok, a soksejtes gömb, a szív és a torpedóstádium. Közben az embrió bipolárossá válik. A szuszpenzor felőli oldalon a gyökércsúcs, az ellentétes oldalon pedig a sziklevek kezdenek differenciálódni. A radikula és a hipokotilkezdemények megnyúlásának eredménye a torpedóstádiumú embrió. Ezt követően a sziklevek fejlődése általában megáll és megindul az embrió szöveteinek differenciálódása (Dudits és Heszky, 2003) (3. ábra).



3.ábra Szomatikus embriogenezis fejlődésének szakaszai (Plant and Soil Sciences eLibrary, 2012 <http://plantandsoil.unl.edu/pages/>)

Szomatikus embriogenezis során a normális fejlődésű embriók mellett előfordul, hogy az embriók egy része a fejlődés valamely fázisában megreked (gömb, szív, torpedó, szikleveles) illetve eltérések tapasztalhatóak néha a sziklevek számában (Jayasankar et al. 2003). Egyes esetekben előfordul, hogy az embriók fuzionálhatnak illetve hogy egyazon gömbstádiumú embrión több, további embrió is fejlődhet (másodlagos embriogenezis) (4.ábra) (Dos Santos et al. 2006).



4. ábra Szomatikus embriogenezis különböző útjai szója (*Glycine max*) esetén.

a. Szomatikus embrió kiinduló sejtjei. b. Bazális sejtek antiklinális osztódása. c-f. Bazális sejtek periklinális osztódások után. g. Gömb stádium. h. Szív stádium. i. Torpedó stádium. j. Szikleveles embrió. k. Kibővült elsődleges gömb stádiumú embrió. l. 3 növekedési központot mutató állapot. m. Különbség a másodlagos és elsődleges embrió között. n. Korai szakaszban hámsejtekből kialakuló globuláris embriók. o. Gömb stádiumú embriók fúziója. p. Különleges szikleveles embrió. (ac= apikális sejt, bc= bazális sejt)

4.3. Szőlő embriogén kallusz indukció, növényregeneráció szilárd táptalajon

A hatékony növény-sejt-növény rendszer alapvető feltétele számos módszer sikeres kivitelezésének. A szomatikus embriogenezis többek között nemesítési programok szerves részét képezheti (Martinelli és Gribaudo, 2001) a nemesítési folyamat felgyorsításával, és megfelelő alapot biztosít a rezisztencianemesítés számára is (Bouquet és Torregrosa, 2003). E módszer felhasználásával lehetőség nyílik mutánsizolálásra (Ahloowalia et al. 2004), vírusmentesítésre (Gambino et al. 2006), mikrooltás kivitelezésére (Torres-Vinals et al. 2004), és a genetikai transzformációnak (Kikkert et al. 2001) is biztos alapot ad. Szőlő esetén az első sikeres szomatikus embriogenezistről Mullins és Srinivasan számolt be 1976-ban (Mullins és Srinivasan, 1976), míg az első járulékos organogenezistről Rajesakaran és Mullins 1981-ben (Rajesakaran és Mullins, 1981). A *Vitis* nemzetségen belül számos fajból sikerült regenerált növényeket előállítani. Többek között *Vitis vinifera* (Mauro et al. 1986), *Vitis thunbergii* (Harst, 1995), *Vitis berlandieri* (Cersosimo et al. 1990), *Vitis amurensis* (Mozsár és Süle, 1994), *Vitis rupestris* (Stamp és Meredith, 1988), *Vitis rotundifolia* (Gray, 1992), *Vitis longii* (Gray és Mortensen, 1987), *Vitis aestivalis* (Matsuta, 1992)

és *Vitis latifolia* (Salunkhe et al. 1999) fajok esetében. Mivel még nem létezik egy általánosan minden fajra és genotípusra jól használható indukciós és regenerációs eljárás ezért a termesztő körzetek legfontosabb fajtáira fókuszálnak a kutatások. Elmondhatjuk, hogy a növény szinte minden részéből megkísérelték a regenerációt. Zigotikus embrióból Emershad és Ramming 1994-ben vitt végre sikeres szomatikus embriogenezist (Emershad és Ramming, 1994). A virág különböző részeiből is állítottak elő embriókat. Felhasználásra került a magház és a termő (Gray és Mortensen, 1987) és a portok (Rajasekaran és Mullins, 1979; Mozsár és Süle 1994). A levélen és levélnyélén is létrehoztak sikeres indukciót és regenerációt (Krul és Worley, 1977). A kísérletek kiterjedtek egyéb növényi részre is, kacsából (Salunkhe et al. 1997) hajtás szegmensből (Krul és Worley, 1977), hipokotil és járulékos gyökér felhasználásával (Vilaplana és Mullins, 1989) állítottak elő szomatikus embriókat. Protoplaszt felhasználásával is értek el sikeres szomatikus embriogenezist (Zhu et al. 1997). Habár a növény szinte minden részéből lehet sikeresen embriogenezist indukálni mégis 3 inokulomot használnak leggyakrabban, ezek pedig a portok (Altamura et al. 1992), termő (Srinivasan és Mullins, 1980) és zigotikus embrió (Stamp és Meredith, 1988). Az embriogén kallusz indukcióját jelentősen befolyásolja a genotípus (Gray, 1992). Szinte minden kutatás központi témája a genotípushoz leginkább megfelelő táptalaj kiválasztása és az alkalmazott hormonok kombinációja és koncentrációja. A két leggyakrabban használt táptalaj: a NN és (Nitsch és Nitsch, 1969.) és MS (Murashige és Skoog, 1962). Ezen alaptáptalajokat használják fel módosítva (például aktív szén kiegészítés (Thomas, 2008)) a leggyakrabban az indukció és regeneráció folyamán. Az embriogén tenyésztés indításának egyik központi kérdése a felhasznált hormonok fajtája és koncentrációja. A leggyakrabban alkalmazott kombináció a 2,4-D és BAP (Robacker 1993; Mozsár és Süle, 1994). Az indukció és regeneráció hatékonyságának fokozására több módszert alkalmaznak.

A kallusz indukció hatékonyságának fokozására a zárt virágzat 48-72 órás hidegkezelésének hatékonyságáról számoltak be a portokok izolációja előtt (Perl et al. 1995). Csírázó embrió hajtásfejlődését 1-1,5M koncentrációban alkalmazott BAP jelentősen megnöveli (Gray és Mortensen, 1987; Salunkhe et al. 1997). Egy másik kutatócsoport hasonló eredményről számolt be, de az 1,1M BAP-ot 5M IAA-val egészítették ki (Torregrosa et al. 1995). Egyes szerzők a hidegkezelés hatékonyságáról számoltak be szőlő szomatikus embriogenezis esetében (Mauro et al. 1986; Rajasekaran és Mullins, 1979). Más szerzők szerint viszont nem fokozza a hatékonyságot a hidegkezelés (Salunkhe et al. 1997). A regenerációs ráta fokozására felhasználnak más vegyületeket is. Marou és munkatársai a kazeinhidrolizátum, glutamin és adenin használatát vizsgálták (Mauro et al. 1986), egy másik kísérletben pedig maltóz és glicerol felhasználásával sikerült javítani a

hatékonyságon (Mauro et al. 1995). A szomatikus embriogenezis előnye lehet az egy sejtől induló embriófejlődés (Faure et al. 1996). Ezzel szemben az organogenezis egyik legnagyobb hátránya a kimérák magas aránya (Perl és Eshdat, 1998). A szomatikus embriogenezis mellett az organogenezisen alapuló növényregenerációs rendszerek esetében is értek el sikereket, pl.: fiatal levélből (Péros et al. 1998), hajtásszegmensből (Rajasekaran és Mullins, 1981), portokból (Cersosimo et al. 1990) valamint rügyből indukált merisztémából (Mezetti et al. 2002) neveltek fel intakt növényeket.

4.4. Növényregeneráció folyékony táptalajon

A szilárd táptalajon folyó szomatikus embriogenezis kutatások mellett folyadékkultúrák létesítésére is sor került. Az első sikeres indításról 1992-ben számoltak be (Coutos-Thevenot et al. 1992a). Habár ez a technika még kevésbé elterjedt, de számolni kell a folyamatos térnyerésével a nagyobb hatékonyság és az embriófejlődés jobb és egyöntetűbb szinkronizációjából kifolyólag. Ugyanakkor a nagyobb technológiai fegyelmet igénylő a folyadékkultúrák eredményességét az irodalom igazolt (Vidal et al. 2009) és felhasználásuk leginkább a géntechnológiában szolgált biztató eredménnyel (Vidal et al. 2003). A szinkronizáció elősegítésével lehetővé válik az automatizálás és jelentős költségcsökkentés érhető el (Tonon et al. 2001). A folyadékkultúrában történő felszaporítás és indukció folyamán számos problémába ütköztek, többek között fokozott barnulást tapasztaltak, mely a tenyészet elhalását jelenti a friss tömeg gyarapodás leállításával és a sejtszuspenziók embriogén jellegének elvesztésével. E problémák kiküszöbölésére számos eredmény született. Sikeresen alkalmaztak alacsony sejtszámú tenyésztést, illetve különböző antioxidáns kiegészítőket (Coutos-Thevenot et al. 1992b). Van Engelen és munkatársai a tenyésztés során a táptalajban megjelenő anyagcsere termékekben vélték felfedezni a problémák okozóját (Van Engelen et al. 1992). Amar és munkatársai a táptalajba a kultúrák által kiválasztott arabinogalaktánok friss tömeg gyarapodására gyakorolt indukáló hatásáról számoltak be (Amar et al. 2007). A kutatások kiterjedtek az embriók szinkronizálására is. Több növénynél sikerült elérni szinkronizált embriogenezist, ilyenek például a kőris (Tonon et al. 2001), a szója (Kim et al. 2004) vagy a sárgarépa (Fujimura és Komamine, 1979.). Szőlő esetében még nem sikerült szinkronizálni az embriófejlődést (Jayasankar et al. 1999; Colova, 2007). Bár az eredmények biztatóak, de még nem tekinthető teljesen megoldottnak a szinkronizált embriogenezis megvalósítása. Egyes tanulmányok kiterjedtek az anatómiára és morfológiára is (Jayasankar et al. 1999, 2003), ezek a munkák említést tesznek az embriók fejlődési állapotainak nagyfokú heterogenitásáról, az embriók

méretbeli eltéréseiről valamint feltételezik az embriók nyugalmi állapotát is. Ezzel szemben eltérő eredményeket értek el Amar és munkatársai, akik közel azonos fejlettségű embriókról számoltak be nyugalmi időszak nélkül (Amar et al. 2007).

4.5. *In vitro* mutáció és szelekció

Az örökítő anyagban történő mutáció mind az állatok mind pedig a növények esetében az új variációk megjelenésének egyik alapvető forrása. Hatásuk a letálistól az új tulajdonságok megjelenéséig terjedhet. Számos mutáció nem jelenik meg a fenotípus szintjén, míg néhány jelentős változásokat okozhat. Ilyen lehet például az anyagcsere enzimjeinek sérülése mutáció révén. Ezek a mutációk a növényélettanban jelentenek fontos kutatási alapot az egyes biokémiai utak felderítésében. A mutánsok felhasználása élettani, alapkutatási szempontból is fontos lehet. A nemesítés is felhasználja a mutációval előállított variánsokat. Ha nem is sikerül közvetlenül konkrét fajtát előállítani, akkor a nemesítési alapanyagok bővítésére használhatják fel (Tóth és Bódi, 2006).

A mutáció fajtái lehetnek: spontán a természetes folyamatok által előidézett vagy indukált. A mutáció eredményeként megjelenő nem letális tulajdonság lehet domináns vagy recesszív. A testi sejtek genetikai állományában bekövetkező változás során szomatikus, míg az ivarsejtek genetikai állományának módosulása esetén gametikus mutációról beszélhetünk. A mutáció típusai szerint beszélhetünk kromoszóma szerkezeti és számbeli mutációkról vagy csak egy bázispárt érintő változásról, a pontmutációról. A pontmutációnak két változata van, mely lehet tranzíció vagy transzverzió.

A pontmutáció fehérje szintjén bekövetkező fajtái:

- Silent - „csendes” mutáció. A tripletben bekövetkező bázisváltozás mely nem eredményez új aminosavat.
- Neutral – új aminosav épül be a fehérjébe, de a fehérje funkcióját észrevehetően nem módosítja.
- Missense – megváltozott értelmű, a beépült új aminosav a fehérje funkcióvesztésével vagy módosulásával jár.
- Nonsense – „értelmetlen” általában stop kodon keletkezik, ezért a fehérje elveszti funkcióját az idő előtti elongáció leállítása miatt.

- Frameshift – kereteltolódás, egy vagy két bázis kiesése vagy beépülése révén módosulnak a tripletek, melynek eredményeként teljesen új aminosav sorrend keletkezik.

A mutációtól elválaszthatatlan a reverzió folyamata, vagyis a back mutáció. Ilyenkor a megváltozott DNS szekvencia visszaáll úgy, hogy ismét az eredeti funkciója áll helyre a fehérjének, ennek két típusát ismerjük. Az egyik az exakt reverzió, melynek eredményeképpen DNS szinten is visszaáll az eredeti állapot. A másik reverziós folyamat az ekvivalens reverzió mely során, DNS szinten nem, csak funkciójában áll vissza az eredeti állapot. A reverzió mellett van még egy másik vad fenotípust visszaállító módosulás. Ez a szupresszor mutáció. Ez csak közvetett visszaalakulást jelent. A második mutáció a genomban máshol következik be, ami elnyomja az elsődleges mutáció hatását. Két típusa ismert az, intragénikus szupresszor mutációk - génen belül bekövetkező második mutáció melynek eredménye az eredeti funkció helyreállása - és az extragénikus szupresszor mutáció – génen kívüli mutációk eredményeképpen helyreálló eredeti funkció (Sutka, J. 2004).

Kromoszóma szerkezeti változások és mutáció típusaik:

- Delécio – a kromoszóma kisebb-nagyobb szegmentumának elvesztése.
- Duplikáció – a kromoszóma kisebb-nagyobb szegmentumának megkettőződése.
- Inverzió – a kromoszóma kisebb-nagyobb szegmentumának fordított sorrendben történő újbóli beépülése.
- Transzlokáció – két nem homológ kromoszóma között történő szegmentum-áthelyeződés
- Transzpozíció – a kromoszóma vagy DNS kisebb-nagyobb szegmentumának intra- vagy interkromoszómás kivágódása, beékelődése, inszerciója.

Kromoszóma számbeli változások során két fő csoportot különítünk el. Az egyik csoport az euploidia (a poliploid kromoszómaszáma az alap kromoszómaszám egész számú többszöröse). Az euploidia további két csoportra osztható. Az autopoliploidia, mely során a homológ genom sokszorozódik. Eredménye a diploid, triploid, tetraploid, pentaploid, hexaploid, oktaploid genom. Az euploidia másik változata az allopoliploidia – kettő vagy több faj genomja található meg egy növényegyeden belül (pl.: hexaploid búza). A másik csoport az aneuploidia, mely során csak egyes kromoszómák esetében változik a kromoszómaszám, vagyis az aneuploidok nem a kromoszóma alapszám egész számú többszörösét hordozzák. Eredményezhet nulliszóm, monoszóm, triszóm és tetraszóm állapotot (Velich, I. 2001).

A mutáció bekövetkezhet spontán módon valamint indukálhatók is. Mutációk előidézése számos módon történhet, például kémiai vagy fizikai mutagének alkalmazásával (1. táblázat).

1. táblázat *In vitro* indukált mutagenézishez alkalmazható kémiai és fizikai mutagének.

A	Kémiai mutagének	fizikiai mutagének
	• alkiláló szerek (mustárgáz, EMS, EI, NEK, EMK) • bázis analógok (5BU, 2AP) • salátromossav • akridinfestékek (proflavin, akridin narancs, ICR 191)	ionizáló besugárzás: • elektromágneses sugárzás (röntgen, X-sugarak és kozmikus sugarak) • korpuszkuláris sugárzások (béta és alfa részecskék, protonok, neutronok) • ultraibolya sugárzás

mutagén ágensek alkalmazásának egyik oka, hogy jelentősen emelik a mutációs rátát, így nagyobb esély van a populációban mutánsok szelektálására (Dudits és Heszky, 2003). A mutáció gyakoriságát a mutációs rátával fejezzük ki. A mutációs ráta megadja, a mutációk számát génre és időegységre vetítve. Az egyes faktorok nem csak hatékonyságban térnek el egymástól, hanem az alkalmazásuk körülményességében és veszélyességében is. Az elmúlt 70 évben mintegy 2250 fajtát állítottak elő indukált mutagenézissel (Ahloowalia et al. 2004). A szőlőhöz hasonlóan vegetatívan szaporított növényeknél (szőlő, banán, ananász, burgonya) a munkák többségében valamely növényi rész kezelését végezték el: rügy, hajtásszegmens, hajtáscsúcs, levél (Predieri, 2001). Ezekben az esetekben viszont a mutánsok felnevelését követően a kimérák magas számával kell számolni, mivel a regeneránsok nem egy sejtől származnak. Ennek egyetlen elkerülési lehetősége protoplaszt kultúrák használata vagy sejtszuspenziók mutációja, ahol szomatikus embriogenezisen keresztül van lehetőség növényt regenerálni, mert itt az embriók egyetlen sejtől fejlődnek (Ahloowalia és Maluszynski, 2001; Mba et al. 2009).

A sejtenyészeteknél kihasználható a szomaklonális variabilitás jelensége, ami a spontán mutációk eredménye. A növények különféle szomatikus (testi) szöveteiből létesített *in vitro* kultúrákból (kallusz, sejtszuspenzió, protoplaszt) regenerált növények között kimutatható különbségeket nevezzük szomaklonális variabilitásnak (Larkin és Scowcroft, 1981). Maga az *in vitro* tenyésztés is felfogható mutagén kezelésként. A szintetikus növekedésserkentők alkalmazása, a de- és redifferenciálódás folyamata mind-mind növelik a tenyészetben a variabilitás mértékét (Dudits és Heszky, 2003). Nem létezik egy jól körülírható mechanizmus vagy faktor, amely a szomaklonális variabilitás egyedüli kiváltója lenne. Feltételezhetően több tényező együttes megléte szükséges a szomaklon sejtek felszaporodásához. Ilyen faktorok lehetnek még a tenyészetek kora,

valamint a genotípus. A passzálások számával ugyanis nő a variabilitás mértéke ezekben a kultúrákban (Jain, 2001). Szabadföldön a teljes növények szintjén végzett mutánsizolálással szemben az *in vitro* módszer egyik legnagyobb előnye, hogy lehetőséget ad hatékony szelekciós nyomás alkalmazására. A táptalajhoz adagolt szelekciós ágensek többfélék lehetnek. Leggyakoribbak szárazságstressz esetén a PEG vagy mannitol, sótűrés esetén a NaCl vagy tengervíz (Rai et al. 2011). Oxidatív stresszre akár paraquat táptalajhoz történő adagolásával (Bittsánszky et al. 2009) lehet szelektálni, vagy akár megnövekedett alumínium tolerancia érhető el AlCl_3 adagolásával (Zhu et al. 2003.).

Az *in vitro* mutagenézis (vagy akár a tenyészetekben már meglévő szomaklonális variabilitást felhasználva) alkalmazása sejttenyészetek esetén korlátozottan használható. Olyan tulajdonságokra, mint a termésátlag vagy a tenyészidő hossza, nem tudunk szelektálni. A korlátozás abból adódik, hogy csak a dedifferenciálódott, aktívan osztódó tenyészetekben, elsősorban alapvető sejtfunciókat érintő mutációk szelektálhatóak, vagyis csak a sejtszinten megjelenő tulajdonságokat tudjuk felhasználni a szelekció során, például rezisztencia herbicidekkel szemben vagy különböző biotikus és abiotikus stressz hatásokra. Az így szelektált rezisztens sejt/sejtek esetén is előfordulhat azonban, hogy az előnyösnek mutatkozó tulajdonság az egyed szintjén már nem jelenik meg. Mindezen negatívumok ellenére egy nagy előnye mégis van a módszernek, hogy elviekben minden egyes sejtből lehetséges intakt növényt regenerálni, ezért egy időben hatalmas populációval tudunk dolgozni szelekciós nyomás alatt. Egy másik nem elhanyagolható szempont, hogy a munkánk nagyrészt függetleníthető az évszakoktól is. A szelekció kivitelezése során alkalmazhatunk közvetlen vagy közvetett szelekciót, attól függően, hogy a mutáns vagy a vad típusra folyik a szelekció. A szelekciós ágenszt adagolhatjuk fokozatosan emelkedő koncentrációban - így az átmeneti érzékenységet mutató sejteknek esélyt adva a túlélésre - vagy a szelekció kezdetétől magas koncentrációban, valamint időszakonként meg is lehet szakítani azt rövidebb periódusokra (Rai et al. 2011).

5. ANYAG és MÓDSZER

5.1. Embriogén kallusz indukció

Az embriogén kallusz kultúrák indításához szükséges szőlővesszőket a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Intézet Szőlőnemesítési és Génmegőrzési Tanszékének vezetőjétől Dr. Kozma Páltól, valamint a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet tudományos főmunkatársától, Dr. Szegedi Ernőtől kaptuk. Embriogén kallusz indukciót 8 fajta több klónjának portok kultúráján kíséreltünk meg: a 'T5.C', 'T5C GM6', 'Richter 110', 'Georgikon 28', 'Rajnai rizling', 'SO4', 'Hárslevelű p47', 'Hárslevelű p41', 'Hárslevelű p22', 'Furmint p41' és 'Furmint p19'. Az embriogén kallusz előállításához 2 különböző táptalajt: MSE (Mozsár és Viczián, 1996) és az MST (Oláh et al. 2003)-t használtuk. MSE táptalaj egy MS alapú táptalaj 20g/l szacharózzal, 1,1mg/l 2,4-D-vel és 0,1mg/l BAP-nal kiegészítve, míg MST táptalaj esetén a BAP-t 0,05mg/l thidiazuronnal helyettesítettük. Az embriogén kultúra indításához szükséges portokokat üvegházban hajtattott szőlővesszők zárt virágzatából nyertük. A téli nyugalmi időszakban szedett vesszőket (melyeket a felhasználásig üvegházban, nejlonzsákban tároltunk) 2 rügyes dugványokra vágtunk fel. A felvágást követően gombaölőszeres készítményt tartalmazó vízben egy órán át áztattuk a dugványokat. Az áztatást követően egy literes perlittel megtöltött faiskolai konténerbe kerültek. Egy konténerbe 3 dugványt helyeztünk el. A konténereket csapvízzel nedvesítettük. A kihajtást követően, mely 2-3 hét után következett be hetente eltávolításra kerültek a levelek. A növény fotoszintetikus apparátusától részlegesen megfosztva arra kényszerítettük, hogy a kihajtott virágzatot használja fel a fotoszintézishez, így elérhettük, hogy nem rúgta el a virágzatokat. Üvegházban az indítást követően kb. az 5. hét közepére érik el a virágzatok a megfelelő stádiumot. Embriogén kallusz indukciójához alkalmas portokok 0,1-0,5mm hosszúak, fehér/áttetsző színűek, a virágzatok még nem nyíltak fel. A virágzatokat leszedésük után 4 napig 4°C-on történő hidegkezelésnek vetjük alá petricsészében nedves szűrőpapíron. A portokok kipreparálása előtt fertőtlenítettük a virágzatokat 10% NaOCl oldatban nedvesítőszer (Twin-20) mellett. Ezt követően háromszori 10 perces steril desztillált vizes öblítést alkalmaztunk. A már steril, de felhasználásra rögtön nem kerülő virágzatrészeket steril desztillált vízzel nedvesítve petricsészébe helyeztük a további tárolásra. A portokok kipreparálása a virágokból sztereomikroszkóp alatt, általunk átalakított lándzsátű és csipesz segítségével történt. Törekedtünk a portokok portoknyéllel együtt történő táptalajra helyezésére. Tapasztalataink valamint a szakirodalom alapján ez fokozza az embriogén jellegű kalluszosodás mértékét. Minden egyes petricsészébe 40 db portok került lerakásra. A portokokkal feltöltött petricsészéket a továbbiakban

23°C-on sötétben tároltuk. Az inkubáció végén a megjelent embriogén kalluszokat friss táptalajra passzáltuk át. Az embriogén kultúrák fenntartását havonkénti passzálassal végezzük.

5.2. Eltérő összetételű táptalajok hatása a sejtszuszpenziók friss tömeg gyarapodására

A Tanszéken rendelkezésünkre álló 'Chardonnay' fajta embriogén kalluszával elindítottunk egy táptalaj összehasonlító kísérletet. Célunk volt a laborkörülményeik között legnagyobb friss tömeg gyarapodást biztosító táptalaj megtalálása. Az embriogén sejtszuszpenziók létesítésére és a kallusz friss tömeg gyarapodására 8 különféle táptalaj hatását vizsgáltuk (2. táblázat). MSM (Murashige and Skoog, 1962), CP (Duchefa Biochemie) (Chée and Pool, 1987) valamint MSB (Gamborg B5 makroelemek, Murashige and Skoog mikroelemek és vitamin) (Gamborg et al. 1968). A táptalajokat különböző növekedésszabályozókkal 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, 2-naphtoxy-ecetsav valamint szénforrással egészítettük ki (maltóz, szacharóz). 30 ml embriogén sejtszuszpenzió indításához 0,3g kalluszt használtunk fel. A táptalaj részleges cseréjét hetente végeztük, a táptalaj 1/3-ad részének eltávolítása után a denzitást friss táptalajjal 1g/100ml-re állítottuk be. A kultúrákat síkrázógépen 120 fordulat/perc mellett 25°C-on sötétben tartottuk. 3-3 ismétlést végeztünk, a friss tömeg gyarapodást minden héten feljegyeztük.

2. táblázat Táptalaj összehasonlító kísérlethez felhasznált táptalajok növekedésszabályozói és szénforrásai.

táptalaj	növekedésszabályozó	szénforrás
MSM1	1 mg/l NOA	18 g/l maltóz
MSM2	1 mg/l 2-4 D	20 g/l szacharóz
CP1	1 mg/l 2-4 D	18 g/l maltóz
CP2	1 mg/l NOA	18 g/l maltóz
MSB1	1 mg/l 2-4 D	60 g/l szacharóz
MSB2	1 mg/l NOA	18 g/l maltóz
MSB3	1 mg/l 2-4 D	18 g/l maltóz
MSB4	1 mg/l 2-4 D	20 g/l szacharóz

5.3. Eltérő pH-jú táptalajok hatása a sejt kultúrák friss tömeg gyarapodására, valamint a kultúrák pH-jára

Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a kultúrák aktívan képesek megváltoztatni a táptalaj pH értékét. Kíváncsiak voltunk, hogy a táptalaj eltérő pH-ja ehhez mennyiben járulhat hozzá. 'Richter 110' alany fajta esetében vizsgáltuk, hogy azonos fenntartási körülmények között 300mg kallusz/30ml táptalaj, hetenkénti táptalajcsere az elhasznált táptalaj 1/3-ad részének eltávolítása, majd friss táptalajjal a kezdeti denzitás beállítása mellett, a táptalaj eltérő pH-jának milyen hatása van a kultúrák friss tömeg gyarapodására, valamint a kultúrák pH-jára.

Négy különböző táptalajt hatását vizsgáltunk: a pH-t 5,8-ra, 4,6-ra valamint 4,3-ra állítottuk be a táptalaj autoklávozása előtt citromsavval. Az 5,8-4,3 táptalaj esetén a pH-t autoklávozás előtt 5,8-ra majd autoklávozás után steril citromsavval 4,3-ra állítottuk be. Mind a 4 esetben 3-3 ismétlést végeztünk. Mind a kultúrák friss tömegét, mind a pH-t 6 héten keresztül minden héten mértük.

5.4. Táptalajcsere optimalizálása, sejtaggregátum típusok azonosítása

Miután kiválasztottuk a számunkra megfelelő táptalajt a következő lépés a táptalajcsere módjának optimalizálása volt. Erre azért volt szükség, mert az irodalomban egymástól igen eltérő fenntartási módokat találtunk. Eltéréseket találtunk a különböző munkák esetében az alkalmazott denzitásban, a táptalaj cserélésének intenzitásában (hetente, kéthetente), a friss és használt táptalaj arányában. Célul tűztük ki, ezen módszereknél hatékonyabb vagy kevesebb munkaerő ráfordítást igénylő eljárás kidolgozását. Kísérletünkben a 'Richter 110' fajta kalluszát használtuk fel MSM1 táptalajon. 6 különböző módszert vizsgáltunk egyszerre. Minden héten megmértük a szuszpenziók friss tömeg gyarapodását, valamint a kultúrák pH-ját is. A kultúrák létesítéséhez mind a 6 típus esetén 120ml-es Erlenmeyer lombikokat használtunk, típusonként 5 ismétléssel. Minden lombikba 30ml friss táptalaj került. Egyes típusok esetén eltérő kallusz tömeggel indultunk. A táptalajcsere gyakorisága minden változatnál egy hét volt. 5 héten keresztül folytattuk méréseinket.

A táptalajcsere alábbi változatait alkalmaztuk:

- I. Lombikonként **300mg** a kiinduló kallusz tömege. A táptalajcsere módja: minden héten a **régi táptalaj 1/3-át eltávolítottuk** és a denzitást beállítottuk friss táptalaj hozzáadásával **1g/100ml-re**.
- II. Lombikonként **150mg** a kiinduló kallusz tömege. A táptalajcsere módja: minden héten a **régi táptalaj 1/3-át eltávolítottuk** és a denzitást beállítottuk friss táptalaj hozzáadásával **0,5g/100ml-re**.
- III. Lombikonként **600mg** a kiinduló kallusz tömege. A táptalajcsere módja: minden héten a **régi táptalaj 1/3-át eltávolítottuk** és a denzitást beállítottuk friss táptalaj hozzáadásával **2g/100ml-re**.
- IV. Lombikonként **300mg** a kiinduló kallusz tömege. A táptalajcsere módja: minden héten a denzitást beállítottuk **friss táptalaj hozzáadásával 1g/100ml-re**.
- V. Lombikonként **300mg** a kiinduló kallusz tömege. A táptalajcsere módja: minden héten **megdupláztuk a táptalaj térfogatát**.
- VI. Lombikonként **300mg** a kiinduló kallusz tömege. A táptalajcsere módja: minden héten a **régi táptalaj 1/2-ét eltávolítottuk** és friss táptalaj hozzáadásával kiegészítettük a kiindulási 30ml-re.

A táptalajok pH-ját az eltávolításra kerülő részből határoztuk meg, így a IV. és V. változatnál nem tudtuk az eljárás miatt minden héten mérni a pH-t, mivel az a kultúrák fenntartásának megváltoztatásával járt volna. Itt csak a kezdeti és az 5. hét eredményei állnak rendelkezésünkre. A másik négy eljárásnál hetente rögzítettük a pH alakulását. A pH-át azért követtük nyomon, mert kíváncsiak voltunk lehet-e összefüggést találni a pH alakulása és a tömeggyarapodás, illetve a sejtuszpenziók morfológiája között és a kultúrák képesek-e aktívan befolyásolni azt.

Táptalajcsere hetenkénti kivitelezését az alábbi lépésekben végeztük:

1. A kallusz kinyerése. Erlenmeyerre helyezett saját gyártmányú rozsdamentes steril szűrőre fektetett steril Miracloth (Calbiochem) szűrőn átfolyattuk a szuszpenziókat automata pipettor segítségével.
2. A kallusz zárható steril centrifugacsőbe helyezése és a tömegének lemérése. A centrifugacsöveket előzetesen feliratoztuk és lemértük a tömegüket.
3. Ezt követően visszamértük a régi táptalaj térfogatát és meghatároztuk az eltávolítandó mennyiséget.
4. A kallusz tömege alapján a fenntartási módnak megfelelő végtérfigat megállapítása.

5. A régi és friss táptalajból a végtérfogatnak megfelelő mennyiség kimérése és összeállítása.
6. A kallusz visszahelyezése a frissített táptalajba.
7. A centrifugacsőbe régi táptalaj helyezése a pH méréshez.

A különböző sejtaggregátum típusok elkülönítésére különböző a mikroszkópiában alkalmazott festékek vizsgálatát végeztük el: Lugol-oldat (kálium jodid vizes oldata), szafranin és a bázikus festékek közül a toluidinkéket hatását vizsgáltuk fénymikroszkóp alatt.

5.5. Fajta összehasonlító kísérlet

A táptalajcsere módjának optimalizálása után beállítottunk egy fajta összehasonlító kísérletet. Öt fajtaval dolgoztunk: 'Richter 110', 'Chardonnay', 'Furmint p14', 'Hárslevelű p22', 'Rajnai rizling'. Az összehasonlítás alapját a friss kallusz hetenkénti tömeg gyarapodása valamint a kultúrák pH-jának hetenkénti változása képezte. A vizsgálat során hetenkénti táptalajcserét végeztünk. Ekkor mértük a friss kallusz tömeget és a pH-át. A kiindulás során 125ml-es Erlenmeyer lombikot használtunk. Két hét után átkerültek 500ml-es Erlenmeyer lombikba a tenyészetek. Mind az öt fajtánál a kiindulási kallusz tömege 150mg volt. Ez 30ml MSM1 táptalajba került. 4-4 ismétlés esetén a hetenkénti táptalajcserénél a 0,5g/100ml denzitást állítottuk be. A tömeg és pH méréseket az előző pontban ismertettek alapján végeztük el.

5.6. Szomatikus embriogenezis indukciója

Az embriogén kallusz felszaporítása (proliferációja) és az indirekt szomatikus embriogenezis indukciója eltérő környezeti feltételeket igényel. Míg a proliferáció mesterséges növekedésszabályozók jelenlétében történik, addig a szomatikus embriogenezist hormonmentes táptalajon indukáljuk. A mesterséges auxinok megvonása mellett további fizikai paraméterek indukáló, illetve a szomatikus embriogenezis hatékonyságát befolyásoló hatásáról számoltak be. Ilyen paraméterek a továbbiakban alkalmazott alacsonyabb sejtsűrűség (denzitás), a táptalaj teljes/részleges hetenkénti cseréje, a táptalaj kiegészítése a kultúrákra nem toxikus pufferrel (pl. MES), aktívszén alkalmazása, a táptalaj különböző nitrogén forrásainak megváltoztatása, egyes esetekben növekedésszabályozók alkalmazása alacsony koncentrációban.

Elsőként 6 különböző táptalaj hatását vizsgáltuk (R1-R6) a szomatikus embriogenezis indukciójára (3. táblázat). A proliferáció során vizsgált sejtsűrűségek (5-20mg/ml) után csökkentett 1mg/ml denzitást alkalmaztunk 3-3 ismétlésben 50-50ml táptalajban, 5 héten keresztül a táptalaj

egészének hetenkénti friss táptalajra történő cseréje mellett. További kísérleteink során az 5. hetet követően újabb hígítást alkalmaztunk az eddig R3 táptalajon fenntartott kultúrák esetében további 3 hétig a táptalaj hetenkénti teljes cseréje mellett (1,2,4 és 10mg/ml denzitással), valamint 1mg/ml denzítés mellett R7 és R8 táptalajokon 3-3 ismétlésben. Az embriókat ezt követően minden esetben szilárd MSEM (1/2 MS hormonmentes MS táptalaj, 10g/l szacharóz, 1g/l aktív szén, 4,5 g/l agar, pH 5,8) táptalajra helyeztük (Oláh et al. 2003), Erlenmeyerenként 1-1 petricsészébe. Az R2 táptalaj esetén további hígítást alkalmaztunk (1mg/ml), majd 2 hetet követően a fejlődött embriók egy részét MSEM táptalajra helyeztük a regenerálódó képesség ellenőrzése céljából.

3. táblázat Szomatikus embriogenezis indukciójára felhasznált hormonmentes táptalajok. R1-R4 táptalajok 1/2MS hormonmentes táptalajok különböző kiegészítésekkel (MES, laktalbumin-hidrolizátum, autoklávozás után a pH 6-os értékre állítva). Az R5 táptalaj módosított MS táptalaj melyben az ammónium-nitrátot Na-nitrátra cserélték (Duchefa Biochemie), míg az R6 módosított MS (Finer és Nagasawa) táptalaj melyben a KNO₃ anyagmennyiségét 1,6-szorosára emelték, az ammónium-nitrát mennyiségét pedig a felére csökkentették (Duchefa Biochemie). Az R7 táptalaj 1/2 MSM1 táptalaj 1g/l aktív szén kiegészítéssel, míg az R8 táptalaj MSM1 1g/l aktív szénnel kiegészítve.

	Hormonmentes táptalaj
R1.	1/2 MSM1
R2.	1/2 MSM1 + 0,5 gr/l MES
R3.	1/2 MSM1 + 1 g/l laktalbumin hidrolizátum
R4.	1/2 MSM1 pH=6
R5.	1/2 FN
R6.	1/2 NO5
R7.	1/2 MSM1 + 1g/l aktív szén
R8.	MSM1 + 1g/l aktív szén

R3 táptalajról MSEMCM táptalajra helyezett embriókat a lerakást követő 50. napon számoltuk le az alábbi módon: petricsészénként lemértük az összes embrió tömegét, majd külön-külön 4-szer 100 embrió tömegét. A 100 embrió átlagtömegének kiszámítását követően kiszámoltuk az embrió/petricsésze értékeket, majd ezeket kezelésként átlagolva határoztuk meg kezelésként és denzitásonként az átlagos embrió/petricsésze értékeket, melyekből meghatároztuk a regenerációs rendszerek hatékonyságát.

5.7. *In vitro* mutagenesis

Indukált mutációk kiváltására választásunk a neutron besugárzásra esett. A Központi Fizikai Kutatóintézet kutató reaktorában a besugárzásokat Pálfalvi József végezte. A sugáregység

mértékegysége a gray (Gy). 1 gray az a sugárdózis, amelyet 1kg tömegű anyag nyel el, ha vele állandó intenzitású ionizáló sugárzás után 1 Joule energiát közölnek. Az alkalmazott dózis mértéke erősen függ a besugárzandó növényi résztől. Egy hajtásszegmens vagy mag jóval magasabb dózist igényel (akár 700 Gy), mint például az embriogén kallusz kultúrák. Pálfalvi József ajánlására mi a 0-5,78 Gy közötti tartomány mellett döntöttünk 8 különböző dózissal (4. táblázat). Ez a dózis megegyezik az irodalomban található kallusz kultúrákra ajánlott 2-5 Gy értékkel (Ahloowalia és Maluszynski, 2001). A besugárzást szilárd táptalajon fenntartott 'Richter 110' embriogén kallusz kultúrákkal végeztük, dózisonként 3-3 ismétléssel. A besugárzott kalluszok 2 hónapos szilárd táptalajon történő fenntartása után indítottunk folyadékkultúrákat 3-3 ismétléssel 300mg kallusszal (0,5g/100ml denzitás, hetenkénti táptalaj csere). Az 5 hetes proliferációs szakaszt követően elkezdtük a kultúrákból a növényregenerációt R3 táptalajon, mely munkák jelenleg is zajlanak.

4. táblázat 'Richter 110' embriogén kallusz kultúrák neutron besugárzásához alkalmazott dózis értékek, a besugárzások hossza és az alkalmazott ciklusszám.

sorszám	besugárzási idő ('perc, " másodperc)	ciklus szám	Dózis (Gy)
1.	40'	238	5,78
2.	21' 5"	124	3
3.	14' 10"	82	2
4.	10' 42"	62	1,5
5.	7' 15"	41	1
6.	5' 31"	31	0,75
7.	3' 48"	20	0,5
8.	2' 25"	11	0,3

5.8. *In vitro* szelekció

A különböző *in vitro* kultúrákban alkalmazható szelekciós módszerek közül választásunk elsőként a szárazságstressz stimulálására alkalmas polietilén glikolra (PEG) esett. A PEG nagy molekulatömegű, nem toxikus inert ozmotikum, mely a vízpotenciál csökkentése révén a koncentráció függvényében megnehezíti a sejtek vízfelvételét, ezáltal szárazságstresszt idéz elő. A

0-30 tömeg %-ban a táptalajhoz adagolt PEG-6000 (0, 1, 3, 5, 10, 20 és 30%) hatását vizsgáltuk 'Richter 110' embriogén sejtszuszpenziók friss tömeg gyarapodására 6 héten keresztül 3-3 ismétlésben 300mg kallusszal (0,5g/100ml denzitás, hetenkénti táptalaj csere). Ezt követően elkezdjük a növényregenerációt R3 táptalajon, mely kísérletek jelenleg is tartanak.

6. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. Embriogén kallusz indukció

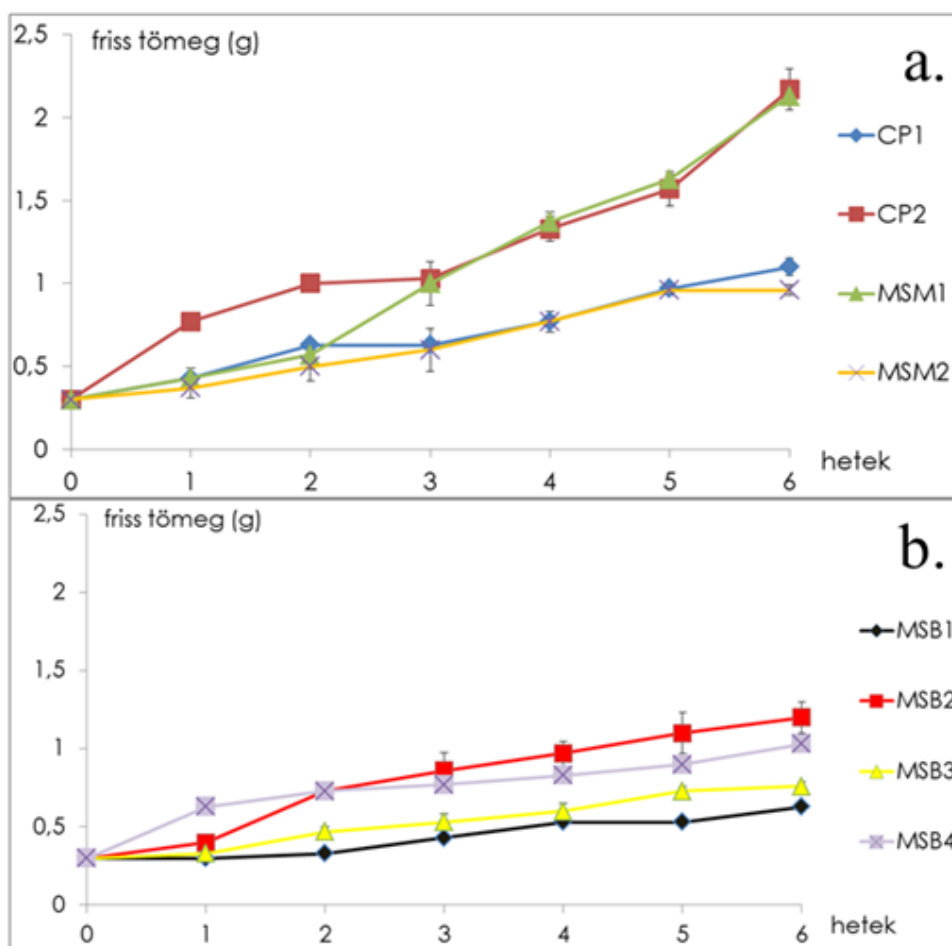
A Tanszéken eddig vizsgált fajták mellett további fajtákból létesítettünk sikeresen embriogén kallusz kultúrákat (5. táblázat). Nem sikerült embriogén kallusz kultúrát indítanunk az alany fajták közül: 'T5C', 'T5C GM6', 'Georgikon 28' és 'SO4' esetében, valamint a nemes fajták közül 'Hárslevelű p22' és 'Furmint p19' klónok esetében. Eddigi tapasztalataink alapján további kutatásokra lenne szükség az embriogén kallusz indukciójának optimalizációjához, melyre ezen a dolgozat keretein belül nem volt lehetőségünk idő hiányában.

5. táblázat Embriogén kallusz indukciójához felhasznált fajták, táptalajok és az izolált portokok száma.

Fajta	MSE táptalaj (portokok száma)	MST táptalaj (portokok száma)	Embriogén kallusz
'T5C'	1280	360	-
'T5C GM6'	1200	160	-
'Richter 110'	5280	140	+
'Georgikon 28'	1680	560	-
'SO4'	1320	240	-
'Hárslevelű p47'	520	280	+
'Hárslevelű p41'	360	160	+
'Hárslevelű p22'	1480	360	-
'Furmint p41'	920	360	+
'Furmint p19'	200	80	-
'Rajnairizling'	2520	400	+

6.2. Eltérő összetételű táptalajok hatása a sejtszuspenziók friss tömeg gyarapodására

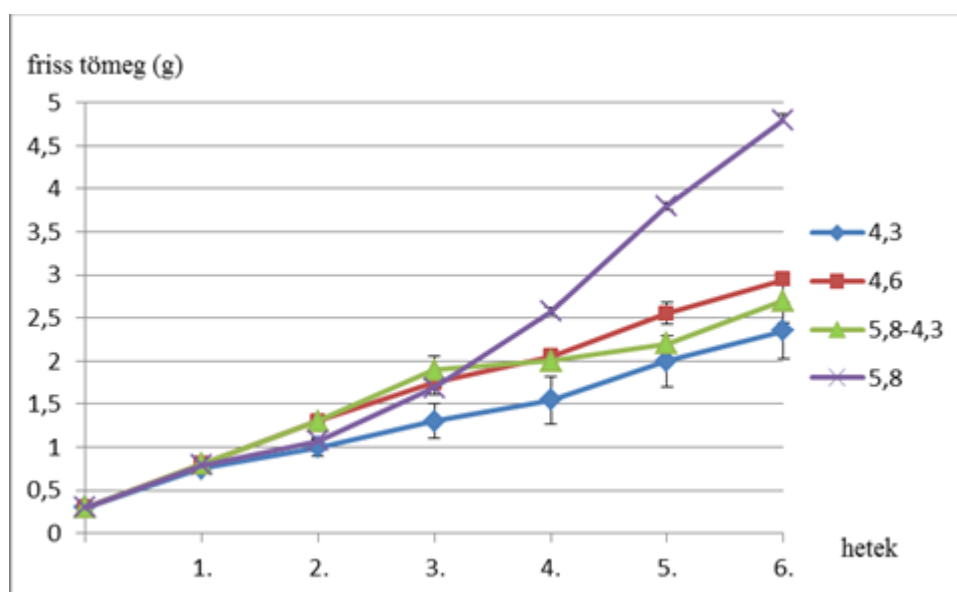
A legnagyobb friss tömeg gyarapodást MSM1 és CP2 táptalajok esetén tapasztaltunk (5. ábra), amikor szénhidrátforrásként maltózt (18 g/l), növekedésszabályozóként pedig NOA-t (1mg/l) használtunk. Ezen táptalajok esetén a friss tömeg gyarapodás a 6. hét végére duplája volt a többi táptalaj esetén mért értékeknek (5.ábra). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az embriogén kallusz indukciójához alkalmazott szilárd MS alapú táptalajoktól a folyadékkultúrákban a továbbiakban sem lehet eltérni (melyet különböző Nitsch és Nitsch alaptáptalajjal végzett előkísérleteink is megerősítettek ahol a kultúrák a 3. hétre elbarnultak, majd elpusztultak). Ennek feltételezhető oka a különböző táptalajok eltérő sókoncentrációjában (mikro- makroelemek) és vitamin összetételében, valamint a táptalaj váltáskor ezen okokból fellépő stresszhatásokban keresendő. Az MSM1 és CP2 táptalajok hasonlóan jó eredménye (5/a ábra) feltételezhetően az azonos típusú és koncentrációjú növekedésszabályozó és szénhidrátforrás mellett az MS és CP táptalajok hasonló összetételének is köszönhető.



5. ábra Eltérő összetételű táptalajok hatása 'Chardonnay' embriogén sejtszuspenziók friss tömeg gyarapodására.

6.3. Elterő pH-jú táptalajok hatása a sejtkultúrák friss tömeg gyarapodására, valamint a kultúrák pH-jára

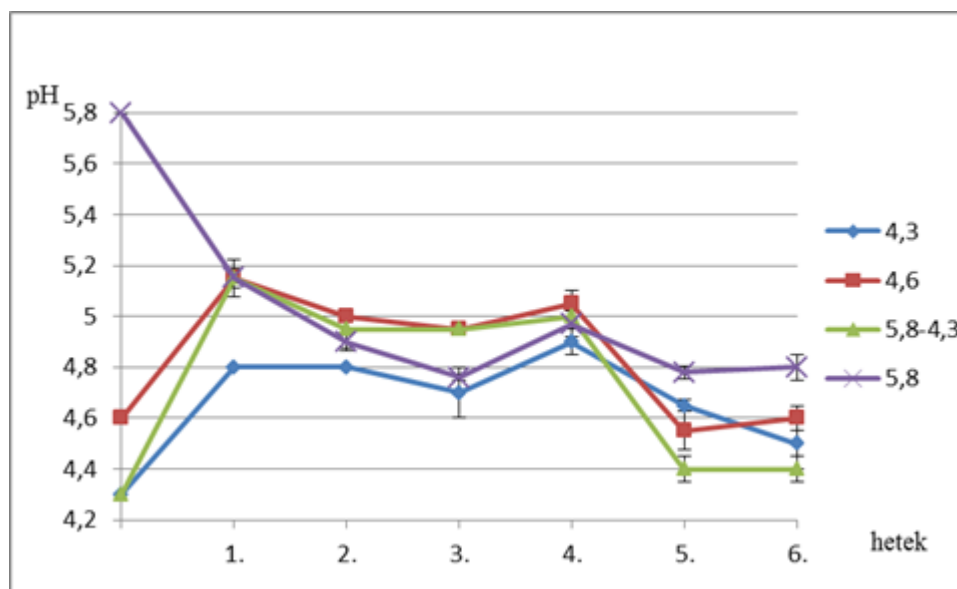
A 4 különböző táptalaj esetében az első 2 hétben a tömeg gyarapodásban nem tapasztaltunk jelentős különbségeket (6.ábra). A 3. héttől viszont a különböző táptalajok esetében mért értékek egyre jobban elkülönültek egymástól. A 3. héttől kezdve legalacsonyabb friss tömegeket a 4,3-as pH-jú táptalaj esetén mértünk ami a vizsgált periódus végéig meg is maradt. A 4. héttől kezdve az 5,8-as pH-jú táptalaj esetén a friss tömeg gyarapodásban drasztikus emelkedést tapasztaltunk, ami a 6. hétig meg is maradt. A friss tömeg közel kétszerese volt a 4,3-as pH-jú táptalaj esetében mért értékeknek. A 6. hét végére a 4,3, 4,6 és 5,8-4,3 táptalajok esetében a friss tömegek közel azonosan alakultak.



6. ábra Elterő pH-jú táptalajok hatása 'Richter 110' embriogén sejtszuszpenzió friss tömeg gyarapodására.

Az 5,8-as pH-jú táptalaj esetében a kultúrák pH-ja a 3. hétre 4,8-as értékre esett ami a következő heti enyhe emelkedést követően a következő 2 hétre állandósult is. Az 5. és 6. héten ez az érték mind a 3 másik táptalaj esetében alacsonyabb volt (4,4-4,6), ami a friss tömeg gyarapodásban is megmutatkozott. Az eredmények alapján összefüggés tapasztalható a táptalajok pH-ja és a sejtkultúrák friss tömeg gyarapodása, valamint azok pH-ja között. Meglepő módon a legmagasabb pH-jú táptalaj esetén mértük a legnagyobb tömeg gyarapodást és ebben az esetben volt a legmagasabb a vizsgált periódus végén a kultúrák pH-ja, ami így is a kiindulási érték alatt volt. Az 5,8-4,3 táptalaj esetén, ahol autoklávozás után állítottuk a pH-t 4,3-ra, az első hétre a

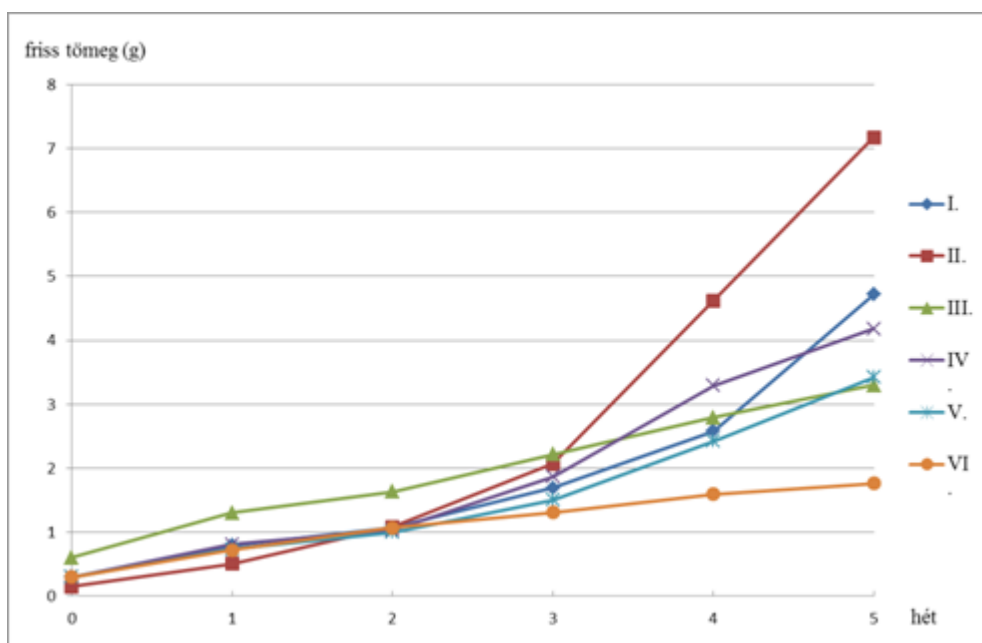
kultúrák pH-ja elérte az 5,2-t ami megegyezett az 5,8-as és 4-6-os táptalajok értékeivel. Az utóbbival a 4. hétig közel azonos, (pH 5) körüli értékeket követően az 5-6. hétre jelentősen (pH 4,4) csökkent a kultúrák pH-ja elérve a 4 táptalaj közötti legalacsonyabb értéket. Mind a 4 táptalaj esetében a 4. hetet követően a sejt kultúrák pH-jában jelentős csökkenést tapasztaltunk. A legkisebb esést a legmagasabb pH-jú táptalaj esetén mértük, ami ezzel párhuzamosan a legnagyobb friss tömeg gyarapodást is mutatta (7.ábra).



7. ábra 'Richter 110' sejtszuszpenziók pH-jának hetenkénti változása eltérő pH-jú táptalajok alkalmazásakor.

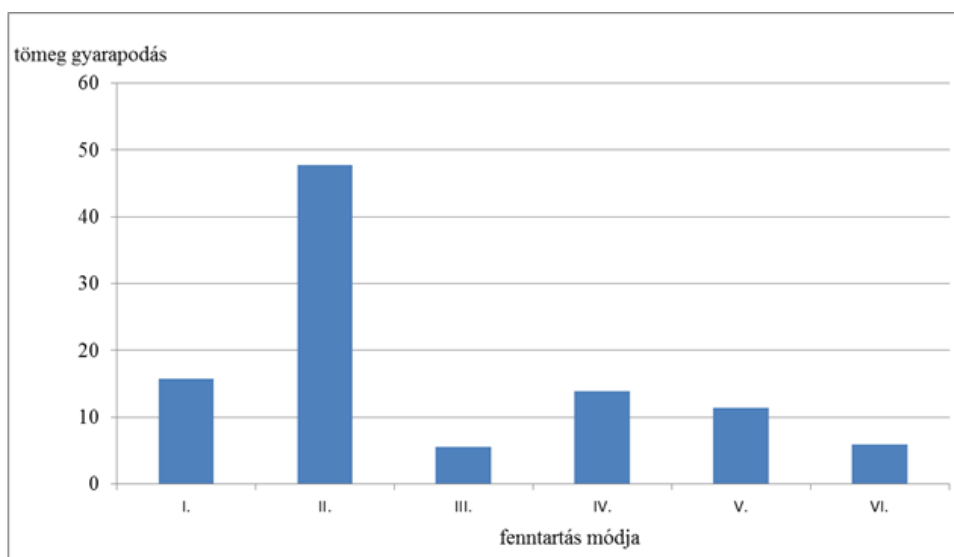
6.4. Táptalajcsere optimalizálása, sejtaggregátum típusok azonosítása

Az általunk választott fenntartási módok különböztek a hetenként alkalmazott denzitásban, (I-III.), a táptalaj csere módjában (IV. és V. esetben nem távolítottunk el használt táptalajt), illetve abban ,hogy nem állítottunk be hétről-hétre adott denzitást (V-VI.). A szakirodalomban minden esetre találhatunk példát. A legkisebb mértékű friss tömeg gyarapodást abban az esetben mértük, amikor hetenként csak a táptalaj felét cseréltük frissre (VI.). A 3. héttől kezdve a másik 5 fenntartási mód értékei jóval meghaladták ezen módszer értékeit. Feltételezzük, hogy a 2. héttől kezdve ezek a kultúrák „túl töményedtek”. A kezdeti 1g/100ml sűrűségről indulva ekkorra meghaladták a 3g/100ml-t és az 5. hétre megközelítették a 6g/100ml sűrűséget. Ezen módszer ellentéte az V. módszer, melynél a denzitástól függetlenül hétről-hétre megdupláztuk a térfogatot friss táptalajjal. Ebben az esetben kaptuk a 2. legalacsonyabb értéket. A kezdeti 1g/100ml-ről a 3. hétre a kultúrák 0,5g/100ml-re, az 5. hétre pedig 0,3g/100ml-re hígultak (8.ábra).



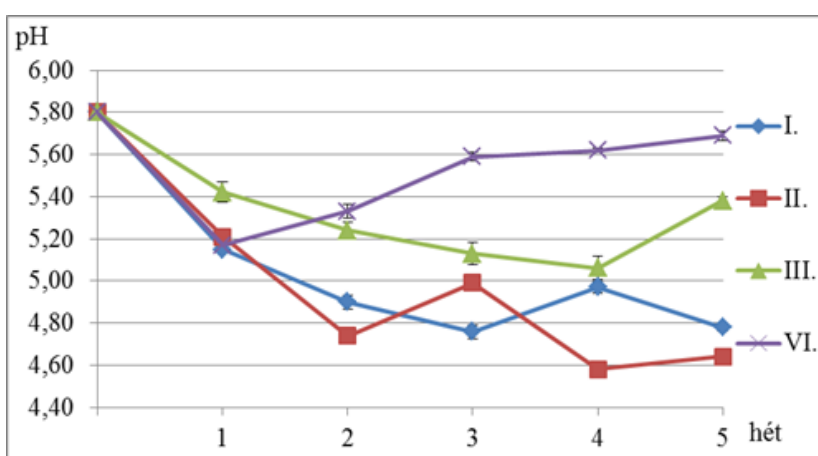
8. ábra Az eltérő fenntartási módok hatása 'Richter 110' embriogén sejtszuszpenziók friss tömeg gyarapodására a vizsgált 5 hét alatt.

Az eredmények alapján feltételezzük, hogy a sikeres sejtszuszpenziók fenntartásának egyik kulcsa a közel állandó denzitáshoz igazodó úgynevezett „dinamikus” fenntartási mód, melyet az első 4 esetben alkalmaztunk. A III. esetben alkalmazott legmagasabb 2g/100ml-es denzitás első 2 hétben magasnak tűnő eredményei a kultúrák nagyobb kezdeti sűrűségéből adódnak, mely eredményeket a következő hetekben a hígabb, dinamikusan fenntartott módszerek jóval felülmúltak. Ezek közül is a 3. héttől kezdve kiugró eredményt kaptunk a II. módszernél, ahol a legalacsonyabb 0,5g/100ml denzitást állítottunk be hétről-hétre és az 5. hét végére a kultúrák több mint 47-szeres friss tömeg gyarapodást mutattak a kiindulási héthez viszonyítva, ami több mint háromszorosa az I. és IV. (1g/100ml) eredményeinek és nyolcszorosa a VI. módszer eredményeinek (9.ábra).



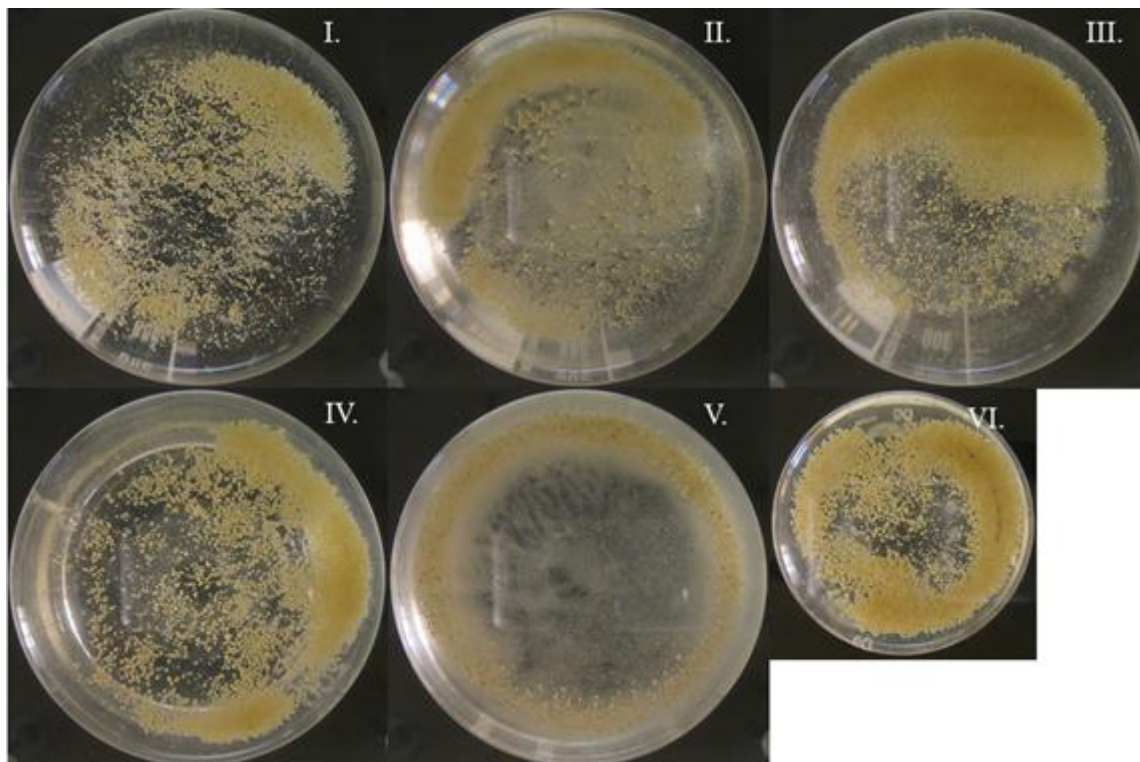
9. ábra Friss tömeg gyarapodás az 5. héten a kiindulási kallusz mennyiségekhez viszonyítva a 6 különböző fenntartási mód esetében. (I-VI magyarázat a szövegben.)

A IV. és V. módszer esetében nem állnak rendelkezésünkre hetenkénti pH adatok, az I./II./III. és VI. esetben viszont igen. Az 1. héttől kezdve a többi módszertől eltérően a VI. esetben a pH hétről-hétre fokozatosan emelkedett, ami az előzőekben bemutatott alacsony friss tömeg gyarapodási értékekkel arra utal, hogy a „túltöményedés” egyben a kultúrák pH-jának emelkedésével is jár, bár az ok-okozati összefüggést még nem sikerült tisztáznunk. A legnagyobb tömeg gyarapodást mutató módszereknél (I. és II.) a pH értéke az 5. hétre 4,6-4,8 közötti értékre állt be. Az I. esetben az utolsó héten 5-ről 4,8-ra eső pH változás mellett a friss tömeg gyarapodás közel kétszeres volt. A II. esetben a 3. hétről 4. hétre történő közel 0,4-es pH csökkenés (10.ábra) a friss tömeg közel 2,5-szeres növekedésével járt együtt (8.ábra).



10. ábra Elterő típusú fenntartás hatása a sejt kultúrák pH változására a létesítést követő 5. hétig.

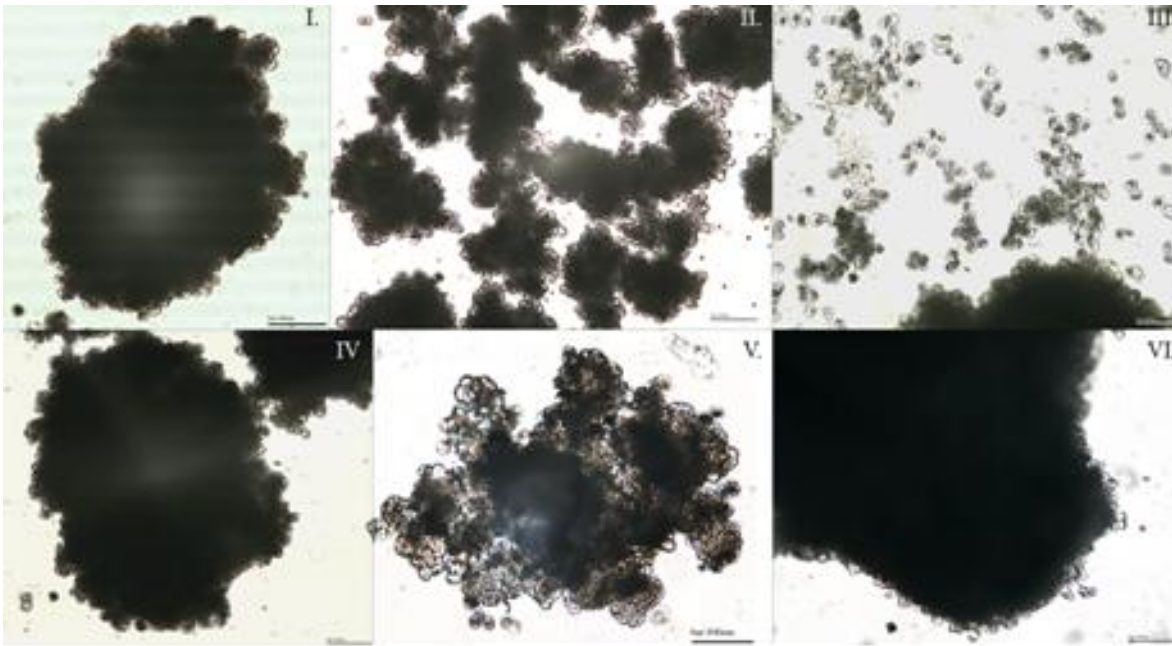
A friss tömeg gyarapodás, valamint a kultúrák eltérő pH-ja mellett morfológiai különbségeket is azonosítottunk a különböző fenntartási módszerek esetén (11.ábra). Az I. és IV. megegyező denzitású fenntartási mód esetén azonos aggregátum típusokat azonosítottunk. A II. és V. esetben a kultúrák szabad szemmel azonos elfinomodást mutattak, fénymikroszkóp alatt viszont a különböző típusú sejt aggregátumok jól elkülönültek. A II. esetben az I. és IV. típus esetén azonosított aggregátumokat találtunk viszont azok mérete jóval kisebb volt. Sötét, szabálytalan alakú felületükön jól elkülöníthető sejtekkel. Az V. esetben világosabb aggregátumokat kaptunk, melyek felületén proembriókra hasonlító kerekded kitüremkedések láthatóak (12.ábra). A III. esetben az aggregátumok mellett különböző alakú, morfológiájú különálló sejtek jelentek meg nagy számban. A VI. esetben az aggregátumok felülete lekerekített volt, felszínükön jól azonosíthatóan megnyúlt, pálcika alakú sejtek jelentek meg.



11. ábra I-VI. (a-f.) 'Richter 110' embriogén sejtuszpenziók az 5. héten. (Magyarázat a szövegben.)

A fenntartási mód hatása a friss tömeg gyarapodásra ismert jelenség, melyben kutató csoportonként eltérések tapasztalhatóak. Azon eredmények, mi szerint a fenntartási mód befolyásolja a sejtuszpenzió morfológiáját, vagyis egymásba átalakuló sejt aggregátum típusok különböztethetők meg, új tudományos eredménynek tekinthető, erre példát jelenlegi ismereteink

szerint a szakirodalomba nem találunk. A fenntartási mód befolyásolja a kultúrák morfológiáját, valamint a kultúrák pH-ját is. Az eltérő pH eredmények következhetnek az eltérő fenntartási módból közvetlenül, illetve elképzelhető, hogy az eltérő sejt aggregátumok anyagszere termékeinek az eredménye. A pH és fenntartási mód közötti összefüggésre nem találtunk példát az irodalomban. Hosszú fenntartású banán embriogén sejtszuszpenziók esetén a kultúrák korának növekedésével eredményeinkhez hasonló pH értékekről (Chung et al. 2006) számoltak be.



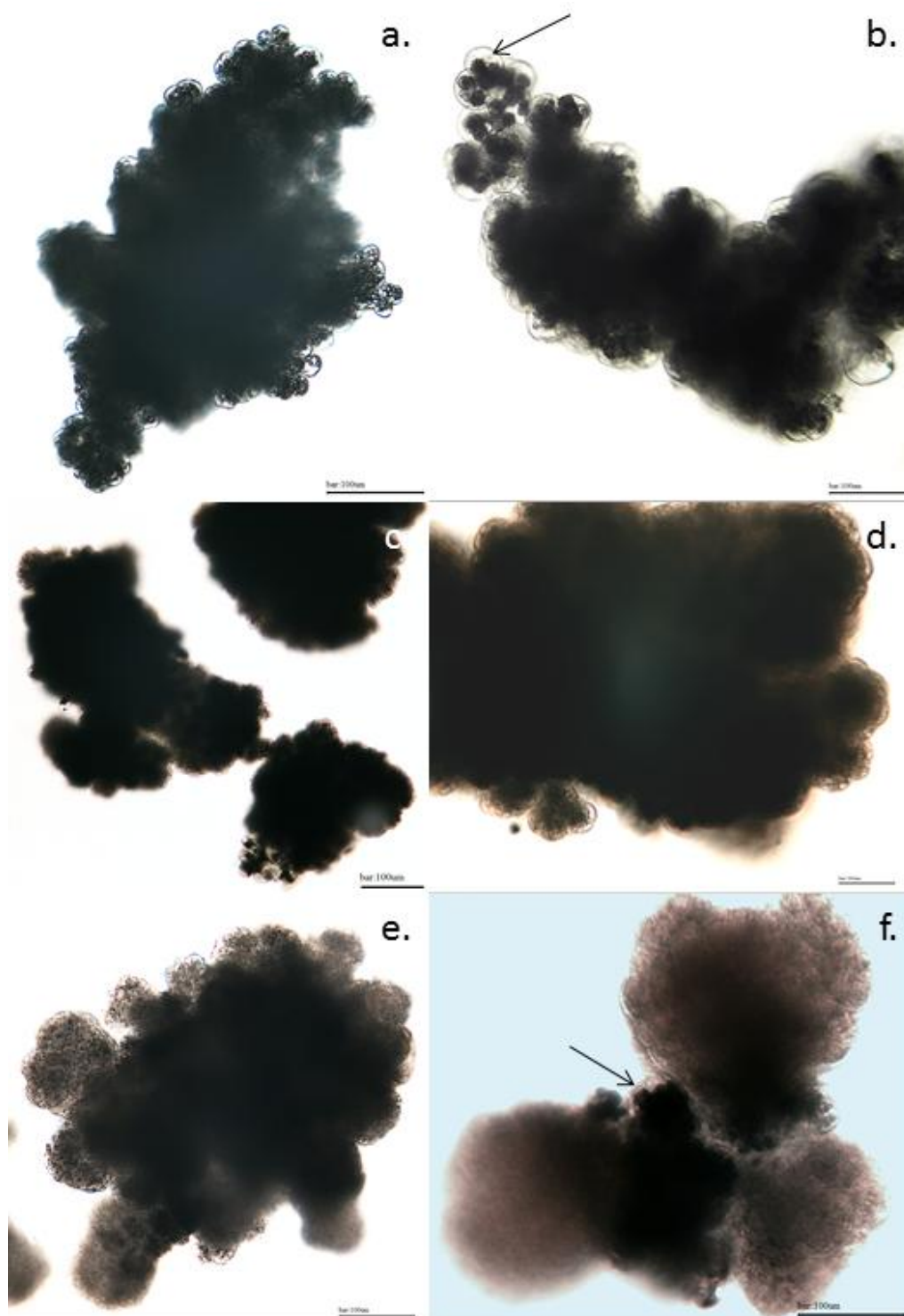
12. ábra Különböző sejtaggregátumok fénymikroszkóp alatti felvételei I-VI. fenntartású sejtszuszpenziókban.

A különböző festékek közül csak a Lugol-oldattal sikerült a sejtaggregátum típusok elkülönítése. 3 különböző típust sikerült azonosítanunk a sejtek keményítő tartalma alapján.

I-es típus: szabálytalan alakú sejtaggregátum. Az aggregátumok felszínén jól elkülöníthető gömbölyű különálló sejteket tartalmaz. A sejtekben nagy számban találhatóak kerek keményítő szemcsék, melyek a festés hatására sötét színreakciót adtak (13.ábra a, és b.).

II-es típus: az aggregátumok felszíne lekerekített, jól elkülönülő, különálló sejteket nem tartalmaz. Az aggregátumok felszínén megjelenő kezdeti globuláris képletek sejtes szerkezete nem kivehető, keményítő szemcsében gazdag sejteket nem tartalmaz. Az aggregátumok sötét színűek (12.ábra c, és d.).

III-as típus: Az aggregátumok felszínén nagyméretű, világos, egyértelmű globuláris struktúrák jelennek meg. Ezek a struktúrák a Lugol-oldat hatására nem festődnek, keményítő szemcsét tartalmazó sejteket nem tartalmaznak. Az aggregátumok központi magját erősen festődő keményítő szemcsét tartalmazó sejtek alkotják (13. ábra e, és f.).

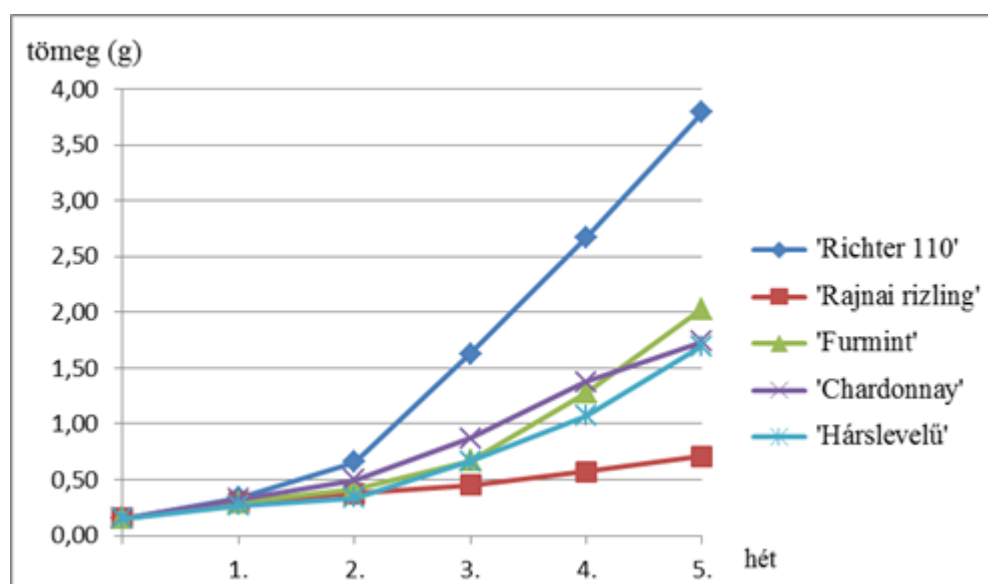


13. ábra Különböző típusú sejttaggregátumok fénymikroszkópos felvételei. I-es típus (a. és b.), II-es típus (c. és d.), III-as típus (e. és f.). b-f. Lugol-oldattal festve. Nyíl: keményítő szemcséket tartalmazó sejtek.

Jelenlegi ismereteink szerint szőlő embriogén sejtszuspenziókban, illetve szőlő embriogén kallusz kultúrákban hasonló sejtaggregátum típusokat mindaddig nem írtak le. A szőlőhöz hasonlóan vegetatívan szaporított és az embriogén kultúrák indukciójához hasonlóan portokot felhasználó banán kultúrák esetében nagyon hasonló típusokat írtak le (Georget et al. 2000; Chung et al. 2006). Feltételezzük ezen munkák alapján (valamint saját táptalajcsere optimalizáló kísérletünk VI-os kultúrái alapján) egy további sejtaggregátum típus meglétét. Ez a típus globuláris aggregátumokat tartalmaz azok felületén erősen megnyúlt, pálcika alakú vakuolizált sejtekkel, melyek keményítő szemcséket nem tartalmaznak. Banán sejtkultúrák esetén ebből a típusból nem sikerült növényt regenerálni, így feltételezhető, hogy ezen típus a kultúrák előregedésének, a regenerációs képesség elvesztésének a jele (Georget et al. 2000).

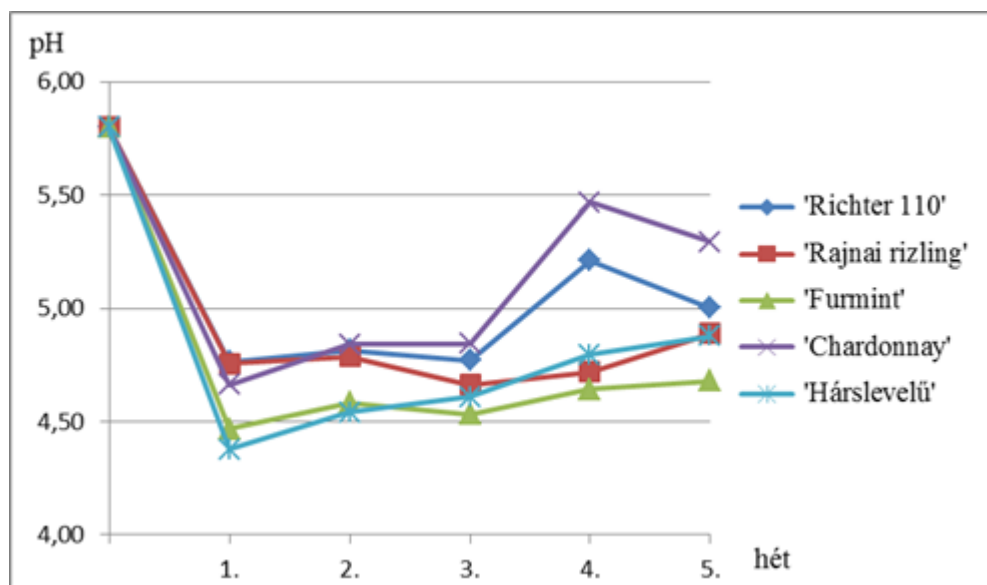
6.5. Fajta összehasonlító kísérlet

Azonos fenntartási mód mellett különbségeket tapasztaltunk az eltérő genotípusok friss tömeg gyarapodásában (14. ábra). Legnagyobb gyarapodást 'Richter 110' fajta esetén mértünk, legkisebbet pedig a 'Rajnai rizling'-nél. Közel azonos volt az 5. hét végén a 'Furmint', 'Chardonnay' és 'Hárslevelű' fajtáknál mért friss tömeg gyarapodás. Eltérést mértünk a kultúrák pH értékeiben is (15. ábra). Az 5. hét végére legmagasabb értékeket 'Chardonnay' esetében mértünk (pH 5,3). Legalacsonyabb értéket 'Furmint p14' kultúráiban mértünk (pH 4,6). 'Richter 110' esetén pH 5 körüli értéket mértünk a vizsgált periódus végén, ennél valamivel alacsonyabb érték volt tapasztalható 'Hárslevelű' és 'Rajnai rizling' fajtáknál.



14. ábra Friss tömeg gyarapodás hetenkénti alakulása azonos fenntartás esetén eltérő szőlő genotípusok embriogén sejtszuspenzióiban.

Feltételezzük, hogy a mért különbségek magyarázatának hátterében nem csak a genotípus függőség áll. A Tanszéken fenntartott embriogén kallusz kultúrák között, (hasonlóan mint más szövettenyésztő laboratóriumokban) eltérések tapasztalhatóak a tenyészetek homogenitásában. 'Richter 110' fajta esetében sikerült az évek alatt olyan homogén embriogén sejtvonalat izolálni, mely az előbbieken leírt I-es típusú sejt aggregátumokat tartalmaz. A többi fajta esetében a kallusz kultúrák ennél heterogénebbek. Vegyesen tartalmaznak I-es, II-es és III-as aggregátum típusokat valamint proembriókat és gömb stádiumú szomatikus embriókat. A jövőben tervezzük ezen kultúrákból további sejtvonalak szelekcióját melyek nagyobb arányban tartalmaznak I-es típusú sejtaggregátumokat a 'Richter 110' embriogén kallusz kultúrákhoz hasonlóan.

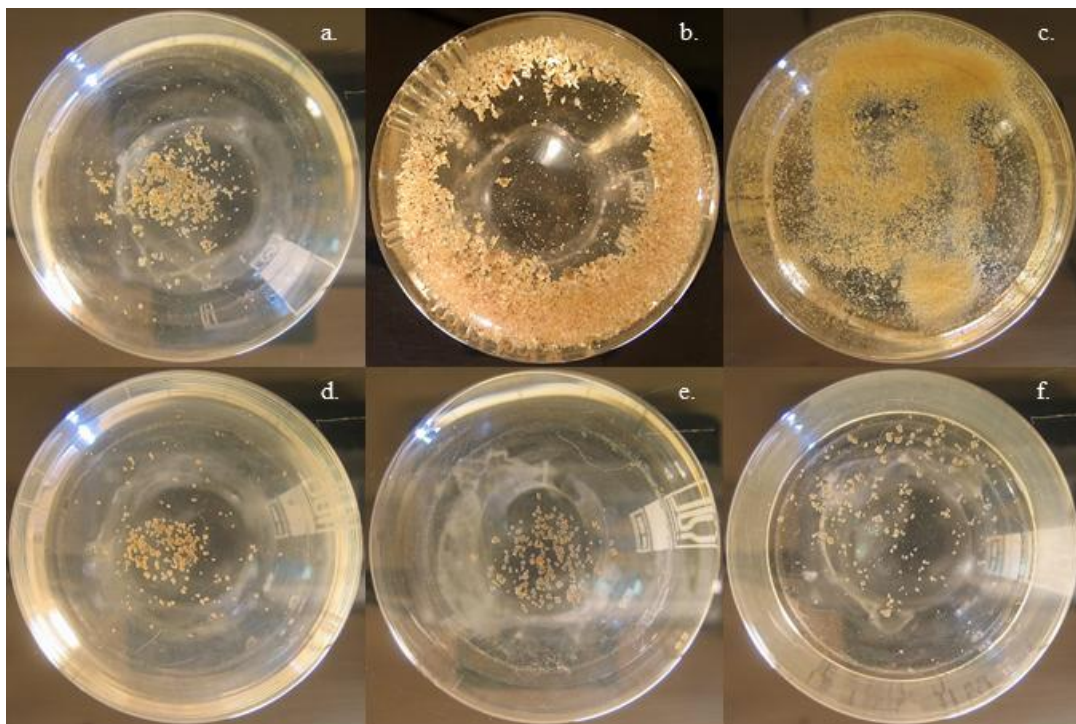


15. ábra Eltérő szőlő fajták embriogén folyadékkultúráiban a pH hetenkénti változása a vizsgált 5 hetes periódusban.

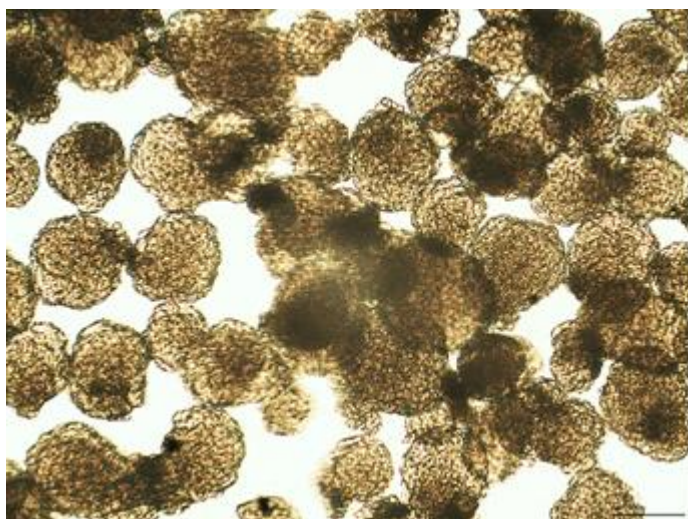
6.6. Szomatikus embriogenezis indukciója

Az alkalmazott 6 táptalaj embriogenezisre gyakorolt hatása között jelentős eltéréseket tapasztaltunk (16. ábra). R2 és R3 táptalajon jelentős tömeg gyarapodást tapasztaltunk, így további regenerációhoz csak ezeket a kultúrákat használtuk fel. R3 táptalajon a globuláris proembriók/gömb stádiumú embriók nagyfokú szinkronizációját tapasztaltuk (17. ábra). A további differenciálódás viszont ezekben a kultúrákban nem volt tapasztalható, aminek feltételezhető oka, hogy az embriók nagy száma reverzibilisen gátolja a további differenciálódást (előkísérleteink alapján). A denzitás további csökkentését követően ez a gátló hatás feloldható (18. és 19. ábrák). Az újbóli hígítás hatására R2 és R3 táptalajon eltérő morfológiájú embriók differenciálódását tapasztaltuk. MES alkalmazása esetén (R2) a 10. napra bazális részükön erősen megnyúlt, torz sziklevelű embriók fejlődtek melyekből (17/b. ábra) sikeresen regeneráltunk MSEM táptalajon növényeket (17/c.

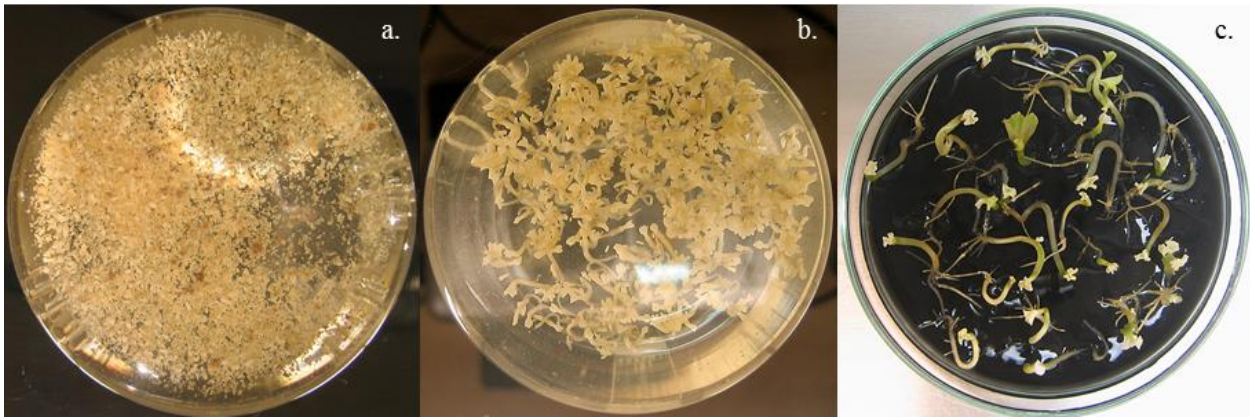
ábra), de az embriók kezdeti abnormális fejlődése miatt ezzel a regenerációs rendszerrel a továbbiakban már nem dolgoztunk.



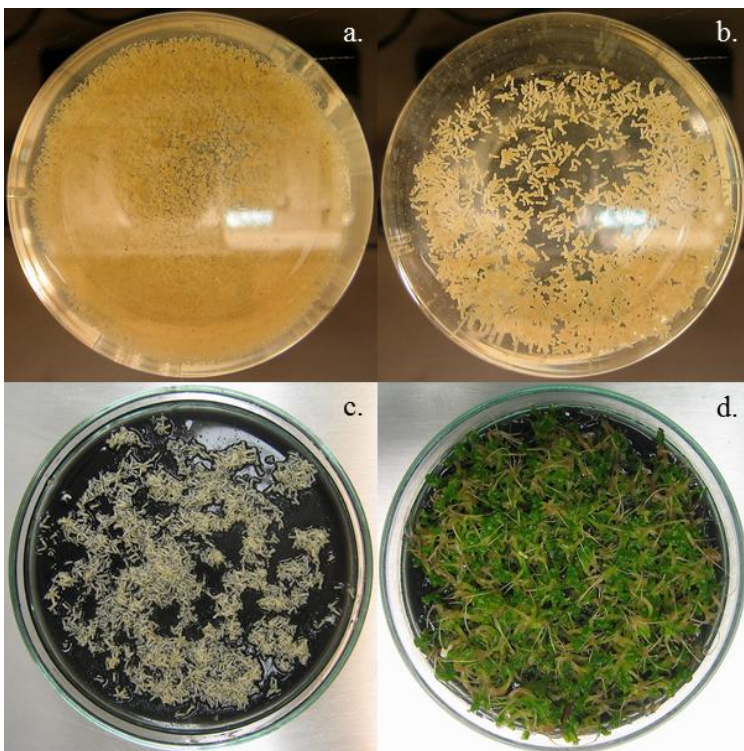
16. ábra 'Richter 110' embriogén sejtszuszpenziók a proliferációt követő 5. héten R1-R6 (a-f.) táptalajokon.



17. ábra Proembriók/gömb stádiumú erősen szinkronizált 'Richter 110' kultúrák R3 táptalajon az 5. héten.



18. ábra R2 táptalajon (MES 0,5g/l) történő szomatikus embriogenezis, a. első hígítást követő 5. héten, b. második hígítást követő 10. napon, c. szilárd MSEM seedling táptalajon további 2 hónap után.

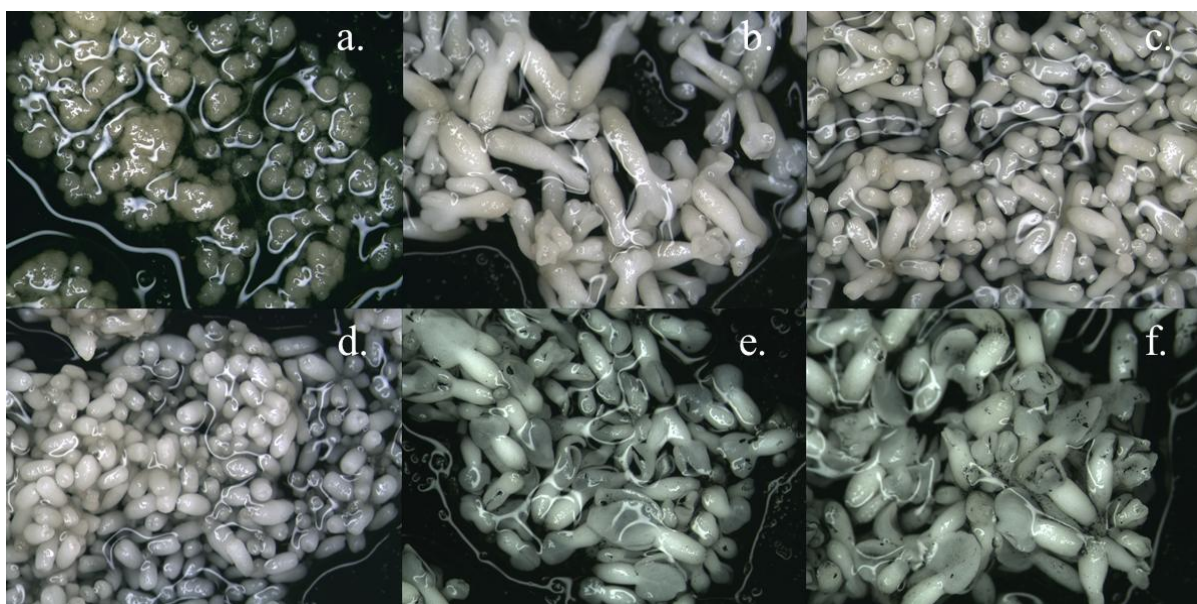


19. ábra R3 táptalajon történő szomatikus embriogenezis, a. első hígítást követő 5. héten, b. 2. hígítást követő 3. héten (1mg/ml), c. MSEM seedling táptalajon 1 hete, d. MSEM seedling táptalajon 2 hónapja tartott kultúrák.

R3 táptalajon jól fejlett sziklelevelű erősen szinkronizált, nagyszámú normális fejlődésű embrió differenciálódott a 2. hígítást követő 3. hétre (19/c. ábra) a folyékony kultúrákban. Szilárd táptalajon további 2 hónapot követően az embriók továbbfejlődtek (19/d. ábra). Érdekes módon az első hónapban nem tapasztaltuk az embriók további fejlődését. Ez feltehetően vagy a tenyészedények (petricsészék) kis légterének az eredménye, vagy pedig a szomatikus embriók egy

rövid nyugalmi állapoton esnek át. Az első passzálást követő első hét után az embriók csírázása egyöntetű volt.

R3 táptalajon a 2. hígítás esetén alkalmazott eltérő hígítások hatására eltérő fejlettségű embriók fejlődtek a 3. hétre. Alacsonyabb sűrűség esetén (1mg/ml) szikleveles embriók alkották többségében a kultúrákat (20/b.). A denzitás emelésének hatására a szikleveles embriók száma drasztikusan csökkent, 10mg/ml esetén a kultúrák szív stádiumú fejlődésnél megrekedtek (20/b, c és d. ábrák), míg a 2. hígítás hiányában a kultúrák még ennél is fejletlenebbek (20/a ábra). MSEM szilárd táptalajon ez a gátlás megszűnt és sikeresen regeneráltunk minden sűrűség esetén növényeket, bár ezek számában jelentős különbségeket tapasztaltunk (6. táblázat). Leghatékonyabb regenerációt abban az esetben tapasztaltunk, mikor 2. hígításkor a táptalajt aktív szénrel (R7 és R8 táptalaj) is kiegészítettük (19/e és f. ábrák). Ebben az esetben a 2. hígítás végére az embriók sziklevele elérte vagy meghaladta az embrió teljes hosszának az 50%-át. Leghatékonyabb regenerációt R8 táptalaj alkalmazása esetén mértünk.



20. ábra Eltérő fejlettségű embriók 1 hete MSEM szilárd táptalajon. A kultúrák ezt megelőzően az alábbi kezelést kapták: a, R3 táptalaj hígítás nélkül, b, 2. hígítás 1mg/ml-re, c, 3. hígítás 4mg/ml-re, d, 4. hígítás 10mg/ml-re, e, 2. hígítás R7 táptalajra 1mg/ml-re, f, 2. hígítás R8 táptalajra 1mg/ml denzitás mellett.

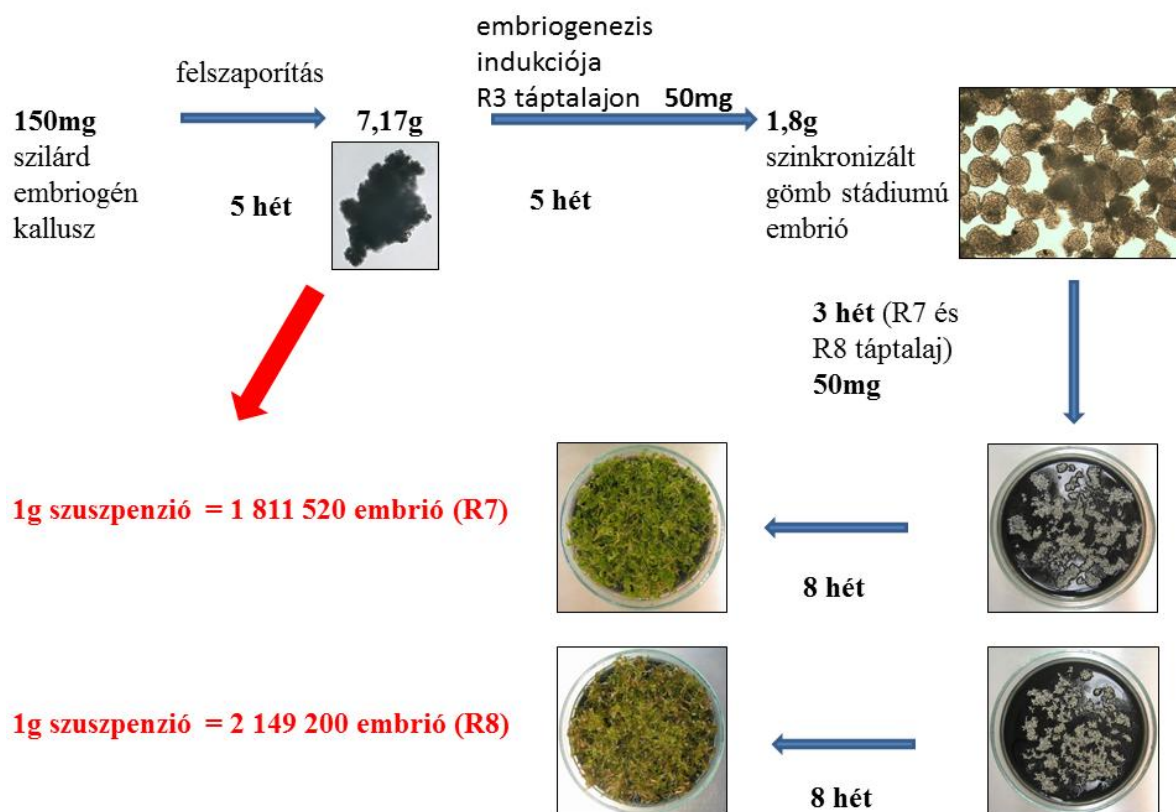
Feltételezzük, hogy mind az aktív szén az embriogenezis késői fázisában (előkísérleteink alapján ez az indukáló hatás az 1. hígítás alkalmazásakor nem figyelhető meg) valamint az 1/2 MS alapú táptalajról (R3) teljes MS-re (R8) történő váltásból adódó ozmotikus stressz erősen indukálja a szomatikus embriogenezist. Ebben az esetben több mint 2 millió embrió fejlődik 1g embriogén

sejtszuspenzióra számolva, míg ezen váltások nélkül 0,8 millió embrió differenciálódik. A 2. hígítás esetén 10 mg/ml denzitás mellett ez az érték 0,4 millió embrióra csökken. Tapasztalatunk szerint minden esetben ezek az embriók csírázásukat követően közel 100%-ban fel is nevelhetők. Az általunk kidolgozott szőlő szomatikus embriogenezisen alapuló regenerációs rendszer hatékonyságát nem könnyű más rendszerek hatékonyságával összevetni. A banán esetében (Georget et al. 2000. Chung et al. 2006.) publikált legjobb regenerációs rendszerek esetében kb 150 000-300 000 embrió regenerációja lehetséges 1ml ülepedett sejtszuspenzióból (méréseink alapján szőlő esetében 1ml ülepedett szuszpenzió tömege kb. 1g). Az *in vitro* regeneráció erősen genotípus függő, így más szőlő kutatócsoportok más fajtával elért eredményeivel csak nagyságrendbeli összevetést tartunk elfogadhatónak. Hasonló szőlő folyadékkultúrán alapuló szomatikus embriogenezisen alapuló regenerációs rendszerek esetén 1ml ülepedett térfogat (1g) esetén nem talákoztunk 15 000 embrió regenerációjánál hatékonyabb rendszerrel az irodalomban (Amar et al. 2007; Vidal et al. 2009).

Véleményünk szerint a 'Richter 110' fajtára kidolgozott regenerációs rendszerünk (21. ábra) az irodalomban található hasonló szőlő kultúrák hatékonyságánál körülbelül 2 nagyságrenddel hatékonyabb és a banán regenerációs rendszereknél publikált eredményeknél közel 1 nagyságrenddel hatékonyabb

6. táblázat 2. hígítást követő 11. héten fejlődött szikleveles szomatikus embriók száma eltérő táptalaj és/vagy eltérő denzitás mellett.

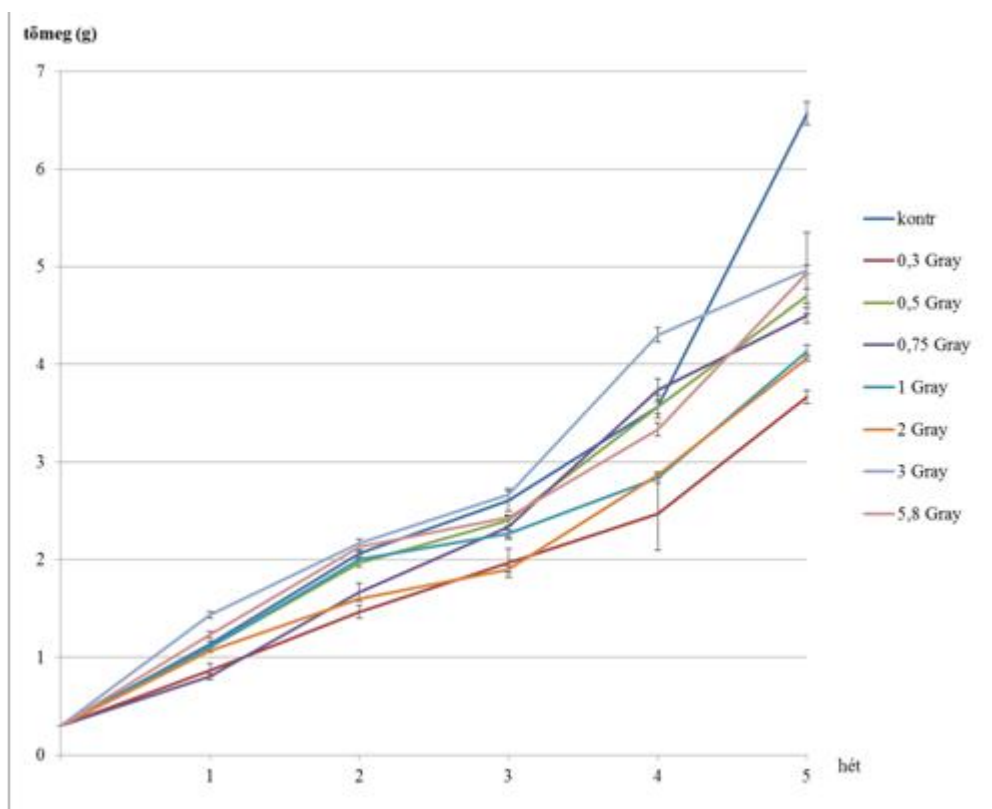
táptalaj	2. hígítás (mg/ml)	100 embrió átlagos tömege (g)	embrió/ petri csésze (db)	embrió/ g sejtszuspenzió (db)
R3	1	0,96	1145	824400
R3	2	0,44	1926	693360
R3	4	0,2	5666	1019880
R3	10	0,16	5783	416376
R7	1	0,51	2516	1811520
R8	1	0,44	2985	2149200



21. ábra Az általunk kidolgozott szőlő szomatikus embriogenezisen alapuló regenerációs rendszer vázlata.

6.7. *In vitro* mutagenézis

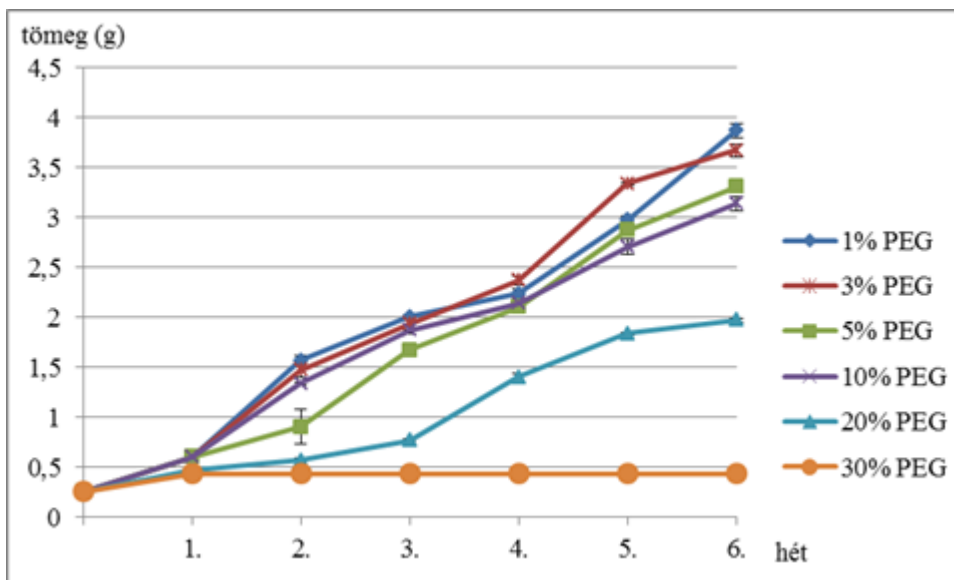
Az embriogén kallusz sugárkezelését követően a 2 hónapos szilárd táptalajon történő fenntartás során az 1,5 Gy dózisú kalluszokat gombás fertőzés miatt nem tudtuk továbbvinni folyadékkultúrákba, így 7 különböző dózisú, valamint a kontrol kultúrák friss tömeggyarapodását rögzítettük. A 4. hétig a kultúrák friss tömeg gyarapodása nem mutatott egymástól jelentős eltérést, sőt ezen a héten a kontrol kultúrák értékeit az 1 Gy dózisú kultúrák felül is múlták. Az 5. hétre jól láthatóan a neutron besugárzott tenyészetek a kontrolhoz képest lemaradást mutattak a tömeg gyarapodásban (22.ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy bár az 5. hétre a neutron besugárzott embriogén kalluszokból indított sejtszuszenziók gyarapodása a kontrolhoz képest elmaradt még, így is jelentős tömeg gyarapodás volt mérhető, vagyis a kultúrák túléltek a besugárzást és lehetséges belőlük aktívan osztódó sejtszuszenziók létesítése, ami az alapja további munkánknak. A besugárzott kultúrák regenerációját elkezdjük a kultúrák regenerálódó képességének összehasonlítása céljából.



22. ábra Elterő neutron sugár dózis hatása 'Richter 110' embriogén sejt kultúrák friss tömeg gyarapodására.

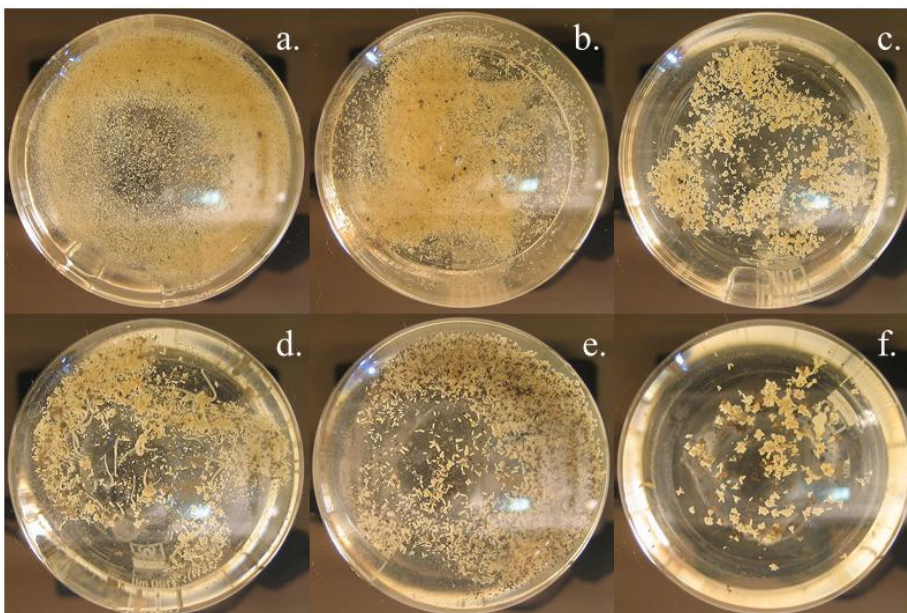
6.8. *In vitro* szelekció

Az eltérő PEG kezelések jelentősen befolyásolták a sejtszuszpenziók friss tömeg gyarapodását a vizsgált 6 hetes periódusban. 30 tömeg% esetén gyakorlatilag nem mértünk tömeg gyarapodást, ami jól elkülönül a többi kultúra értékeitől. A második legalacsonyabb értéket a 20 tömeg%-os kultúrák esetén mértünk, ebben az esetben ez megközelítette a 2g-ot. Az 1-10 tömeg %-os kultúrák tömeg gyarapodása hasonlóságot mutatott nem csak a 6. hétre, hanem a tenyésztés során hétről- hétre, így dinamikájuk is közel azonosnak mondható. Érdekes, hogy 20 tömeg% PEG alkalmazása esetén a tömeg gyarapodás jelentősebben csak a 3. héttől növekedett, ami igaz volt az 5 tömeg% esetén is (23.ábra). A továbbiakban tervezzük a kísérletek megismétlését a 20-30 tömeg% közötti több koncentráció bevonásával, a szelekció hosszának megemelésével, valamint hétről-hétre történő emelkedő koncentráció sor alkalmazásával is.



23. ábra Eltérő PEG-6000 koncentráció hatása 'Richter 110' embriogén sejt kultúrák friss tömeg gyarapodására.

Elkezdtek a 6 hetes szelekciót követően a kultúrák regenerációját (24. ábra). Az R3 táptalajon vizsgáltuk a kultúrák regenerálódó képességét. Morfológiailag az 1-3 tömeg% esetén nem tapasztaltunk eltérést az eddigiekben is alkalmazott regenerációs rendszertől. 5-30 tömeg% között a kultúrák csökkent regenerációs képességét tapasztaltuk. A koncentráció emelkedésével nő az elhalt sejt aggregátumok száma, csökken a tömeg gyarapodása. Regenerációs kísérleteink még zajlanak, de az eddigi eredmények alapján elmondható, hogy a 6 hetes 30 tömeg%-os PEG-6000-rel történő *in vitro* szelekció esetén is képesek vagyunk növényeket regenerálni a kultúrákból.



24. ábra Eltérő koncentrációjú PEG-6000 szelekciós kísérletekből származó kultúrák R3 táptalajon az 5. héten (a. 1%, b. 3%, c. 5%, d. 10%, e. 20% és f. 30% PEG-6000).

7. Összefoglalás

A munkánk során célul tűztük ki egy a meglévő regenerációs módszer hatékonyságát meghaladó folyadékalapú rendszer kidolgozását, mely biztos alapot nyújthat a további kísérletekhez. Célul tűztük ki továbbá az embriogén kallusz felszaporítás hatékonyságának növelését és a szomatikus embriók fejlődésének szinkronizálását. A hatékony regenerációs rendszer fejlesztése után célunk volt az *in vitro* mutációs és szelekciós munkák megalapozása. A célkitűzéseink tükrében első körben embriogén kallusz indukciót hajtottunk végre 10 genotípuson. Két indukciós táptalajt használtunk fel. A következő klónok vagy fajták esetén nyertünk embriogén kalluszt: 'Richter 110', 'Rajnai rizling', 'Furmint p41', 'Hárslevelű p47', 'Hárslevelű p41'. Az embriogén kallusz megléte a további munkánk alapja. Irodalmi adatokra támaszkodva 8 táptalaj hatását hasonlítottuk össze. Ezek alapján az MSM1 táptalaj került kiválasztásra ami egy MS alapú 18g/l maltózt és 1mg/l NOA tartalmaz 5,8pH mellett. A pH pontos beállítása egy következő kísérlet volt. Itt 4 különböző pH hatását vizsgáltuk. Ez alapján az 5,8pH-át választottuk ki. A táptalaj összetétel és pH optimalizálás után egy fenntartási módokat összehasonlító kísérlet következett a 'Richter 110' fajta embriogén kalluszával és az optimalizált táptalajjal. 6 eltérő fenntartási eljárást vontunk be a kísérletbe. Az eredmények alapján a II. fenntartási eljárás magasan kiemelkedett a többi közül. Az eljárás menete a következő: kiindulásként 150mg kalluszt 30ml táptalajba helyezünk. Ezt hetenkénti táptalajcsere követte. Minden héten eltávolítjuk a használt táptalaj 1/3-át. A tömeg visszamérése alapján friss táptalaj hozzáadásával beállítjuk a 0,5gr/100ml sejtsűrűséget. Az eljárások tesztelése során azonosításra került 3 sejtaggregátum típus melyet eddig szőlő esetén nem közöltek. Ezt követte egy fajta összehasonlító kísérlet. Az optimalizált táptalaj és fenntartási eljárás mellett a 'Richter 110', 'Rajnai rizling', 'Furmint', 'Hárslevelű', 'Chardonnay' fajták kerültek összehasonlításra. A kallusz morfológiát itt is nyomon követtük. a megfigyeléseink alapján a 'Richter 110' fajta az általunk azonosított I. sejtaggregátum típusból állt 100%-ban. A többi genotípus mindhárom aggregátum típust tartalmazta eltérő arányban. Ezek alapján a rendszer genotípus függőségét szem előtt tartva arra jutottunk, hogy az aggregátum típusok jelentősen befolyásolják a kultúrák tömeggyarapodását. A felszaporítást követően elindítottuk az embriógenesis hatékonyságának fejlesztését. 8 különböző hormonmentes táptalaj hatását vizsgáltuk. Ebből 3 táptalaj került kiválasztásra. Az R3, R7 és R8. A rendszerben sikerült a szinkronizált embriógenesiszt elérni. 1g kalluszból képesek vagyunk közel 2 000 000 embriót regenerálni. Az általunk alkalmazott fenntartási eljárás és a szinkronizált embriógenesis legalább 2 nagyságrenddel haladja meg más kutatócsoportok eredményeit. Ezt követte a szelekciós és mutációs rendszer megalapozása. A szelekció során PEG kiegészítést alkalmaztunk. Az 1-10tömeg% értékeknél

jelentős tömeggyarapodásbeli különbségek nem tapasztalhatóak. A 20 és a 30tömeg% esetén már számottevő csökkenés figyelhető meg. 30tömeg% esetén gyakorlatilag tömeggyarapodás nem figyelhető meg. A mutáció során neutron besugárzást alkalmaztunk. A KFKI-ban Pálfalvi József végezte el a besugárzást. Irodalmi adatokra támaszkodva 0,3-5,8 Gray dózist alkalmaztunk. A friss tömeggyarapodásban megmutatkozott a kezelések hatása. A kontrollnál mindegyik kevesebb gyarapodást mutatott.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kísérleteim elvégzéséhez nagyon sok segítséget kaptam, amit ezúton szeretnék megköszönni:

Köszönöm Forgács István PhD hallgató konzulensemnek önzetlen segítségnyújtását mindennapi munkám során.

Köszönöm Dr. Oláh Róbert egyetemi docensnek szakmai segítségét és iránymutató munkáját.

Köszönöm a Genetika és Növénynemesítés Tanszék dolgozóinak, kiemelten Tóth Veronikának, hogy tanácsaival, tapasztalatával segítette munkámat.

Köszönöm Pálfalvi Józsefnek a KFKI munkatársának a neutron sugárkezelés lehetőségét.

Köszönöm Dr. Pedryc Andrzej egyetemi tanár, tanszékvezető úrnak, hogy biztosította számomra kísérleti munkám hátterét.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M. 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. Eup. 118:167-173.
2. Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., Nichterlein, K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Eup. 135:187-204.
3. Altamura, M. M., Cersosimo, A., Majoli, C., Crespan, M. 1992. Histological study of embryogenesis and organogenesis from anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *in vitro*. Prot. 171: 134-141.
4. Amar, A. B., Cobanov, P., Boonrod, K., Krczal, G., Bourid, S., Chorbél, A., Reustle, G. M. 2007. Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. Plant Cell Rep. 26:1439-1447.
5. Bittsánszky, A., Gyulai, G., Gullner, G., Kiss, J., Szabó, Z., Kátay, Gy., Heszky, L., Kőműves, T. 2009. *In vitro* breeding of grey poplar (*Populus x canescens*) for phytoremediation purposes. J. Ch. T. Bio. 84: 890-894.
6. Bouquet, A., Torregrosa, L. 2003. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: Jain, S. M., Ishii, K. (Eds): Micropropagation of woody trees and fruits 75: 319-352. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.
7. Cersosimo, A., Crespan, M., Paludetti, G., Altamura, M. 1990. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration from anther culture in *Vitis*. Acta Hort. 280: 307-314.
8. Chée, R., Pool, R. M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. Sci. H. Cult. 32:85-95.
9. Chung, J. P., Chang, T. L., Chi, A. Y. M., Shi, C. T. 2006. Triploid banana cell growth phases and the correlation of medium pH changes with somatic embryogenesis in embryogenic cell suspension culture. P. C. Tiss. Org. Cult. 87: 305–314.
10. Colova, V. M., Bordello, P. N., Phills, B. R., Bausher, M. 2007. Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of grapevine *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. Vitis 46: 15-18.
11. Coutos-Thevenot, P., Goebel-Tourand, I., Mauro, M. C., Jouanneau, J. P., Boulay, M., Deloire, A., Guern, J. 1992a. Somatic embryogenesis from grapevine cells. I-Improvement of embryo development by changes in culture conditions. P. C. Tiss. Org. 29:125–133.

12. Coutos-Thevenot, P., Maes, O., Jouenne, T., Mauro, M. C., Jouanneau, J. P., Boulay, M., Deloire, A., Guern, J. 1992b. Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and nonembryogenic situations. *Plant Sci.* 86:137–145.
13. Dos Santos, K. G. B., Aracijo-Marioth, J. E., Moco, M. C. C., Bodanesse-Zanettini, M. H. 2006. Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* (L.) Mer.): Ontogeny of somatic embryos. *B. A. Bio. Tech.* 49: 49-55.
14. Dudits D., Heszky L. 2003. *Növényi biotechnológia és géntechnológia.* Budapest. Agroiinform kiadó.
15. Dudits, D. 1982. *Fuzionált sejtek, hibrid növények.* Korunk tudománya sorozat. Budapest. Akadémia Kiadó.
16. Emershad, R. L., Ramming, D. W. 1994. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 14: 6-12.
17. Faure, O., Aarrouf, J., Nougarede, A. 1996. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.) proembryogenesis. *Ann. Bot.* 78: 23-28.
18. Fujimura, T., Komamine, A. 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 64:162-164.
19. Gambino, G., Bondaz, J., Gribaudo, I. 2006. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 397-404.
20. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
21. Gautheret, R. J. 1959. *La culture des tissus végétaux techniques et réalisations.* Masson, Paris. In: Dudits és Heszky, 2003.
22. Georget, F., Domergue, R., Ferriere, N., Cote, F.X. 2000. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa AAA* cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Rep.* 19: 748–754.
23. Gray, D. J. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. *Am. J. Bot.* 79: 542-546.
24. Gray, D. J., Mortensen, J. A. 1987. Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* ‘Microsperma’. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9: 73-80.

25. Harst, M. 1995. Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines. *Vitis* 34: 27-29.
26. International Organization of Vine and Wine Statistical report on world vitiviniculture. 2012. <http://www.oiv.int/oiv/cms/index>
27. Jain, S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166.
28. Jayasankar, S., Bonbada, B. R., Li, Z., Gray, D. J. 2003. Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. *Am. J. Bot.* 90:973–979.
29. Jayasankar, S., Gray, D. J., Litz, R. E. 1999. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. *Plant Cell Rep.* 18: 533–537.
30. Kikkert, J. R., Thomas, M. R., Reisch, B. I. 2001. Grapevine genetic engineering. In: K. A. Roubelakis-Angelakis (Ed.): *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, 393-410. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands.
31. Kim, Y. J., Park, T., Kim, H. S., Such, S. K., Yun, S. J. 2004. Effective multiplication of somatic embryos using suspension culture and regeneration in soybean. *J. Plant Biotech.* 6: 91–96.
32. Krul, W. R., Worley, J. F. 1977. Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval' a French hybrid grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102: 360-363.
33. Larkin, P. J., Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
34. Maliga, P., Kiss, Zs. R., Dix, P. J., Lázár, G. 1979. A Streptomycin-Resistant Line of *Nicotiana sylvestris* Unable to Flower. *Molec. Gen. Genet.* 172:13-15.
35. Martinelli, L., Gribaudo, I. 2001. Somatic embryogenesis in grapevine. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. (Ed.): *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, 327-352. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London.
36. Matsuta, N. 1992. Effect of auxin on somatic embryogenesis from leaf callus in grape (*Vitis* spp.). *Jap. J. Breed.* 42: 879-883.
37. Mauro, M. C., Nef, C., Fallot, J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Rep.* 5: 377-380.

38. Mauro, M. C., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thevenot, P., Deloire, A., Barbier, P. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Sci.* 112: 97-106.
39. Mba, C., Afza, R., Jankowicz-Cieslak, J., Bado, S., Matijevic, M., Huynh, O., Till, B. J. 2009. In: Shu, Q. Y. (Ed.) *Induced plant mutations in the genomics era*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 262-266.
40. Mezzetti, B., Pandolfini, T., Navacchi, O., Landi, L. 2002. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology*. 2: 18 (<http://www.biomedcentral.com/14726750/2/18>)
41. Mozsár, J., Viczián, O. 1996. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. *Vitis* 35: 155-157.
42. Mozsár, J., Süle, S. 1994. A rapid method for induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured anthers of *Vitis riparia*. *Vitis* 33: 245-246.
43. Mullins, M. G., Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cultivar Cabernet sauvignon) by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 27: 1022-1030.
44. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
45. Nitsch, J.P., Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
46. Oláh, R., Szegedi, E., Ruthner, S., Korbuly, J. 2003. Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties. *Vitis* 42: 133-136.
47. Perl, A., Eshdat, Y. 1998. DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. In: Tombs M. P. (Ed.): *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15: 365-386. Intercept Ltd., Andover.
48. Perl, A., Saad, S., Sahar, N., Holland, D. 1995. Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars-a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid. *Plant Sci.* 104: 193-200.
49. Péros, J., Torregrosa, I., Berger, G. 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *J. Exp. Bot.* 319: 171-179.
50. Plant and Soil Sciences eLibrary. 2012. <http://plantandsoil.unl.edu/pages/>
51. Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64:185-210.

52. Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangol, M. P., Dhawan, A. K. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – an overview of the recent progress. *En. Exp. Bot.* 71:89-98.
53. Rajasekaran, K., Mullins, M. G. 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Bot.* 30: 399-407.
54. Rajasekaran, K., Mullins, M. G. 1981. Organogenesis in internode explants of grapevine. *Vitis* 20: 218-227.
55. Reustle, G., Harst, M., Alleweldt, G. 1995. Plant regeneration of grapevine (*Vitis sp*) protoplasts isolated from embryogenic tissue. *Plant Cell Rep.* 15:238–241.
56. Robacker, C. D. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. *Hort. Sci.* 28: 53-55.
57. Salunkhe, C. K., Rao, P. S., Mahtre, M. 1999. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell Rep.* 18: 670-673.
58. Sipra, G., Maheshwari, S. C. 1964. *In vitro* Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
59. Skoog, F., Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-131.
60. Srinivasan, C., Mullins, M. G. 1980. High frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Sci. Hort.* 13: 245-252.
61. Stamp, J. A., Meredith, C. P. 1988. Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 941-945.
62. Steward, F. C., Mapes, M. O., Mears, K. 1958. Growth and organized developments of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.
63. Sutka, J. 2004.. *Növényi citogenetika*. Budapest. Mezőgazda Kiadó Kft.
64. Thomas, D. T. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Bio. Ad.* 26: 618-631.
65. Tonon, G., Berardi, G., Rossi, C., Bagnaresi, U. 2001. Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of *Fraxinus angustifolia*. *In Vitro Cell Dev. Plant* 37: 462–465.
66. Torregrosa, L., Torres-Vials, M., Bouquet, A. 1995. Somatic embryogenesis from leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. *Vitis* 34: 239-240.

67. Torres-Vinals, M., Sabate-Casaseca, S., Aktouche, N., Grenan, S., Lopez, G., Porta-Falguera, M., Torregrosa, L. 2004. Large-scale production of somatic embryos as a source of hypocotyl explants for *Vitis vinifera* micrografting. *Vitis* 43: 163-168.
68. Tóth, Sz., Bódi, Z. 2006. Indukált mutációval létrehozott kukorica génbank a nemesítői alapanyagbázis növeléséért. *Agrártudományi közlemények* 19: 45-49.
69. Van Engelen, F. A., De Vries, S. C. 1992. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.* 8: 66–70.
70. Velich I. (Szerk.) 2001. Növénygenetika. Budapest. Mezőgazda Kiadó Kft.
71. Vidal, J. R., Kikkert, J. R., Wallace, P. G., Reisch, B. I. 2003. High-efficiency biolistic cotransformation and regeneration of ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera* L.) containing *npt-II* and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep.* 22: 252-260.
72. Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez, M., Segura, A., Gonzalez-Benito, M. E. 2009. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 96: 85–94.
73. Vilaplana, M., Mullins, M. G. 1989. Regeneration of grapevines (*Vitis* spp.) *in vitro*: Formation of adventitious buds on hypocotils and cotyledons of somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 134: 413-419.
74. Zhu, M. Y., Pan, J., Wang, L., Gu, Q., Huang. C. 2003. Mutation induced enhancement of Al tolerance in barley cell lines. *Plant Sci.* 164: 17-23.
75. Zhu, Y. M., Hoshino, Y., Nakano, M., Takahashi, E., Mii, M. 1997. Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis by using embryogenic callus culture and activated charcoal. *Plant Sci.* 123: 151-157.