

ITDK dolgozat

Schneider Szilvia

2014

Gyógynövények in vitro tenyésztése embriókultúrákból

In vitro propagation of medical plants by embryo culture

Kézirat lezárása: 2014.10.27.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS

- 1.1 Bevezetés a zöld biotechnológiába
- 1.2 A biotechnológiának a növénytermesztésben alkalmazott legfontosabb módszerei és célkitűzései
- 1.3 Magyarországi helyzet a gyógynövények terén
- 1.4 Növénytermesztési biotechnológia
- 1.5 Sejt és szövettenyésztési technikák
- 1.6 Gyógynövények szövettenyésztésének irodalmi áttekintése

2. CÉLKITŰZÉS

3. ANYAG és MÓDSZER

4. KÍSÉRLETEK

- 4.1 Barna mustár
- 4.2 Muskotályzsálya
- 4.3 Kecskeruta
- 4.4 Kisvirágú füzike
- 4.5 Gyapjas gyűszűvirág
- 4.6 Közönséges orbáncfű

5. EREDMÉNYEK

6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

Ábrajegyzék

1. ábra: Barna mustár

2. ábra: A barna mustár magjai indító táptalajon

3. ábra: A barna mustár tenyésztése

4. ábra: A barna mustár felszaporítási fázisban

5. ábra: A barna mustár gyökereztetési fázisban

6. ábra: Muskotályzsálya

7. ábra: A muskotályzsálya steril csíráztatása

8. ábra: A muskotályzsálya szaporító táptalajon

9. ábra: A muskotályzsálya a felszaporítási fázisban

10. ábra: Gyökeres muskotályzsálya

11. ábra: A muskotályzsálya gyökereztetése

12. ábra: Kecskeruta

13. ábra: A kecskeruta steril hajtása

14-15. ábra: A kecskeruta felszaporítási fázisban

16. ábra: Gyökeres kecskeruta

17. ábra: A kecskeruta, muskotályzsálya és barna mustár eltérő szaporodása 1 mg/l BA hatására.

18. ábra: Kisvirágú füzike

19. ábra: A kisvirágú füzike steril csíráztatása

20. ábra: A kisvirágú füzike felszaporítása

21. ábra: Gyökeres kisvirágú füzike

22. ábra: Gyapjas gyűszűvirág

23. ábra: A gyapjas gyűszűvirág steril csíráztatása

24. ábra: A gyapjas gyűszűvirág szubkultúrálása

25. ábra: A gyapjas gyűszűvirág felszaporítása

26. ábra: In vitro gyökereztetett gyapjas gyűszűvirág

27. ábra: Közönséges orbáncfű

28. ábra: A közönséges orbáncfű steril csíráztatása

29. ábra: A közönséges orbáncfű szubkultúrálása

30. ábra: A közönséges orbáncfű felszaporítása

31. ábra: Gyökeres közönséges orbáncfű

32. ábra: A gyűszűvirág, a füzike és az orbáncfű szaporodása azonos alaptáptalajon, azonos BA / 1 mg/l / hatására.

33. ábra: Az optimális szaporító táptalajon lévő növények.

1. BEVEZETÉS

1.1 Bevezetés a zöld biotechnológiába

A zöld biotechnológia a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban hasznosított mikroorganizmusok, növények és állatok szaporodásának, valamint genetikai programjának megváltoztatását és az így kialakult új képességek technológiai alkalmazását jelentik. Mint alkalmazott és szintetizáló kutatás-fejlesztési terület, a molekuláris genetika és molekuláris biológia eredményeit hasznosítja, és felhasználja az in vitro sejt és szövettenyésztési, valamint asszisztált reprodukciós technikákat. Ezeket az eljárásokat gyakorlati célok megvalósítása érdekében alkalmazza tenyésztett állatokon, termesztett növényeken vagy gazdaságilag jelentős mikroorganizmusokon.

/Fodorpataki - Szigyártó 2008/

A növényvilág örökletes változatosságának a megőrzése és a génerózió megelőzése céljából a természetes növényzet illetve a kultúrflóra különböző fajainak a fellelhető populációiból az egész világon mintákat vesznek, melyek in vitro génbankokban vagy csíraplazmabankokban őrizhetők meg az utókor számára. A megőrzés a minták fenntartását és tartós tárolását jelenti. Ennek leggyakoribb módja a generatív úton szaporított növényeknél a magként való tárolás 6-10 %-os légköri nedvességtartalom és 5-20°C-os hőmérsékleti körülmények között.

A növény biotechnológia alkalmazásának legnagyobb gazdasági hasznot hozó területe a növénynemesítés, annak ellenére, hogy a mezőgazdaságban csakis olyan új fajtákat lehet termesztetni, amelyek az állami fajtaminősítés 3-5 éves kísérleteiben megfelelő eredményt nyújtottak.

1.2 A biotechnológiának a növénynemesítésben alkalmazott legfontosabb módszerei és célkitűzései:

a) *Merisztéma tenyésztés:*

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

b) *Embriótenyésztet, magkezdemény kultúra, in vitro megtermékenyítés:*

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

c) *Androgenézis és ginogenézis:*

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

d) *Kalluszkultúra és sejttenyészet:*

- másodlagos anyagcseretermékek bioszintézise
- üzemi sejtfermentáció

- sejtszintű mutánsizolálás (szárazság-, hideg-, vegyszer-, kártevő-, kórokozó- és egyéb stressz-rezisztencia kialakítására)
 - alapanyag létrehozása protoplaszt izolációhoz
 - génbank mélyfagyasztott sejtek gyűjteménye által szomaklonális variabilitás kiváltása
 - mesterséges mag előállítása
- e) *Protoplasztok izolációja és szomatikus sejthibridizációs fúziója:*
- paraszexuális faj- és nemzetséghibridek előállítása által távoli rokon növények hasznos tulajdonságainak egyesítése
 - gének, kromoszómák átvitele fajok és fajták között aszimmetrikus hibridizációval
 - poliploidok gyors és irányított előállítása
- f) *Cibridizáció:*
- új sejtmag - mitokondrium - kloroplasztisz kombinációjú sejtek létrehozása
 - hímsterilitás átvitele különböző fajokba
 - herbicidrezisztencia átvitele szenzitív fajokba
 - a fotoszintézis és a légzés hatékonysága
- g) *Növényi génszétválasztás:*
- vírus-, baktérium-, gomba-, rovar-, állat-, és emberi gének bevitele növényekbe
 - stresszrezisztencia átjuttatása szenzitív fajtákba
 - speciális termékek (főleg számunkra hasznos fehérjék) termeltetése szántóföldön, új céllal termesztett növényfajok megjelenése

1.3 Magyarországi helyzet a gyógynövények terén

A biológiailag aktív anyagokat tartalmazó gyógynövények kutatása, életközösségeinek jellemzése, hasznosítása - mind a vadon termő növények gyűjtése, mind szántóföldi termesztése révén - Magyarországot nemzetközileg is elismert rangra emelte.

Napjainkban, az élelmiszer-, a gyógyszer- és a kozmetikai-ipar nyersanyagszükséglete,

a megbízható és folyamatos ellátás a vadon termő növények gyűjtése útján csak korlátozott mértékben biztosítható. Ezeknek a fajoknak egy jelentős része ma már természetvédelem alatt áll, ami a gyűjtés lehetőségeinek korlátozását is jelenti. A gyógyszeripari hasznosítás, a jó drogminőség és a hatóanyag tartalom standardizálás iránti kereslet fokozza az ismert eredetű homogén nyersanyag előállítására tett törekvéseket. A kiváló drogminőség, pl. biológiai tisztaság biztosításának egyik lehetséges és fontos módja a termesztés. A gyógynövények diverzitásának felmérése, a genetikai tartalékokból való mintavétel, illetve a gyűjtés viszont sok tekintetben eltér a termesztett növények egyéb csoportjainál alkalmazott módszerektől. A 60.000-re becsült, gyógyászati értékkel bíró, növény – taxon felkutatása.

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

1.4 Növénytermesztési biotechnológia

A növényi biotechnológia magába foglalja azokat a technológiai eljárásokat, amelyek növényélettani, biokémiai és genetikai ismereteket használnak fel. Jellemző biotechnológiai eljárások a sejt és szövettenyésztés, a rájuk alapozott mikroszaporítás és dihaploid, uniformis genetikai/nemesítési anyagok előállítása, de ide sorolható a

molekuláris markerek alkalmazása a növénynemesítésben is. Egyik legfontosabb ága az idegen növényfajok közti géntranszfer, mely által új, előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező kultúrnövényeket állít elő az iparág. A növényi biotechnológiai módszerek kiterjesztik a hagyományos növénynemesítés határait, mert e technikákkal olyan növényi gének lehetnek addíció tárgyai, mely géneket, tulajdonságokat klasszikus növénynemesítéssel egyik növényből a másikba átvinni nem lehet, illetve a hagyományos növénynemesítésben mindig két komplett genom találkozik (két növény tulajdonságaiért felelős gének összessége), míg a növényi biotechnológiában egyes génekkel egészítik ki az adott növény genomját.

A növénytermesztési biotechnológia négy fő alterülete:

- Marker asszisztált szelekció
- Mikroszaporítás
- Genetikai módosítás
- Agromikrobiológia

Legtöbbet a hideg- és szárazságtűrő, valamint kórokozókkal szemben ellenálló növényekről hallani.

Az utóbbi időben azonban a kutatások egyre inkább az emelt tápértékű (például vitaminokat is termelő) fajták irányába fordult.

A tudósoknak minden esetben szem előtt kell tartaniuk az élelmiszer-biztonság fontosságát, ugyanakkor vitathatatlan, hogy ezen a téren látványos és gyors intézkedésekre van szükség.

1.5 Sejt és szövettenyésztési technikák

A mikroszaporítás a növények in vitro aszexuális szaporítását jelenti sejt szövettenyésztési technológiák felhasználásával. E módszer lehetőséget biztosít a kiválasztott genotípus elvileg korlátlan mennyiségben történő felszaporítására. Az alkalmazott in vitro módszer azonban függ a szaporítani kívánt növényfajtól. A mikroszaporítás azon területeken terjedt el, ahol gazdaságos és valamilyen előnnyel

rendelkezik a hagyományos szaporítási módokkal szemben. Legfontosabb előnyei a gyors növény regeneráció, helytakarékoság, az utódok közötti nagyfokú azonosság, és kórokozó mentesség. Ezen túlmenően alapanyagot szolgáltat a genetikai transzformációhoz és MAS szelekcióhoz illetve genetikai térképezéshez.

A mikroszaporító laboratóriumok többsége csak kereskedelmi célokra állít elő növényeket, rutin módszereket alkalmazva. Néhány laboratóriumban fejlesztést végeznek, mely során újabb növényfajokra és explantumokra dolgoznak ki módszereket. Az EU-ban, legszélesebb körben a dísnövények esetén alkalmazzák, ezt követik a zöltség növények és gyümölcsök. A kilencvenes évek második felében végzett felmérés során az Európai Unióban 193 mikroszaporító laboratóriumot találtak, melyek többsége Hollandiában (36), Németországban (31), az Egyesült Királyságban (18), Belgiumban (14) és Olaszországban (14) működött, bár valószínű ez a szám alulbecsli a működő mikroszaporító helyek számát. A módszert elsősorban azon növényfajok esetén alkalmazzák, melyek piaci értékesíthetősége jó (pl. orchideák), így a laboratóriumok többségében e fajok szaporítása folyik. Ezért az ágazatra nagy hatással van a piac pillanatnyi alakulása, mely néhány év alatt is jelentős lehet.

Magyarországon a Mikroszaporítók Szövetségének adatai alapján tíz mikroszaporító cég és tíz kutató illetve oktató intézményben folynak in vitro szövettenyésztési munkák. Természetesen ez a lista is alulbecsüli a mikroszaporító laboratóriumok számát. Tevékenységük alapján elsősorban kertészeti növények szaporítása folyik, ezt követik a gyümölcsök és erdészeti növények. Gabonafélék esetén dihaploid fajta előállítás folyik, de ennek mértéke eltörpül a hagyományos nemesítési módszerekkel előállított fajták mellett. Hazánkban sokkal kiegyenlítettebbek az egyes alkalmazási területek, mint az EU-ban bár itthon is ez az ágazat képviseli a zöld biotechnológiai vállalatok többségét.

A laboratóriumok többségében rutin szaporító munka folyik, kevés a kutató - fejlesztő intézmény. A terület fejlődése az elmúlt években megtorpant. Mivel ez az ágazat közvetlenül a piacra termel ezért annak változásai gyorsan érvényesülnek. A biotechnológia többi területéhez képest kevésbé tökeigényes. Legnagyobb költség a jól képzett munkaerő, mely a költségek 60%-át is kiteheti. A laborok többsége jól kidolgozott rutin módszereket alkalmaz, azonban új fajták, és fajok bevonása szükségessé teszi a folyamatos fejlesztést, melynek eredményeként nő a hatékonyság és a módszer gazdaságossága. A közép és kis tőke is érvényesülhet ezen a területen. Mivel a módszer munkaigényes a kisebb vállalatok is piacot szerezhetnek a nagy vállalatok mellett. Elsősorban speciális növény fajok használatával.

1.6 Gyógynövények szövettenyésztésének irodalmi áttekintése

Cassells A. C. – Wallsh C. (1999): *Arnica chamissonis* mikroszaporítását oldották meg, és mintegy 10.000 mikroszaporított növényt ültettek ki szántóföldi körülmények közé.

Gadzovska S. – Maury S. (2007): Tanulmányában a *Hypericum perforatum* sejt-szuszpenziós kultúráját tesztelte és különböző fenol tartalmú komponenseket izoláltak.

Coste A. – Vlase L. (2011): Tanulmányában a *Hypericum hirsutum* és a *Hypericum maculatum* hajtáskultúrájában különböző növényi regulátorok hatását vizsgálta a másodlagos metabolitok képződésére.

Cui, Xi-Hua – Murthy H. (2010): *Hypericum perforatum* gyökérereditű szuszpenziós kultúrájában vizsgálta a szacharóz indukálta ozmotikus stressz hatását, metabolitok és antioxidánsok képződésére.

Requel P. – Romanato S. (2000): *Hypericum perforatum* levélből eredő callus képződését, majd az ebből történő növényregenerációt vizsgálta.

Moraes R. (2011): Az *Echinacea tenesseeensis* in vitro felszaporított klónjait, annak jellegzetességeit, illetve farmakológiai tulajdonságait vizsgálta.

Koroch A. (2002): *Echinacea purpurea* levél eredetű explantjaiból regenerált hajtást.

Choffe K. L. (2000): Szintén az *Echinacea purpurea* hipocotyl illetve cotyledon eredetű explantjaiból regenerált növényeket.

Gao S. L. (1996): *Salvia miltiorrhiza* rügykultúrájában indukált autotetraploid növényeket colchicine kezeléssel.

Bolta I. (2000): *Salvia officinalis* sejtszuszpenziós kultúrájában indukált ursolic savat.

Karam N. S. (2003): *Salvia fruticosa* sejtszuszpenziós és gyökérkultúrájában vizsgálta a rozmaringsav termelődését és felszaporodását.

Grezlak A. (2002): A *Calendula officinalis* sejt kultúrás kísérleteiben a sejtindítás és -növekedés jellegzetességeivel foglalkozott.

Chitra D. (2011): *Desmodium motorium* szomatikus embriogenezissel történő előállítását vizsgálta.

Andrade L. B. (1999): A *Levenedula vera* in vitro szaporítását vizsgálta beleértve a hajtásképződést és gyökeresedést.

Kairong C. (1999): *Lycium barbarum* szomatikus embriogenezise folyamán figyelte a különböző gének megnyilvánulását.

Bhattacharya S. (1997): *Jasminum officinale* gyors in vitro felszaporítását érte el nodális szegmentekből.

Woo S. H. (1997): *Hyoscanus niger* gyökérkultúrájában indukált járulékos gyökereket.

Koroch A. R. (1997): *Hedeoma multiflorum* in vitro szaporítását és akklimatizálását vizsgálta.

Klaur R. (1999): *Valeriana jatamansi* in vitro felszaporításának technológiát dolgozta ki.

Jullien F. (1998): *Menta x piperita* protoplasztkultúrájából történő növényregeneráció lehetőségét vizsgálta.

Diemer F. (1999): *Mentha spicata* és *Mentha arvensis* Agrobacterium tumefaciens segítségével történő transzformációját, különböző gének bevitelét szabályozta, és transzgénikus növényeket sikerült előállítani.

Furmanowa M. (1999): *Rhodiola rosea* sejt kultúrájában Rosavin termelődését mutatta ki.

Xu J. F. (1998): *Rhodiola sachalinensis* sejt kultúrájában megnövekedett salidroside termelődését mutatta ki.

Bonfill M. (2003): *Panax ginseng* calluskultúrájából történő növényorganogenezis lehetőségét vizsgálta.

Teng W-L. (2002): Szintén *Panax ginseng* in vitro felszaporítását tanulmányozta.

Soniya E. V. (2002): *Piper longum* in vitro felszaporítását tanulmányozta.

Farzami S. (2002): *Rheum ribes* calluskultúrájában történő Anthraquinon képződését figyelte meg.

Zhai Y. (2005): *Rheum rhaporticum* mikroszaporított növényeinek jellegzetességeit hasonlította össze hagyományos növényekkel.

Sommer J. (1997): Vanilin glucosidok in vitro képződését tanulmányozta *Catharanthus roseus* sejt kultúrájában.

Fraternali D. (2003): *Thymus mastichina* in vitro hajtásképződését tanulmányozta.

Murakamy Y. (1998): Transzformált *Hyssopus officinalis* gyökér kultúrájában figyelte a rozmaringsav és különböző fenolok képződését.

Whitmer S. (1998): Transzgenikus *Catharanthus roseus* alkaloid képződését vizsgálta.

Mészáros A. (1999): A citromfű (*Melissa officinalis*) mikroszaporítási technológiáját dolgozta ki.

2. CÉLKITŰZÉS

Célkitűzésünk az volt, hogy néhány fontosabb gyógynövény in vitro tenyésztését oldjuk meg embriótenyésztési módszerekkel.

Mivel nem rendelkezünk klónokkal, a kiinduló alapanyag minden esetben mag volt, melyeket László Bencsik Ábel a Gyógynövénykutató Intézet munkatársa volt szíves rendelkezésünkre bocsátani. Elsősorban olyan gyógynövényeket vontuk be a kísérletekbe, melyeket széles körben használnak gyógyászati célokra, ill. egészségmegőrzésre.

3. ANYAG és MÓDSZER

A kiindulási alapanyag minden esetben a gyógynövény magja volt, melyeket a kísérletek folyamán hűtőszekrényben tároltunk. A magvak sterilizálása 70%-os alkohol, és négyszeresére hígított hypo segítségével történt, melyet 4x5 perces steril vizes kimosás

követett. Ezután a magvakat lamináris boxban steril táptalajra tettük, és 'in vitro' csíráztatást végeztünk. Kidolgoztuk az indító, felszaporító és gyökereztető táptalajt is. Kísérleteinkben a korábban már leírt és bevált alacsony sótartalmú DCR táptalajt használtuk, /Gupta - Durzan 1985/ különböző hormon kiegészítésekkel. Az 'in vitro' csíráztatásnál benzyladenint és gibberellint használtunk, a felszaporító táptalajnál csak benzyladenint, a gyökereztető táptalajnál pedig indolvajsavat. Az alkalmazott szénhidrát forrás minden esetben 3% szacharóz volt. A tenyészeteket fényszobában tartottuk, a növényeket 21 naponta értékeltük.

A 2013 év őszén elkezdett kísérletsorozatba a következő 6 gyógynövény került:

Barna mustár	<i>Brassica juncea</i>
Kecskeruta	<i>Galega officinalis</i>
Muskotályzsálya	<i>Salvia sclarea</i>
Kisvirágú füzike	<i>Epilobium parviflorum</i>
Gyapjas gyűszűvirág	<i>Digitalis lanata</i>
Közönséges orbáncfű	<i>Hypericum perforatum</i>

4. KÍSÉRLETEK

4.1 Barna mustár / *Brassica juncea* /

A mustár nevének eredete a régi római időkből származik, mint elmaradhatatlan csípős, tüzes fűszere az újbarnak, a 'mustus'-nak. Hazája a Földközi-tenger vidéke, ahonnan a korai európai kolostorkertekbe is eljutott. Neve, a 27 növénynevet tartalmazó első magyar gyógynövényjegyzékben, a 12-13. század fordulóján keletkezett ún. Pray-kódexben is szerepel már, mint a kolostorok „patikájának” egyik gyógyfüve. A termesztett mustárfajok a káposztafélék (*Brassicaceae*) család, Sinapis és Brassica nemzetségébe tartoznak. A mustárfajok magját a konzervipar használja, mint fontos fűszert. Örleményéből pépes borogatást állítanak elő reumás bántalmak enyhítésére. Illóolaját a kozmetikai ipar is hasznosítja. Legfontosabb hatóanyaga a mustárglikozid emellett illóolaj, zsírosolaj, nyálkaanyagok. Magyarországon többnyire két mustárfajt

termesztenek: a fehér vagy angol mustárt (*Sinapis alba*) és a barna vagy szareptai mustárt (*Brassica juncea*). Az apró magvú fekete vagy francia mustár (*Brassica nigra*) termesztése Magyarországon elenyésző. A barna mustár szára sima, 80-160 cm magas, levelei alul szélesebbek, karéjosan szeldeltek, felül hosszúkásak, kanyargós szélűek. Virágzata sátorozó fürt, kénsárga színű. Termése 2-2,5 mm széles, 30-50 mm hosszú becő, sima felületű. Egy becőben 10-12 mag van, amelyek vörösesbarnák. Ezermagtömege: 2,5 – 3,0 g. A mag 1,4 – 1,8 mm átmérőjű, gömbölyű, vörösesbarna. A drog szagtalan. Rágva eleinte kesernyés, később csípős, fűszeres ízű.

A drog csak a barna mustár magvaiból állhat. A növény egyéb részeiből az I. osztályú drog 1%-ot, a II. osztályú drog 2%-ot tartalmazhat. A drog nem lehet dohos, penészes, idegen szagú. Mérgező vagy ártalmas növényi részek, idegen anyagok nem lehetnek benne. Idegen anyag az I. osztálynál 2%, a másodosztálynál 4% lehet. Rovarirtó szerek, növényvédő szerek porát nem tartalmazhatja. Ne legyen a drogban a kerekrepa (*Brassica rapa* L.) barnás színű, sima felületű, rágva kevésbé csípős ízű magja, sem a vadrepce vagy a mezei mustár (*Sinapis arvensis* L.) magja. Továbbá az erősen mérgező hatású őszi kikerics (*Colchicum autumnale* L.) magja.



1. ábra

Barna mustár

Indító táptalaj

A barna mustár magjai esetében a fertőtlenítés 100%-ban sikerült, a növény magjai a DCR+GA 0.5 mg/l tartalmazó táptalajon csírázásnak indultak, a letett magvak 82%-a csírázott ki. A steril csíráztatást a második számú képen mutatjuk be.

Tenyésztés

A növényeket ezután álló lombikban tenyésztettük tovább.

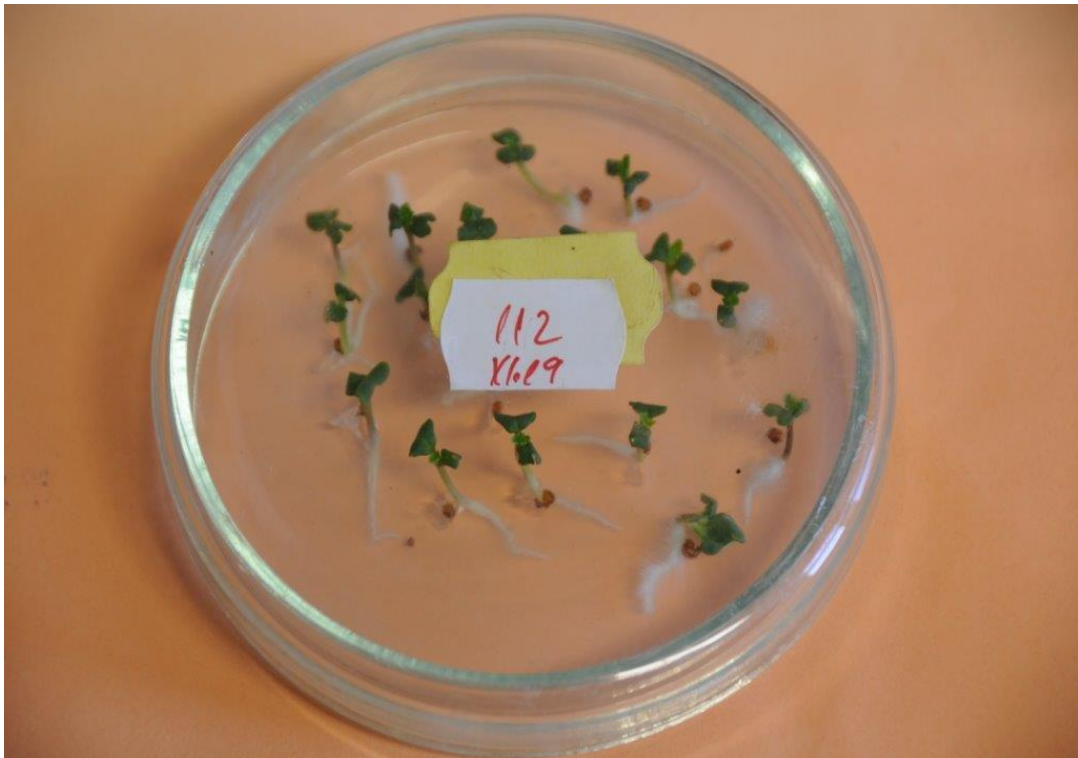
Felszaporítási fázis

A szaporító táptalaj DCR+ 1mg/l BA-t tartalmazott, ezen a táptalajon a barna mustár átlag szaporodási rátája egy 21 napos tenyésztési periódus után 2.7 hajtás volt.

A tenyészeteket ezután kisebb benzyladenin-t tartalmazó táptalajra tettük / 0.2 mg/l BA /, a felszaporítás ezen a táptalajon történt.

Gyökereztetés

A gyökereztetést DCR+IVS 0.5 mg/ l tartalmú táptalajon oldottuk meg, amelyen a növények 100%-ban legyökeresedtek.



2. ábra

A barna mustár magjai indító táptalajon



3. ábra

A barna mustár tenyésztése



4. ábra

A barna mustár felszaporítási fázisban



5.ábra

A barna mustár gyökereztetési fázisban

4.2 Muskotályzsálya /*Salvia sclarea* /

Az orvosi zsálya Dél-Európában vadon termő, nálunk csak termesztett, az ajakosok családjába tartozó gyógynövény. Fő hatóanyagai: az illóolaj, mely fő komponense a mérgező *tujon* (30-50%), cineol, borneol, tartalmaz cserzőanyagot triterpéneket, keserű anyagot, ösztrogén anyagokat és nikotinsav amidját. Kezdetben az ókori görögök és rómaiak tartósításra használták, azonban hamar elterjedt a gyógyhatásai miatt is. A latin neve is erre utal, hiszen a "salvia" 'gyógyítani'-t jelent. Elsősorban kitűnő, klinikailag is tesztelt szer tüdővészések éjjeli izzadása ellen. Naponta 3-4-szer kell inni hidegen 2 evőkanálnyi mennyiséget. A növény sajátossága, hogy azoknál, akik izzadnak izzadáscsökkentő, akik nehezen izzadnak, izzasztó hatású. Beteges izzadásnál, ha zsályateát iszunk, 3 órán belül hatni fog és hatása kb. 3 napig tart. Az egyik legjobb vértisztító gyógynövény, különösen ekcéma, köszvény és nehezen gyógyuló sebeknél. Ha mézzel ízesítjük, akkor hurutoldó hatása van. A zsályalevél porát ételekre is lehet szórni. A meleg zsályatea, mivel fertőtlenít és gyulladáscsökkentő, nagyon jó toroköblítő a szájban fellépő betegségeknél, mandulagyulladásnál, foghúslazulásnál, fogínyvérzésnél. Ilyenkor fél óránként kell öblögetni. Éhgyomorra fogyasztva csökkenti a vércukorszintet, valamint keserű íze miatt kitűnő étvágyjavító és megkönnyíti az emésztést is. Azoknál a

kismamáknál, ahol tejmérgezés veszélye áll fenn, segíthet az orvosi zsálya. Aranyeres bántalmaknál ülőfürdők készítésére javasolt, külsőleg pedig sebek gyógyítására és nedvező ekcémára is alkalmas. Mivel a közönséges zsálya illóolaja gyakran mérgező, ezért a gyógyításhoz másféle zsálya olaját ajánlatos használni! Ilyen például a muskotályzsálya, ami tartalmazza az orvosi zsálya minden jótékony tulajdonságát, és nem mérgező. A muskotályzsálya neve a *Salvia sclarea* a latin *clarus* szóra vezethető vissza, amely 'tisztítást' jelent. A középkorban szentisztító fűként emlegették, mert megnyugtatta a fáradt szemeket, és a zsálya magvaiból kivont nyákos anyaggal ki lehetett hajtani a szemből az idegen anyagokat. A muskotályos zsálya olyan hormonszerű anyagokat is tartalmaz, amelyek egyensúlyban tartják női hormonháztartást. Segít menstruációs panaszok, görcsök enyhítésénél, de jótékonyan hat a menopauza idején fellépő hőhullámoknál, migréneknél is. Erősíti az idegrendszert, és különböző légzőszervi betegségek gyógyítására is alkalmas, tehát adható megfázások, hörghurut, torok- és mandulagyulladásnál. Ellazítja az emésztőszervek izomzatát, így elősegítve a könnyebb emésztést és nyugtatja a bélgáz vagy gyomorfájás miatt háborgó emésztőrendszert. Jótékonyan hat a pikkelysömör okozta gyulladásoknál és más egyéb bőrbetegségeknél.

Az égési seb gyorsabban gyógyul és csökken a viszkető, égető érzés is általa. Fiatalosan tartja a bőrt, szabályozza a faggyú kiválasztást ezáltal csökkentve a pattanásodást. Ha a fejbőrbe masszírozzuk, elmúlhat a korpásodás és csökken a hajhullás. Kiegyensúlyozza a lelkiállapotot, mérsékeli a mélabússágot, eloszlatja a félelmeket. Egyes tapasztalatok szerint egy muskotályzsálya kezelés után eleven és élménydús álmok keletkezhetnek. Nagy változások, vagy feladatok előtt, nyomasztó helyzetekben igen nagy hasznát vehetjük, mivel tompítja a stressz következményeit, csökkenti a lelkünk mélyéről feltörő feszültséget és megnyugtatta az idegeket.

Aki használja ezt az olajat, érzelmileg ellenállóbbá válik. Az európai orvosok és elmeorvosok a lélektani értelemben nehezen elviselhető frigiditást és férfiasági zavarokat kezelik vele. Felveszi a harcot a fertőzésekkel szemben, erős gyulladáscsökkentő és izomgörcsoldó. Szabályozza az anyagcsere-folyamatokat, elősegíti a jó emésztést, jótékonyan hat a nők tisztulási folyamataira, növeli a szexuális élvezetekre való hajlandóságot. Tilos vele várandós mamákat kezelni, mivel vetélést okozhat, valamint használata alatt kerülni ajánlatos az alkoholt, mert a zsálya növeli a részegség kellemetlen tüneteit, súlyosbítja a másnaposságot! Egyesek elálmosodhatnak tőle. A tea elkészítése: 1 teáskanálnyi mennyiséget 2 dl vízben 5 percig kell főzni, ha emésztési

zavaroknál használjuk, akkor étkezés előtt 20 perccel édesítés nélkül fogyasszunk naponta 2 dl-t. Öt perc főzéssel elillan a mérgező tujon és az adagok betartásával nem okoz mellékhatást, ha túladagolnánk a *tujon* görcsös rángásokat okoz. Az orvosi zsálya illóolaját nem szabad lenyelni! Belső használatra csak a muskotályzsálya, vagy más zsálya olaja megfelelő!



6. ábra

Muskotályzsálya

Sterilizálás

A muskotályzsálya esetében is 100%-osan sikerült, a letett magvak 60%-a csírázott ki, és került további szubkultúrálásra. A barna mustárhoz hasonlóan itt is szép, egészséges csíranövényeket kaptunk.

A csírázó magvak radiculáját levágtuk, így kerültek a szaporító táptalajra.

A növényeket ebben az esetben is gömblombikban tenyésztettük tovább.

Felszaporítás

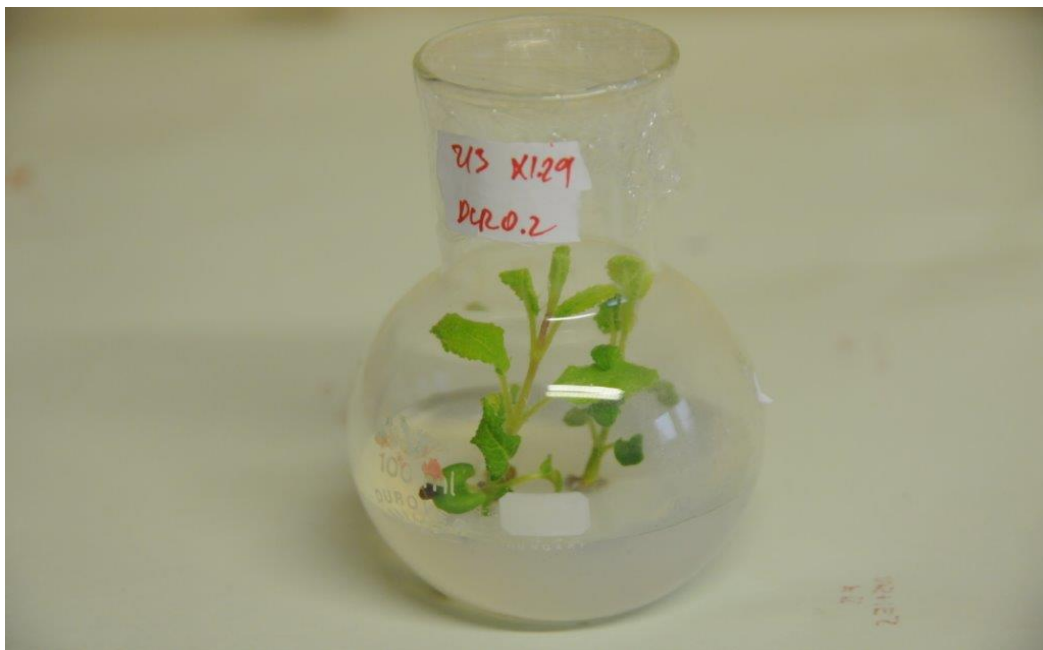
A növényeket ez esetben is 1 mg/l BA-t tartalmazó táptalajon tartottuk az átlag szaporodási ráta 2.2 volt.

Gyökereztetés

Ez esetben is 0.5 mg/l IVS hozzáadásával történt, a gyökeresedési % elérte a 90%-ot.



7.ábra
A muskotályzsálya steril csíráztatása



8.ábra
A muskotályzsálya szaporító táptalajon



9.ábra

A muskotályzsálya a felszaporítási fázisban



10. ábra

Gyökeres muskotályzsálya



11.ábra

A muskotályzsálya gyökereztetése

4.3 Kecskeruta /*Galega officinalis*/

A pillangósvirágúak (*Fabaceae*) családjába tartozó nemzetség. Használható minden mirigy és hormon megbetegedés, vízajtás, bélpanaszok, vesepanaszok, fejfájás, epilepszia, cukorbetegség, elhízás, máj és epebetegségek, növekedési problémák, ótvár esetén.

A Kecskeruta leveles, virágos szára és magja a gyógynövény. A vérre, a velőre, a mirigyre van hatással.

Hatását az emésztőrendszeren, a húgyúti szerveken, illetve a véren keresztül fejti ki. Mirigyekre ható, vércukorszint csökkentő, vizelethajtó, izzasztó, tejkiválasztást fokozó hatással rendelkezik.



12. ábra
Kecskeruta

Sterilizálás

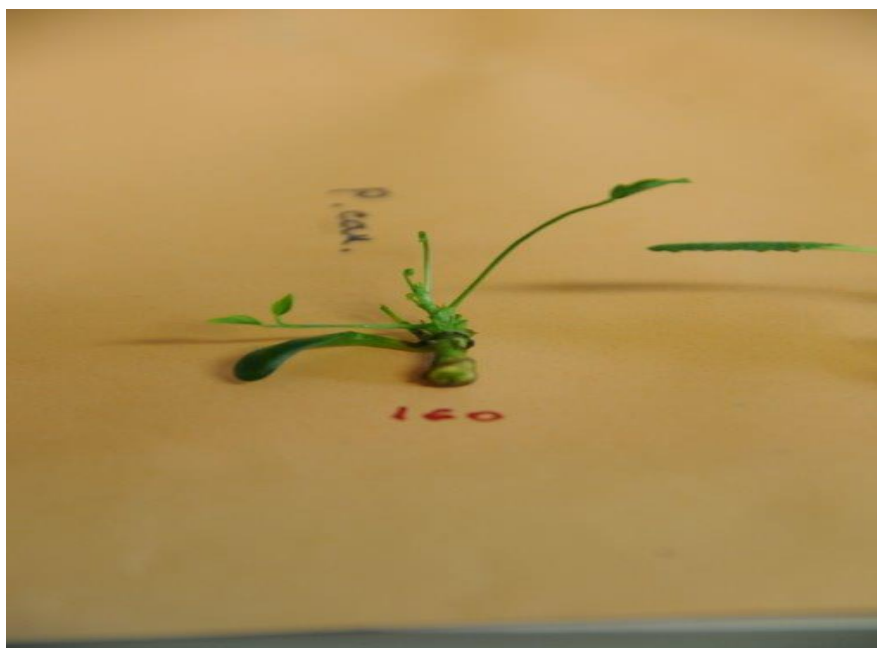
A letett magvakat itt is sikerült 100%-ban sterilizálni, a magvak 45%-a csírázott ki, az alkalmazott táptalaj itt is megfelelő volt, bár a növények habitusa nem volt olyan szép, mint a barna mustár és muskotályzsálya esetében.

Felszaporítás

BA 0.2 mg/l táptalajon történt, a szaporodási ráta 1.8 volt, a növények nem olyan szépek, mint az előző két esetben.

Gyökereztetés

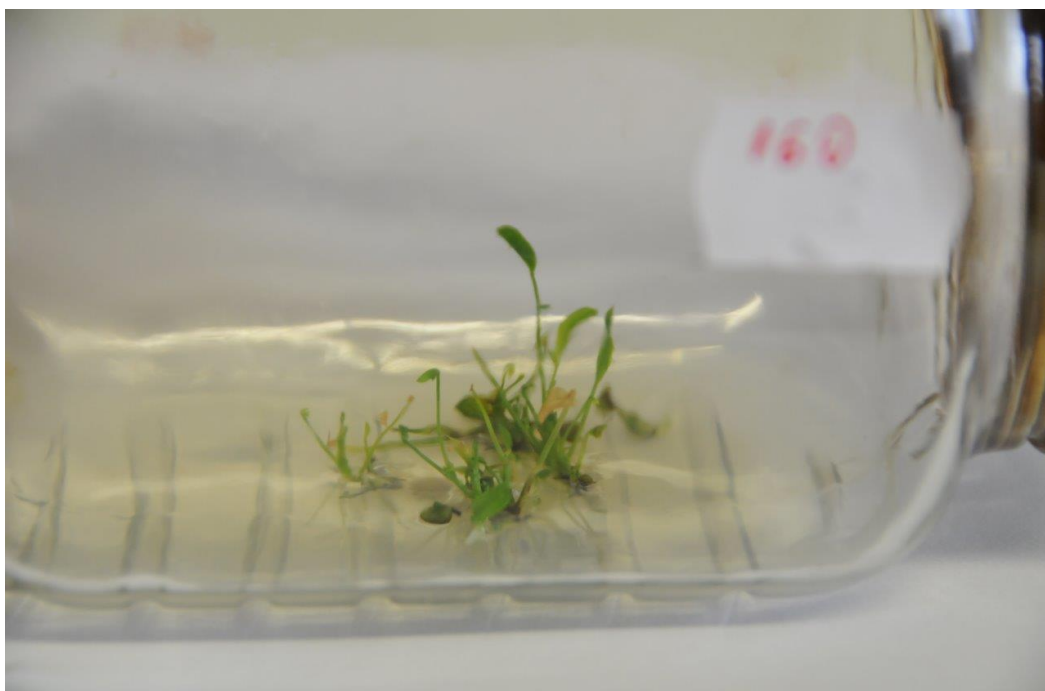
0.5 mg/l IVS hozzáadásával történt, a gyökeresedési arány alig 70% volt.



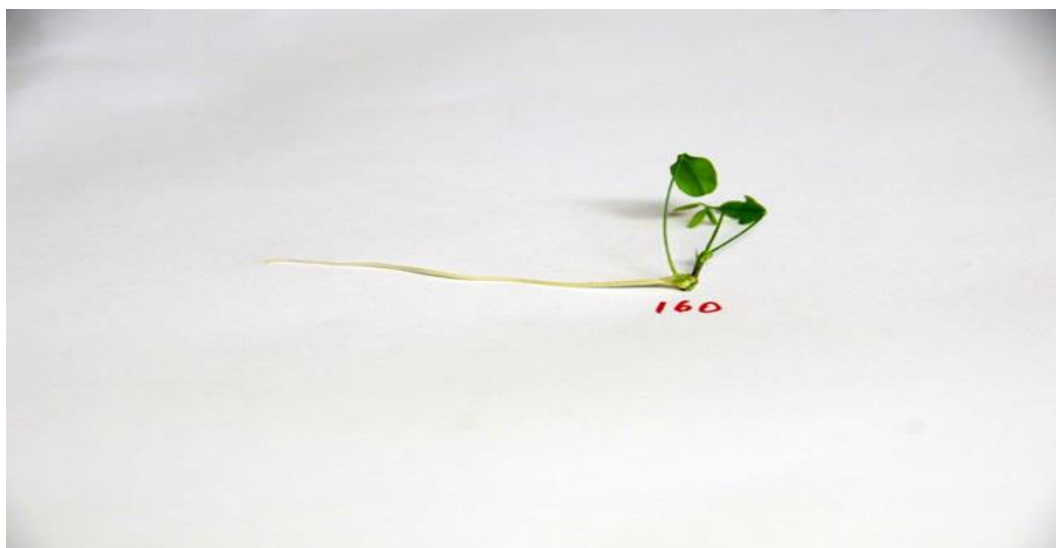
13.ábra
A kecskeruta steril hajtása



14.ábra
A kecskeruta felszaporítási fázisban



15. ábra
A kecskeruta felszaporítási fázisban



16. ábra
Gyökeres kecskeruta



17.ábra

A kecskeruta, a muskotályzsálya és a barna mustár eltérő szaporodása 1 mg/l BA hatására

4.4 Kisvirágú füzike /*Epilobium parviflorum*/

A ligetszépe félék (*Oenotheraceae*) családjába tartozó, kistermetű, vékonyka szárú, halvány rózsaszín virágú, molyhos levelű növény. A termése szőrös tok, a magok körte alakúak, 1 mm hosszúak. Dél-Ázsiában, Észak-Afrikában őshonos, de nálunk is áttelel. Nedves réteken megtalálható egész Magyarország területén.

Földfeletti hajtását gyűjtjük júliustól szeptemberig. Gyűjtése szaktudást igényel, mert van egy hasonmása, a *deréce*, ami nem gyógynövény, mérgező!

Hatóanyagai flavonoidok, szterolok és polifenolok.

A prosztatata karbantartója, gyulladáscsökkentő hatása miatt hólyaggyulladás, hólyagműködési elégtelenség esetén is kiválóan használható, nőknek is ajánlott ezekre a problémákra. Folyamatosan fogyasztható, hozzászokni nem lehet. Ismert káros mellékhatása nincs.



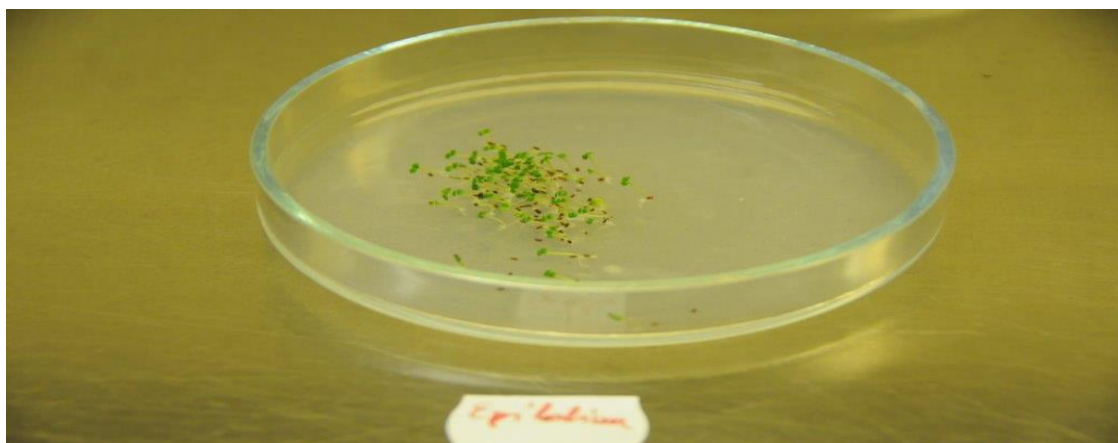
18. ábra

Kisvirágú füzike

Sterilizálás: A kisvirágú füzike nagyon jól reagált a fertőtlenítésre, 100%-os volt, a csírázási % szintén. A csíráztatás DCR+BA 0.5+ GA 0.5 mg/l tartalmú táptalajon történt.

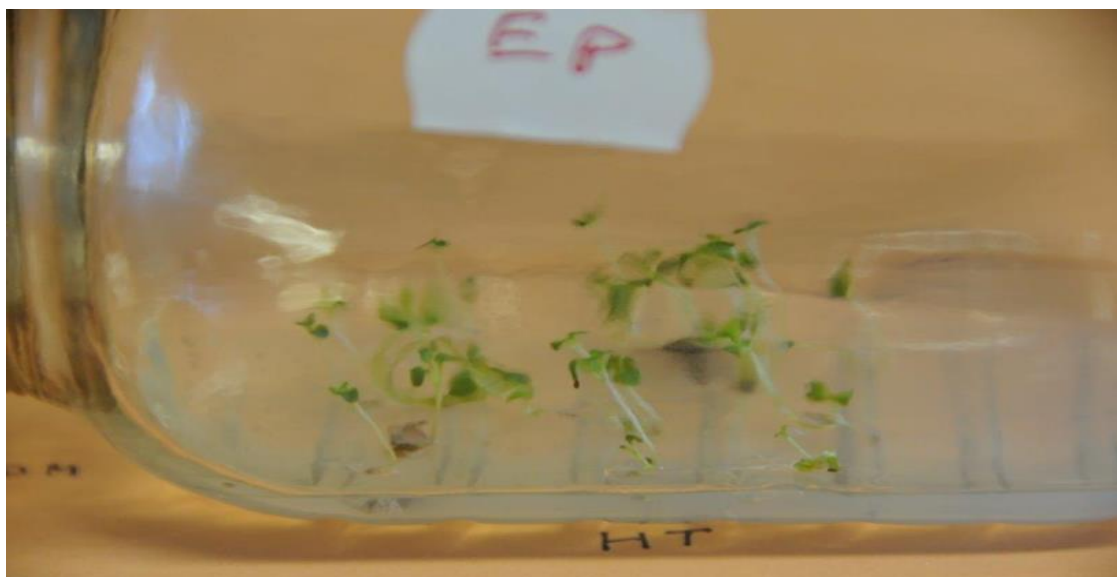
Felszaporítás: A növényeket a steril csíráztatás után 700 ml-es tenyészüvegekbe tettük, a további szubkultúrálás ezekben az üvegekben történt. A felszaporítás DCR+ 1mg/l BA hozzáadásával történt, a növények habitusa és szaporodási rátája megfelelő /2.8/ volt.

A gyökereztetéshez a jól bevált 0.5 mg/l IVS-t használtuk, és 92%-os gyökeresedést értünk el.



19. ábra

A kisvirágú füzike steril csíráztatása



20. ábra
A kisvirágú füzike felszaporítása



21. ábra
Gyökeres kisvirágú füzike

4.5 Gyapjas gyűszűvirág /*Digitalis lanata* cv. *Kristály*/

Nevét onnan kapta, hogy virágzati tengelye és csészelevelei szőrösek, gyapjas-molyhosak.



22. ábra

Gyapjas gyűszűvirág

Rendszertani besorolása:

- család: tátikafélék- *Scrophulariaceae*
- nemzetség - *Digitalis*

Drog: *Digitalis lanatae folium*

Hatóanyag: szteroid glikozoidok, szaponinok, flavonoidok (lanatozid glikozidok)

Farmakológiai hatás: szívműködésre, perifériás keringésre, légzésre ható glikozidok, drogként is felhasználható!

Életforma: kéteves növény

Előfordulása: DK-Európában őshonos, Magyarországon a Budai-hegyekben és a Mecsekben.

Fokozottan védett, nem gyűjthető!

Sterilizálás

A magvak 100%-a steril maradt, de a csírázási % alig érte el a 30%-ot.

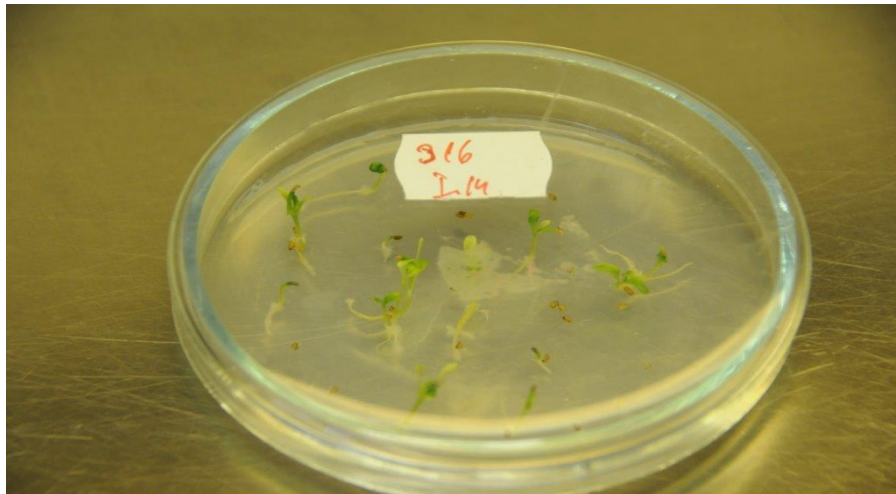
A továbbiakban a szubkultúrálást itt is nagyméretű üvegekben folytattuk.

Felszaporítás

DCR + BA 1mg/l táptalajon folytattuk, 1.7 szaporodási rátát értünk el.

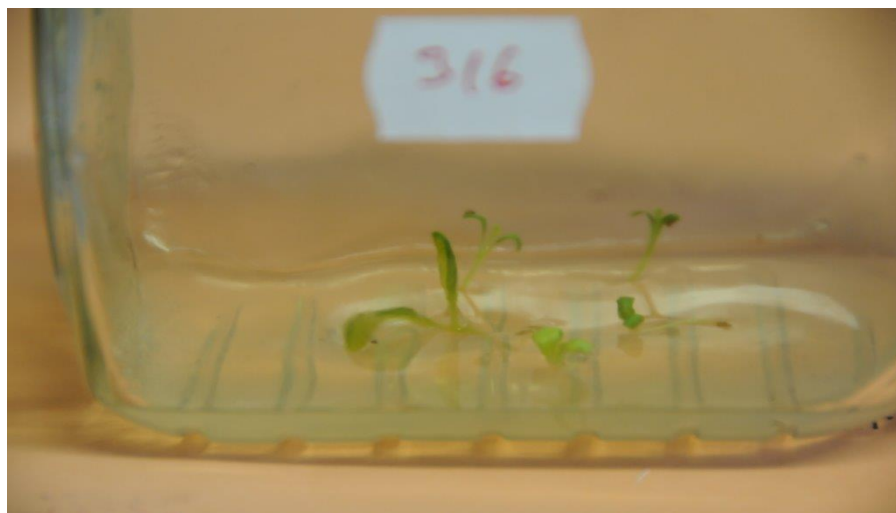
Gyökereztetés

A gyökereztető táptalajon 75%-ban gyökeresedtek le a növények.



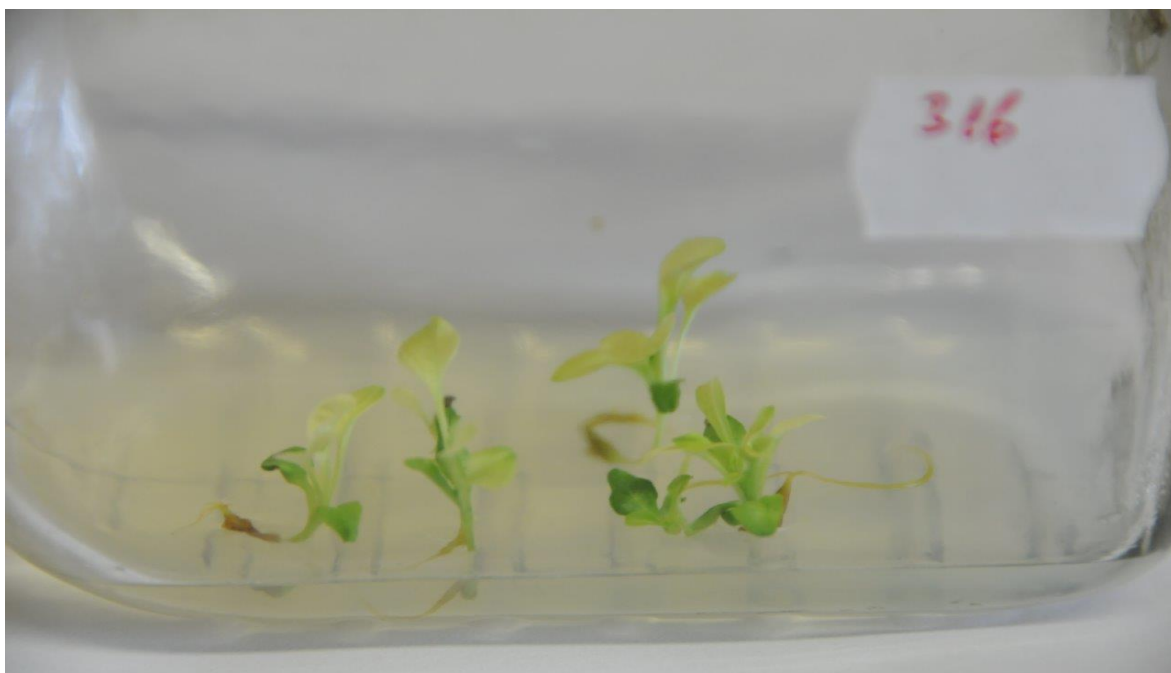
23. ábra

A gyapjas gyűszűvirág steril csíráztatása



24. ábra

A gyapjas gyűszűvirág szubkultúrálása



25. ábra

A gyapjas gyűszűvirág felszaporítása



26. ábra

In vitro gyökereztetett gyapjas gyűszűvirág

4.6 Községes orbáncfű */Hypericum perforatum/*

A növény leírása:

Az orbáncfűfélék (*Guttiferae*) családjába tartozó évelő növény, amely erdőszélek, füves, cserjés helyek gyakori növénye.



27. ábra

Községes orbáncfű

Hogyan gyűjtjük?

A növény felső virágos hajtását június-július folyamán gyűjtik. Ha a virágot ujjaink között szétmorzsoljuk, sötétpirosas levet ereszt.

Mi van benne?

A növény illóolajat, cseranyagot, flavonoidokat (hiperozidot), naftodiantronokat (hipericint) tartalmaz.

Mire jó?

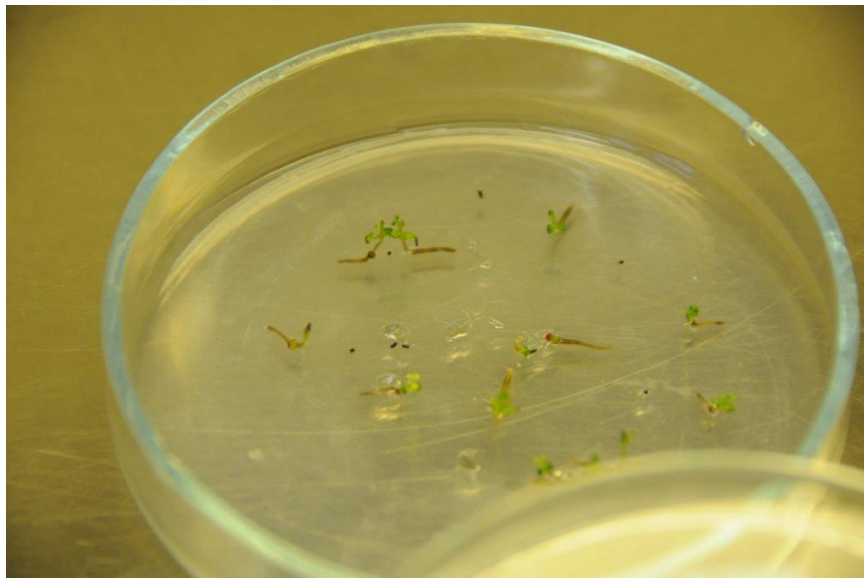
Az orbáncfű teáját sokan használják idegeskedés, depresszió, alvászavarok ellen, de alkalmazzák bőrgyulladások, nehezen gyógyuló sebek kezelésére is. Jótékony hatással van az emberi szervezetre gyomorfekély vagy vese- és epebántalmak, továbbá idegi eredetű gyomor-bélrendszeri panaszok esetén. A száj belső sérülései ellen szintén ajánlott.

A népi gyógyászatban az orbáncfűvet (orbáncfű olajat) reumás fájdalmak enyhítésére és egyes bőrbetegségek kezelésére használják. Köszvény, furunkulózis és egyéb gennyesedések, felületi-külső vérzések esetén használták.

A sterilizálás itt is 100%-os volt, a csírázási arány pedig magas 74%-os . A szubkultúrálás 700 ml-es tenyészedényben történt.

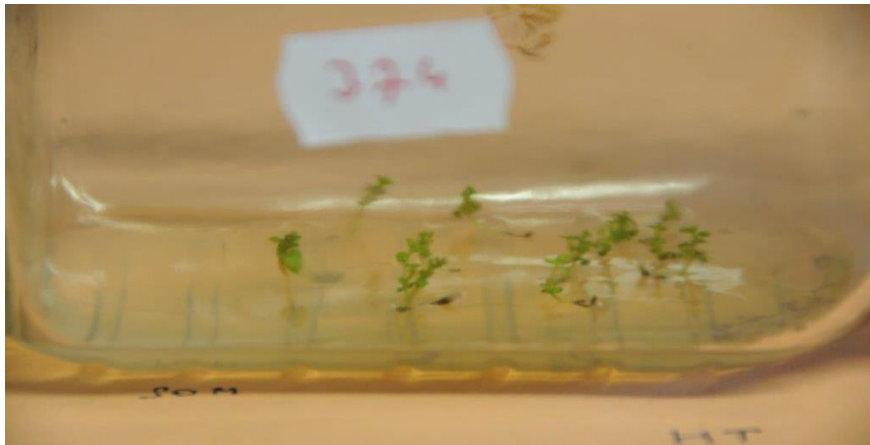
Felszaporítás: A szaporító táptalaj DCR+ 0.5 mg/l BA-t tartalmazott, ezen a növények nagyon jól szaporodtak /3.6/ és megfelelő habitusúak voltak.

Gyökereztetés: A növények gyökeresedése a 0.5 mg/ IVS-t tartalmazó táptalajon, magas, 81% volt.



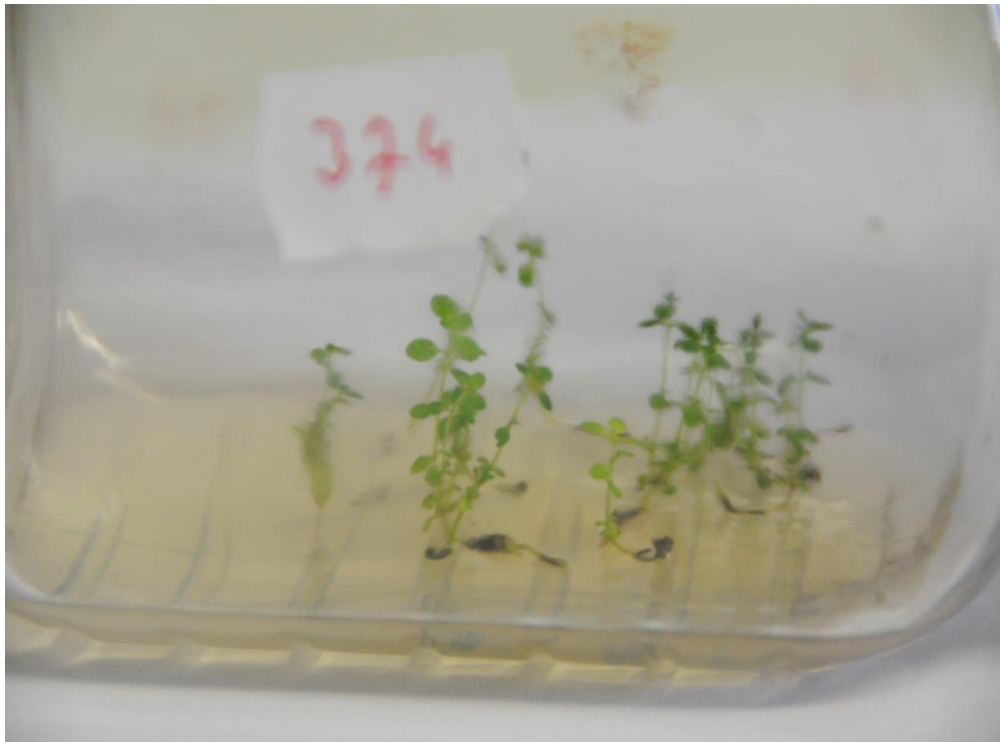
28. ábra

A közönséges orbáncfű steril csíráztatása



29. ábra

A közönséges orbáncfű szubkultúrálása



30. ábra

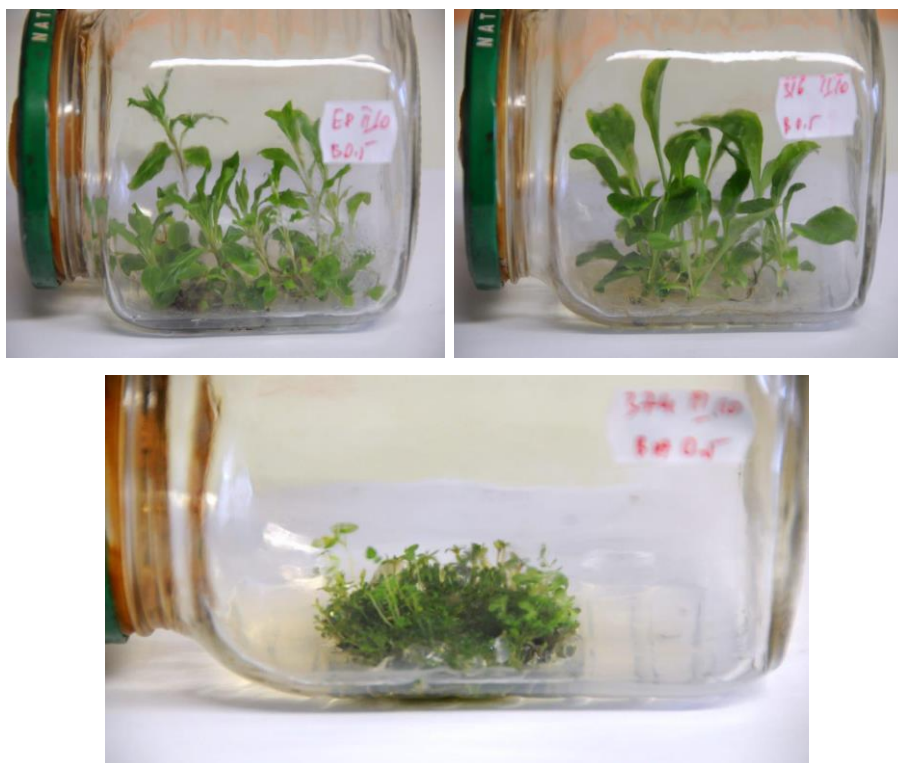
A közönséges orbáncfű felszaporítása



31. ábra
Gyökeres közönséges orbáncfű



32. ábra
A gyűszűvirág, a füzike és az orbáncfű szaporodása azonos alaptáptalajon, azonos
BA /1 mg/l/ hatására.



33. ábra

Az optimális szaporító táptalajon lévő növények
/Füzike, gyűszűvirág, orbáncfű/

5. EREDMÉNYEK

Kísérleteink eredményeképp elmondhatjuk, hogy a kitűzött célt elértük, kidolgoztuk több fontos gyógynövény embriókultúrából történő tenyésztését. Az eredményeket felhasználhatjuk a gyógynövények nemesítésében, a sejtszintű kultúrák /protoplaszt, sejt kultúra/ létrehozásában, és ezen keresztül a növényi hatóanyagok, fitofarmakonok 'in vitro' előállításában.

6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BA: benzil-adenin

GA: gibberelin

DCR: Gupta-Durzan táptalaj (1985)

IVS: indol-vajsav

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

Andrade L. B., Echeverrigaray S., Fracaro F. (1999):

- The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC).

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1999, pp. 79-83(5)

Bhattacharya S. (1997):

- Rapid multiplication of *Jasminum officinale* L. by in vitro culture of nodal explants.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, 1997, pp. 57-60(4)

Bolta I., Bari evi D., Bohanec B., Andren ek S. (2000):

- A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, 2000, pp. 57-63(7)

Bonfill M., Cusidó R.M., Palazón J. (2003):

- Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, April 2003, pp. 37-41(5)

Cassells A. C. – Wallsh C., Belin M., Cambornac M (1999):

- Establishment of a plantation from micropropagated *Arnica chamissonis* a pharmaceutical substitute for the endangered *A. montana*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1999, pp. 139-144(6)

Chitra D., Narmathabai V. (2011):

- Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, September 2011, pp. 409-418(10)

Choffe K. L., Murch S.J. (2000):

- Regeneration of *Echinacea purpurea*: Induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, 2000, pp. 227-234(8)

Coste A. – Vlase L. (2011):

- Effects of plant growthregulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, August 2011, pp. 279-288(10)

Cui, Xi-Hua – Murthy H. (2010):

- Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, October 10, pp. 7-14(8)

Diemer F., Caissard J.C., Moja S. (1999):

- Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Mentha spicata* and *Mentha arvensis*.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, 1999, pp. 75-78(4)

Farzami S., Ghorbanli M.(2002):

- Effects of nutritional factors on the formation of *Anthraquinones* in callus cultures of *Rheum ribes*.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, February 2002, pp. 171-175(5)

Fodorpataki L.,Szigyártó L. (2008): A növények szaporodása és a mesterséges növénysszaporítás biotechnológiai alkalmazása. /Kolozsvári Egyetemi Kiadó/

Fraternale D., Giamperi L., Ricci D. (2003):

- The effect of triacontanol on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, July 2003, pp. 87-97(11)

Furmanowa M., Hartwich M., Alfermann A.W. (1999):

- Rosavin as a product of glycosylation by *Rhodiola rosea* (roseroot) cell cultures.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1999, pp. 105-110(6)

Gadzowska S. – Maury S. (2007):

- Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number1, April 2007, pp. 1-13(13)

Gao S. L. , Zhu D. N. (1996):

- Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, 1996, pp. 73-77(5)

Grezlak A., Janiszowska W. (2002):

- Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, October 2002, pp. 29-40(12)

Gupta P.K. – Durzan D.J. (1987):

Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas fir cell suspension culture.
Plant. Sci. 52: 229-235

Jullien F., Diemer F., Colson M. (1998):

- An optimising protocol for protoplast regeneration of three peppermint cultivars (*Mentha x piperita*).
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, 1998, pp. 153-159(7)

Kairong C., Gengsheng X., Lin Q. (1999):

- The analysis of differential gene expression in early somatic embryogenesis on *Lycium barbarum*.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, 1999, pp. 169-174(6)

Karam N. S., Jawad F.M., Arikat N. A. (2003):

- Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, May 2003, pp. 117-121(5)

Kaur R., Sood M., Chander S. (1999):

- In vitro propagation of *Valeriana jatamansi*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, 1999, pp. 227-229(3)

Koroch A. R., Juliani Jr. H. R., Trippi V. S. (1997):

- Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, 1997, pp. 213-217(5)

Koroch A., Juliani H.R., Kapteyn J., Simon J.E. (2002):

- In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, April 2002, pp. 79-83(5)

Mészáros A., Bellon A., Pintér É. (1999):

- Micropropagation of *lemon balm*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1999, pp. 149-152(4)

Moraes R. , Lata, Sumyanto (2011):

- Characterization and pharmacological properties of in vitro propagated clones of *Echinacea tennesseensis* (Beadle) Small.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, August 2011, pp. 309-315(7)

Murakami Y., Omoto T., Asai I. (1998):

- Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, 1 January 1998, pp. 75-78(4)

Raquel P. – Romanato S. (2000):

- Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 2000, pp. 107-113(7)

Sommer J., Schroeder C., Stöckigt J. (1997):

- In vivo formation of *vanillin glucoside*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1997, pp. 119-123(5)

Soniya E. V., Das M. R. (2002):

- In vitro micropropagation of *Piper longum* – an important medicinal plant.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, September 2002, pp. 325-327(3)

Teng W-L., Sin T., Teng M-C (2002):

- Explant preparation affects culture initiation and regeneration of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, March 2002, pp. 233-239(7)

Whitmer S., Verpoorte R. (1998):

- Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharantus roseus*.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1998, pp. 135-141(7)

Woo S. H., Park J.M., Yang J-W. (1997):

- Induction of branch roots by cutting method in *Hyoscyamus niger* root culture.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 2, 1997, pp. 131-134(4)

Xu J. F., Ying P.Q., Han A.M. (1998):

- Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth regulators and sucrose.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 1, 1998, pp. 53-58(6)

Zhao Y., Grout B., Crisp P. (2005):

- Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum rhaponticum*) PC49, compared to conventional plants.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Number 3, September 2005, pp. 357-361(5)