

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynemesítés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Rukkola mikroszaporítása és regenerációja

Szepesi Kinga
Kertészmérnök BSc III. évfolyam

Konzulens: Zok Anikó, egyetemi tanársegéd
Dr. Oláh Róbert, egyetemi docens

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

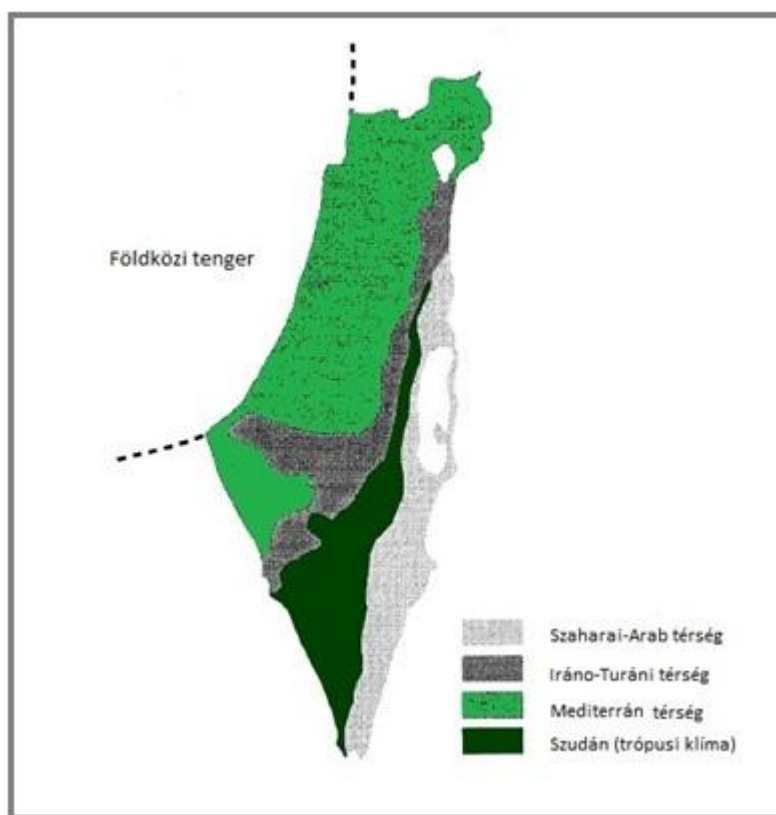
Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. A <i>Diplotaxis tenuifolia</i> jellemzése	7
3.1.1. Történeti áttekintés	7
3.1.2. Általános jellemzés.....	8
3.1.3. Rendszertani besorolás	9
3.1.4. Élettani és gyógyászati hatása	10
3.1.5. Termesztése	12
3.2. A mikroszaporítás.....	15
3.2.1. Történeti áttekintés	15
3.2.2. A mikroszaporítás módszerei.....	17
3.2.3. <i>In vitro</i> morfogenezis.....	19
3.2.4. Rukkola <i>in vitro</i> kísérletek	20
3.2.5. Genetikai transzformáció	21
4. Anyag és módszer.....	22
4.1. Steril magvetés és csíráztatás	22
4.2. Mikroszaporítás.....	24
4.3. Kalluszindukció.....	24
4.4. Akklimatizáció	25
4.5. Transzformáció	26
5. Eredmények és megvitatásuk.....	28
5.1. Steril magvetés és csíráztatás	28
5.2. Mikroszaporítás.....	29
5.3. Kalluszindukció.....	30
5.4. Akklimatizáció	32
5.5. Transzformáció.....	33
6. Következtetések	35
7. Összefoglalás	36
Köszönetnyilvánítás	37
Irodalom jegyzék.....	38

Rövidítések jegyzéke

2,4-D	2,4-Diklorofenoxiacetil sav
BA	N6-benziladenin
CP	Chée és Pool (1987) táptalaj
CK	Citokinin
GA	Gibberellin sav
MS	Murashige és Skoog (1962) táptalaj
NAA	Naftilecetsav
NN	Nietsch és Nietsch (1969) táptalaj
TDZ	Thidiazuron

1. Bevezetés

A *Diplotaxis* nemzetség a *Brassicaceae* családba tartozik és több mint húsz fajt foglal magába, amelyek leginkább a mediterrán térségben terjedtek el. A Földközi-tenger vidékén és Dél-Európában őshonos rukkola Marokkó partvidékén, Portugáliától Törökországig vadon is megterem. Géncentrumát az 1. ábra jelöli. Élő növény, mely a mediterrán régió homokos és meszes talajain egyaránt megél. Felálló, elágazó szárú növény, melynek magassága a fél métert is meghaladhatja. Hosszúkas levelei kezdetben épek, majd a fejlődés során karéjosodnak. A lombozat fölé emelkednek a sárga, négysziromlevelű virágok. Az egyes szirmok lekerekítettek és megközelítőleg egy centiméter hosszúak. A termése a káposztafélékre jellemző becőtermés, 3-5 centiméter hosszú. Március és július között virágzik.



1. ábra: A *Diplotaxis tenuifolia* géncentruma (Plitman és mtsai, 1983)

1930 és 1940 között került Európába, az itteni klímához a Jeruzsálem melletti Júdeai-hegység között alkalmazkodott. Észak-Amerikába az olasz telepesek által került, és az erzsébetkori Angliában is igen elterjedt fűszernövény volt.

Széles körben felhasználható, de első sorban étkezési célt szolgál. A friss levelek pikáns, fűszeres aromájuk miatt saláták alapanyagai, a virágokat pedig köretnek készíthetjük el, illetve díszítésre is alkalmasak. Az idősebb levelek már igen csípősek, ezért öntetekhez és levesekhez használható. Gyakran salátakeverékek részeként találkozhatunk vele, egyéb salátafélék fiatalabb

levelei mellett. Főzve vagy párolva egyéb ételekhez is adható. Az olasz konyha elmaradhatatlan fűszere.

Üzletekben általában műanyag dobozokba vagy zacskókba csomagolva találhatjuk. Ezek mindig ki vannak lyuggatva, mert a bennrekedő pára károsítaná a leveleket. A csomagoláson esetenként meg van jelölve a faj neve (*Diplotaxis tenuifolia* vagy *Eruca sativa*), és a származási helye.

Korábban a mediterráneumban, közép-keleten, Észak- és Közép-Indiában illetve Brazíliában termesztették nagy mennyiségben, a '80-as évek óta azonban ismét „divatos” növénynek számít, így jelenleg Franciaország, Egyiptom, Olaszország és Nagy Britannia is a fontosabb termesztő országok közé tartozik. A *Diplitaxis tenuifolia* Franciaországban és Olaszországban vadon is megtalálható.

A *Diplotaxis tenuifolia* gyógyászati hatásai miatt igen értékes, ám ennek ellenére tudományos szempontból kevésbé vizsgált növényfaj. A növény termesztése során az állomány felszámolása igen nehézkes. A talajba forgatás után a feldarabolt gyökérdarabokból újra kihajtott növények erősen gyomosítják a következő kultúrát. Zok Anikó tapasztalatai alapján a növények olyan nagymértékű regenerációs potenciállal rendelkeznek, hogy a kultúra felszámolásakor a talajba forgatás előtt a növényállomány totális gyomirtószerrel történő kezelésére van szükség. Ez az erőteljes regenerációs hajlam indokolja, hogy a növényt *in vitro* körülmények között is érdemes megvizsgálni. Amennyiben *in vitro* körülmények között is ugyanez a tendencia mutatkozik, a növény bevonható a különböző genetikai transzformációs kísérletekbe, hiszen ezen kísérletek alapja egy jól működő regenerációs rendszer. A transzformációs kísérletek segítségével pedig hasznos információkhoz juthatunk a génekkel és azok működésével kapcsolatban.

2. Célkitűzés

Munkánk célja a *Diplotaxis tenuifolia* mikroszaporítása és egy működő regenerációs rendszer megalapozása. További terveink között szerepel a növény transzformációja agrobaktériummal alap kutatások céljából. A genetikai transzformáció napjainkban a növényi funkcionális genomikai kutatások egyik kulcsmódszerévé vált, ami izolált gének beépítését és így transzgénikus növények előállítását jelenti. A transzformációs kísérletekhez egy riporter gént tartalmazó konstrukciót kívántunk felhasználni, mert munkánk célja az agrobaktériumos fertőzés hatékonyságát befolyásoló tényezők és körülmények optimalizálása.

Célunk megvalósítása érdekében a következő módszereket alkalmaztuk:

- steril magvetés
- a csíranövények felnevelése fényszobában
- a kifejlett növények mikroszaporítása
- a felszaporított növények akklimatizálása
- a kalluszosodás mértékének vizsgálata levélkorongokon, hipokotil és sziklevelel darabokon.

A kísérleteket különböző táptalajok bevonásával, illetve különböző hormonkombinációk alkalmazása mellett kívántuk elvégezni.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A *Diplotaxis tenuifolia* jellemzése

3.1.1 Történeti áttekintés

Jelenleg a rukkolát elsősorban élelmiszerként használjuk, emellett gyógyító hatásai is ismertek, ám ezt a tulajdonságát régen sokkal jobban kihasználták. A rukkoláról már az ókorból találhatunk feljegyzéseket. Galenus, bár filozófusnak tartotta magát, szerteágazó érdeklődését a rukkola is megragadta. A növény csípős ízére utalva azt írta, hogy "forró érzetet kelt", ezért önmagában nem fogyasztható, ám különböző pozsgások mellé kellemes kiegészítő. A héberek a Talmudban tesznek róla említést. Ők gyógyászati szempontból tartották hatásosnak, leginkább szemfertőzések esetén javasolták. A ókori Római Birodalom polgárai körében roboráló és revitalizáló szernek minősült. Olyannyira hittek ebben, hogy úgy gondolták, aki fogyasztja leveleit, akár a korbácsütések okozta fájdalmat is könnyebben elviseli. Ezen tulajdonságát Plinius latin történetíró jegyezte fel. Élénkítő, tonizáló hatása ma is ismert (Arietti, 1965; Ellison és mtsai., 1980; Ambasta és mtsai., 1986).

Sokrétű felhasználhatóságát igazolja az is, hogy a római nép afrodiziákumként fogyasztotta az olívaolajba áztatott rukkola magokat (Fernald, 1993). Mutinus Tutinus római termékenység-i isten (görög megfelelője: Priaposz) szent növénye volt, áldozatként mutatták be neki. Ezen tulajdonsága a későbbiekben is ismeretes volt, emiatt a középkori kolostorok területén tilos volt a termesztése, hogy ne jelentsen kísértést a szerzetesek számára (Mascagno, 1987).

Szintén arról árulkodik, hogy már az ókorban is ismerték és használták, hogy Plinius és Columella, akinek *De re rustica* könyve korának kiváló kertészeti szakkönyve volt, megemlíti, mint különleges növényt, mely csípős íze miatt kulináris különlegességnek számított (Mascagno, 1987). A görög szakíró és orvos Pedaniosz Dioszkoridész is említést tesz róla *Peri hülész iatrikész* ('A gyógyító anyagról') művében, mely Kr. u. 64 körül íródott. Ez a mű az 1. század legfontosabb herbáriumának számított (Vékony, 1989).

Tudományos elnevezése Carl von Linnétől származik, akinek a nevéhez kötődik a modern tudományos nevezéktan kidolgozása. További szinonímái a *Brassica tenuifolia* (L. 1828), *Sysimbrium tenuifolium* (L., 1755), *Sysimbrium acre* (Lam. 1778), *Arabis sylvestris* (Scop. 1772), *Eruca perennis* (Mill., 1768), *Eruca tenuifolia* (L., 1794). Emellett több más néven is ismert: borsmustár, arugula, de leginkább a toszkán rukkola vagy rucola név használatos. A népnyelvben útszéli vagy szabdalt kányazsázsa néven maradt fenn. Egyéb nyelvekben is általában több elnevezése van; angolul wild rocket, perennial wild rocket, wall rocket, lincoln weed, sand rocket, sand mustard, garden rocket illetve náluk is használatos a rucola vagy arugula elnevezés. A német nyelv a Schmalblättriger Doppelsame, Feinblättriger Rucola, Würzrauke neveket használja. Olaszul

a már említett rucola, arugula, argula vagy rughetta selvatica, míg franciául a roquette, roquette jaune, diplotaxe à feuilles menues a neve. Fontos megjegyezni, hogy a legtöbb nyelv megkülönbözteti a két termesztett rukkola fajt.

3.1.2. Általános jellemzés

A *Diplotaxis tenuifolia* poliploid és nagy, sok hurokból álló kromoszómái vannak. Kettős termőlevele (külső, belső) van, a magkezdemény pedig krasszinucelláris, azaz a nucellusz az embriózsák fejlődése során sejtosztódással gyarapszik, az érett embriózsákot pedig a magkezdemény tömör teste veszi majd körül. A maghéj több rétegből áll: egy nyálkás egy-két rétegű epidermisz szövetből, ami a külső termőlevélből képződött és egy merevebb, támasztó szereppel rendelkező bőrszöveti rétegből, ami pedig a belső integumentumból alakult ki. Az endospermium magas aleuron (besűrűsödött fehérjetartalmú vakuólumok) tartalmú, a maghéjon pedig jellegzetes hálószerű mintázat látható (Lamba és Arora, 1981).

Jellemzőek rá a *Brassicaceae* családra vonatkozó sajátosságok: lágy szárú évelő, levelei szórtnak állnak, de megfigyelhetünk törőzsát nevelő egyedeket is. Virága négy csésze- és négy szirmlevélből áll, melyek kettesével egymással szemben állnak és sárga színűek. Csészelevelei csupaszok, 5-6 mm hosszúságúak, míg a szirmok 7-12 mm-esek. A virágban egy termő és hat porzó található, ezek közül kettő rövidebb a többinél. Fiatal levelei 80 mm hosszúak, míg a kifejtett idős levelek akár a 200 mm-t is elérhetik. A levelek erezte élfutó szárnyas. Magháza alsó állású, a termőtája cönokarp típusú, a termőlevelek a magház közepéig teljesen összenőttek, azaz szinkarp gynoeciummal rendelkezik. Húsos becőtermése 25-50 mm hosszú és 1,8-3 mm széles. Magja igen kicsi, ezermagtömege 0,18-0,2 g/1000 db, sárgásbarna vagy mustár színű. A növény morfológiai felépítése a 2. ábrán látható.



2. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* felépítése: levél, virág, termés, mag (<http://www.biolib.de>, Deutschlands Flora in Abbildungen)

A bazális test a köldökzsinórral ellentétes irányba fordul a mikropíle környékén. A maghéj belső szövetei megvastagodnak, de csak a mag egyik oldalán fejlődik ki teljesen (Prasad, 1977). A száraz magvak ellenállást mutatnak a gamma sugárzással szemben (Gómez-Campo és Delgado, 1964).

Szintén Lamba és Arora (1980) kísérletei alapján tudjuk azt is, hogy a becők száradása során az egyes szövetek más-más sorrendben repednek fel, ami a különböző sejtfal vastagságoknak köszönhető. Erős feszültség jön létre, ami összeomlásra készíti a légzőnyílásokat tartalmazó szöveteket, a replum-becő találkozásánál pedig felnyílik a termésfal. A termés négy hasítékkal nyílik, a magok a replumokon találhatóak. Marginális placentáció jellemzi. A hasíték a termés alján indul meg és halad a becő felső részéig. A felnyílást tovább segíti, hogy a replumok környékén a szövet nem rostos.

Palántákkal végzett kísérletek kimutatták, hogy a sziklevelek 77%-al több légzőnyílást tartalmaznak, illetve ezek nagyobbak is, mint az első lombleveleken találhatóak (Zeleny és Resnickova, 1985).

3.1.3. Rendszertani besorolás

A *Diplotaxis tenuifolia* L. a keresztesvirágúak családjába tartozik. Egyéb rukkola fajok is ismeretesek, ám ezek az *Eruca* nemzetségbe tartoznak (pl. *Eruca sativa*, *Eruca vesicaria*, *Eruca setulosa* stb.) és sok tulajdonságban különböznek a *Diplotaxis* nemzetségbe tartozóktól.

A *Diplotaxis* nemzetség tagjaira igen változatos kromoszómaszám jellemző. Az eddig vizsgált fajoknál a kromoszómák száma lehet: $n=7$ (*D. eruroides*), $n=8$ (*D. brevisiliqua*, *D. ibicensis*, *D. ilorcitana*, *D. siettiana*), $n=9$ (*D. assurgens*, *D. berthautii*, *D. brachycarpa*, *D. catholic*, *D. tenuisiliqua*, *D. virgata*), $n=10$ (*D. siifolia*, *D. viminea*), $n=11$ (*D. pi-tardiana*, *D. cretacea*, *D. simplex*, *D. tenuifolia*, *D. acris*), $n=13$ (*D. harra*, *D. glauca*, *D. gracilis*, *D. hirta*) és $n=21$ (*D. muralis*). Egyéb fajok kromoszóma száma még meghatározásra vár (Gómez-Campo and Hinata, 1980).

A *Diplotaxis tenuifolia*-t gyakran összetévesztik az ún. "szelíd" rukkolával, az *Eruca sativa*-val, mivel általában leveleiket fogyasztjuk, ezek megjelenésében között pedig nincs jelentős különbség. Az "eruca" név valószínűleg a latin "uro" vagy "urere" szavakból származtatható, ami égést, égető érzést jelent, utalva csípős ízére. A "Diplotaxis" ezzel szemben görög gyökerekkel rendelkezik. Mivel a "diplos" (dupla) és "taxis" (sor) szavakból tevődik össze, így jelezve, hogy a magok két sorban helyezkednek el a becőben (Bremmes, 1988).

A két rukkola faj növényrendszertani szempontból ugyanabba családba tartozik, ezért alapvetően külső megjelenésükben hasonlítanak, bár az *Eruca sativa* robusztusabb, nagyobb habitusú. Mindkettő a mediterráneumból származik, ez utóbbi szélesebb körben terjedt el.

Alapvetően mindkettő fűszer és saláta alap, de a gyógyászat is alkalmazza. A két növény részletesebb összehasonlítását az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: *Diplotaxis tenuifolia* és *Eruca sativa* összehasonlítása

		<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	<i>Eruca sativa</i>
Megjelenés	méret	60-70 cm	80 cm
	levél	karéjos vagy épszelű	karéjos vagy épszelű
	gyökérzet	bojtos	bojtos
	csészelevél	zöld	fehéres, sárga, lila, barnán erezett
	virág	sárga	fehér, barnán erezett
	becő mérete	25-50 mm	200-300 mm
Életforma		évelő	egyéves (kétéves)
Virágzás ideje		március-június	február-április
Kromoszómaszám		2n=22	2n=22
Ivarúság		egylaki kétivarú	egylaki kétivarú
Talajigény		meszes talaj	bármilyen jó minőségű talaj
Tenyészterület		75-100 cm ²	150-200 cm ²

Ezen felül ismeretesek még a *Diplotaxis muralis*, mely a *Diplotaxis tenuifolia* és *Diplotaxis viminea* keresztezéséből származik. Kromoszóma száma n=21, mivel a *D. vimineától* n=10-et örökölt (amfiploid hibrid, Mummenhoff és mtsai, 1933). Szintén ehető rukkola faj a *D. eruroides*, *D. crassifolia*, *D. Duveyrierana*, *D. sieberi*, *D. griffithii*. Az *Eruca* nemzetségből az *Eruca pinnatifida* egy ehető, ám kevésbé jelentős faj.

A *Diplotaxis tenuifolia* fajnak két alfaja ismeretes: *D. tenuifolia subsp. tenuifolia* és *D. tenuifolia subsp. cretacea* (Martín, Sánchez-Yélamo, 2000).

3.1.4. Élettani és gyógyászati hatása

A rukkola gyógyító hatása már nagyon régóta ismert. Az ókorban külsőleg és belsőleg egyaránt hatékonynak bizonyult. Mivel tudományos alapja nem volt, a hagyományos gyógyászat alkalmazta, szeplők halványítására, a hajhagymák növekedésének serkentésére, a kellemetlen testszag megszüntetésére (Ellison és mtsai., 1980). Fiatal anyáknak tejszaporító főzetet készítettek belőle, illetve a rosszullét tüneteinek kezelésére is ajánlották. Teaként és szirupként köhögés, hurut és bélférgek ellen tartották hatásosnak (Mascagno 1987). A magból kivont olaj és a leveleket kivonata jó rovarriasztónak bizonyult (Sharma és Wattal, 1982). Az állati táplálék nem egészíthető ki vele, mivel glukoeucin tartalma miatt magjai is keserűek (Sindhu Kanya, Kantharaj Urs 1989).

Napjainkban már bizonyított, hogy gyomorsav csökkentésére alkalmas, illetve az emésztőrendszer fekélyei ellen is hatásos. Szerepe van a koleszterin- és vércukorszint

szabályozásában (Feo és Senatore, 1993). Antikarcinogén növényként tartják számon. Elősegíti a sebgyógyulást. A magvakban található illóolajok serkentik az emésztést, védik a nyirokrendszert.

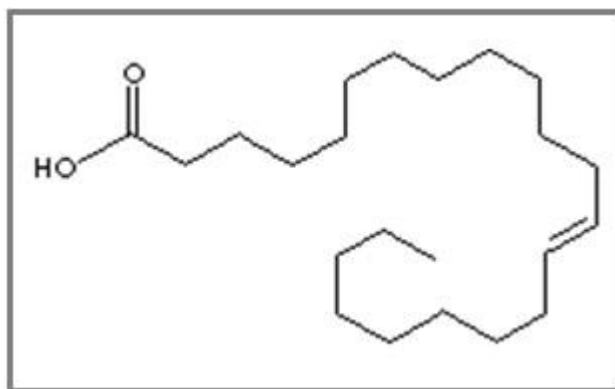
A kifejlett levelek nagy mennyiségben tartalmaznak vitaminokat (A-, B-, C-, K-vitamint valamint folsavat), ásványi anyagokat (vasat, foszfort, káliumot, mangánt, szilíciumot, magnéziumot, kalciumot), klorofillt és béta-karotint. Emellett nagy mennyiségben tartalmaz erukasavat; izraeli kutatások szerint 37-38%-ban (Yaniv és mtsai., 1993).

A rukkola jellegzetes ízét az izotiocianátoknak köszönheti. Ezek szerves kénvegyületek, amelyek általában intenzív aromájú zöldségek, fűszerek pikáns ízeért felelősek, ilyenek például a torma, mustár, vagy a hazánkban még kevésbé elterjedt vaszabi. A *Brassicaceae* családra intenzívebb kénanyagcsere jellemző, innen származnak a rukkola további ízanyagai. Egyéb hatszénatomos komponensek egészítik ki az aromákat, mint például a zöld levelek és frissen vágott fű illatáért felelős „levél” alkohol, illetve ennek a vajsav észtere.

A *Diplotaxis tenuifolia* jelentős hatóanyaga az erukasav. Az erukasav jelenléte a *Brassicaceae* családra jellemző, megtalálható a repcében (*Brassica napus*), fehér mustárban (*Sinapis alba*), de nagyobb mennyiségben az abesszin tátorjában (*Crambe abyssinica*).

Az erukasav egy omega-9 telítetlen zsírsav, mely 22 szénatomból álló lánc (3. ábra). A szénláncban egyetlen kettős kötés található, kapcsolódik hozzá egy keto- és egy hidroxicsoport. Cisz-13-dokozénsavnak is nevezik, izomerizációval pedig a brassica-sav képződik belőle transz-izomerként.

Az erukasav egy fehér, viaszos anyag. Már 35°C-on megolvad, forráspontja pedig igen magas, 359°C. Mint a zsírsavak általában, vízben nem oldható, de a legtöbb szerves oldószerben (pl. etanol, metanol) igen.



3. ábra: Az erukasav szerkezeti képlete, jelölése: 22:1 ω-9

(<http://www.chemicaland21.com/industrialchem/organic/112-86-7.gif>)

3.1.5. Termesztése

A rukkola szabadföldön és üvegházi körülmények között egyaránt termesztethető (az így termesztett növények vetés után 40 nappal már értékesíthetőek). Nem túl igényes növény, így termesztése könnyen kivitelezhető. Magvettéssel szaporítjuk, évente kétszer is vethetjük, tavasszal és ősszel. A tavaszi vetésű rukkola a félárnyékos helyet kedveli, ám a részleges napsütést is elviseli. Amennyiben teljes napfénynek tesszük ki, a szárazabb körülményekre úgy reagál, hogy erőteljesebb ízű leveleket fejleszt, ezek színe is sötétebb lesz, amit akár már kellemetlennek is érezhetünk. Az őszi vetéshez napos, szélvédett területet kell választanunk, hogy sikerrel áttelelhessen. Bár a talaj szempontjából sem túl érzékeny, ha lehetőség van rá, öntözzük, illetve száraz körülmények között gondoskodni kell a talajtakarásról is. A folyamatos termés érdekében szakaszosan is vethetjük. A jobb területkihasználás érdekében vethetünk mellé zellert, babot, de az *Apiaceae*, *Cucurbitaceae* és *Solanaceae* családba tartozó növényeket kerüljük. Gyomosodásra hajlamos, a kultúrában jelentős gyomoknak számítanak a disznóparéj félék (*Amaranthus sp.*), a porcsinok (*Portulaca sp.*) illetve a fehér libatop (*Chenopodium album*).

Vetése talajfelszínre történik, majd vékony réteggel takarni kell. Emellett balkonládába is vethetjük, hiszen kis tenyészterületigényű. Világos, napsütötte helyet keressünk neki. Fontos, hogy a csírázás ideje alatt végig nedvesen tartsuk és a későbbiekben is rendszeresen öntözzük. Annak ellenére, hogy apró magvú, nem szükséges egyelni. A magok 10-20°C fokon 5-10 nap alatt csíráznak.

Növényvédelmére igen nagy figyelmet kell fordítani, mivel számos kártevő jelent veszélyt számára. A rukkola növényvédelmét Mary Louise Flint: *Pests of the Garden and Small Farm* (1990) és Ralph Howard Davidson illetve William Francis Lyon *Insect pests of farm, garden, and orchard* (1987) című könyve alapján dolgoztam fel. A hártváscsárnyúak rendjéből a maggyűjtő hangyákat (*Pogonomyrmex rugosus*) kell megemlíteni. Nem gyakori károsítói a növénynek, ám ha mégis előfordulnak a palántákat és fiatal leveleket rágnak meg, illetve behordják a vetőmagot a bolyba. Biológiai védekezési módszer nem ismert, a kémiai növényvédelem megoldható, a szert a hangyaboly körül kell kihelyezni, hogy a dolgozók szétterjeszthessék a többi hangya között, és eljusson a termékeny nőstényig. A *Coleoptera* rendbe tartozó rovarok már nagyobb gondot jelentenek. Négy fajt kell kiemelnünk: kis földibolha (*Phyllotreta striolata*), nyugati földibolha (*Phyllotreta pusilla*), nyugati csíkos földibolha (*Phyllotreta ramosa*) és a földi bolha (*Epitrix cucumeris*). A nőstény földibolha a talajra, levélre, növényen keletkezett sebekbe helyezi petéit. Fajtól függően a kifejlődött lárvák leveleken vagy gyökereken fognak táplálkozni, míg az imágók a növényeket károsítják, kis lyukakat rágva a levél fonáki részébe, óriási kárt okozva a fejlődő állományban. Már egy kis populáció is képes kipusztítani egy teljes ültetvényt. A földibolhák által károsított leveleket nem lehet értékesíteni. Természetes ellenségei nem ismeretesek, vegyszerekkel

lehet ellenük védekezni. Megelőzésre is figyelni kell, mert könnyen átmigrálhatnak a szomszéd ültetvényekről. Fontos a vetésforgó alkalmazása, de körültekintően kell megválasztani a növényösszetételt, mert a földibolháknak sok tápnövényük van.

A tücskök (*Gryllus sp*, *Orthoptera* rend) kis mértékben jelentenek veszélyt, ám ha felszaporodnak az okozott kár mértéke is megnő. Növényvédő szerekkel lehet ellenük védekezni, ám nincs kimondottan tücskök ellen ható. Meg kell említenünk az aknázó legyeket (*Liriomyza sp*, *Diptera* rend), melyek lárvái járatokat fúrnak a levél mezofillumába, szintén eladhatatlanná téve a terméket. *Diglyphus* és *Chrysocharis* nemzetségbe tartozó parazita darazsak a természetes ellenségeik, így felhasználhatóak biológiai növényvédelem céljából.

A lepkék rendjének (*Lepidoptera*) számottevő képviselője jelent gondot a rukkolatermesztés szempontjából. A mocsári lepke (*Estigmene acrea*) hernyója tömegesen ősszel jelenhet meg, amikor úgy a palántákat, mint az idősebb leveleket lerágják. Kémiai módszerekkel lehet ellenük eredményesen védekezni. A káposztamoly (*Plutella xylostella*) lárvái a növény bármely fejlődési fázisában képesek károsítani, ám legjelentősebb kárt a palántákon teszik. A kémiai védelem megoldható.

A levéltetvek károsítása szintén jelentős a rukkolán. A zöld őszibarack-levéltetű (*Myzus persicae*) és csíkos burgonya-levéltetű (*Macrosiphum euphorbiae*) a floém nedveit szívják ki, emiatt a növény fejlődése megreked, illetve a növény halálát is okozhatják. Emellett fontos szempont, hogy vírusvektorként is működnek, pl az AMV (alfalfa mosaic virus), LMV (letuce mosaic virus) és BMV (bean yellow mosaic virus) vírusok kerülhetnek be így a növény keringési rendszerébe. Léteznek ugyan olyan paraziták, amelyekkel szabályozni lehet a tetvek számát, ám ennél hatékonyabb a vegyszerek használata. A tripszek (*Frankliniella occidentalis*) hasonló tüneteket okoznak, időnként a levelek deformálódását is megfigyelhetjük.

A rovarok mellett a gerincesek is veszélyeztethetik állományunkat. Elsősorban a madarak okozhatnak nagy kárt, többek között jelentős a pacsirta, seregély, fekete rigó, csóka, több verébfaj, és a pintyek kártétele, ami a magok elfogyasztásában nyilvánul meg, időnként a palántákba is belecsípnek. Ezeket akusztikus és vizuális ijesztő berendezések segítségével lehet távol tartani. A pockok és ürgék járataik ásása közben károsíthatják az öntöző berendezést, illetve megrághatják a palántákat. Ezeket a kártevőket csapdázással iktathatjuk ki, illetve természetes ellenségeik (ragadozók, vércsék, üregi baglyok) is könnyíthetik a munkánkat.

Az állati kártevők mellett a gombás megbetegedések is veszélyeztetik a sikeres termesztést. A peronoszpóra (*Peronospora parasitica*) fertőzése a levélfonákon kezdődik, majd áttérjed a levél színére is, klorotikus sérüléseket mutatva, amik a későbbiekben lila színűvé válnak. A fiatal leveleken száradást idézhet elő, amit a levél lehullása követ, az idősebb levelek szövete papírszerűvé válik. A fertőzés következménye a fotoszintézis mértékének csökkenése, ezáltal a

növényállomány nagymértékű elhalása. A peronoszpórával fertőzött növényt kizárólag kémiai módszerekkel lehet kezelni.

A baktériumos fertőzések közül a fekete rothadásra (*Xanthomonas campestris*) kell figyelniük. Kezdetben sárgás-narancssárgás V-alakú foltok jelennek meg a levelek szélén, majd ezek megszáradnak és kiesnek a növényből. A fekete rothadás a növény keringési rendszerét károsítja, innen kapta a nevét is: a szállítóyalábok fekete színűvé válnak. Ez a kór különös figyelmet igényel alacsony hőmérsékleten, mivel ilyenkor nem mutat tüneteket, csupán apró barna foltok jelennek meg a leveleken, ami könnyen összetéveszthető más bakteriális fertőzéssel. Elhúzódó fertőzöttség esetén a növény gyengülését, hervadását, pusztulását okozhatja, ezáltal nem lesz értékesíthető. Kémiai védelme nem ismert, alternatív megoldásként komposztot szórhatunk a talajra, hogy megelőzzük a patogének szaporodását. Virális betegségek közül a már leírtakon túl a RaMV (radish mosaic virus) fertőzése jelentkezhethet rajta.

A rukkola beporzása rovarokkal történik, és jelenlétük feltétlenül szükséges, ha nagymennyiségű termést szeretnénk. A virágok reggel nyílnak és megközelítőleg három napig maradnak ilyen állapotban. Ezután felnyílnak a portokok a bibeszál felé irányulva, ami lehet rövid vagy hosszú. Nektár mindaddig nem képződik, amíg a virágok nem nyíltak ki annyira, hogy a méhek a lepellegek között elérjék azt. Free (1970) kutatása szerint a hozam, mézelő méhek telepítésével megnövelhető. Azok a növények, amelyeket elkülönítve termesztettek nem hoztak magot. A virágok csupán 7%-a termékenyült meg önbeporzás által, míg a keresztbe porzás 98%-os sikert jelentett. A rügyeket auxinnal kezelve növelhető a képződő magok mennyisége (Maini és Sandhu, 1959).

A magok csírázási aránya fungicidek használata után megnőtt, mivel csökkentette a maggal terjedő gombák általi veszteséget. Ezen gombák nagyrésze az *Aspergillus* nemzetségbe tartozik (*Aspergillus flavus*, *A. niger* és *A. fumigatus*), de az *Alternaria* fajok is veszélyt jelenthetnek, mint például az *Alternaria alternata* és *A. flavus* (Gupta és Saxena, 1984). A magokat 0,5-1 cm mélyre kell vetni, 15-20 cm-es sortávolságra, a tőtávolság 5 cm (*Eruca sativának* nagyobb a tenyésztési területe). Ilyen módon 3 kg/ha vetőmag szükséges. Amennyiben magfogás a cél 40 cm-es sortávolságot és 20-30 cm-es tőtávot kell tartani. Epigeikus csírázás jellemző rá. A magok csírázásához legalább 10°C szükséges, a két sziklevel 5-6 napon belül megjelenik a talaj felszínén. Oswal és Sharma (1975) csírázási potenciállal kapcsolatos kísérleteket végeztek *Eruca sativa* magjain. 0,5 és 1%-os kálium-nitrát oldatban, 10 és 100 ppm koncentrációjú indol-ecetsavban és vízben vizsgálták, hogy melyik a legjobb előcsíráztató módszer. Az időintervallum egy órától 2 napig tartott. A legjobb módszernek a 6 órán át tartó vízben való áztatás bizonyult, amit az esti órákban történő vetés is pozitívan befolyásolt. Narwal és mtsai (1990) cirok vizes oldatában figyelték a csírázást. Különböző koncentrációjú oldatokat használtak (0-10%). Enyhe csökkenést

figyeltek meg, amikor a koncentráció meghaladta a 4%-ot. A csírázás ideje alatt a sziklevelek triglicerid tartalma az erukasav növekedésével egyenes arányban csökken (Sukhija és Bhatia, 1972).

Ha a vetés célja, hogy minél nagyobb mennyiségben hozzon magot, fontos betartani a vetési időt. Indiai kutatások szerint az október elsején vetett magokból származó termés 0,81 t/ha volt, 90%-al eredményesebb volt, mint a november végi vetésből származó termés tömege (Singh és Singh, 1985). A vetés késleltetése csökkentette a magok fehérje- és olajtartalmát illetve a hozamot. A sortávolság változtatása nem eredményezett szignifikáns változásokat (Singh és Rajput, 1993).

Törökországban a tenyészterület változtatásának a következményeit vizsgálták *Eruca sativa* esetében. A sortávot 30, 40 és 50 cm-re adták meg, míg a tőtáv állandó, 5 cm maradt. A termésmennyiség ugyan nem változott, de a magok tömege akkor volt a legnagyobb, amikor 30 cm-es sortávot alkalmaztak. Maliwal és Mundra (1990) kísérleteiben a magok olajtartalma csökkent a sorok közötti távolságok növelésével, ezeket az eredményeket 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: *Eruca sativa* levélhozama és olajtartalma a sortávolság függvényében

Sortáv (cm)	Hozam (t/ha)	Olajtartalom (%)
30	0,82	33,9
45	0,75	32,9
60	0,69	32,8

Fogyasztásra első sorban a fiatal levelek ajánlottak, mivel az idősebbeknek sokkal intenzívebb, csípősebb az aromája. A fiatal levelek ízét gyakran mondják édeskésnek, a dió vagy földimogyoró ízéhez hasonlítják. Amennyiben egészséges állományt sikerült felnevelnünk, ajánlott mindig frissen szedni, mert hűtőszekrényben tárolva már néhány nap után megbarnul, megpuhul.

Az értékesítésre szánt rukkola szedését gépesíteni is lehet. A levágott leveleket konténerekben szállítják a csomagolóüzemekbe, ahol háromszori mosást a levelek tisztítása követi, ami azt jelenti, hogy eltávolítják a fölösleges növényi részeket. A továbbiakban műanyag dobozokba vagy zacskókba csomagolva kerülnek a vásárlók elé. A rukkolát megtalálhatjuk különböző előre összeállított salátakeverékekben is. Az eladhatóságát és szállíthatóságát befolyásolja a termék megjelenése, eszerint nem ronthat a megjelenésén penész vagy rothadás, illetve a szedés során esetleg a növények közé került kártevőket is el kell távolítani csomagolás előtt (Martínez-Sánchez, A. és mtsai, 2006).

3.2 A mikroszaporítás

3.2.1 Történeti áttekintés

A mikroszaporítás az *in vitro*, vegetatív szaporításnak egy egyre inkább elterjedő módszere, ami mára már iparággá nőtte ki magát. Mikroszaporítás során az utódok az anyanövény tökéletes másolatai, klónjai lesznek, hiszen nem az ivarsejtek vesznek részt a szaporítás folyamatában, hanem az új egyedek az anyanövény szomatikus sejtjeiből alakulnak ki. Ezeket a testi sejteket, szöveteket steril, kontrollált körülmények között táptalajon tenyésztjük. Jelenleg négy technikáját ismerjük: a merisztéma- és hajtáskultúrákat, a járulékos szervtenyészeteket, illetve a szomatikus embriogenezist (Dudits és Heszky, 2000).

Az első folyamatosan fejlődő merisztématenyészetet Loo indította 1945-ben. Ő *Asparagus* – szal foglalkozott, 5 mm-es hajtáscsúcsokat nevelt kezdetleges táptalajon. Egy évvel később Ball (1946) fehér csillagfürt (*Lupinus albus* L.) levélprimórdiumait tartalmazó merisztémával próbálkozott és sikerrel járt, ám ennél kisebb izolátumokat csak akkor sikerült kitenyészteni, amikor a táptalajokba kókusztejet vagy GA –t (gibberellinsav) tettek kiegészítésként. A kutatások ezek után a generatív merisztémák és a virágfejlődés *in vitro* indukcióját illetve a vírusmentesítést célozták meg (Dudits és Heszky, 2000).

A nagy áttörés 1960-ban valósult meg, amikor a francia kutató, Morel sikeresen mikroszaporított egy orchideafajt. A kísérlet célja a *Cymbidium* vírusmentesítése lett volna, ám a vizsgálatok során protokormok (az orchideákra jellemző szaporító képlet kezdetleges formája) kialakulását figyelte meg. Sikerült bebizonyítani, hogy a protokormok feldarabolásával és táptalajra helyezésével a *Cymbidium* szaporítható.

Szintén egy lényeges mérföldkő, hogy Toshio Murashige és Folke K. Skoog 1962-ben összeállították a róluk elnevezett MS táptalajt, amelyen mai napig is nagyon sokféle kultúra tenyészthető.

A következőkben egyre több fajra dolgoztak ki speciális mikroszaporító rendszert, aminek következtében a '80-as években már világszerte kereskedelmi célú laboratóriumok alakultak. Az első ilyen üzemi laboratóriumok Morel (1960) felfedezésén elindulva első sorban orchideák szaporításával foglalkoztak. 1986-ban megközelítőleg 130 mikroszaporító laboratórium volt hivatalosan bejegyezve világszerte, a legnagyobb hozammal az angol, francia, belga, olasz és holland üzemek rendelkeztek (Dudits és Heszky, 2000). Ma már első sorban a piaci elvárások befolyásolják leginkább az előállított növények mennyiségét. Gazdasági jelentősége igen nagy, évente körülbelül 700 növényfajt szaporítanak ezzel az eljárással. Európában a hetvenes évek elején 4 millió volt a mikroszaporított növények száma, ami 1979-re már 20 millióra növekedett. A '90-es évek elejére már évi 230 millió volt az ily módon szaporított növények száma, aminek nagy része

Hollandiában készült. Ám néhány évvel később megjelent az indiai és dél-afrikai konkurencia, aminek hatására a termelést kénytelenek voltak csökkenteni. Első sorban élelmisznőnövények (zöldség, gyümölcs) szaporítása a meghatározó, de kisebb mennyiségben dísnövényeket is mikroszaporítanak (Dudits és Heszky, 2000). Az Amerikai Egyesült Államokban Európával egy időben indult meg az üzemi termelés és szintén az orchidea volt a legnagyobb mennyiségben előállított termék. Mára már körülbelül 100 laboratórium foglalkozik szervezeten mikroszaporítással, ezek közül legjelentősebb a floridai, melynek évi hozama meghaladja a 6 milliót (Dudits és Heszky, 2000). Náluk, Európával ellentétben, első sorban a dísnövények iránt a legnagyobb az érdeklődés, de foglalkoznak zöldségnövényekkel, gyümölcsökkel és gyógynövényekkel egyaránt. Közel-Keleten az izraeli laboratóriumok hozama számít a legjelentősebbnek, mivel az összesen előállított 23 millió növényből 20 millió itt készül. Nagy mennyiségben szaporítanak datolyapálmát, ezen felül a banán, burgonya, pisztácia és a rózsza előállítása folyik nagyüzemi szinten (Dudits és Heszky, 2000).

Maróti professzornak köszönhetően 1965-ben már Magyarországon is elkezdődhetett a nagyüzemi szaporítás ezen módszerének alkalmazása, ugyanis ő volt az, aki annak idején Morel módszereit átvette és továbbfejlesztette. 1990-ig nagy számban állítottak elő dísnövényeket, amiket első sorban vágott virágnak szántak (pl. gerbera, szegfű). Ez leginkább a jól működő termelői szövetkezetnek volt köszönhető (Mezőgazdasági Termelői Szövetkezet és Kertészeti Termelői Szövetkezet). Az említett szegfűvel és gerberával az Óbuda TSz és Rozmaring TSz foglalkozott, de egyéb szövetkezetekben (Szombathelyi Kertész Mg. Tsz, Sasad TSz) egzotikusabb növények szaporítására is szakosodtak, mint az orchideák és broméliák (Dudits és Heszky, 2000). A Propomatic-rendszer kidolgozása Fári Miklós (Zöldségtermesztési Kutató Intézet, 1996) nevéhez kötődik. Ez nagymértékben felgyorsította és leegyszerűsítette a munkát, hiszen minimalizálódott a kézi munkaerő szükséglete. A Propomatic-rendszerrel automatizálni tudták a táptalajfőzést és adagolást illetve a gázsterilizációt is. A Kertészeti Kutató Intézet fás szárúak vírusmentes szaporítóanyag előállítására szakosodott. (Dudits és Heszky, 2000). A következőkben, 1990-től megváltozott a mikroszaporítás hazai helyzete. A TSz-ek helyett kisebb laboratóriumokban folytatódott az üzemi munka, illetve megnőtt a magánvállalkozók szerepe is, akik főképp exportra szánt növényeket termeltek többek között kivit, banánt, egyéb fás szárú növényt. Akkoriban országszerte 3 millió palánta körüli volt a magánvállalkozások éves termelése (Dudits és Heszky, 2000).

A Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem dendrológia tanszékén Jámborné Dr. Benczúr Erzsébet vezetésével jelentős számú dísnövényfaj számára fejlesztettek ki megfelelő mikroszaporítási technológiákat (Dudits és Heszky, 2000). Az ő nevéhez fűződik a Magyar Növény-Mikroszaporítók Egyesületének megalakítása 1993-ban.

3.2.2. A mikroszaporítás módszerei

A mikroszaporítás a szövettenyésztés azon formája, amikor egy anyanövény adott szervéből egy új növényt klónoznak, azaz genetikai állományuk teljesen megegyezik majd. Célja általában egy értékes genotípus örökítése, amelyet az új állományokban nagy mértékben fel tudunk majd szaporítani. A mikroszaporítási technikák fajokként, fajtákként eltérnek egymástól, amely módszerek általában titkosak, mivel a mikroszaporító vállalatok saját eljárásaikat szabadalmaztatják.

A mikroszaporítás négy tenyésztési eljárás alapján történhet: hajtástenyésztés, járulékos hajtástenyésztés, járulékos szervtenyésztés és szomatikus embriogenezis. A mesterséges magok is ide sorolhatóak, amelyek sejtszuspenzióban fejlődött kapszulázott szomatikus embriók. A „szomatikus” kifejezés utal arra, hogy az ilyen módon történő szaporítás során tulajdonképpen az anyanövény klónjait hozzuk létre. A szomatikus embriót körülveszi egy mesterséges endospermium, mint táplálószövet, burka pedig egy szintetikus maghéj (Bornmann és mtsai, 1993).

A XX. század jelentős újítása volt, hogy megoldották mikroszaporítási folyamatok automatizálását a nagyüzemi termelés optimalizálása érdekében. Többek között a RITA tenyésztési rendszer is ide sorolható. Ennek lényege, hogy szilárd táptalaj helyett folyékonyt használ, ami jelentősen csökkentette a költségeket és a munkaerő szükségletet. A RITA használata eddig igen praktikusnak és hasznosnak bizonyult, leginkább a szomatikus embriók érlelésében és csíráztatásában. A következő innováció Ausztráliában a Vitron 501 mikroszaporító robot kifejlesztése volt. Gyökeres vagy már hajtással rendelkező növényeket állít elő, évente 15 millió növényt (első sorban akácfát, tikkát és eukaliptuszt) (Dudits és Heszky, 2000).

A fotoautotróf mikroszaporítási technológia alapja, hogy a táptalaj szerves összetevőit fél koncentrációban adják csak hozzá, cukrot pedig egyáltalán nem tartalmaz, ehelyett a levegőből származó szén hasznosítják. A CO₂ és fényforrás szabályozásának eredményeként erőteljesebb, jobb minőségű növényeket kapunk (Dudits és Heszky, 2000).

A bioreaktorokban történő mikroszaporítás két lépésben zajlik: először citokinines kezeléssel megindítják a merisztémák differenciálódását, ezek szaporodását fermentorban tartják fenn, amely során sejtaggregátumok és rügyaggregátumok keletkeznek. Ez utóbbi nagyon gyorsan szaporodik, mondhatni korlátlan szaporítást tesz lehetővé (Gorst és mtsai, 1999).

Az üzemi mikroszaporítási technológia a következő lépések szerint működik: kiválasztásra kerülnek a szaporításra szánt anyanövények, majd ellenőrizték, hogy biztosan kórokozómentes legyen az alapanyag. Ezután a növényt darabolják, a felhasználni kívánt részeit sterilizálják, a fajnak, genotípusnak megfelelő táptalajra helyezik. A törzstenyésztések fenntartása magában foglalja, hogy mindig biztosítják a növények számára ideális körülményeket, aminek legfontosabb eleme, hogy havonta passzálják őket. Fokozottan ügyelni kell arra, hogy átoltáskor ne fertőződjön

be az állomány. Amikor a növény már elérte vagy megközelíti a teljes fejlettséget, előkészítik az akklimatizációra. Ilyenkor fokozatosan szoktatják hozzá az állományt a természetes körülményekhez (fény, hőmérséklet, levegő páratartalma). Az ezek után történő edzés már *ex vitro* történik. A mikroszaporított növényeket fokozatosan kell az új körülményekhez szoktatni (Dudits és Heszky, 2000).

A mikroszaporítás óriási előnye, hogy kis helyen nagymennyiségű növényt szaporíthatunk fel, viszonylag rövid idő alatt, és mindez lehetővé teszi a folyamatos előállítását. Az előállított tenyészetek könnyen szállíthatóak, amit a kis helyigényük tesz lehetővé. Mindig egészséges állományt kapunk, hiszen csakis kórokozómentes anyanövényekkel dolgozhatunk, a visszafertőződés esélye is minimális, mivel minden munkafolyamat szigorúan steril körülmények között zajlik, ugyanezért a környezeti tényezők sem befolyásolják a szaporítást. Manapság nagy előnye, hogy a folyamatok automatizálhatóak (Dudits és Heszky, 2000).

Emellett nem elhanyagolható, hogy fenn áll a fertőződés veszélye, ami a folyamat bármelyik lépésénél következne be, az egész állományt elpusztíthatja. Mivel az akklimatizáció nincs minden egyes növényfajra tökéletesen kidolgozva, kiültetéskor is számítani kell veszteségre. Az előállított növények genotípusban eltérhetnek az anyanövénytől (a szomaklonális variabilitás miatt). Nem elhanyagolható tényező, hogy a növények ilyen fajta szaporítása kizárólag laboratóriumi körülmények között végezhető hozzáértő munkaerővel, nagy befektetés árán (Dudits és Heszky, 2000).

3.2.3. *In vitro* morfogenezis

Az *in vitro* növényi rendszerek sajátossága, hogy nincs szükségünk szaporító sejtekre, már akár egyetlen szomatikus sejtől is regenerálhatunk egy teljes növényt. Az ontogenezis ezen formájának jelenleg két alternatívája ismert: szomatikus embriogenezis és organogenezis.

A szomatikus embriogenezis kiinduló pontja egyetlen testi sejt, vagy ilyen sejtek csoportja. Ez a jelenség csak a növényvilágban figyelhető meg, akár spontán módon is megtörténik. A *Bryophyllum daigremontianum* levélszélein kis sarjakat hoz, melyek lehullva életképes növényekké fejlődnek. Az első szomatikus embriogenezis elindítására alkalmas körülményeket a német Reinert és amerikai Steward alkotta meg 1958-ban, ők sárgarépa szuszpenziót használtak (Reinert, 1959). Módszerük az volt, hogy a kallusz táptalajából kihagyták a 2,4-D-t, ezáltal merisztematikus központok alakultak ki benne, a szomatikus embriogenezis pedig ezen képződmények felületi sejtjeiből indukálódott. Úgy egyszíkű mint kétszíkű növényeknél megfigyelhető ez a folyamat. A szomatikus embriogenezis növényanatómiai szempontból nem tér el a zigotikus embriogenezistől, ám adódhatnak morfológiai különbségek.

Az ontogenezis másik módja az organogenezis. Ennek két lépése van: először merisztéma

differentiálódást figyelhetünk meg, majd ezt követi a tulajdonképpeni szervdifferentiálódás. A merisztéma differentiálódás menete és eredménye auxinok és citokininek különböző arányaival befolyásolható. A szervdifferentiálódás már ezeknek a merisztémáknak a további morfogeneziséből származik. Ehhez a választott növényi részt, ami tetszőlegesen lehet levéldarab, sziklevel, szár, gyökérdarab stb. táptalajra kell helyeznünk. A táptalaj összetétele fajról fajra változhat. Az így lekerült szervrészek sejtjei a sebzési felületeken intenzív osztódásba kezdenek, azaz kalluszt képeznek, így elmondható, hogy a hegyszövet dedifferentiálódott sejtekből áll, melyek elvesztették eredeti funkciójukat. Hogy a továbbiakban a kalluszból milyen szerv differentiálódik ismét a használt hormonoktól függ. Hajtásdifferentiálódáskor külön fejlődik a protoderma, a levélprimordiumok illetve a hajtástenyészőkúp. Az előző a tunikából alakul ki, ami a hajtáscsúcs-merisztéma külső burka. A protodermából lesz a későbbiekben az epidermisz. A levélprimordiumokat a kerületi merisztéma hozza létre. A továbbiakban kialakul a prokambium és a szállítónyaláb-kezdemenyek; mindezek fejlődésének a következménye a hajtástenyészőkúp kialakulása. Kifejlődésben a gyökértenyészőkúpot megelőző hisztogének (szövetképzők) az általános merisztémából alakulnak ki (Dudits és Heszky, 2000).

3.2.4. Rukkola *in vitro* kísérletek

Az eddigi mikroszaporítási kísérletek különböző növekedésszabályozók hatását vizsgálták protoplaszt regeneráción illetve ezt követően olyan palántákon, amelyek organogenezisen vagy szomatikus embriogenezisen keresztül jöttek létre (Sikdar és mtsai, 1987). Az így kapott növények nem mutattak semmilyen deformációt és diploidok voltak. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy érdemes a protoplasztfúzióval tovább kísérletezni, például különböző stressztoleranciák kialakítása érdekében.

Parkash és mtsai (1989) *Eruca sativa* szikleveleinek regenerációját különböző koncentrációjú NAA-val (naftilecetsav), BA-val (N6-benziladenin) és kinetinnel kiegészített MS táptalajon vizsgálták. A legjobb eredményt a 2 mg/l BA vagy kinetin hozzáadása adta, míg a NAA koncentrációját alacsonyan tartották.

Amla és Dhingra (1991) kéthetes palánták nóduszt tartalmazó növényi részeit szintén MS táptalajon tenyésztették, amihez különböző koncentrációjú citokinin és auxin jellegű hormonokat adtak. Ezek hatására megnőtt a gyökerek és hajtások száma.

Ahloowalia 1987-es kísérletében szövettenyésztési lehetőségeket vizsgált. Éretlen embriók organogenezis jeleit mutatták a hipokotilon, míg a sziklevelek fonáki oldalán szomatikus embriogenezist fedezett fel.

3.2.5. Genetikai transzformáció

Genetikai transzformáció során különböző géneket integrálhatunk adott növények genomjába, eredményül egy transzgénikus növényt kapunk, ami egy vagy több tulajdonságában eltér az eredeti növénytől (szerk. Velich, 2001). Az idegen géneket direkt és indirekt úton juttathatjuk be a gazdanövénybe. A különböző vektorokkal történő fertőzés a genetikai transzformáció közvetett formáját jelenti. *Agrobacterium* vektorokkal történő fertőzés esetén természetes génátviteli rendszerként *Agrobacterium* törzseket használunk, amelyek hordozzák az integrálandó génszekvenciát. Ebből a nemzetségből két talajbaktérium fajt használunk, az *A. tumefaciens*-t és az *A. rhizogenes*-t, amelyek a növények sebzési helyein tumorképződést indukálnak. Ezt az *A. tumefaciens* sejtjeiben jelen lévő tumort indukáló (Ti-) plazmid okozza (Zaenen és mtsai, 1974). Fertőzés során ennek egy része, a transzfer (T-) DNS átkerül a fertőzött növény sejtjeibe és beépül a sejtmag DNS-ébe.

4. Anyag és módszer

Munkánk során a Rédei Kertimag Vetőmagkereskedelmi Zrt.-től vásárolt vetőmaggal dolgoztunk. A vetőmagból felnevelt növényeket, illetve azok részeit használtuk fel a mikroszaporítási, kalluszindukciós és transzformációs kísérletek során.

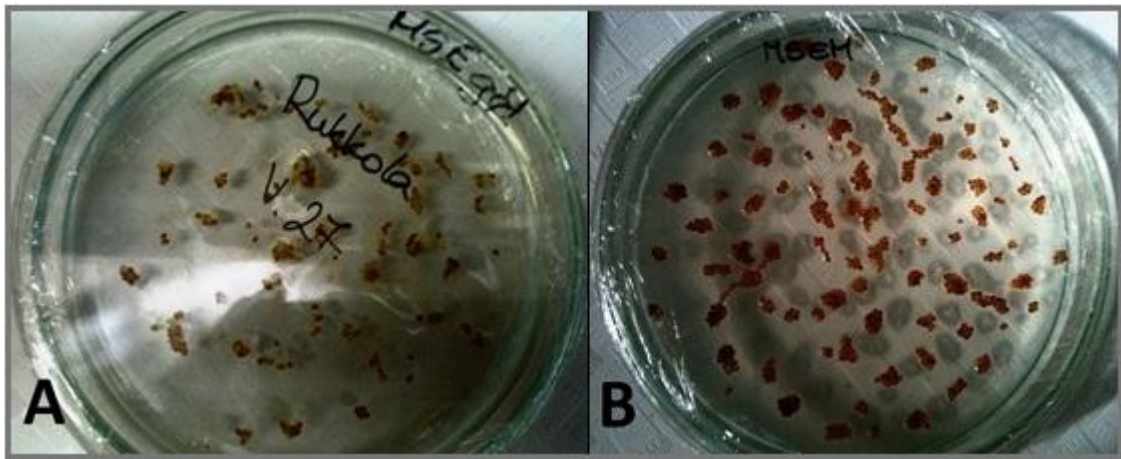
4.1. Steril magvetés és csíráztatás

A steril tenyészet indításához magokat vetettünk táptalajra. A befertőződés elkerülés érdekében lamináris fülkében történt a magvetés előre sterilizált eszközökkel (Erlenmeyer lombik, üvegbot, desztillált víz).

Vetésig a magokat szobahőmérsékleten tároltuk. A rukkola magjait három lépésben sterilizáltuk. A vetéshez körülbelül 600 magot használtunk. Először 25 ml 70%-os etil alkoholba helyeztük a magokat rövid időre (max 30 másodperc), majd következett egy tíz perces tartó sterilizálás 75 ml 15%-os nátrium-hipoklorit oldatban, amihez hozzáadtunk 3 csepp Tween 80-at. Ez egy nem ionos detergens, mely oldhatóvá teszi a membránfehérjéket. Emellett kipróbáltuk a 15 perces tartó 10%-os nátrium-hipokloritos áztatást is. A magokat időnként steril üvegbottal megkevertük, hogy az oldat minden oldalukat érje. A tíz perc letelte után 75 ml steril desztillált vízbe kerültek át a magok, amiben ismét tíz perces álltak. Ahhoz, hogy a sterilizáló szerek maradéktalanul eltűnjenek, ezt a lépést még kétszer megismételtük. A magokat elektronikus pipettor és steril műanyag hegy segítségével vittük át egyik sterilizáló közegből a következőbe.

Az első magvetés MSE illetve MSEM jelölésű táptalajokra történt, amint azt a 4. ábra is mutatja. Az MSE táptalaj a Murashige és Skoog (1962) által kidolgozott MS táptalaj alapösszetevőin kívül 0,1 mg/l BA és 1,1 mg/l 2,4-D növekedésszabályozó anyagokat tartalmaz. Az MSEM táptalajban pedig a makroelemek az MS táptalajhoz képest fele koncentrációban vannak jelen. Mindkét táptalaj 10 g/l szacharózt és 7 g/l oxid agart tartalmaz. A pH-t mindkét esetben 5,8-ra állítottuk be. Egy petri-csészébe körülbelül 200 mag került. A magvetést szintén pipettor segítségével végeztük el.

Az elvetett magokat két részre osztottuk: egyik felét hosszúnappalos körülmények között (16 óra megvilágítás, 8 óra sötét, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$) csíráztattuk fényszobában, míg a másik felét inkubátorba helyeztük, sötétre ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$).



3. ábra: *D. tenuifolia* magjai MSE (A) és MSEM (B) táptalajon

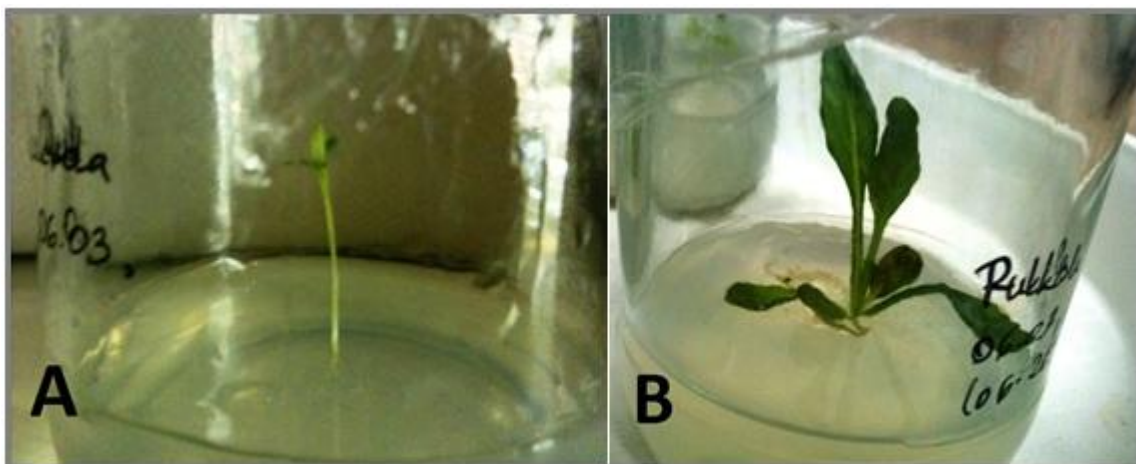
A későbbi magvetések során további négy hormonmentes táptalajt is kipróbáltunk: MS (Murashige és Skoog, 1962) CP (Chée és Pool, 1987), NN (Nitsch és Nitsch, 1969), Gamborg B5 (Gamborg és mtsai., 1968). Ezen táptalajok összetevőit a 3. táblázat tartalmazza. A magvetések során a pipettort csepegtető módra állítottuk át, mivel a korábbi magvetések alkalmával azt tapasztaltuk, hogy egyszerre túl sok mag jut a táptalajra, ami a későbbiekben megnehezítette a magok szétválasztását.

3. táblázat: A MS, NN, Gamborg B5 és CP táptalajok összetevői

	MS (mg/l)	NN (mg/l)	Gamborg B5 (mg/l)	CP (mg/l)
Mikroelemek				
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-	0,025	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,7	36,7	36,7	36,7
H ₃ BO ₃	6,2	10	3	6,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	11,94	10	0,85
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	10	2	8,6
Makroelemek				
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	492,30
CaCl ₂	332,02	166	113,23	-
KH ₂ PO ₄	170	68	-	170
NaH ₂ PO ₄	-	-	130,44	-
KNO ₃	1900	950	2500	1900
MgSO ₄	180,54	90,27	121,56	180,54
NH ₄ NO ₃	1650	720	-	1650
(NH ₄)SO ₄	-	-	134	-
Vitaminok				
Biotin	-	0,05	-	-
Folsav	-	0,5	-	-
Glicin	2	2	-	-
Mio-inozitol	100	100	100	10
Nikotinsav	0,5	5	1	1
Piridoxin HCl	0,5	0,5	1	1
Tiamin HCl	0,1	0,5	10	1

4.2. Mikroszaporítás

Vetés után tíz nappal lamináris fülke alatt MSEM táptalajjal megtöltött bébiételes üvegbe tettük át a csíranövényeket a 5. ábra szerint. Az üvegeket a sterilitás megőrzése érdekében három réteg lélegző fóliával zártuk le. 21 nap után a növényeket ismét áttűzdeltük friss MSEM táptalajra.



5. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* csíranövények első (A) és második (B) tűzdelés után

4.3. Kalluszindukció

A kalluszképződést kétféle táptalajon (NN és Gamborg B5) vizsgáltuk. Mindkét táptalaj esetében a TDZ (thidiazuron) illetve a TDZ+BA hormonkombináció hatását vizsgáltuk. Az egyes táptalajokban felhasznált hormonok koncentrációját a 4. táblázatban láthatjuk. Kontrollként hormonmentes táptalajokat alkalmaztunk.

4. táblázat: A kalluszindukció során felhasznált táptalajok és növekedésszabályozó anyagok:

Táptalaj	Hormon	
	TDZ	BA
NN	0,05 mg/l	0,5 mg/l
	0,05 mg/l	-
B5	0,05 mg/l	0,5 mg/l
	0,05 mg/l	-

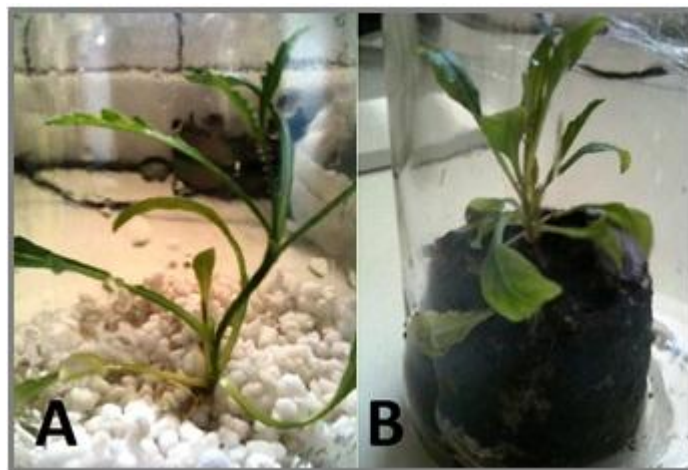
A kalluszindukciós kísérletekhez hipokotilt és sziklevelet használtunk. A kiindulási anyagot olyan formában daraboltunk, hogy minden növényi részen két vágási seb keletkezzen. A szik alatti szárrészeket fektetve illetve állítva, félig a táptalajba süllyesztve helyeztük el.

Ezen kívül szintén két vágásfelülettel ellátott lombleveleket helyeztünk hormonmentes NN és táptalajra a levél fonáki oldalával lefelé.

4.4. Akklimatizáció

Az edzést a különböző táptalajokról (MS, MSEM, CP, NN) lekerülő MSEM táptalajon mikroszaporított növényekkel végeztük. A kísérlet során csapvízzel nedvesített perlitbe (6.A ábra)

és tőzegkorongba (6.B ábra) helyeztük át a kifejlett növényeket. A növényeket tartalmazó bébiételes üvegeket továbbra is a fényszobában tartottuk. Azokat szintén három réteg lélegző fóliával takartuk, amit kezdetben a bébiételes üveg szájának egyharmadáig felnyitottunk. Folyamatosan növelve a rést, 14 nap után a fóliát teljesen eltávolítottuk. Az állományt kétnaponta öntöttük csapvízzel.



6. ábra: *D. tenuifolia* kifejlett növények perlitben (A) és tőzegkorongban (B)

A perlitből és Jiffy-ből a növények tőzeg és perlit 50-50%-os keverékével megtöltött 6x6 cm-es rekeszekkel rendelkező ültetőtálcába kerültek át. Az ültetőtálcán belül aszerint különítettük el őket, hogy milyen táptalajról származtak (2 db növény MS táptalajról, 2 db MSEM táptalajról, 3 db CP táptalajról és 4 db NN táptalajról). Ezt az elosztást mutatja az 7. ábra. A tálcát a továbbiakban klímaszekrénybe helyeztük, ahol a hőmérséklet $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, a páratartalom pedig 60-70%-os. Jeltáblával jelöltük, hogy melyik növény milyen táptalajról, majd pedig ültető közegből került ki. A növényeket kétnaponta öntöttünk 2,2 g/l koncentrációjú NN táptalaj oldattal.



7. ábra: Mikroszaporított rukkola növények tőzeg és perlit 50-50%-os keverékébe átültetve.

4.5. Transzformáció

A genetikai transzformációhoz az EHA101 (EHA101+pTd33) *Agrobacterium tumefaciens* törzset használtuk. Az EHA101(pTd33) vektor konstrukcióban a T-DNS megfelelő szakasza a *gusA* riportergén mellett kanamycin rezisztenciát biztosít a növény számára. A *gusA* gén valamint az *nptII* (neomycin-foszfo-transzferáz) szelektációs markergén működését a CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S promóter határozza meg. (Szegedi és mtsai., 2001).

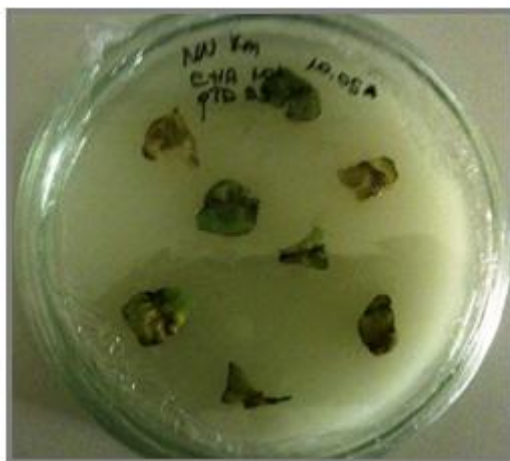
A baktériumot 28°C-on, sötétben, AB (Lichtenstein és Draper, 1986) táptalajon szaporítottuk fel. A táptalaj összetevőit az 5. táblázat tartalmazza.

5. Táblázat: az AB mininal táptalaj összetétele

Komponensek	Koncentráció (mg/l)
K ₂ HPO ₄	3000
NaH ₂ PO ₄	1000
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
KCl	150
Fe-EDTA	70
Vitaminok	
Glicin	2
Myo-Inozitol	100
Nikotinsav	0,5
Piridoxin HCL	0,5
Tiamin HCL	0,1

A baktériumból steril fülke alatt 5 oltókacsnyit 20 ml folyékony MS táptalajhoz adtunk, kiegészítettük 200 µl acetosziringonnal, majd 1 órán át rázattuk 28°C-on. Az acetosziringon szerepe az *Agrobacterium*-os kezelés hatékonyságának fokozása. Ezt követően a baktériumot tartalmazó táptalajt szintén steril körülmények között rápipettáztuk a NN táptalajra előkészített levélkorongokra (a levéldarabokon ismét két vágást ejtettünk). Két napig tartó kokultiváció után a levéldarabkák átkerültek 20 mg/l kanamycinnel, 300 mg/l claforannal és 300 mg/l carbenicillinnel kiegészített NN táptalajra (8. ábra).

Egy másik kísérletben hasonló feltételek mellett 24 órán át szaporítottuk rázatás során az *Agrobacterium*ot a táptalajban, ám ez esetben csak egy napig tartott az együtt tenyésztés. A levelek ebben az esetben is átkerültek antibiotikumokkal kiegészített táptalajra.



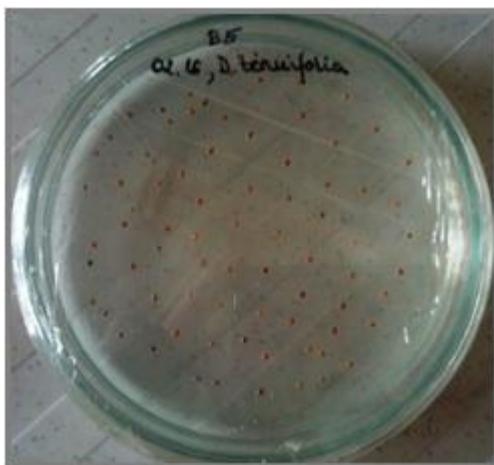
8. ábra: Rukkola levélkorongok antibiotikumot tartalmazó táptalajon.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1. Steril magvetés és csíráztatás

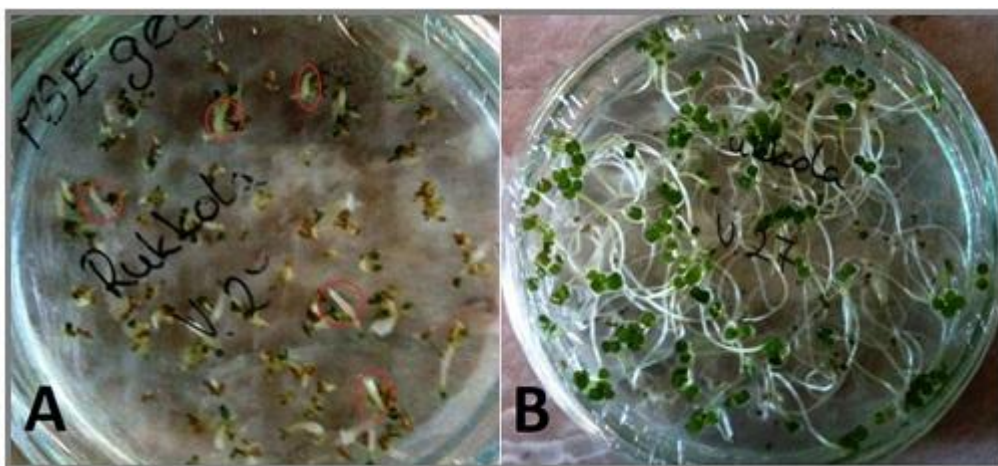
A sterilizálás megfelelőnek bizonyult, amikor 15%-os hipoklorit oldatban 10 percig áztattuk a magokat, ám a csökkentett koncentrációjú oldatban (10%) történő meghosszabbított idejű (15 perc) sterilizálás már túl soknak bizonyult, a magok elvesztették életképességüket. Kísérleteink során egyértelművé vált, hogy a magok egyértelműen sötétben csíráznak, nappali körülmények között ellenben egyáltalán nem.

A pipettor használata eleinte megnehezítette a magvetést, mivel egyszerre túl nagy mennyiségű mag került a táptalajra, nehéz volt ezeket széthúzni, hogy ne legyenek sűrűn egymás mellett. Ez a későbbiekben, a csírázó növények kitűzdelése során komoly gondot jelentett, mert a palántákat nem tudtuk úgy szétválasztani, hogy ne történjen közben befertőződés. Ezt a problémát kiküszöböltük a pipettor átállításával. Az eredményt az 9. ábra mutatja be. Csepegtető módban egyszerre 5-8 magot tudunk a táptalajra juttatni, így megoldható volt, hogy egy-egy petri-csészébe maximálisan 50 mag kerüljön, egyesével elhelyezve.



9. ábra: Csepegtető módban végzett magvetés eredménye.

Az első magvetés után jelentős különbségeket láthattunk a kétféle táptalajon (MSE és MSEM) található növények között. A hormonokat is tartalmazó (0,2 mg/l BA, 1,1 mg/l TDZ) MSE táptalajon a hipokotilok megvastagodtak (10.A ábra), míg növekedésszabályozóktól mentes MSEM táptalajon a szik alatti rész egy hét alatt megnyúlt (10.b ábra) és a növények megfelelő mennyiségű és állapotú gyökereket hoztak ahhoz, hogy átültethessük őket MSEM táptalajjal megtöltött bébiételes üvegbe. MSE táptalajon fejlődött megvastagodott hipokotillal rendelkező növényeket egy hét után áttettük hormonmentes MSEM táptalajra, de ezek a növények nem fejlődtek tovább, 3 hét után elpusztultak. Ezért a hormontartalmú MSE táptalajt a további magvetések során már nem alkalmaztuk.



10. ábra: *D. tenuifolia* csíranövények vetés után egy héttel MSE (A) és MSEM (B) táptalajon

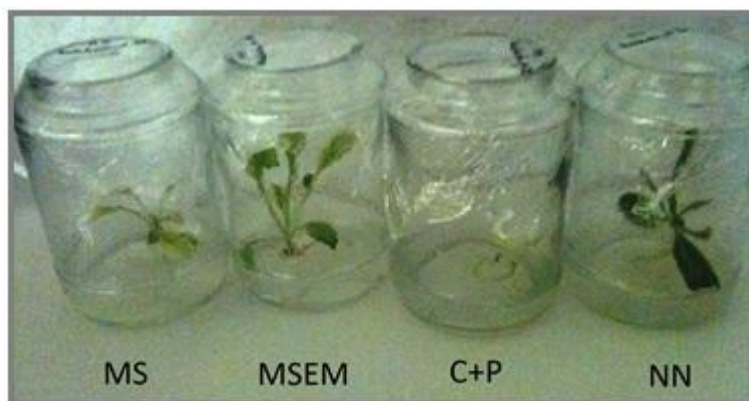
5.2 Mikroszaporítás

Az első vetésből származó növények közül csak az MSEM táptalajon csírázottakat tettük ki fényszobába, ahol szabályozott körülmények között fejlődhetnek tovább. Néhány egyed klorózisra utaló jeleket mutatott, ezért a továbbiakban alacsonyabb sótartalmú táptalajokat (NN és CP) is kipróbáltunk.

Második vetés után 91 bébiételes üvegben került ki a növényállomány a fényszobába, táptalajonként a következő megoszlásban: MS táptalajon 6 db, MSEM táptalajon 21 db, CP táptalajon 19 db, míg NN táptalajon 45 db növény. Két hét után vizsgáltuk a klorózisos növények arányát a táptalajok függvényében. Az eredményeket a 6. táblázat és 11. ábra mutatja be:

6. táblázat: A klorotikus tüneteket mutató növények előfordulásának gyakorisága a különböző táptalajokon.

Táptalaj	Növény egyedek száma	Klorózisos egyedek (%)
MS	6	100
MSEM	21	47,61
CP	19	68,42
NN	45	22,22



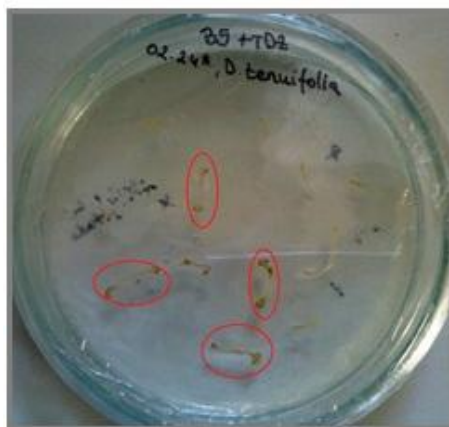
11. ábra: A klorózis mértéke a különböző táptalajokon.

Már a NN táptalajon életben maradt növények száma is előrevetíti, hogy ez a táptalaj megfelelő a *Diploaxis tenuifolia* csíráztatására és fenntartására, ám ezt az is alátámasztja, hogy ezen a táptalajon tapasztaltuk legkevésbé a klorotikus tüneteket. Ezt az eredményt felhasználva, a továbbiakban a magvetés már döntően NN táptalajra történt. A szintén alacsony sótartalmú Gamborg B5 táptalaj kipróbálásakor is hasonlóan jó eredményt kaptunk.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a *D. tenuifolia* sóérzékeny növény, alacsony sókoncentrációjú táptalajok használata esetén nem mutatja klorózis jeleit, egészségesen fejlődik, így a további kutatásokkor ezeket a táptalajokat volt érdemes felhasználni.

5.3. Kalluszindukció

Kalluszindukciós kísérleteinkben a legszembetűnőbb eredményt a hormont tartalmazó illetve hormonmentes táptalajokon lévő növényi részek összehasonlítása adta. Míg a hormont tartalmazó táptalajokon található növénydarabokon kalluszosodást tapasztalunk (12. ábra), addig a hormonmentes táptalajon erőteljes gyökeresedés indult be (13. ábra). A TDZ+BA hormonkombináció és a TDZ hatása között nem találtunk különbséget, azt tapasztaltuk, hogy a TDZ önmagában is elég volt a kalluszosodás beindításához. A hipokotil kalluszosítása eredményesebb volt, mint a sziklevele daraboké, hormonmentes táptalajon a gyökeresedés mindkét esetben egyforma mértékű volt. A két különböző táptalaj (NN és Gamborg B5) használata nem befolyásolta a kalluszosodást illetve gyökeresedést.

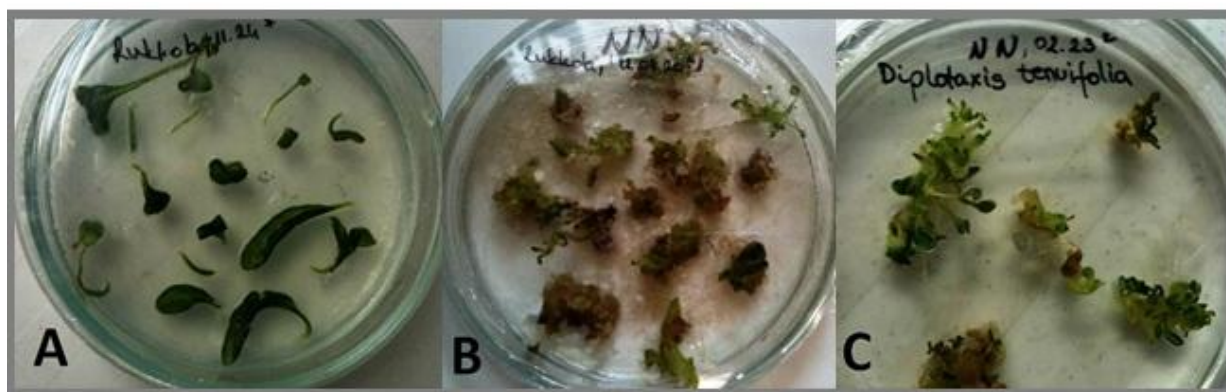


12. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* hipokotil darabok kalluszosodása 0,05 mg/l TDZ tartalmú táptalajon



13. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* sziklevél darabok gyökeresedése hormonmentes táptalajon

A továbbiakban hormonmentes táptalajon lévő levélkorongok fejlődését vizsgáltuk. A levélkorongok vágási felületein kalluszosodást tapasztaltunk, majd további növekedés után - sztereomikroszkóp segítségével organogenezist figyelhattunk meg. A folyamatot a 14. ábrán követhetjük nyomon.



14. ábra: Az organogenezis folyamata rukkola levélkorongokon, balról jobbra: levélkorongok (A), kalluszosodás (B), hajtásképződés (C).

A levélkorongok már egy hónap után látványosan megnagyobbodtak, majd lerakás után másfél hónappal kalluszosodást figyelhattunk meg. Két hónap elteltével megjelentek az első levélkék, de ezek nem a kalluszból fejlődtek. Amint egy-egy levélkorong vágási felülete mentén ötnél több levélkét találtunk, szétválasztottuk őket újabb hormonmentes táptalajjal megtöltött petri csészékbe, és a leválasztott részek friss táptalajon is változatlanul fejlődtek tovább, míg végül teljes növényt regeneráltunk belőlük.

5.4. Akklimatizáció

A perlitben és Jiffy-ben történő akklimatizáció sikeresnek bizonyult, a fényszobában 30 növényből csupán 2 pusztult el szürkepenész miatt. Amikor a növényeket átültettük perlit és tőzeg 50-50%-os keverékébe és a klímasekrényben továbbneveltük azokat, nem történt újabb fertőződés. A növények további 30 napot töltöttek itt. Ez idő alatt virágot hoztak, amiből termés fejlődött (15. ábra). A leveleket ötnapoként megszedtük, ami azt eredményezte, hogy az újonnan fejlődött levelek egyre szeldeltebbek lettek. A termések 10 nap alatt értek meg, amelyekből magot fogtunk (16. ábra), amit aztán NN táptalajra elvetettünk. Sötétben csíráztattuk, majd fényszobában neveltük ezeket tovább az előzőekben ismertetett módon (5.1. fejezet).



15. ábra: A tőzeg-peréit keverékben fejlődött növények kiültetés után 3 héttel.



16. ábra: Az akklimatizált növényekről származó termések és magok.

5.5. Transzformáció

A transzformációs kísérlet során agrobaktériummal kezelt levélkorongok jelenleg fényszobában vannak antibiotikumokkal kiegészített MSEM táptalajon. A levélkorongokon a vágási felületről kiinduló barnulás figyelhető meg, kalluszosodást még nem tapasztaltunk (17.ábra). Az agrobaktériumos kezelés sikerességét GUS-teszttel kívánjuk ellenőrizni, az antibiotikumokat tartalmazó táptalajra kerülés után 30 nappal.



17. ábra: Agrobaktériummal kezelt *Diplotaxis tenuifolia* levélkorongok antibiotikummal kiegészített táptalajra kerülés után 3 héttel.

Transzformációs kísérleteinkben az agrobaktériumos fertőzés hatékonyságát befolyásoló tényezőket és körülményeket szeretnénk tanulmányozni és optimalizálni. Egy hatékony transzformációs és regenerációs rendszer kidolgozása esetén pedig hasznos génekkel végzett transzformációs kísérletekkel szeretnénk hozzájárulni a funkcionális genomikai alap kutatásokhoz.

6. Következtetések

A sterilizálási kísérletek során megállapítottuk, hogy a 10 percig 15%-os hipoklorit oldatban történő áztatás segítségével a rukkola vetőmagokból fertőződéstől mentes *in vitro* kultúrák létesíthetők. Indító táptalajnak alacsony sótartalmú, hormonmentes táptalaj használata javasolt, a magokat pedig sötétben csíráztassuk. A mikroszaporítási kísérletekhez is az alacsony sókoncentrációjú, hormonmentes táptalajok voltak a legalkalmasabbak, ezeken a táptalajokon a növények egészségesen fejlődtek.

Kalluszindukciós kísérleteinkben a TDZ használata a táptalajban már önmagában is eredményesnek bizonyult a sziklevel és hipokotil darabok esetében. A két vágási felülettel ellátott levélkorongok hormonmentes táptalajra történő helyezésekor pedig organogenezist figyelhattunk meg. Parkash és munkatársai (1989) *Eruca sativa* sziklevelein vizsgálták a regeneráció mértékét különböző koncentrációjú növekedésszabályozókkal kiegészített MS táptalajon. Kísérleteinkben a regeneráció 2 mg/l citokinin (BA és kinetin) hozzáadásával volt a leghatékonyabb. 1987-ben Ahloowalia az *E. sativa* szövettenyésztési lehetőségeit vizsgálva éretlen embriókon fedezte fel az organogenezis jeleit. Ezzel szemben mi hormonok hozzáadása nélkül értünk el organogenezist *D. tenuifolia* levélkorongokon; a sziklevel és hipokotil darabok hormonmentes táptalajra helyezésekor pedig erőteljes gyökérfejlődést tapasztaltunk. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy Zok Anikó feltételezése igaznak bizonyultak, a növény valóban egy különleges regenerációs képességgel bír, melyet a különböző transzformációs kísérletekben érdemes kihasználni. A tudományos kísérletekben szerzett információk pedig a későbbiekben akár a növény nemesítésében is hasznosulhatnak.

7. Összefoglalás

Napjainkban egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az egészséges életmódnak, aminek számottevő része a megfelelő táplálkozás. A táplálkozási piramis szerint a bevitt táplálék 18%-át zöldségeknek kell kitenniük, hogy biztosítsuk a kielégítő vitamin- és ásványi anyag szintet. A növényt önmagában nem mindenki tudja fogyasztani pikáns aromája miatt, de már néhány levél is különleges ízt adhat ételeinknek. A rukkolát leginkább az olasz kulináris világból ismerhetjük, de hazánkban is egyre gyakrabban találkozhatunk vele. Fogyasztásának jelentőségét alátámasztja a benne található számos vitamin és ásványi anyag, emellett szerepe van a vércukor- és koleszterinszint szabályozásában (Feo és mtsai., 1993).

Kísérleteink során a *Diplotaxis tenuifolia* mikroszaporítását és regenerációs rendszerének kidolgozását tűztük ki célul, hogy a későbbi transzformációs kísérletekhez egy hatékony rendszer álljon rendelkezésünkre. Ehhez első lépésként steril körülmények között magot vetettünk, majd eltérő körülmények között figyeltük a csírázás mértékét. Megállapítottuk, hogy a rukkola sötétben csírázik megfelelően, így további vetéseink során ezt a módszert alkalmaztuk. Bébiételes üvegbe történő áttűzdelés után klorózis jeleit tapasztaltuk a leveleken, ezért különböző táptalajokat próbáltunk ki, hogy meghatározzuk a legmegfelelőbb tápközeget a növény számára. Az alacsony sótartalmú NN táptalaj bizonyult a legalkalmasabbnak a további kutatásokhoz, vetéseink is erre a táptalajra történtek a következőkben. A sikeresen mikroszaporított növényeinket előbb fényszobában, majd klímaszekrényben akklimatizáltuk, ahol virágoztak, termést hoztak, majd azokról életképes magot fogtunk.

A NN táptalajon fejlődő növényeket használtuk alapanyagként a regenerációs kísérletekhez. Levélkorongokat vágunk, majd hormonmentes illetve hormont tartalmazó táptalajra helyeztük azokat. A hormon tartalmú táptalajon kalluszosodás indult be, míg a hozzáadott hormont nem tartalmazó táptalajon organogenezist figyelhettünk meg, tehát elmondható, hogy a *Diplotaxis tenuifolia* regenerációja sikeres volt. Ezt az eredményt felhasználva genetikai transzformációs kísérletekbe kezdtünk, melynek során a levélkorongokat az EHA101(pTd33) vektorkonstrukciót tartalmazó *Agrobacterium*mal fertőztünk, majd a baktérium elölésének céljából a levélkorongokat átraktuk antibiotikumot tartalmazó táptalajra. Transzformációs kísérleteink jelenleg folyamatban vannak.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik e dolgozat elkészülését lehetővé tették.

Mindenek előtt Dr. Pedryc Andrzej tanszékvezető Úrnak, aki lehetőséget biztosított a kutatásra.

Köszönöm konzulenseimnek, Zok Anikónak és Dr. Oláh Róbertnek, hogy folyamatosan segítettek munkám és jó tanácsokkal láttak el. Külön megköszönöm Forgács István PhD hallgató és Tóth Veronika laboránsnő türelmét és segítségét.

Végül köszönöm Genetika- és Növénynemesítés Tanszék minden munkatársának támogatását.

Irodalom jegyzék

1. Ahloowalia, B.S. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eruca sativa*. Crop Sci. 27:813-814.
2. Ambasta, S.P. és mtsai. 1986. The useful plants of India. Publ. Inf. Directorate, 202-203., Council Sci. Industriaal Res., New Delhi.
3. Amla, B., Dhingra, M. 1991. Production of plantlets of *Eruca sativa in vitro*. J. Phytological Res. 4(1):73-77.
4. Arietti, N. 1965. Flora medica ed erboristica nel territorio bresciano. 1a edn., Commentari Ateneo di Brescia, Tip. Fratelli Geroldi, Brescia. 460.
5. Bornmann, C.H. 1993. Synthetic seed. In Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I. (eds). Plant breeding: principles and prospects. Chapman and Hall, London.
6. Bremmes, L. 1988. Il grande libro delle erbe. 1a edn., A. Mondadori, Verona, 135.
7. Chée, R., Pool, R.M. 1987 Improved Inorganic Media Constituents for In Vitro Shoot Multiplication of Vitis. Sci. Hort. 32: 85-95.
8. Davidson, R.H., Lyon, W.F. 1987. Insect Pests of Farm, Garden, and Orchard. John Wiley & Sons, New York.
9. Dudits D.-Heszky L 2000. Növényi biotechnológia és géntechnológia, 2. bőv. átd. kiad. Agroinform, Budapest
10. Ellison, J.A., Hylands, P., Paterson, A., Pick, C., Sanecki, K., Stuart, M. 1980. Enciclopedia delle erbe. 1a edizione, A. Mondadori, Verona.
11. Feo, V. de, Senatore, F. 1993. Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. J. Ethnopharmacol. 39: 39-51.
12. Fernald, M.L. 1993. Gray's Manual of Botany. 1st edn., 2, 709 p. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
13. Flint, M. L. 1990 Pests of the Garden and Small Farm, A Grower's Guide to Using Less Pesticide, Division of Agriculture and Natural Sciences, University of California, 6701 San Pablo Ave., Oakland, 48-167.
14. Free, J.B. 1970. Insect pollination of crops. 1st edn., Academic Press, London and New York, 544.
15. Gamborg, O.L., Miller, R.A, Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151.
16. Gomez-Campo, C., Delgado, L. 1964. Radioresistance in crucifers Radiation Bot. 4(4): 479-483.

17. Gómez-Campo, C., Hinata, K. 1980. A check list of chromosome numbers in the tribe *Brassicaceae*. In: Tsunoda, S., Hinata, K., Gómez-Campo, C. (eds.), *Brassica* crops and wild allies. Japan Science Societies Press, Tokyo, Japan. 51-63.
18. Gorst, J.R., Teasdale, R.D. 1999. Robotic micropropagation for Commercial Forestry In Altman, A., Ziv, M., Izhar, S. (eds). *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st century*, Kluwer Acad. Publishers Dordrecht-Boston-London, 632-642.
19. Gupta, R.C., Saxena, A. 1984. Efficacy of some fungicides on incidence of seed-borne fungi of *Eruca sativa* grown in Tarai region of Nainital, Madras. *Agric. J.* 71: 512-515.
20. Lamba, L.C., Arora, B.B. 1980. Structure and dehiscence mechanism of fruit wall in *Eruca sativa* Mill. An oleiferous crucifer. *Curr. Sci.* 48(2):62-64.
21. Lamba, L.C., Arora, B.R. 1981. Anatomical and morphological studies on field-ripe seeds of *Eruca sativa* Mill. In *Acta Bot. Indica*, 9: 88-93.
22. Lichtenstein C., Draper, J. 1986. Genetic engineering of plants. In Glover, D.M. (ed) *DNA Cloning: A Practical Approach*. Vol. II., IRL Press, Oxford. 67-119
23. Maini, N.S., Sandhu, S.S. 1959. Effect of some growth substances on seed set in *Eruca sativa*. *Sci. Cult.*, 25: 377-378.
24. Maliwal, P.L., Mundra, S.L. 1990. Effect of inter-and intra-row spacing on yield and quality of taramina (*Eruca sativa* L.). *Int. J. Trop. Agric.* 8: 223-225.
25. Martín, J. P., Sánchez-Yélamo, M. D. 2000. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (*Brassicaceae*) using inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 101:1234–1241
26. Martínez-Sánchez, A., Marín, A., Llorach, R., Ferreres, F., Gil, M.I. 2006. Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) In *Postharvest Biology and Technology* 40: 26–33.
27. Mascagno, V. 1987. Coltivata o selvatica la rucola è ottima in insalata. *Vita in Campagna* 5(12): 42-43.
28. Mummenhoff, K., G. Eschmann-Gupe and K. Zunk. 1993. Subunit polypeptide composition of Rubisco indicates *Diplotaxis viminea* as maternal
29. Murashige, T., Skoog, F. 1962. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
30. Narwal, S.S., K. Gupta and S.S. Pahuja. 1990. Allelopathic effects of aqueous stubble extract on the seed germination of seedling growth of winter crops. *Ind. J. Ecol.* 17:171-174.
31. Nitsch, J. P, Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains, *Science* 169, 85

32. Oswal, M.C., Sharma, J.C. 1975. Effect of different presoaking treatments and different day times of sowing on germination of gram (*Cicer arietinum*) and taramira (*Eruca sativa*). Ind. J. Agric. Res., 9(4): 187-191.
33. Parkash, S., Chowdury J.B., Jain, R.K. 1989. Callus initiation and regeneration potential in differing genotypes of *Eruca sativa*. Curr. Sci., 58: 979-980.
34. Plitman, U., C. Heyn, A. Denin and A. Shmida. 1983. Pictorial flora of Israel. Massada, Israel.
35. Prasad, K. 1977. The development and structure of basal body in the ovule and seed of certain species of Cruciferae. Bot. Jahr. Syst. Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 98:266-271
36. Reinert, J. 1959. Über die Kontrolle für Morphogenese und Induktion von Adventiveembryonen on Gewebe Kulturen aus Karotten. Planta, 54: 118-131.
37. Sharma, S.K., Wattal, B.L. 1982. Further studies on mosquito larvicidal potential of mucilaginons seeds. J. Entomol. Res. 6:159-165.
38. Sikdar, S.R., Chatterjee, G., Das, S., Sen, S.K. 1987. Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of the wild crucifer (*Eruca sativa*) Lam. Plant Cell Reports 6:486-489.
39. Sindhu Kanya, T.C., Kantharaj Urs, M. 1989. Studies on taramira (*Eruca sativa*) seed oil and meal. JAOCS 66:139-140.
40. Singh, G. and G. Singh. 1985. Effect of dates of sowing on the appearance and abundance of *Myzus persicae* Sulzer on yield of taramura crop. Ind. J. Agric. Sci. 55:287-289.
41. Singh, S.P., Rajput, O.P. 1993. Seed quality and oil yield of rocket-salad (*Eruca sativa*) as influenced by date of sowing and row spacing. Ind. J. Agron., 38, 335-336.
42. Sukhija, P.S., Bhatia, I.S. 1972. Lipid changes in germinating taramira (*Eruca sativa*) and linseed (*Linum usi tatissimum*). J. Res. 9: 316-320.
43. Szegedi, E., Oberschall, A., Bottka, S., Oláh, R. and Tinland, B. 2001. Transformation of tobacco plants with virE1 gene derived from *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 and its effect on crown gall tumor formation. Int. J. Hort. Sci. 7: 54-57.
44. Vékony G. 1989. Dákok, rómaiak, románok, Akadémiai Kiadó, Budapest. 94–95.
45. Velich, I. (Szerk.) 2001. Növénygenetika, Mezőgazda Kiadó, Budapest. 397-402.
46. Yaniv, Z., Schafferman, D., Elber, Y., Ben-Moshe E., Zur, M. 1993. Evaluation of *Sinapis alba*, native to Israel, as a rich source of erucic acid in seed oil. J. Indust. Crops 2:137-142.
47. Zaenen, J., van Larebeke, N., Tenchy, H., Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol. 86: 109-127.

48. Zeleny, V., Reznickova, V. 1985. Stomatal apparatus in some *Brassicaceae* seedlings. Sbirnik Vysoke Skoly Zened. Prazc. Fac. Agron. A, 42: 73-90.