

Szent István Egyetem  
Gödöllő

---

**LÓBAB NEMESÍTÉSI ALAPANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSA  
*IN VITRO* SZOMATIKUS ÉS MERISZTÉMA  
TENYÉSZETEKBŐL**

*Doktori értekezés*

*Dr. Molnár Zoltán*

*Gödöllő*  
2002

**Doktori iskola:**

Tudományterület: Agrártudományok

Tudományág: Növénytermesztési és kertészeti tudományok, D62i  
Növénytudományi Doktori Iskola

Vezető: Dr. Virányi Ferenc, egyetemi tanár, az MTA doktora  
SZIE Növényvédelemtani Tanszék, Gödöllő, 2103

Titkár: Dr. Gyulai Gábor, egyetemi docens, a biológiai  
tudomány kandidátusa  
SZIE Genetika és Növénynevelés Tanszék,  
Gödöllő, 2103

**Doktori program**

Növénynevelés és biotechnológia

Vezető: Dr. Heszky László, egyetemi tanár, az MTA lev. tagja  
SZIE Genetika és Növénynevelés Tanszék,  
Gödöllő, 2103

**Témavezető:**

Dr. Gyulai Gábor, egyetemi docens, a biológiai tudomány  
kandidátusa, SZIE Genetika és Növénynevelés Tanszék,  
Gödöllő, 2103

Gödöllő, 2002.

Jóváhagyta:

.....  
Dr. Virányi Ferenc, DSc

iskolavezető

.....  
Dr. Gyulai Gábor  
egyetemi docens  
témavezető

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés .....	6
2. Irodalmi áttekintés .....	9
2.1 A lóbab rendszertani besorolása, botanikai jellemzői .....	9
2.2 A lóbab sejt- és szövettenyésztés módszerei, eredményei ..	11
2.2.1 Embriókultúrák .....	11
2.2.2 Generatív szervek kultúrái .....	12
2.2.3 Vegetatív szervek kultúrái .....	13
2.2.3.1 Merisztéma tenyészetek .....	14
2.2.3.2 Hajtástenyészetek .....	16
2.2.4 Szomatikus sejt kultúrák, növény regeneráció .....	18
2.2.4.1 Kallusz- és sejttenyésztés, <i>in vitro</i> variabilitás ....	18
2.2.4.2 Protoplaszt kultúrák .....	24
2.2.4.3 Növény regeneráció szomatikus tenyészetekből ...	26
2.2.5 Transzgénikus növények létrehozása genetikai transz- formációval .....	28
2.3 Molekuláris markerek a lóbab-nemesítésben .....	30
2.4 A lóbabnemesítés és a növényi biotechnológia, géntech- nológia kapcsolata .....	33
3. Anyag és módszer .....	35
3.1 Merisztéma tenyésztés .....	35
3.2 Hajtástenyésztés .....	38
3.3 Kallusztenyésztés .....	38
3.4 Mikroszatellita és RAPD markerek azonosítása .....	40
4. Eredmények .....	42
4.1 A genotípus hatása a hajtáscsúcs <i>in vitro</i> fejlődésére .....	42
4.2 A 6-benzil-amino-purin (BAP) és auxinok hatása a különböző eredetű merisztémák fejlődésére .....	43
4.2.1 A BAP hatása a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D) jelenlétében .....	43
4.2.2 A BAP hatása az $\alpha$ -naftilecetsav (NES) jelenlétében ....	48
4.2.3 A BAP hatása az indol-3-ecetsav (IES) jelenlétében ....	52

4.2.4 A hajtáscsúcs, allevél és sziklevél merisztémák fejlődése <i>in vitro</i> .....	56
<b>4.3 Kallusz- és organogenezis indukció érett sziklevél     tenyészetekben .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4 A nodális szegmentekre alapozott klónozás lehetősége ....</b>	<b>60</b>
<b>4.5 Izolátumfüggő kalluszindukció .....</b>	<b>62</b>
<b>4.6 Lóbabfajták jellemző RAPD mintázata 3'- ill. 5'-végen     horgonyzott SSR/ISSR és OPERON primerek esetén .....</b>	<b>68</b>
<b>4.7 Új tudományos eredmények .....</b>	<b>71</b>
<b>5. Megvitatás .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Merisztéma és hajtáskultúrák .....</b>	<b>73</b>
5.1.1 Merisztéma .....	73
5.1.2 Sziklevél .....	74
5.1.3 Nodális szegment .....	74
<b>5.2 Szomatikus kallusztenyészet .....</b>	<b>75</b>
<b>5.3 Mikroszatellit- és RAPD-PCR vizsgálat .....</b>	<b>76</b>
<b>6. Összefoglalás .....</b>	<b>78</b>
<b>Summary .....</b>	<b>80</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>82</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>89</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
B5	B5 táptalaj (Gamborg et al., 1968)
BAP	6-benzil-amino-purin
GA <sub>3</sub>	gibberellinsav
GUS	β-glükuronidáz
IES	indol-3-ecetsav
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
IVS	indol-3-vaajsav
KIN	kinetin
KM	KM táptalaj (Kao és Michayluk, 1975)
L2	L2 táptalaj (Phillips és Collins, 1979)
LS	LS táptalaj (Linsmaier és Skoog, 1965)
MS	MS táptalaj (Murashige és Skoog, 1962)
NES	α-naftil-ecetsav
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	polietilén-glikol
PVP	polivinil-pirrolidon
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Ri	gyökérindukáló plazmid
SH	SH táptalaj (Schenk és Hildebrandt, 1972)
SPAR	Single Primer Amplification Reaction
SSR	Simple Sequence Repeat
Ti	tumorindukáló plazmid

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A lóbab (*Vicia faba* L.) az egyik legrégebben termesztett kultúrnövény. A jelenleg is folyó kutatások szerint származási helye Közép- és Nyugat-Ázsia. Régészeti leletek szerint termesztésbe vonása a Neolitikumban történt és a korszak második felében terjedt el Spanyolország, Portugália és Kelet-Európa szerte. I.e. 3000-ben a lóbab termesztése általános volt a Földközi-tenger környékén és a mai Európa területén. Ma a világ nagy részén termesztett hüvelyes, bár Észak-Amerikában és Óceániában csak a közelmúltban vonták köztermesztésbe.

Mivel nem tartozik a világ mezőgazdaságát meghatározó növényfajok közé, a vele kapcsolatos -biotechnológiát megalapozó- élettani, genetikai ismeretek messze elmaradnak a fejlett mezőgazdasággal rendelkező országokban termesztett fontosabb kultúrnövényekétől. A citológiai kutatások kedvelt objektuma, mert kromoszómaszáma kevés ( $n=6$ ) és kromoszómái nagyok. A vizsgálatok eredményeként a citogenetikájára vonatkozó ismeretek jelentősen kibővültek. Ez ugyan ad valami segítséget a biotechnológia alkalmazásához, de kevés ahhoz, hogy gyors és átütő sikert érjünk el.

A biotechnológiát megalapozó ismeretek részleges hiánya, a gazdasági jelentőségéből fakadó periférikus helyzete végül is azt eredményezte, hogy napjainkban kevés kísérletes eredményt közöltek a lóbab biotechnológiájával kapcsolatban.

Abból a célból, hogy a génszabványi, vagy sejtgenetikai módszerek bármely fajnál alkalmazhatók legyenek, ki kell dolgozni vagy adaptálni kell -ha lehetséges- azokat a technikákat, melyek lehetővé teszik, hogy az adott faj szomatikus ( $2n$ ) és haploid ( $n$ ) a sejtjeiből, illetve protoplasztjaiból növényt lehessen regenerálni. Az 1. táblázatban lucerna és a lóbab *in vitro* növény regenerálás helyzetét mutatja be. A táblázat egyértelműen szemlélteti, hogy a lóbab esetében gyakorlatban is alkalmazható, kész növény – sejt – növény rendszerekkel egyik ploidszinten sem rendelkezünk.

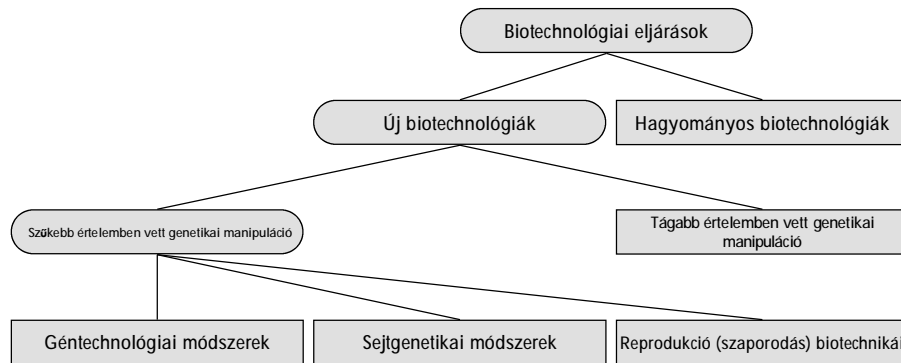
A genetikai manipuláció alapján a biotechnikákat az 1. ábrán bemutatott séma alapján csoportosítjuk. A három fő területről általánosságban az alábbiak mondhatók el a lóbabbal kapcsolatban (a lucernával összehasonlítva):

1. Géntechnológiai módszerek: mindössze néhány, kevésbé reprodukálható eredményt mutató közlemény jelent meg a lóbab transzformációról (lucerna sikeres transzformációjáról már 1986-ban beszámoltak, Deák et al., 1986).

1. táblázat

A növény-sejt-növény rendszer helyzete		
<i>In vitro</i> tenyésztet	<i>Vicia faba</i> L.	<i>Medicago sativa</i> L.
I. Szomatikus sejt (2n)		
1. Kalluszindukció	+	++
2. Kallusztenyésztés	+	++
3. Kallusz → növény	+	++
4. Sejtszuszpenzió	+	+
5. Sejt → növény	-	++
II. Haploid sejt		
1. Pollen → növény	-	+
2. Ginogenezis	-	-
III. Protoplaszt (2n, n)		
1. Protoplaszt izolálás	+	++
2. Protoplaszt tenyésztés	+	++
3. Protoplaszt → növény	+	++

(++ = a rendszer készen áll; + = az eredmény nehezen reprodukálható; - = nincs sikeres közlemény)



1. ábra: A növényi biotechnológiai eljárások csoportosítása

2. Sejtgenetika és szövettenyésztés: kevés közlemény van a sikeres fúziót követő szomatikus hibridek előállításáról (növény regeneráció nélkül), továbbá mutánsok, szomaklónok izolálásáról (lucerna esetében fajhibrideket állítottak elő protoplasztfúzióval)

és számos szomaklónt regeneráltak és teszteltek a nemesítésben, Dudits és Praznowsky, 1985, Li et al., 1993, Pupilli et al., 1995, Nenz et al., 1996).

3. Szaporodás biotechnikai: szomatikus szövetekből (merisztéma, hipokotil, stb.) a növényregeneráció sikeres volt, ami a vírusmentesítés és szaporítás alapjait teremtheti meg. Haploid növényeket pollenből (mikrospórából) még nem állítottak elő (a lucernánál az *in vitro* androgenezis már ismert, Zagorska és Dimitrov, 1995).

Ma a morfológiai markerek mellett egyre nagyobb jelentősége van a molekuláris markereknek, nemcsak az alapkutatásban, hanem az alkalmazott kutatásban is, így pl. a növénynemesítésben. A korábban alkalmazott izoenzim és RFLP markerek mellett növekszik PCR-alapú markerek jelentősége, részben az izoenzimes rendszerek korlátozott mértékű polimorfizmusa, részben pedig az RFLP-technikák idő- és költségigénye miatt. A lóbab esetében már számos gént azonosítottak a faj genomjában (pl. legumin, vicilin), amelyekkel sikerrel transzformáltak más növényfajokat (pl. dohányt). A mediterrán régióban termesztett fajták gyűjteményében megállapították a genotípusok közötti genetikai diverzitást. Az egyes gének kapcsoltságát fokának megállapítására rendelkezésre állnak RFLP és PCR markerek (Link et al., 1995, Torres et al., 1993). A hazai, köztermesztésben levő fajtákról azonban még nincs információ e téren.

Összefoglalva megállapítható, hogy a lóbabnál a legtöbb sejt- és szövettenyésztési technikát kipróbálták, azonban a módszerek kidolgozatlansága miatt a kezdeti eredmények a gyakorlatban biztonsággal nem alkalmazhatók. E nézőpontból tehát legfontosabb feladat a kurrens sejtgenetikai és szaporodás biotechnikai eljárások kidolgozása és adaptálása lóbabra, továbbá tesztelése különböző felhasználási célokból.

A fentiek alapján a dolgozatban ismertetett vizsgálatokat a következő ***célkitűzésekkel*** végeztem el:

- *a merisztéma tenyészetek fejlődését befolyásoló tényezők vizsgálata (a genotípus, a különböző izolátumok, a táptalaj növényi hormon tartalmának hatása);*
- *az in vitro vegetatív mikroszaporítás lehetőségeinek tanulmányozása eltérő eredetű izolátumokkal;*
- *szomatikus sejt kultúrák (kallusztényszetek) létesítése;*
- *PCR-technikára alapozott genom összehasonlítás néhány genotípusnál.*



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A lóbab rendszertani besorolása, botanikai jellemzői

A lóbab (*Vicia faba* L.) a bükköny (*Vicia*) nemzetségbe tartozik. A nemzetség rendszertani besorolása:

Törzs: *Angiospermatophyta* (zárvatermők),

Osztály: *Dicotyledonopsida* (kétszikűek),

Alosztály: *Rosidae* (rózsaalkatúak),

Rend: *Fabales* = *Leguminosales* (hüvelyesek),

Család: *Fabaceae* = *Papilionaceae* (pillangósvirágúak),

Nemzetség: *Vicia* (bükköny),

Faj: *V.faba*.

A faj eredete máig nem tisztázott. Egyetlen vadon élő rokona sincs, rendszertanilag legközelebb a *Vicia narbonensis* L. (narboni bükköny) áll hozzá. A hasonló morfológiai felépítés ellenére lényegesen különbözik a két faj kromoszómaszáma: *V.faba* -  $2n = 12$ , *V.narbonensis* -  $2n = 14$ . A lóbab kromoszómák mérete és DNS tartalma viszont csaknem kétszerese a rokon fajénak, amely az ismétlődő repetitív DNS szekvenciákkal magyarázható (Raina és Ogihara, 1995).

Az általánosan elfogadott nézet szerint a *V.faba* géncentruma Közel-Keleten található, ősalakját (*V.faba* var. *paucijuga* Alef.) jelenleg Afganisztánban és Indiában termesztik. A különböző méretű és alakú magokra történt szelekció eredményeként ebből a változathól fejlődtek ki az alábbi varietások:

var. *faba* (disznóbab) (var. *megalosperma* Alef., var. *major* Harz.): a mag mérete 25-35 mm hosszú, illetve széles, 8-10 mm vastag, felszíne lapos, sima, vagy homorú; ezermagtömeg 1000-2400 g, szélsőségesen előfordul ennél nagyobb tömegű mag is;

var. *equina* Pers. (nagymagvú lóbab): a mag 12-20 mm hosszú, ill. széles, 5-8 mm vastag, felszíne lapos, sima, vagy homorú; az ezermagtömeg 500-1000 g;

var. *minor* Peterm. (kismagvú lóbab): a mag mérete 5-9 mm hosszú, ill. széles, 5-8 mm vastag, alakja inkább gömbölyű, felszíne sima, ezermagtömege 500 g alatti (Cubero, 1974).

A lóbab egyéves, lágyszárú növény. Magyarországon csak tavaszi vetésidejű fajtákat termesztenek. A világ szubtrópusi klímájú országaiban azonban őszi vetésű fajtái is megtalálhatók. Allorhízás gyökérzete a gyököcskéből képződő főgyökérből és oldalgyökerekből áll. A főgyökérrendszer orsó alakú, erőteljes, átmérője a gyökérnyaknál 10-14 mm, színe sötétbarna. A gyökérgümőkben nitrogénfixáló baktériumokat (*Rhizobium*

*leguminosarum* bv. *viciae*) találunk. Az endomikorhizás asszociációk is jellemzők a növény gyökerére. A szár felálló, sima felületű, színe zöld, éretten barnás, vagy barnás-fekete, rajta négy, kiemelkedő borda fut végig, nagyobb tenyészterületű helyeken elágazhat. Hossza leggyakrabban 80-120 cm között változik. A primer lomblevél tojásdad alakú, 2-3 cm hosszú. A levéllemez színe zöld, felülete sima, a levélszél ép, a levélnyel hossza 1,5-2,0 cm. A levélnyel alapi részénél két, háromszög alakú pálhalevél található. A párosan szárnyalt, 2-6 pár, tojásdad alakú, sima felületű, ép szélű levélkéből álló összetett levél kékeszöld színű, hossza 8-10 cm. A levelek szórt állásúak. Virágzata összetett fürt, az egy virágban található fakultatív idegen termékenyülő zigomorf virágok száma 2-8 db. A virág tipikus pillangósvirág, rendszerint fehér alapszínű, hossza többnyire 20-30 mm. A vitorlán különféle színeződések figyelhetők meg, ezek gyakran zöldesek, lilák, vagy barnásak. Ismertek teljesen fehér virágszínű fajták, ezek tannintartalma kisebb. A csésze 5 csészelevélből áll. A virágok 10 porzólevelet tartalmaznak. A felsőállású magház egyetlen termőlevélből áll, amelynek hasi oldalán több magkezdemény (legtöbbször 3-5) képződik. A virágzás az alsó nóduszoktól indul felfelé a száron. A növények teljes virágzásának időtartama környezetfüggő, évente átlagosan 25-30 nap. A teljes virágzat hossza 6-10 cm. Növényenként rendszerint 6-12 virágfürt található, melynek száma elsősorban a növény magasságától függ. A hüvelykezdemény felálló, mely az érés felé lecsüngő is lehet. A hüvely formája alapján lehet kerekded, a disznóbaboknál azonban már lapított. Ez a szerv kezdetben húsos, színe zöld, éréskor azonban már lehet fekete, barnás-fekete, ritkán szürke. Alakja a kismagvú fajtáknál legtöbbször egyenes vagy gyengén hajlott, kerek. A nagymagvú lóbabok hüvelye erősen hajlott, lapos, a magvak ezekben sokkal jobban tapinthatók. A hüvelyek általánosságban 50-150 mm hosszúak és 10-20 mm szélesek, 2-7 magvúak. Az első hüvelyek rendszerint a növény 5. vagy 6. nóduszán fejlődnek ki. A legkorábban virágzó nóduszokon található gyakran a legtöbb termékenyült virág. A növényenkénti termékenyült virágok száma a legtöbb esetben nem éri el az összes virág 10-15 %-át. A mag alakja, mérete és színe is rendkívül formagazdag. Nagyságára és ezermagtömegére nézve ez a fajták hazai osztályozásának az alapja. A maghéj rendszerint sárga, fakó-sárga, csontszínű, de előfordul barna, sötét fekete színű mag is. Tartósabb tárolás esetén még a világosabb színű magok is megsötétednek. A köldök rendszerint a maghéj színénél sötétebb, a sötét fajtáknál annál világosabb (Kajdi, 2001).

A fajták gazdasági értékmérő tulajdonságai közül a területegységre jutó magtermés, a tenyészidő hossza, a virágzás kezdete, a virágzás időtartama, a növényenkénti nódusz- és termő nódusz szám, a növényenkénti hüvely- és hüvelyenkénti magszám, a növény-

állományok magassága, az alsó hüvely talajszinttől mért távolsága, a szárszilárdság, az ezermagtömeg és a rozsdarezisztencia a legfontosabbak (Kajdi, 1999).

## 2.2 A lóbab sejt- és szövettenyésztés módszerei, eredményei

A növényi sejt- és szövettenyészetek egyik lehetséges csoportosítási módja az izolátum eredete szerinti klasszifikáció. E szerint megkülönböztetünk:

- embriókultúrát;
- generatív szervek kultúráit (portok, pollen, ovárium, ovulum, endospermium, stb.);
- vegetatív szervek kultúráit (merisztéma, gyökér, hajtás, levél, hagyma, gumó, stb);
- szomatikus sejt-kultúrákat (kallusz, szuszpenzió, fermentáció, protoplaszt, mesterséges mag, stb.);
- sejtgenetikát (szomaklónok, mutánsok, protoplasztfúzió, cibridizáció, organelum-átvitel, stb.)
- géntechnológiát (génizolálás, DNS-szintézis, vektorok, transzformáció, transzgenikus növényregenerálás, stb.) (Dudits és Heszky, 2000).

A lóbabnál - mint ahogy a bevezetésben már említettem - csak kezdeti sikereket értek el az egyes tenyészet típusoknál. A teljesség kedvéért nemcsak a vizsgálatokhoz szorosan kapcsolódó kultúráknál ismertetjük az eddig elért eredményeket, hanem röviden az összes többinél is.

### 2.2.1 Embriókultúrák

Az embriótenyésztés során az embriógenézis különböző fejlődési stádiumában levő zigotikus proembrió steril feltételek között ki kell preparálnunk az embriózsákból és olyan szilárd táptalaj felületére kell helyezni, mely tartalmazza mindazokat az anyagokat (makroelemek, mikroelemek, vitaminok, ozmotikumok, hormonok, szacharóz, stb.), melyek szükségesek a normális embriófejlődés fenntartásához. Az inkubáció során megfelelő hő- és fényviszonyokat is biztosítani kell. Az embriók, befejezve fejlődésüket „kicsíráznak” és belőlük normál növények fejlődnek.

A módszer gyakorlati jelentőségét az adja, hogy olyan esetekben is kaphatunk növényeket, amikor *in vivo* az embriógenézisnek valamilyen akadálya van, pl. inkompatibilitás. Végeredményben olyan új faj- és nemzetséghibrideket tudunk a előállítani, melyek a fellépő inkompatibilitás miatt a természetben nem jöhetnek létre. Ezekben az esetekben a hibrid embrió abortálását a mesterséges felneveléssel

megakadályozzuk. További alkalmazási lehetőség még az öninkompatibilitás, a hosszú csíranyugalom leküzdése, az évente előállítható nemzedékek számának növelése.

A *Vicia* nemzetségben számos interspecifikus hibridizációról beszámoltak már. A vizsgálatokat elsősorban genetikai kapcsolatok tisztázása érdekében végezték. Nagy jelentősége lenne a bizonyos kórokozókkal szembeni rezisztenciát mutató *Vicia* fajok hibridjei előállításának embriókultúrával. Pl. a *Vicia narbonensis* rozsdá (*Uromyces viciae-fabae*) és aszkohita (*Ascochyta fabae*) rezisztens. Yamamoto (1984) kariotípus és izoenzim tanulmányokat végzett *V.faba* és *V.narbonensis* fajokon. A fajkereszteszések azonban sikertelenek voltak. Roupakias (1986) anatómiailag is igazolta, hogy a mesterséges megporzást követően a termékenyülés bekövetkezik, azonban az embrió abortál. A hibrid embrió 20 nappal a megporzást követően pusztult el. A hibrid embriók megmentését vizsgálta Lazaridou et al. (1993). A nagyon fiatal ovulumok (1,0-1,8 mm-es) tenyésztése nem járt sikerrel, azonban az öntermékenyült, *in vitro* hüvelytenyészetekből a megporzást követő 4. (*V.narbonensis*) ill. 11. naptól (*V.faba*) izolált embriókból életképes növényeket neveltek fel. A megfelelő keresztezési partnerek (genotípusok) kiválasztásával, majd ezt követően az embriókultúra kidolgozásával *Vicia* fajokra, az abortálást megelőzően kiperarált hibrid embriókból *in vitro*, hibridek lennének felnevelhetők.

#### 2.2.2 Generatív szervek kultúrái

A lóbab esetében a gyakorlati felhasználás szempontjából a generatív szervek tenyésztői közül legnagyobb jelentősége az androgenetikus haploidoknak van. A mikrospóra fejlődésének korai stádiumában a továbbfejlődés iránya még nem determinált. Ez a tény adja az elvi lehetőségét annak, hogy a pollen fejlődését az *in vitro* portokkultúrában a mikrogametogenezis helyett sporofita irányba térítsük el. Az *in vitro* androgenézis során soksejtes „pollenszem” alakul ki, melyből embrió- vagy organogenezis indukcióval haploid növényeket nevelhetünk fel.

A haploid sejtszövettenyészetekben a recesszív tulajdonságok előfordulási gyakorisága jóval nagyobb, mint a diploidokban: Ebből kifolyólag a módszer gyakorlati jelentőségét az adja, hogy a haploidok rediploidizációjával „homozigóta” stabil, további szelekciót nem igénylő diploid növények állíthatók elő. Így módon pl. a hibridkukorica előállítás alapfeltételét jelentő beltenyésztett vonalak előállításának és általában a mezőgazdasági növények hibrid nemesítésének idejét -az évekig tartó szelekció kiküszöbölésével- legalább felére lehet csökkenteni.

A gaméták a meiózis során lejátszódó rekombináció (crossing over, homológok véletlenszerű szétválása) miatt genetikailag különbözőek. A haploidia lehetővé teszi, hogy a gaméták szintjén jelentkező genetikai változatosságot -a másik gaméta hatása nélkül- az intakt növények szintjére hozzuk. Ez a gametoklonális variabilitás ma még egyedülálló az élővilágban (Dudits és Heszky, 2000).

A pillangós, illetve abrakhüvelyes növényeknél jelenleg kevés irodalmi adat van az androgenetikus haploidokat illetően. Ivers et al. (1974) kalluszindukcióról számoltak be szója (*Glycine max* (L.) Merr.) anthera kultúráiban. Különböző táptalaj összetevők hatását vizsgálták a kallusz és/vagy növényfejlődésre. Embrioid fejlődést, illetve növény regenerációt nem figyeltek meg a diploid kalluszon, ami a szövet szomatikus eredetére utal.

Lóbabnál csupán néhány kísérleti eredményről számoltak be az androgenetikus haploidokkal kapcsolatban. Paratasilpin (1984) az *in vitro* pollen-növekedésre és -fejlődésre legmegfelelőbbnek az MS alaptápközeget (Murashige és Skoog, 1962) találta, módosított vitamin és aminosav kiegészítéssel (mezo-inozít 100 mg/l, glicin 2 mg/l, tiamin.HCl 0,5 mg/l, nikotinsav 5 mg/l, piridoxin.HCl 0,5 mg/l, folsav 0,5 mg/l és biotin 0,05 mg/l). Soksejtmagvas pollenszemek fejlődtek a 0,2 mg/l kinetint tartalmazó táptalajon. A szacharóz 3 %-os adagolása volt a leghatásosabb a tenyészetekben. A soksejtmagvas pollenek főleg a vegetatív sejt osztódása révén keletkeztek. Hét sejtből álló proembrioidokat is megfigyelt 0,2 mg/l kinetin (KIN), 0,1 mg/l  $\alpha$ -naftil-ecetsav (NES) és 5,0 mg/l 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D) kiegészítéssel. A proembrioidok továbbfejlődését azonban nem tapasztalta. A növény fiziológiai állapotát vizsgálva a tenyészetek fejlődésére megállapította, hogy a hidegkezelés nem járt tartós hatással, valamint a szabadföldi, májusban gyűjtött portokok a legmegfelelőbbek a haploid indukcióra lóbabnál.

Két lóbabfajta és néhány F2-F3 hibrid anthera kultúráit vizsgálta Golyshkina és Golyshkin (1987). Összesen 14 táptalaj kombinációt, valamint a bimbók hóvel történt előkezelését (2-10 és 30-35 °C) értékelve megállapították a 3-6 napig tartó, 4-8 °C-os kezelést, valamint a táptalajok fitohormon tartalma fokozta a haploid produkciót. A hibrideknél nagyobb haploid indukciót figyeltek meg.

### 2.2.3 Vegetatív szervek kultúrái

A vegetatív szervek tenyésztési közül legnagyobb jelentősége a merisztéma és hajtáskultúráknak van. Az említett tenyészet típusok a vegetatív mikroszaporítás fő technikáját jelentik. A növényeknek -eltérően más élő szervezetektől- a rügyekben,

hajtáscsúcsokban van egy sajátos differenciálatlan sejtekből álló szövete, a merisztéma, amely a növény élete során megtartja osztódóképességét. Ennek működése biztosítja a növény hosszirányú növekedését. A nyitva- és zárvatermő növények föld feletti részeinek növekedése tulajdonképpen a csúcsmerisztémákban lejátszódó osztódások, sejtmeinyulás és differenciálódás következménye. A merisztéma átmérője átlagosan 0,1 mm, hossza 0,05-0,3 mm. Amennyiben a hajtáscsúcs osztódó zónáját táptalajra izoláljuk, abból megfelelő inkubációs feltételek esetén hajtás fejlődik. A táptalajban újabb és újabb merisztémák differenciálódását indukálhatjuk, ezzel a tenyészetekben felnevelhető növények számát jelentősen növelhetjük. Az utóbbi évtizedekben bebizonyosodott, hogy e módszerrel elvileg korlátlan (millió/milliárdos) szaporulat érhető el évente.

Az *in vitro* kultúrák kiváló feltételeket teremtettek a vírusmentesítés és vírusdiagnosztizálás új -részben biotechnológiai- módszereinek felhasználásához, ugyanis a folyamatosan osztódó csúcsmerisztéma bizonyos sejtrétegei még kórokozómentesek és ha az izolálás csak ebből a részből történik, a regenerált növények is patogénmentesek lesznek. A tenyészetekben a kórokozómentes alapanyagok a tenyésztési feltételek -táptalaj, hőmérséklet, fény, stb.- megfelelő változtatásával, évi 1-2-szeri átoltással korlátlan ideig az újrafertőződés veszélye nélkül fenntarthatók, tárolhatók. A vegetatív úton szaporított növények génbankban, változatlan formában történő tartós tárolása a hajtástenyészetekben megoldható.

A lóbab esetében beszámoltak hajtás- és merisztéma kultúrákon alapuló vegetatív mikroszaporításról, de ténylegesen gyors szaporítási módszer nem áll rendelkezésre.

#### 2.2.3.1 Merisztéma tenyészetek

Az első sikeres hajtáscsúcs organogenezisről hajtásméristéma eredetű kalluszból Galzy és Hamoui (1981) számoltak be. Az organogenezis vizsgálata során használt tápközegek tartalmazták a tenyészetek indukciójánál alkalmazott növekedés szabályozókat, de az auxinok és citokininek mennyiségét, valamint arányát megváltoztatták. Hajtás differenciálódást csak akkor tapasztaltak, ha az auxin NES volt. A hajtásfejlődésre leghatásosabb kiegészítőnek a 0,1 mg/l NES és 0,5 mg/l 6-benzil-amino-purin (BAP) bizonyult.

Tejklova et al. (1984) faktoriális kombinációban vizsgálta a NES és BAP hatását 7-8 napos csíranövények tenyésző csúcsainak fejlődésére, módosított MS táptalajon, egy *in vitro* mikroszaporítási rendszer kidolgozása céljából. A legnagyobb axilláris hajtás-

proliferációt 0,1  $\mu\text{M}$  NES és 20  $\mu\text{M}$  BAP kiegészítéssel érték el. Szubkultúránként átlagosan 6 db jól fejlett hajtást kaptak egy-egy izolátumból. Az explantátumok regenerálóképességüket hosszú ideig megtartották. Megfigyelték az explantátumok feketedéssel járó nekrozisát is az *in vitro* tenyésztés során.

Bieri (1985) szintén a BAP (1 mg/l) kedvező hatásáról számolt be. Az *in vitro* fejlődött hajtások gyökeresedését hormonmentes táptalajon indukálta, a kiültetett növények azonban csak 30 %-os túlélést mutattak.

Schulze et al. (1985) nemcsak a hajtáscsúcs, hanem a náduszok és hipokotil explantátumok növény regenerációs képességét is vizsgálták LS (Linsmaier és Skoog, 1965) tápközegen. Főleg hipokotil eredetű tenyészetekből, 0,1 mg/l NES és 0,5 mg/l BAP kiegészítéssel regeneráltak hajtásokat, amiket 2 mg/l indol-3-ecetsavat (IES) tartalmazó LS táptalajon gyökereztettek meg.

Busse-Eisenreich (1986) különböző auxinok és citokininek hatását vizsgálta csíranövényből származó explantátumokon. Értékelte az explantátumok és a kalluszk organizációs képességét. Abban az esetben, amikor az inokulum hajtásmerisztémát is tartalmazott mind a merisztémából, mind a merisztéma kalluszból a növényregeneráció sikeres volt. Az epikotil, gyökér és embrió eredetű kalluszból csak gyökeret tudott regenerálni. Az allevél merisztémákból kiindulva MS tápközegen, 0,175 mg/l IES és 2,25 mg/l BAP hormon kiegészítéssel kapta a legtöbb hajtást. A gyökereztetést hormonmentes MS táptalajon végezte, 20 %-os hatékonysággal. Az alacsony hatékonyságot később fokozni tudta 90 %-ra egy két lépéses gyökereztetési módszer kidolgozásával, amelyben módosított MS táptalajt használt (Busse-Eisenreich és Kunze, 1989). A tápközeg N-tartalmát csökkentette, hormon kiegészítőként az első lépésben 2 mg/l indol-3-ecetsavat (IES) és 1 mg/l kinetint, a másodikban 2 mg/l NES-at és 0,1 mg/l KIN-t használt. A talajba kiültetés után morfológiailag normális növényeket kapott.

Két babfajta (*Phaseolus vulgaris* L.) és a 'Coprosi' lóbabfajta magjait csíráztatta Mohamed et al. (1992) *in vitro* MS tápközegen B5 (Gamborg et al., 1968) vitaminokkal, 30 g/l szacharózzal és változó koncentrációjú BAP-nal (2,5-5,0-7,5  $\mu\text{M}$ ) kiegészítve. A csíranövényeket sötétben, vagy folyamatos megvilágítás mellett 22-24 °C-on nevelték. A merisztéma szöveteket hordozó sziklelevél és primer lomblevél náduszokat izoláltak 14 napos csíranövényekből a csíráztatás során használt MS tápközegre. A legtöbb regenerált hajtást mindkét fajnál a sötétben nevelt növényekből származó náduszokon kapták. Optimálisnak az 5  $\mu\text{M}$  BAP kiegészítés bizonyult mind a csíráztatás során, mind pedig a

merisztéma kultúráknál. Amennyiben más szintetikus citokinineket, így klórfenuront (CPPU) vagy thidiazuront (TDZ) használtak 0,25-1,0  $\mu\text{M}$  mennyiségben, a regenerált hajtások száma 2-5-szörösére emelkedett. A magasabb (2,5-5,0  $\mu\text{M}$ ) CPPU és TDZ koncentráció fokozta a hajtások megnyúlását és a kalluszindukciót. Hisztológia analízisek igazolták az adventív merisztémák kialakulását az *in vitro* tenyésztés 6-8. napján. A regenerált utódok hasonló morfológiával rendelkeztek, mint a magról kelt egyedek.

### 2.2.3.2 Hajtástenyészetek

A hajtástenyészet általában gyökér nélküli hajtások növekedését és fejlődését jelenti táptalajon, steril és kontrollált feltételek között. A mikroszaporítás a tenyészetekben fejlődő hajtásokon, illetve azok hónaljában differenciálódó rügyeken alapul. Az *in vivo* hajtások mellett a szövettenyészetekben kialakult hajtások is felhasználhatók. A kultúrákkal lehetővé válik a legtöbb növényfaj tartós tenyésztése *in vitro*, mivel a hosszú időtartamú tenyésztés során a hajtások megtartják regenerálódó-képességüket és megfelelő feltételek között a genetikai változások valószínűsége kicsi.

Aubry et al. (1975) nodális szegmentekre alapozva kidolgoztak egy eljárást hajtástenyészetben történő mikroszaporításra, de ez széles körben nem tudott elterjedni. Kétnóduszos szárdarabokat gyökereztettek auxin (IES, NES) tartalmú táptalajokon. Leghatásosabbnak mindkét hormontípusnál a  $10^{-6}$  M-os koncentráció bizonyult.

Martin et al. (1979) a *de novo* fenol-oxidáció által kiváltott nekrozist 20 g/l aktív szénnel csökkentette. Az internódiumok megnyúlását  $5 \times 10^{-3}$  M gibberellinsavval ( $\text{GA}_3$ ), a merisztémák differenciálódását  $10^{-7}$  M  $\text{GA}_3$ -val és  $10^{-6}$  M BAP-nal kiegészített, a hajtások gyökeresedését pedig ammónium ion nélküli táptalajon érték el.

Daniel (1986) csíranövények hipokotil régióiból indukált tenyészeteket különböző táptalajokon. A regenerált hajtásokat feldarabolással „szaporította”, 6 átváltáson keresztül. A hajtások gyökérbésképzése csekély volt: a gyökereztetésre két lépésben, csökkentett ammónium ion tartalmú hormonmentes, és 2,0 mg/l IES-val kiegészített tápközeget használt. A regenerált növények a talajba kiültetés után gyenge fejlődést mutattak, gyorsan virágoztak. A szaporítási ráta ennek megfelelően alacsony volt.

Csíranövényekből származó, apikális merisztémákat hordozó hajtásokat tenyésztett Gebre-Medhin et al. (1988). A fejlődő hajtásokból különböző explantátumokat (csúcsrügyek, nóduszok) izoláltak 0,1 mg IES-val és 0,5 mg BAP-nal kiegészített B5



tápközegre. A növényregeneráció kallusz fázis nélkül ment végbe, a tenyészetek 7-8 hónapon át megtartották regenerációs képességüket.

Sayegh (1988) különböző izolátumok hajtásorganizációs képességeit összehasonlítva megállapította, hogy a vegetatív mikroszaporítás céljára a fiatal növények apikális csúcsa, nodális szegmentjei, valamint az epikopil-hipokotil csatlakozási régiója a legmegfelelőbb. A 4 hetes tenyésztést követő átoltással gyökereztető tápközegen 2 genotípus 59 hajtásánál 73 %-os gyakoriságú gyökérfejlődést tapasztalt 5 hét elteltével.

Busse-Eisenreich és Kunze (1989) egy két lépéses gyökereztetési módszert dolgoztak ki, amivel 20 %-ról 90 %-ra növelték a gyökeresedés gyakoriságát (a táptalaj hormon kiegészítését a merisztéma tenyészeteknél már említettem).

Selva et al. (1989) a nitrogénforrás, tenyésztési hőmérséklet és az aktív szén hajtás-tenyészetek gyökérbérbérsére gyakorolt hatását vizsgálta. Az alacsony hőmérséklet (14-18 °C) gátolta a fenolképződést az explantátumokban, ezáltal nem volt szükség aktív szén kiegészítésre. Eredményeiből a nitrogénforrás és hőmérséklet komplex korrelációjára következtettek, amit azonban egy egyszerű törvényszerűséggel nem tudtak leírni. Sziklevél és szárnódusz eredetű kultúrákban hajtás multiplikációt tapasztaltak, BAP jelenlétében. Optimálisnak a 4 mg/l BAP koncentráció bizonyult. A szárnóduszok eredeti elhelyezkedése befolyásolta a növekedésserkentők hatását, amit az apikális dominancia utólagos hatásával magyaráztak.

Fakhrai et al. (1989) aszeptikusan nevelt csíranövények szárából, leveléből, gyökereiből és szikleveléből indukált tenyészeteket. Hajtás organogenezist csak a nóduszos szárdarabokon és sziklevél nóduszokon tapasztaltak, MS táptalajon, 3 % szacharóz, 2,0 mg/l BAP és 0,2 mg/l NES hormon kiegészítéssel. A hajtásfejlődés kalluszosodással járt együtt, amely számos hajtásmerisztéma iniciálist tartalmazott. A kallusz hajtás regenerációs képességét 9 hónapig megtartotta. Hisztológiai vizsgálatokkal igazolták a merisztémák *de novo* kialakulását. A kapott hajtásokat 90 %-os gyakorisággal gyökereztetették feles töménységű MS tápközegen, 1,5 % szacharóz, 0,1 mg/l NES és 0,5 mg/l KIN kiegészítéssel.

Az etilén hatását vizsgálta Khalafalla és Hattori (2000) a szövettényészetekből TDZ hatására regenerált lóbabhajtások gyökérfejlődésére. Különböző vegyületeket teszteltek: az etilén prekursor aminociklopropán-1-karboxilsavat (ACC), három etilén inhibitor: ezüst-nitrát ( $\text{AgNO}_3$ ), acetil-szalicilsav (ASA), kobalt-klorid ( $\text{CoCl}_2$ ), különböző koncentrációkban: 1, 3, 5, 10 mg/l. Az ACC egyértelműen gátolta a gyökérfejlődést. Ezzel szemben az inhibitorok közül az  $\text{AgNO}_3$  3-10 mg/l-es koncentrációban növelte a regenerált

gyökerek számát, a gyökerek hosszát és növekedési rátáját. Az ASA és  $\text{CoCl}_2$  minden koncentrációja fokozta a gyökérfejlődés hatékonyságát. Az eredmények igazolták az etilén gátló hatását a TDZ indukálta hajtások gyökeresedésére, egyben megoldásul szolgáltak más fajok hasonló problémájának leküzdésére is.

## 2.2.4 Szomatikus sejt kultúrák, növényregeneráció

### 2.2.4.1 Kallusz és sejtenyészetek, *in vitro* variabilitás

A kalluszkultúra az *in vitro* dedifferenciáció indukcióját igényli. A dedifferenciálódás *in vitro* folyamata során a táptalajra helyezett sejtek fokozatosan átprogramozódnak, elvesztik differenciáltságukat. E folyamat során kapjuk a kalluszt, amely -az izolátum kambiális és parenchima sejtjeinek intenzív osztódására visszavezethető- differenciálatlan sejtek halmaza. Ezekben csak az osztódáshoz és az alapvető anyagcsere folyamatokhoz szükséges gének működnek. Potenciálisan tehát a sejtek bármivé differenciálódhatnak. A kalluszosodás természetes és szintetikus citokininekkal és auxinokkal váltható ki. Az intenzív kalluszképzés indukciójához azonban a szövetek belső auxinszintjét lényegesen meghaladó külső auxin koncentráció szükséges. A szilárd táptalajra izolált inokulumból fejlődő primér kallusz, többszöri átoltással -passzálással- folyamatosan fenntartható és szaporítható. A kallusz folyékony tápközegbe helyezésével és folyamatos rázatásával elérhető a sejtek leválása, elkülönülése, majd a sejtszuspenzió kialakulása. A növényi sejtenyészetek alatt általában a rázatott szuszpenziós sejt kultúrákat értjük, de sejtenyészet létesíthető a sejtszuspenzió szilárd táptalajra való kiszélesztésével, illetve a növényi sejtek fermentálásával is.

A lóbab *in vitro* kultúráit illetően ez az egyike a leginkább kutatott területeknek. Az első tenyészeteket Venketeswaran már 1962-ben indukálta hipokotil explantátumokból. Ennek oka, hogy a kallusztenyészet bármilyen növényfajból könnyen indukálható és a lóbabsejtek kevés, azonban viszonylag nagy -tehát könnyen vizsgálható- kromoszómákat tartalmaznak (Venketeswaran, 1963). Venketeswaran a kalluszindukcióhoz  $1,0 \mu\text{M}$  2,4-D-at és NES-at használt, 3 g/l élesztő kivonattal kiegészített táptalajban.

Grant és Fuller (1969) gyökérből indukáltak kallusztenyészetet  $1 \mu\text{M}$  2,4-D és 5,0 g/l élesztőkivonattal kiegészítéssel. Kísérletükben az optimális kallusznövekedés feltételeit, valamint szuszpenziós kultúrához legmegfelelőbb, laza szerkezetű kalluszsövet kialakulását vizsgálták. Morfológiailag két eltérő szövettípust figyeltek meg, kémiai analízissel igazolták a laza szerkezet és a sejtfa összetevők kapcsolatát.

Különböző táptalaj összetevők hatását vizsgálta Mitchell és Gildow (1975) epikotil eredetű kalluszok gyarapodására. Módosított SH tápközegen (Schenk és Hildebrandt, 1972) az optimális hormonkoncentráció KIN esetében 0,01 mg/l, 2, 4-D esetében 0,5 mg/l volt. A nitrogéntartalom növelésével gyorsítani lehetett a kallusz proliferációját. A 0,5 mg/l-es 2,4-D koncentráció gátolta az explantátumok gyökéresedését, amit hormonmentes közegen megfigyeltek. A kallusz fenntartásához a táptalajt kazein-hidrolizátummal vagy aminosav keverékkel egészítették ki.

Cionini et al. (1978) citológiai vizsgálatokat végeztek éretlen embrió eredetű kalluszokon. Az indukcióhoz auxinokat (IES és 2,4-D), valamint KIN-t használtak különböző kombinációkban és koncentrációkban. A diploid és endoreduplikált sejtmagok változásait vizsgálták a sejtosztódások során (DNS-tartalom, mitotikus index, stb.).

Röper (1979) gyökér és hajtás eredetű kallusztenyészeteket indított. A folyamatos szubkulturálás eredményeként -módosított SH tápközegen- két, morfológiailag eltérő szövettípust különböztetett meg a gyökér eredetű tenyészetekben. Harminc napos szubkulturálás során a gyorsan nöövő fehér, laza szerkezetű kallusznál harmincszorosa, a lassabban növekvő sárga, laza szerkezetű kilencszeres növekedést tapasztalt. A mitotikus index 4,3 % és 4,2 % volt. Szoros negatív korrelációt figyelt meg a friss tömeg gyarapodás és a mitotikus index között. A hajtás eredetű kultúrákban nem történt jelentős elváltozás. A sárga kalluszból folyékony tápközegben szuszpenziós tenyészeteket indított, a kultúrákból regenerált kalluszok egy sejtől is származhattak.

Martin et al. (1979) szárszegmentekből indukáltak kallusztenyészeteket, a növekedésre legoptimálisabbnak a 0,5  $\mu$ M KIN és 1  $\mu$ M NES bizonyult.

Különböző hormonok eltérő koncentrációit és kombinációit vizsgálta Pevalek et al. (1980) hajtáscsúcs és éretlen embriók hipokotil eredetű kalluszkultúráiban. Az explantátum eredetének megfelelően eltéréseket találtak az optimális táptalaj összetevőkben. Az éretlen embrió eredetű tenyészeteknél az MS alaptáptalaj 3 % szacharóz, valamint 0,3  $\mu$ M 2,4-D és 1,0  $\mu$ M BAP kiegészítéssel, a hajtáscsúcs eredetűeknél a B5 alapközeg 3 %-os szacharóz, 1,0  $\mu$ M NES és 2,5  $\mu$ M BAP hormonkiegészítéssel volt a legjobb.

Galzy és Hamoui (1981) hajtáscsúcsból indukáltak kalluszokat. Auxinokat (NES és 2,4-D) 1 mg/l, valamint citokinineket (BAP és KIN) 5 mg/l koncentrációkban használtak. A hormonkiegészítés befolyásolta a kallusznövekedést és a tenyészetek organogenezis képességét. A kalluszt alacsonyabb hormonszintű táptalajra átváltoztatva gyökér és hajtás neoformációt tapasztaltak.

Éretlen embrió eredetű explantátumokból létesített kallusztenyészetet Jelaska et al. (1981) MS tápközegen, 1,38  $\mu\text{M}$  2,4-D, vagy 0,92  $\mu\text{M}$  2,4-D és 1,0  $\mu\text{M}$  KIN kiegészítéssel. Hasonló növekedést tapasztaltak módosított B5 táptalajon, 2,3  $\mu\text{M}$  2,4-D és 25,0  $\mu\text{M}$  KIN hormon-kiegészítéssel. A csak 2,4-D-at tartalmazó MS táptalajon tenyésztett kalluszokat átoltva feles töménységű MS-re 8-33 %-os gyakorisággal gyökérorganizációt figyeltek meg 5,37  $\mu\text{M}$  NES kiegészítéssel, vagy 2,4-D nélkül.

Tejklova et al. (1984) kalluszképződést figyeltek meg 7-8 napos csíranövények első csúcslevelének bazális részén, MS táptalajon NES kiegészítéssel. Néhány esetben gyökérorganizációt is tapasztaltak a kalluszokon.

Roupakias (1985) hajtáscsúcsból, epikotilból, gyökérből, sziklevelekből indukált kallusztenyészeteket MS és B5 táptalajokon BAP, NES és KIN kiegészítéssel. A magvak aseptikus csíráztatása során 2,4-D-at használt a tápközegben. Hajtás vagy gyökérfejlődést csak az epikotil eredetű kultúrákban figyeltek meg. A csíráztatás során adagolt 2,4-D kedvezően befolyásolta a tenyészetek organogenezis képességét.

Pan et al. (1985) módosított MS táptalajon levelekből indukált kalluszokat 0,5-2,0 mg/l NES hormon kiegészítéssel. Az indukációs gyakoriság 10,1-79,9 %-ig terjedt. A legnagyobb hormonszintnél hajtáscsúcs differenciálódást figyeltek meg 12,6 %-os gyakorisággal. Későbbi vizsgálatukban (Pan et al., 1988) különböző hormon kombinációkat teszteltek. A KIN-nel kiegészített (1-2 mg/l) fenti tápközegen 100 %-os gyakoriságú kalluszindukációt tapasztaltak. Hajtáscsúcs organizáció szempontjából legoptimálisabbnak az 1 mg/l KIN és 2 mg/l NES kiegészítést találták. A feles töménységű MS-en, azonos hormon koncentrációval 33,33 %-os differenciációs gyakoriságot figyeltek meg. A KIN és NES kombinációval a növény különböző részeiből származó leveleken sikerült kalluszokat indukálni.

A sziklevelől nóduszokból származó tenyészeteket találta legmegfelelőbbnek a kalluszindukációra Zhang et al. (1986). A kultúrák 70 %-a elkalluszosodott 10 mg/l NES és 2,5 mg/l kinetin, vagy 30 mg/l NES és 7,5 mg/l kinetin hatására.

Thynn és Werner (1987) a 'Nabor' és 'TP667' lóbabfajta hipokotil, sziklevelől, epikotil és éretlen ovárium eredetű tenyészeit vizsgálta módosított B5 és SH táptalajokon. A 0,5 mg/l 2,4-D, vagy 0,2 mg/l 2,4-D és 0,5 mg/l  $\text{GA}_3$  kiegészítés eredményezte a legjobban növekedő, laza szerkezetű kallusz szövetet, gyökér vagy hajtás regeneráció nélkül, a tenyésztés 2 hónapja alatt.

Az 'Alameda', 'Pegolete' lóbabfajta és az 'FB' nemesítési vonal 14-16 napos korú növényeinek fiatal leveleit izolálta Fernandez-Romero et al. (1990) különböző hormon

összetételű táptalajokra: (a) 1,0 + 5,0; (b) 1,5 + 0,5; (c) 2,0 + 0,5; (d) 2,0 + 2,5 mg/l NES+BAP, valamint 0,25 mg/l 2,4-D. Az egyes genotípusoktól függően eltérő kalluszindukációs rátát figyeltek meg: a legjobb kalluszprodukciónak mind a primer, mind pedig az átoltásokat követő kultúrákban a magas NES-BAP vagy a magas BAP-NES arány eredményezett.

Tao (1991) csírázó magvak kalluszképzését vizsgálta 1-5 mg/l NES hormon kiegészítés mellett. Az auxin hatása megegyezett a 20 mg/l-es daktinomicinével: intenzív kalluszindukáció mellett a hajtások fejlődése gátolt volt. A két vegyület együttes alkalmazása csupán a kallusz szövet kialakulását idézte elő. Észteráz izoenzimes gélelektroforézissel igazolta a NES transzláció szintű hatását a kalluszindukáció során.

Néhány egyiptomi lóbabfajta sziklevel, embrió, rügyecske és gyököcske eredetű tenyészeteket vizsgálta Reda et al. (1997) MS táptalajon, különböző kombinációjú és koncentrációjú 2,4-D, kinetin és aminosavak adagolásával. Kalluszindukációra legmegfelelőbbnek a 2 mg/l 2,4-D és 0,5 mg/l kinetin együttes alkalmazását találták. Különösen a 'Giza Blanca' és 'Giza 3' fajták sziklevel vagy plumula eredetű tenyészeteinél volt intenzív kalluszfejlődés. A 16 órás megvilágítás kedvezőbbnek bizonyult a teljes sötétben végzett tenyésztésnél, valamint a 200 mg/l-es aminosav kiegészítés fokozta kalluszok növekedését. A fenolvegyületek okozta nekrosis elkerülése miatt célszerűnek tartják 3 hetente átoltani a kultúrákat.

A kalluszsejtek intenzív osztódása együtt jár a tenyészetek, ill. a belőlük regenerált növények genetikailag determinált variabilitásával (szomaklonális variabilitás). A variabilitás eredete ma még nem tisztázott, genetikai okai két fő csoportra oszthatók attól függően, hogy a változás az izolálás előtt a növényben *de novo*, vagy az izolálást követően *in vitro* következik be. A szomaklónok említésekor mindig a tenyészetekből (kallusz, sejtszuspenzió, protoplaszt) regenerált növényekre gondolunk. A kultúrákban hosszú ideig fenntartható a differenciálatlan (dedifferenciált) fázis és a gyakori sejtosztódás miatt a genetikai változások valószínűsége nagy. A felhalmozódó változások következményeként a genetikailag heterogénné vált tenyészetekből a redifferenciálódás indukációjával a sejtszintű variabilitás növény szintre hozható. Az *in vitro* variabilitás okai lehetnek kariotípus változások (kromoszómaszám változások, átrendeződések), molekuláris változások (mozgó genetikai elemek -IS-elemek, transzpozonok-, szomatikus génátrendeződések, génamplifikáció, stb.).

Ami a lóbabot illeti a szomaklonális variabilitás bizonyítottan tekinthető: Papes et al. (1978) a kalluszban előforduló triploiditást Giemsa-festéssel bizonyította.

Röper (1979) szuszpenziós tenyészetében a sejtek 76-81 %-a diploid, 12-21 %-a tetraploid és 2-3 %-a ennél magasabb ploidszintű volt.

Három évig fenntartott kalluszban már különböző poliploid és aneuploid sejteket is talált Jelaska et al. (1981). A magas koncentrációjú kinetin sejtosztódásra gyakorolt kedvező hatását is tapasztalták.

Jha és Roy (1982) hipokotil szegmentekből indukáltak sejt kultúrákat. A kromoszóma számbeli változások mellett kromoszóma szerkezeti átrendeződéseket is megfigyeltek, az egy éven át tartó tenyésztés során.

Frolova (1986) megerősítette ezeket az eredményeket. Hússzor passzált sejt szuszpenzió sejtjeinek mitotikus aktivitását, kromoszómaszámát és DNS tartalmát meghatározva arra a megállapításra jutott, hogy a szuszpenzió végül diploid szintre áll be. Ezt a diploid sejtek rövidebb lag-periódusával magyarázta. Feltételezését 10 éves, 46-szor átoltott kallusz vizsgálatának eredményei is alátámasztották.

Zhang et al. (1986) különböző hormonkombinációkat vizsgáltak a kalluszindukció során. A 10 mg/l NES + 2,5 mg/l kinetin hatására fejlődő kalluszsövetekben 13,8 %-os gyakorisággal haploid sejteket figyeltek meg, melyek kromoszóma aberrációk eredményeként jöttek létre. A változások pozitív korrelációban voltak a mikronukleoluszkok százalékos arányával.

A táptalaj összetevői közül a magnézium-szulfát ( $MgSO_4$ , 400-1200 mg/l) hatását vizsgálta Abraham et al. (1992) hipokotil eredetű, módosított SH tápközegen nevelt kallusz tenyészeteken. A primer kultúrákban főleg diploid sejteket találtak. Az átoltások során növelve a  $MgSO_4$  mennyiségét egyre több mixoploid sejtet, kromoszómatorést, összetapadt kromoszómát figyeltek meg.

A növényregenerálás azonban ezekből a tenyészetekből nem volt lehetséges, így a tenyésztett sejtek szintjén detektált variabilitást növény szinten nem tudták bizonyítani.

A szomaklonális variabilitás egyik kiváltó okaként sokan magát az *in vitro* tenyésztést is megemlítik. Maga a kultúrák indukciója lényegében „mutagén” hatásnak tekinthető, mivel a tenyésztés során megváltozott genetikai állományú sejtek is keletkeznek. A mutációs gyakoriság tovább növelhető a sejtek vagy szövetek besugárzásával vagy a kémiai mutagének használatával. Banerji és Chatterjee (1988) max. 8 kR dózisú gamma sugarakkal kezelt lóbab kallusz tenyészeteket. A szövetek morfológiája, citológiája, növekedése függött a sugárzás dóziséjától: 4 kR-nél nagyobb intenzitás elpusztította a sejteket, melyekben kromoszóma töréseket, diplokromatizációt, a kromoszómák egymáshoz tapadását figyelték meg.

A kallusz és sejttenyészetek felhasználása mutánsok izolálására rendkívül előnyös, mivel a laboratóriumban egy-egy kísérletben sok millió egyedet szelektálhatunk. Egy közepes lombikban akár 30-40 millió sejtet is tesztelhetünk. Ennyi növény szelekciójához a lóbab esetében 100-200 hektárnyi területre lenne szükség. Figyelembe véve egy-egy kutatóintézet kísérleti területét, érzékelhető az a nagyságrendi különbség, melyet a módszer jelent. A szelekció során egy sejt egyenértékűnek tekinthető egy intakt növényvel, miután legalábbis elvileg minden tenyésztett sejtől növény regenerálható (Dudits és Heszky, 2000).

A szövettenyészetek természetesen csak olyan funkcióban érintett mutánsok szelekciójára alkalmasak, amelyek megnyilvánulnak a tenyésztett sejtek szintjén. Jelen pillanatban a táptalajba adagolható vegyületekkel kapcsolatos rezisztencia a gazdaságilag legjelentősebb, mint pl. a sőtűrés, gombatoxinokkal, peszticidekkel, herbicidekkel kapcsolatos rezisztencia, stb., vagy a hidegtűrés, szárazságtűrés. Ma már részben az is bizonyított, hogy az izolált mutáns sejtekből regenerált növények megtartják kedvező tulajdonságaikat, tehát a mutáns jelleg növény szinten is megnyilvánul. További kutatásokat igényel, hogy a gazdaságilag fontosabb bélyegek közvetlen vagy közvetett sejszintű szelekciója is lehetővé váljon.

A lóbabnál a mutáns sejtek szelekciójának lehetősége elvben és gyakorlatban adott, hiszen a kallusz és szuszpenziós kultúrák létesítése megoldott. Thynn et al. (1989) a fitoalexinek és a gombabetegségekkel szembeni rezisztencia kapcsolatát vizsgálta hajtás merisztéma eredetű tenyészetekben. Alacsony auxin koncentrációval (0,01 mg/l) 100 %-os gyakoriságban indukáltak a növényregenerációt. A 2,4-D tartalmú B5 táptalajon indukált tenyészeteket fertőzték különböző kórokozókkal (*Botrytis cinerea*, *Phytophthora megasperma*, *Rhizoctonia solani*). Megállapították, hogy csak az alacsony fitoalexin koncentráció kapcsolódik a regenerált növények rezisztenciájához.

Jäkel et al. (1990) lomblevelekből indukáltak kallusztenyészeteket. A kultúrákban aneuploid sejtek domináltak. A különböző herbicidekre (Propham, Probanil) szelektált toleráns sejt vonalakban már főleg diploid sejteket találtak. Végeredményül azonban sem egy új, használható sejt vonalat, sem pedig egy stabil, herbicid toleráns tenyészetet sem sikerült szelektálni.

A lóbab sejttenyészetek vonatkozásában előrelépés csak akkor várható, ha a kalluszból, illetve a sejszuszenzióból bármikor, bármilyen alapanyagból lehetséges lesz növényt regenerálni.

#### 2.2.4.2 Protoplasztkultúrák

A növényi sejtek tényleges genetikai manipulációja során néhány esetben szükséges a sejtfal eltávolítása. A poliszacharid sejtfal cellulózából, hemicellulózából és pektinából álló enzimkeverékkel -megfelelő ozmotikus stabilizáció mellett- sikerrel lebontható a sejttenyészetekben. A kezelést követően kapott sejtfal nélküli növényi sejtek a protoplasztok. Protoplasztokat izolálhatunk szomatikus és haploid sejtekből, a növények különböző szöveteiből, illetve sejttenyészetekből. A frissen izolált protoplasztok alkalmasak a genetikai manipulációra, majd táptalajon a falregenerálódást követően tovább tenyészthetők és a sejttenyészetekhez hasonlóan növények nevelhetők fel.

A protoplasztok  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében végzett polietilén-glikol (PEG) kezelés hatására összetapadnak és a membránfúziót követően a protoplasztok teljes egybeolvadása következik be. A protoplasztfúzió megteremti a feltételét annak, hogy különböző fajok sejtmagjai egyetlen sejtbe kerüljenek (heterokarionok). A sejtmagok szinkron mitózis esetén összeolvadhatnak, amely szinkarionok kialakulását eredményezi. A növényi szinkarionok, vagyis mindkét szülői faj kromoszómáit hordozó hibrid sejtvonalak száma kevés. A szomatikus hibrid sejtek további osztódása során - az esetek többségében - az egyik szülő kromoszómáinak fokozatos eliminálódása következik be. A fajon belüli és fajok közötti szomatikus hibridek genetikai sajátosságuk révén kedvező lehetőséget kínálnak a növény nemesítési problémák megoldására. Az egyik faj (fúziós partner) kromoszómáinak részleges eliminációja teszi lehetővé az ún. aszimmetrikus hibridizációt, mely már csak bizonyos gének átvitelét eredményezi és ezért nemesítési szempontból sokkal értékesebb.

A lóbab protoplasztizolálás és -tenyésztés feltételeit Binding és Nehls dolgozták ki (1978a). A hajtáscsúcsból és különböző korú levelekből izolált protoplasztokat KM (Kao és Michayluk, 1975) táptalajon tenyésztették. Amennyiben a táptalaj a szervesen sókat Binding (V-47) által megadott koncentrációban tartalmazta, a protoplasztok osztódását sikerült fenntartani és kalluszt indukálni, melyeket már MS táptalajon tenyésztettek tovább.

Az izolálást követően Binding és Nehls (1978b) sikerrel fuzionáltatta a lóbab protoplasztokat *Petunia hybrida* L. protoplasztokkal,  $\text{Ca}^{2+}$ , magas pH-érték és PEG jelenlétében. Számos hibrid sejtet kaptak, melyekben a *Vicia faba* L. kromoszómák zömmel eliminálódtak. A hibrid kallusz sejtjei ezért csak 1-2 lóbab kromoszómát tartalmaztak. Növényt nem sikerült regenerálni.



Sejtszuspenzióból izolált protoplasztokat Röper (1981) és KM táptalajon, melyekből 0,5 mg/l IES, 0,2 mg/l 2,4-D, valamint 0,5 mg/l BAP hormon kiegészítéssel kalluszokat indukált. A növényregeneráció azonban itt is sikertelen volt.

Különböző enzimkeverékek és táptalaj összetevők hatását vizsgálta Hagege és Hagege (1985), a minél nagyobb számú mezofill protoplaszt izolálása céljából. A legjobb táptalaj 0,5 M mannitolt,  $10^{-7}$  M BAP-t, 0,25 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és pektinázt tartalmazott. Ha mannitol helyett szorbitolt használtak, akkor csökkent a protoplasztok integritása. A legtöbb protoplasztot (13400 db/mg friss tömeg) az 5,8-as pH-értékű táptalajon érték el, melyet 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ -tal és 0,1 M citromsavval puffereltek. A  $\text{CaCl}_2$  csökkentette a pektináz aktivitását, míg a 0,25 mM-mál nagyobb  $\text{MgCl}_2$  koncentráció protoplaszt lízist váltott ki.

Herscovich et al. (1992) sztóma zárósejtekből és levél mezofillumból származó protoplasztok túlélését vizsgálta 40 napos tenyésztés során, 0,45 M mannitollal és 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -dal kiegészített minimál táptalajon. A 8 órás megvilágítás 50 %-os túlélési rátát eredményezett, szemben a sötétben nevelt tenyészetek 5 %-os gyakoriságával. A 12 napos kísérletben a zárósejt protoplasztok 80 %-a életképes maradt mind a 8 órás vörös fényel történt megvilágítás, mind pedig a sötétben tenyésztést követően. A mezofill protoplasztoknál 45 %, ill. 25 % volt a túlélési ráta az előző körülményeken. A tápközeg magnézium, foszfor, kalcium vagy kálium tartalmának növelése nem fokozta a tenyészetek vitalitását. A  $10^{-8}$  M IES és 0,6 % szacharóz hozzáadásával elértek néhány morfológiai változást (pl. sejtfalképződés), ez azonban nem vezetett sejtosztódáshoz, ill. növényregenerációhoz.

A lóbab protoplasztokból történt első növényregenerációról Wei és Xu (1993) számoltak be. A 'Shen Zao' fajta fiatal magjaiból izoláltak szikleveél eredetű protoplasztokat, a megporzást követő 20-25. napon. A tenyészeteket K8 táptalajon (0,2 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l NES + 0,5 mg/l BAP) nevelték sötétben, 25 °C-on. A 6 hetes inkubáció során fejlődött kis méretű kalluszokat proliferációs tápközegre oltották át, majd erről 2-3 mm-es szöveteket MSB-re szubkulturálták, amely 0,2 mg/l NES-at és 0,5 mg/l BAP-t tartalmazott. A 25 %-os gyakorisággal kapott, intenzíven osztódó kalluszokat ezután MSB differenciációs táptalajra oltották át. 15-20 nap elteltével, 12 órás megvilágítás mellett, 25 °C-on adventív rügyek fejlődtek. A rügyekből fejlődő 3-4 cm-es hajtásokat feles töménységű MS táptalajon, 0,5 mg/l IVS kiegészítéssel gyökereztettek 2 hét alatt. Végeredményként 36 db protoplaszt eredetű regeneráns növényt kaptak.

Tegeder et al. (1995) mezofill protoplasztokból regeneráltak fertilis növényeket. A fitohormonok közül legjobb hatást az önmagában, vagy NES-val kombináltan alkalmazott

TDZ eredményezett. Az általuk kidolgozott módszer egyes genotípusokra történő adaptációja révén adott a lehetőség a növény – sejt – növény rendszer gyakorlati felhasználására a lóbabnál.

A protoplasztokból történt növényregenerációt követően a figyelem a gazdasági hasznot hozó szomatikus hibrid kombinációk felé fordult a lóbab esetében is. A sztóma zárósejtek C4-es fotoszintetikus típusúak, ezért a fotorespiráció kisebb intenzitású bennük, mint a többi, C3-as széndioxid fixálású szomatikus sejtben. Schnabl et al. (1998) a napraforgó fotoszintetikus tulajdonságát kívánta fokozni a hipokotil eredetű protoplasztok lóbab zárósejt protoplasztjainak fúzójával. Az egyedileg kiemelt sejteket párban fuzionálták elektromos árammal, 30-70 %-os sikerrel. A szomatikus hibrideket folyékony tápközegben tenyésztették, 9 nap elteltével 8-9 sejtés mikrokolóniákat kaptak.

A lóbab protoplaszt technika eddigi eredményeiből látható, hogy a növényregeneráció erősen függ a genotípustól, valamint az alkalmazott protoplaszt izolációs technikától, majd az ezt követő tenyésztési feltételektől. Amennyiben a Tegeder et al. (1995) által kidolgozott módszer bármilyen vizsgálati körülményen és genetikai háttéren megfelelő eredményeket ad, akkor adott a lehetőség a további szomatikus hibridizációs kutatásokhoz.

#### 2.2.4.3 Növény regeneráció szomatikus tenyészetekből

A növényi sejt- és szövettenyészetekből történő növény regeneráció a tenyésztett sejtek redifferenciációja indukálásával érhető el. Oelck és Shieder (1983) 7 pillangós növényfaj 19 fajtája kalluszából történő növény regenerációját vizsgálta. A vizsgált 4 lóbabfajta nem mutatott náluk regenerációs potenciált. A nagymagvú pillangós növények, így a lóbab, *in vitro* szövettenyészetből való regenerációját, Hammatt et al. (1986) szerint három fő tényező befolyásolja, ezek:

- a genotípus (faj, fajta, nemesítési vonal, törzs),
- a donor növény fejlettsége és fiziológiai állapota,
- a táptalaj fitohormon és redukált nitrogénforrás tartalma.

A differenciálatlan sejtekből az egyedfejlődés *in vitro* két úton lehetséges: organogenezis és szomatikus embriogenezis révén. Ez utóbbi mindig egyetlen sejtől indul ki, morfológiailag alig tér el a zigotikus embriogenezistől, az embriófejlődéshez azonban nincs szükség csíranugalmi állapotra. Griga et al. (1987) kallusz és szuszpenziós tenyészetekből indukált szomatikus embriókat. Zöldérésben levő növények 4-8 mm-es szikleveleit izolálták L2-es (Phillips és Collins, 1979) táptalajon, 1 % szacharóz, 0,7 % agar és különböző koncentrációjú 2,4-D kiegészítéssel. Az embriogén kalluszindukcióra

legoptimálisabbnak a 2,5  $\mu\text{M}$  auxin kiegészítés bizonyult. A kalluszt megemelt szacharóz tartalmú (2,5 %) és 2,4-D-mentes táptalajra passzálva fejlődtek a szomatikus embriók. Folyékony tápközegre átválva a kultúrákat folyamatosan kaptak embriókat a kalluszokból. Megfigyelték az embriófejlődés különböző stádiumait (gömb, szív és torpedó alak).

A táptalajösszetevők közül az adenin (1 mg/l), valamint az IES és BAP hatását vizsgálta gyököcske eredetű, zöld színű, noduláris kalluszokon Chakraborty és Roy (1983). Az adenin fokozta a hajtások regenerációját, melyeket feles töménységű MS táptalajon sikerrel gyökereztettek.

Thynn és Werner (1987) különböző explantátumok kallusz indukcióját és az azt követő növény regenerációs képességét vizsgálta. A magas 2,4-D koncentráció gátolta a gyökerek regenerációját, a vizsgált összes auxin és BAP kombináció pedig a hajtások fejlődését. A kinetin fokozta a gyökerek differenciálódását és megnyúlását. Az epikotil explantátumokat B5 táptalajon (0,2 mg/l NES) tenyésztve kapták a legjobb hajtás és gyökér regenerációt.

Griga (1988) öt, egymástól jelentősen eltérő tannintartalmú lóbabfajta oldal- ill. csúcsrügy merisztémáit tenyésztette módosított MS tápközegen, különböző kombinációjú és koncentrációjú BAP és NES adagolása mellett. Megállapította az explantátum típusának és méretének, a genotípusnak, valamint a táptalaj összetevőknek szignifikáns hatását a hajtás proliferációra és megnyúlásra, gyökérképzésre és *in vitro* virágzásra. Mind az 5 fajtánál sikeres volt kalluszindukció, majd az ezt követő növényregeneráció, azonban az alacsony tannintartalmú (fehérvirágú) '6823' és '6806' genotípusok adták a legjobb *in vitro* reakciót.

A poliploid és aneuploid sejtek organogén potenciálját vizsgálta Taha és Francis (1990) embrió és gyökér eredetű tenyészetekben. A gyökér eredetű kalluszokon csak gyökér, míg az embrió eredetűeken a gyökér mellett hajtás is képződött. Vizsgálatuk eredményeként megállapították: sem a ploiditás, sem a kromoszómaszám változás nem befolyásolja az organogén potenciált. Az organogenezis indukciója szorosabban kapcsolódik a tenyésztési körülményekhez, mint a sejtciklus speciális változásaihoz.

Griga és Klenoticova (1994) kallusz tenyészeteket indukált a '6806' és '6823' lóbab nemesítési vonalak fejletlen zigotikus embrióiból és fiatal csíranövények hajtáscsúcsaiból. Az indukciós táptalaj 2,4-D-at (4,5  $\mu\text{M}$ -os optimális koncentráció) és NES-at tartalmazott. A tenyészeteket folyamatosan átváltották különböző összetételű regenerációs tápközegre. Szomatikus embriók és hajtáscsúcs primordium jelentek meg az indukciós, auxint tartalmazó, valamint a citokinines regenerációs tápközegeken. A tenyészetek hosszú időn át

megtartották regenerációs képességüket. A fejletlen zigotikus embrióból származó tenyészeteknél a legjobb hajtásnövekedést a 0,1  $\mu$ M NES-at és 5  $\mu$ M zeatint tartalmazó MSB táptalajon kapták. A gyökerek fejlődését hormonmentes MSB-n indukálták, végeredményként számos virágzó növényt nyertek.

A növény regenerációt befolyásoló külső, fizikai kezelések néhány növényfaj esetében fokozzák az *in vitro* regenerációt. Hammad (1996) gamma sugárzással kezelte a 'Planka', 'Giza 461' és 'Giza 2' fajták magjait. Ezt követően a csíranövények sziklevelét nóduszát izolálta feles töménységű MS táptalajra. Multiplikálódott hajtások fejlődtek az epikotilsziklelevel régió találkozási pontján. A fajták eltérően reagáltak a különböző dózisu sugárzásokra, ami a csírázási százalékban, a növény magasságában, friss és száraz tömegben mutatkozott. Végeredményben a gamma sugarak jelentősen nem növelték az organogenezis mértéket.

Saker et al. (1999) embriogén kalluszt indukáltak a 'Giza 3' egyiptomi lóbabfajta fejletlen szikleveleiből. Intenzíven osztódó, nagyfokú regenerációs kapacitással bíró tenyészeteket a 2 mg/l 2,4-D-at és 1,5 mg/l BAP-t tartalmazó MS tápközegen kaptak. A regenerált hajtások további multiplikációját érték el a 0,6 mg/l BAP + 0,2 mg/l NES + 50 mg/l adenin-szulfát hatására. A gyökérfejlődést 2 mg/l IVS-val indukálták. A regenerált növények SDS-PAGE és RAPD analízise nem mutatta a szomaklonális variabilitást. A szerzők megfelelőnek tartják a kidolgozott regenerációs módszert a fajta azonosságot biztosító szaporítás céljára.

#### 2.2.5 Transzgenikus növények létrehozása genetikai transzformációval

A sikeres genetikai transzformáció növényi rendszerben a molekuláris-, sejt- és klasszikus genetikai módszerek együttes alkalmazását igényli. A molekuláris transzformáció végül is sejtszinten történik, mert a sejt a növénynek az a legkisebb része, melyből még intakt növény regenerálható. Ezért lényeges a növény – sejt – növény rendszer, amely még nincs egyértelműen kidolgozva a lóbabra.

A géntechnológia főbb lépéseinek helyzetét lóbabnál (a lucernával összehasonlítva) a 2. táblázatban mutatom be.

2. táblázat

A géntechnológia főbb lépéseinek helyzete lóbabnál és lucernánál

<b>Technika</b>	<i>Vicia faba</i> L.	<i>Medicago sativa</i> L.
I. Génklónozás, klóntár	++	++
II. Transzformáció		
- <i>Agrobacterium</i>		
Ti-plazmid	+	++
Ri-plazmid	+	++
- Mikroinjektálás	-	+
III. Transzgenikus növény	+	++

(++ = kidolgozott; + = már van sikeres eredmény; - = próbálkozás nincs)

A lucernába 1986-ban sikerült a tojás ovalbumin fehérjéjének, illetve a kanamicin rezisztenciáért felelős enzimnek a génjét átvinni. A lóbab legumin és vicillin génjeit még 1980-ban izolálta Müntz et al. a következő módon. A két fehérje kódját tartalmazó mRNS-t izolálták, melyek már nem tartalmaztak intronokat. Ezekről reverz transzkripcióval szintetizálták a kópia DNS-t (cDNS). A cDNS-t bakteriális plazmidba (pBR322) építették be és bakteriális rendszerben klónozták. A klóntárból -az ismert cDNS-t izotóppal jelölve és próbaként használva- DNS-hibridizációval izolálták a géneket.

A legumin B-típusú gént azóta sikeresen átvitték a dohányba, ahol az expresszióját is megfigyelték (Bäumlein et al., 1987). Az első sikeres lóbabtranszformációt *Agrobacterium rhizogenes*-szel végezte Schiemann és Eisenreich (1989). Csíranövényeket fertőztek a mikrobával, a transzformáció eredményességének igazolására  $\beta$ -glükuronidáz (GUS) marker gént használtak. A transzformáció során kapott hajszálgökerekből kallusz tenyészeteket indukáltak, melyekben fluorometrikusan lehetett kimutatni a GUS aktivitást.

Ramsay és Kumar (1990) szikleveleket és szárszegmenteket transzformáltak *A.rhizogenes*-el. A transzgenikus gyökerklónokat hormonautotrófia és az NPTII gén expressziója alapján azonosították. A baktérium infekció szövet és genotípus függőséget mutatott. A transzgenikus gyökerek citológiai elemzése során megfigyelték a ploidszint változását és a kromoszómák szerkezeti átrendeződését.

Három, morfológiailag és származását tekintve eltérő lóbabfajta *Agrobacterium* fogékonyságát vizsgálta Jelenic et al. (2000). Csíranövények szárszegmenseit fertőzték a *A.tumefaciens* vad típusú (A281, B6S3), transzkonjugáns (C58C1(pArA4abc),

C58C1(pArA4b)), a B6S3 gyökér- és hajtásképző mutáns (GV3101(pGV2255), GV3101(pGV2215), GV3101(pGV2235)), valamint az *A.rhizogenes* vad típusú (8196, 15834) törzseivel. Minden vizsgált törzs tumorképzést indukált, megfigyelték a fajták fogékonyasága közötti eltéréseket, valamint a genotípus  $\times$  baktériumtörzs interakciót. A 'Lippói' fajtánál legvirulensebbnek a C58C1(pArA4b), míg a kevésbé fogékony 'Topolo' és 'Oslje' fajtáknál az A281 és B6S3 törzset találták. A keletkezett tumorok méretéből és morfológiai eltéréseiből arra a következtetésre jutottak, hogy az átvitt T-DNS gének eltérően expresszálódnak, ami a fajták eltéréseiből adódik. A tumor kalluszok hormonmentes MS táptalajon fejlődtek és fokozott peroxidáz aktivitást mutattak. A sziklevelek, levelek, internódiumok *Ri*-plazmiddal történt transzformációja sikertelen volt.

A speciális, csak lóbabnál alkalmazható génátviteli módszerek kidolgozása során célszerű gondolni a más nagymagvú pillangósoknál már bevált technikák adaptációjára. Mante et al. (1989) egy egyszerű, adventív hajtásregeneráción alapuló módszert dolgozott ki szójára, érett sziklevelekből kiindulva. A módszert alkalmasnak találták a transzformációs vizsgálatokra. MS táptalajon a legtöbb hajtást 0-2,5  $\mu$ M IVS és 5-10  $\mu$ M BAP kiegészítéssel kapták, míg 2,5  $\mu$ M IVS-val csak gyökerek fejlődtek. A hajtásokat feles töménységű MS-en 0,5  $\mu$ M NES, vagy 2,5-5  $\mu$ M IVS, vagy 5-10  $\mu$ M IES hormon kiegészítéssel gyökerezettették. Azóta a módszer felhasználásával már beszámoltak transzgenikus szójanövények előállításáról (Hinchee et al., 1988), amikor glifozát rezisztenciát sikerült átvinni *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével. Saalbach et al. (1995) *Vicia narbonensis* protoplasztokat transzformáltak kénben gazdag 2S albumin génnel. A regenerált, transzgenikus növények magjainak metionin tartalma jelentősen megemelkedett. A bab (*Phaseolus vulgaris* L.) direkt génátviteli módszerét már szintén kidolgozták (Aragao et al., 1996), a csúcsmerisztémák génbelövésével. Mivel a bab merisztémák morfológiai felépítése nagyon hasonló a lóbabéhoz, ezért a módszer adaptálása sikerre számíthat.

### **2.3 Molekuláris markerek a lóbabnemesítésben**

A PCR-reakció (Polymerase Chain Reaction) módszerének kidolgozás óta (Mullis és Faloona, 1987) a PCR-alapú analízisek számos területen bizonyították alkalmazhatóságukat, így az RAPD, A-PCR, AP-PCR, DAF módszerekben (Caetano-Anolles et al., 1991; Hu és Quiros, 1991), származás és populáció analízisben (Van Heusden és Bachman, 1992), valamint a genetikai térképezésben (Reiter et al., 1992).

A PCR reakció alapja, hogy a DNS-polimeráz (pl. *Taq*-polimeráz) képes az új komplementer DNS szál megszintetizálására *in vitro*. Ehhez szükség van egy start-molekulára, az oligonukleotid primerre, amely a DNS meghatározott részéhez tud kötődni, jelölve ezzel a polimerizáció kezdőpontját, valamint optimális Mg-koncentrációra. A reakció komponensek így a DNS-templát, DNS-polimeráz, dezoxinukleotidok, mint építőelemek, az oligonukleotid primer, a megfelelő pufferrendszer, valamint maga a ciklikus hűtő-fűtő PCR-készülék. A templát DNS kettős szálának szétválasztása, majd az új szálak előállításuk ciklusosan történik. Egy cikluson belül három, különböző hőmérsékleten zajló lépés követi egymást. Az első lépés a denaturáció, amikor 90-94 °C-on a DNS egyszálúvá válik. A második lépésben (annealing) az oligonukleotid primer, szekvenciától függően, kb. 50 °C-on hibridizál az egyfonalas DNS megfelelő, komplementer szakaszával, kialakítva ezzel a harmadik lépés, a polimerizáció startjelét, amely a primer 3'-végétől indulva, 70 °C-on megy végbe. Minden egyes ciklusban megduplázódik a startmolekulákkal szegélyezett templát-fragmensek mennyisége, melyek egyben a következő ciklus kiinduló anyagát is jelentik (Minol, 1996).

Az első ciklusban eltérő hosszúságú DNS molekulák képződnek, amelyek 5'-végükön a felhasznált primer által határoltak, a 3'-végükön pedig különbözőképpen alakulnak, mert a DNS-templát mentén folyó polimerizáció bármelyik ponton megszakadhat. Mivel a kiindulásakor felhasznált DNS-templát koncentrációja nem változik, ezért ezeknek a meghatározott 5'- és meghatározatlan 3'-végű DNS molekuláknak a mennyisége a ciklusok számának növekedésével legfeljebb lineárisan növekedhet. A második reakció ciklusban az első ciklus termékei is a DNS-polimeráz templátjaiként szolgálnak, tehát ebben a ciklusban már a várt DNS molekulák képződhetnek, amelyek mindkét vége a felhasznált primerek által határolt, azaz a hosszúságuk meghatározott. Az optimális DNS-hossz: 100-2000 bp (Williams et al., 1990).

Ezeknek a specifikus DNS-szakaszoknak a száma az első reakciótermék mennyiséggel ellentétben, a ciklusok számával exponenciálisan növekszik, mivel a koncentrációjuk minden egyes ciklusban megduplázódik. Ez az exponenciális amplifikáció azonban nem tart bármilyen hosszú ideig. A 20-25. ciklus után a csökkenő teljesítmény következtében már csak lineáris növekedés figyelhető meg. Ezt a plató-hatást a termék koncentrációban lehet nyomon követni, mivel a PCR-reakció kezdetén kb. 1000000-szoros primerfőlösleg áll rendelkezésre. A primer templáttal való hibridizációja ennek köszönhetően 1 percen belül csaknem teljes mértékben végbemehet, a komplementer DNS-molekulák re-asszociációja viszont így gyakorlatilag nem lép fel. A gyarapodó termék mennyiséggel

ellentétben a primer koncentráció a későbbi ciklusok során annyira lecsökken, hogy lehetővé válik a felszaporított templátok renaturációja és megszűnik a polimeráz szubsztrátként betöltött szerepe. A reakció teljesítménye tehát az első ciklusokban a legnagyobb, amikor a templát koncentráció még alacsony (Mester, 1998). Egy másik fontos tényező amely a ciklusszám növekedésével egyre nagyobb jelentőséget kap, a DNS-polimeráz csökkenő aktivitása, amely miatt a későbbi ciklusokban már nem elegendő az összes templát felszaporítására (Williams et al., 1990).

A magas hőmérséklet miatt csak speciális, eredetileg a *Thermus aquaticus* baktériumból előállított, hőstabil DNS-polimerázokkal oldható meg a folyamatos láncreakció. Ezek felfedezése (Chien et al., 1976) egyszerűbbé, olcsóbbá, és tökéletesebbé tették a PCR reakció hatékonyságát. A folyamat ma már automata vezérlésű berendezésekben zajlik, ahol a hőmérséklet, a reakció időtartalma és a ciklusszám programozható. A reakció során a primer feladata, hogy a DNS-templáthoz kapcsolódjon és kijelölje a szintézis kezdőpontját. A primerek ma már könnyen beszerezhetők (pl az OPERON cég RAPD primerei), illetve szintetizálhatók. A mikroszatellita primerek speciális az 5'- illetve 3'- végén meghosszabbított ISSR primerek (Zietkiewicz et al., 1994). Ezeknek az ISSR primereknek az alkalmazásával a polimorfizmus kimutathatósági határa tovább növelhető (Gyulai et al. 1996).

A PCR fragmentumok szeparációja gélelektroforézissel történik, amely során az oldatban lévő elektromos töltésű részecskék (DNS molekula darabok) elektromos térerősség hatására a velük ellentétes töltésű elektród irányába vándorolnak. A nukleinsavak semleges pH mellett anionként viselkednek, mert a foszfátgerincük sok negatív töltést hordoz, így elektromos térben a molekulák a pozitív töltésű elektódák irányába vándorolnak. (Sambrook et al., 1989). A gélelektroforézis eredményeként az azonos jelzőkkel rendelkező DNS szakaszok egységes frakciókba (sávok, band-ek) rendeződnek, amelyek egymás alatti sávokban mutathatók ki, etídium-bromidos festéssel.

Ahhoz, hogy a 2.2 pontban említett direkt és indirekt géntranszfer módszerek hozzájáruljanak a lóbab nemesítés biotechnológiai módszerekkel történő javításához, szükség van a *V. faba* genomjának minél részletesebb molekuláris megismerésére. A genetikai térképezésre, gének izolálására számos módszer adott ennél a fajnál: rendelkezésre áll a triszómok gyűjteménye (Barcelo és Martin, 1990), a kromoszómák áramlásos citometriája, *in situ* hibridizációja (Fuchs et al., 1994) szintén kidolgozott. Ezeken túlmenően, a legumin gén molekuláris felépítésének megismerése (Pich és Schubert, 1993), valamint a genetikai



diverzitás, azonosság és genetikai kapcsolttság molekuláris markerezése RFLP és PCR technikával (Torres et al., 1993, Link et al., 1995) szintén rendelkezésre állnak.

## **2.4 A lóbabnemesítés és a növényi biotechnológia, géntechnológia kapcsolata**

A növényi biotechnológia és géntechnológia alkalmazásának legnagyobb gazdasági haszonnal kecsegtető területe a növénynemesítés. Ennek oka, hogy a genetikai manipuláció eredményei elsősorban a nemesítésen keresztül tudnak realizálódni a termelésben (Dudits és Heszky, 2000). A következőkben a klasszikus nemesítés főbb lépéseit sorba véve ismertetjük a növénynemesítés és a növényi biotechnológia, géntechnológia kapcsolatrendszerét a lóbabnál (Heszky et al., 1988).

### I. Nemesítési alapanyag előállítása

A jelenleg alkalmazott nemesítési eljárások közül a hibridizációt (ivaros keresztezés), mutációt (besugárzás, kémiai kezelés) és a kórokozó-mentesítést (hőkezelés) említtem meg. A lóbabnemesítés során a felsoroltak hatékonyságát fokozó új biotechnológiai módszer lehet: a hibridizáció során a génátvitel, embriókultúra, protoplasztfúzió, *in vitro* termékenyítés; a mutáció során a pollenkultúra, sejt kultúra; a kórokozó-mentesítésnél pedig a merisztéma kultúra. Amint az előző fejezetekből látható, a felsoroltak közül eddig csak a géntechnológiai módszereket, protoplasztfúziót, sejt kultúrát és merisztéma kultúrát, mint módszert tesztelték, a gyakorlati alkalmazásra a nehéz reprodukálhatóság miatt nem került sor.

### II. Szelekció

A hagyományos nemesítés során a különböző tömeg- és egyed-szelekciókat, valamint a homozigóták (beltenyésztés) előállítását alkalmazzák. Minőségileg új eredményeket hozhat e téren a sejt- és szövettényészetekben elvégzett sejtszintű szelekció, a szomaklonális variabilitás jelenségének kihasználása révén. A homozigóták előállítása során az andro- és ginogenetikus haploidok jelenthetnek újat (portok, pollen, ovárium és ovulumkultúrák). A lóbabnál igazolt a szomaklonális variabilitás az *in vitro* tenyészetekben, azonban a módszert itt is csak tesztelték, gyakorlati alkalmazásra nem került sor.

### III. Felszaporítás

Hagyományosan a különböző vegetatív és generatív szaporítási eljárásokat alkalmazzák. A hatékonyságot fokozó új biotechnológiai módszerek közül a merisztéma és

hajtástenyésztés jelentős. Minőségileg új eredményeket hozhat a szintetikus magvak előállítására, azaz a sejt- és szövettenyészetekben szomatikus embriógenesis révén fejlődő embriók elkülönítése egymástól, majd kapszulázás után lehetővé válik a normál magként történő felhasználás. A lóbabnemesítés során mind a merisztéma, mind a hajtás eredetű kultúrák felhasználhatók, jóllehet a kidolgozott módszerek megbízhatósága még nem kielégítő.

#### IV. Fenntartás, megőrzés

Jelenleg a génbanki tárolás leggyakrabban használt módja a mag formában történő tárolás. A növényi biotechnológia itt is új lehetőségeket adhat, mégpedig a hajtástenyészetek, valamint a tenyésztett sejtek mélyfagyasztásával kialakított *in vitro* génbankok formájában. A módszer gyakorlati jelentőségét bizonyítja, hogy 1984-ben felállították az *in vitro* megőrzés számítógépes nemzetközi adatbankját. Lóbabnál az előző pontban már említett hajtáskultúrák alkalmazhatók, erre már történtek vizsgálatok, biztató eredményekkel.

Összefoglalva megállapíthatjuk, *Vicia faba* L. esetében a gyakorlatban alkalmazható, hagyományos nemesítési eljárások hatékonyságát fokozó biotechnológiai módszerek megbízható alkalmazása még nem megoldott. Elsősorban a növény – sejt – növény rendszer kialakítására kell koncentrálni szomatikus (2n) sejtek (kallusz, sejtszuszpenzió) szintjén. Amennyiben a kutatások sikeresek, azonnal megindulhat az alkalmazása a mutánsizolálás (rezisztencia) és a szomaklonális variabilitás kiaknázására. Az előzőekben kívül kiemelt figyelmet kell fordítani az embriókultúra felhasználására rokon fajokkal történő keresztezésekben, valamint az *in vitro* androgenesis útján történő haploid előállításra. A széles körű és eredményes nemesítési alkalmazásra csak az előzőekben említett problémák megoldását követően lesz nagyobb arányú lehetőség.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1 Merisztématenyésztés

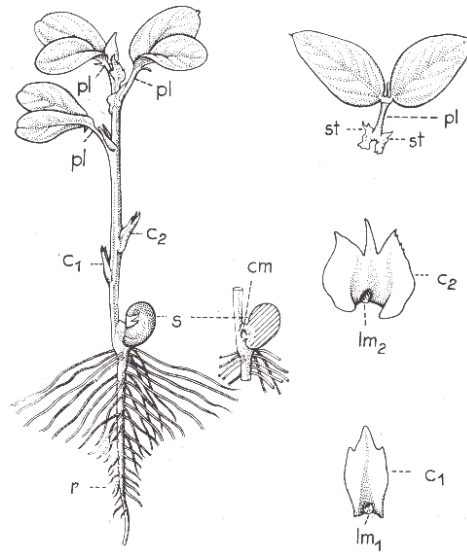
A pillangós növények szövettanyészetekből való regenerációját Hammatt et al. (1986) szerint három fő tényező befolyásolja, ezek: a genotípus, a donor növény fiziológiai állapota, a táptalaj fitohormon és redukált nitrogénforrás tartalma. Ennek megfelelően merisztéma tenyésztési kísérletünk előtt a következő genotípusokat teszteltük: 'Minor', 'Vica', 'Erna', 'Alfred', 'Óvári-137', 'Dino', 'KU-22', 'Lippói', 'Karola', 'VF1 809682', 'Jasny II', melyek ennél és az összes többi kísérletnél is a Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar (NyME MÉK), Nemesítési és Termesztéstechnológiai Állomásáról származtak. A hajtáscsúcs merisztémákat *in vitro* nevelt csíranövényekből izoláltuk. Érett magvakat sterilizáltunk 3-4 %-os NaOCl-ban 20 perces áztatással. A háromszori steril desztillált vizes öblítést követően a magokat 24 órán át áztattuk szintén steril desztillált vízben. A csíráztatás előtt meghámoztuk a magvakat a maghéjban felhalmozódott fenolvegyületek kiküszöbölése céljából (Busse-Eisenreich, 1986). Csíráztatásra Knop-oldatot (Knop, 1885) használtunk, 1 % agarral (Reanal) kiegészítve. A növényeket 5-6 napig, 16 órás megvilágítással, 125  $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$  fényintenzitáson,  $24\pm 1$  °C-on neveltük, 500 ml -es, szűkszájú Erlenmeyer-lombikokban.

Táptalajként B5-t (Gamborg et al., 1968) használtunk 0,5  $\mu\text{M}/1$  BAP (Sigma Co.), 2 % szacharóz (Reanal) és 0,8 % agar (Reanal) kiegészítéssel. A pH-értéket autoklávozás előtt 5,8-ra állítottuk be, sterilizés 121 °C-on, 100 kPa nyomáson, 15 percig történt.

A hajtáscsúcsból kipreparált 1-1,5 mm-es merisztémákat 28×90 mm-es üvegampullákban levő 8 ml-nyi táptalaj felszínére tettük, majd 16 órás megvilágítással, 125  $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$  fényintenzitáson,  $24\pm 1$  °C-on inkubáltuk.

A tenyészetek minőségi változásainak értékelése 8 hetenként történt, a hajtás- és kallusz növekedés bonitálásával és friss tömeg méréssel.

A következő kísérletünkben az *in vitro* tenyésztésre, legalkalmasabb genotípussal ('Lippói') teszteltük a különböző hormonösszetételű táptalajokat. A fentiekben leírtaknak megfelelően aseptikusan nevelt 5-6 napos csíranövényekből, eltérő helyekről izoláltunk merisztémákat: hajtáscsúcs, allevél, sziklelevél (2. ábra).



2. ábra: Lóbab csíranövény (Busse-Eisenreich, 1986)  
 (jelölések: r - gyökér; s - mag; c1, c2 - 1. és 2. allevél; pl - primér lomblevél;  
 st - pálhlevél; cm - sziklelevél merisztéma; lm1, lm2 - allevél merisztéma)

Tápközeg: MS (Murashige és Skoog, 1962) alaptáptalaj, citokininnel (BAP; Sigma Co.) és auxinokkal (IES, NES, 2, 4-D; Sigma Co.), 3 % szacharózzal (Reanal) és 0,8 % agarral (Reanal) kiegészítve. Minden egyes hormont 0 – 0,1 – 1,0 – 10 mg/l-es töménységben használtunk. Az auxinokat az összes lehetséges módon kombináltuk a BAP-nal, így 46-féle tápközeget vizsgáltunk. A sterilizést szintén a fentieknek megfelelően végeztük.

A hajtáscsúcsból kipreparált 1-1,5 mm-es merisztémákat 28×90 mm-es üveg-ampullákban levő 8 ml-nyi táptalaj felszínére tettük, majd 16 óras megvilágítással, 125  $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$  fényintenzitáson,  $24\pm 1$  °C-on inkubáltuk.

A tenyészeteket 8 hetenként értékeltük. Mértük a friss tömeget, a kezelésenkénti hajtásszámot, bonitáltuk a kultúrák fejlettségét és megállapítottuk az optimális citokinin-auxin kombinációt.

Mivel az érett sziklelevél eredetű kultúráknál járulékos merisztémákból történt a hajtás-organizáció, ezért ezt is itt említjük meg. Vizsgálatunkban a 'Lippói' fajtát használtuk. A magokat a már leírtak szerint sterilizáltuk, majd 24 órán át steril desztillált vízben áztattuk. A maghéj eltávolítása után óvatosan elkülönítettük egymástól a két sziklevelet, majd levágtuk

róluk az embrió. Az explantátumokat 25×90 mm-es üvegampullákban levő 8 ml táptalaj felszínére tettük.

Az alkalmazott táptalaj B5 (Gamborg et al., 1968) alap volt, 2 % szacharóz (Reanal), 0,8 % agar (Reanal) és különböző koncentrációjú BAP (Sigma Co.), valamint IVS (Sigma Co.) kiegészítéssel (3. táblázat). A tápközeget 121 °C-on, 100 kPa nyomáson 10 percig sterilizáltuk, előtte a pH-értéket 5,8-ra kalibráltuk.

A tenyészeteket -fejlődéstől függően- 6-8 hétig inkubáltuk, 24±1 °C-on, 16 órás megvilágítással, 125 μM/m<sup>2</sup>/s fényintenzitáson. Kísérletünkben értékeltük a kultúrák hajtás-, gyökér- és kalluszfejlődését, a kezelésenkénti hajtásokat, gyökereket, bonitáltuk fejlettségüket, mértük friss tömegüket.

Mindhárom kísérletben a regenerált hajtásokat hormonmentes alaptáptalajon (MS, B5) gyökerezettük, 370 és 500 ml -es csavaros tetejű (konzerv) üvegekben. Gyökereztetés után a növénykéket Knop-oldattal átitatott perlitben edzettük a talajba kiültetés előtt, 3-4 hétig, 20-22 °C-on, 16 órás megvilágítással, 125 μM/m<sup>2</sup>/s fényintenzitáson. A vizsgálatok eredményeként kapott adatok matematikai-statisztikai értékelését mindegyik esetben Sváb (1981) alapján végeztük el.

3. táblázat

A sziklevél eredetű tenyészeteknél használt hormonok

Táptalaj jele	BAP (mg/l)	IVS (mg/l)
SZ0	0	0
SZ1	0,5	0
SZ2	1,0	0
SZ3	1,5	0
SZ4	0	0,5
SZ5	0,5	0,5
SZ6	1,0	0,5
SZ7	1,5	0,5
SZ8	0	1,0
SZ9	0,5	1,0
SZ10	1,0	1,0
SZ11	1,5	1,0
SZ12	0	1,5
SZ13	0,5	1,5
SZ14	1,0	1,5
SZ15	1,5	1,5

### 3.2 Hajtástenyésztés

Kísérletünkben három fajtát használtunk ('Lippói', 'Kornberger', 'Óvári-137'). Aszeptikusan nevelt (3.1 pont) 5-6 napos csíranövények szárát elvágtuk a második nódusz alatt, amikor a harmadik internódium láthatóvá vált. A hajtáscsúcsot, valamint a kétnóduszos szárát külön-külön gyökereztető tápközegre tettük.

A táptalaj módosított MS volt (MS makro-, Heller mikroelemek; Heller, 1953), 0,186 mg/l (1  $\mu$ M) NES (Sigma Co.), 10 g/l aktív szén (Reanal), 3 % szacharóz (Reanal) és 0,8 % agar (Reanal) kiegészítéssel. Vizsgáltuk még az MS alaptáptalajt is a fenti kiegészítőkkel. A tápközeg 25×90 mm-es üvegampullákba (8 ml/ampulla) és 100 ml -es bőszejű Erlenmeyer-lombikokba (25 ml/lombik) adagoltuk. A sterilizést 121 °C-on, 100 kPa nyomáson az ampulláknál 15, a lombikoknál 20 percig végeztük. A pH-értéket sterilizés előtt 5,8-ra állítottuk be.

A szervtenyészeteket 16 órás megvilágítással, 125  $\mu$ M/m<sup>2</sup>/s fényintenzitáson, 24±1 °C-on 7-8 hétig inkubáltuk, a gyökérfejlődés intenzitásától függően. A tenyésztési idő elteltével értékeltük a gyökérorganizáció gyakoriságát.

### 3.3 Kallusztenyésztés

Vizsgálatainkban különböző izolátumokat és táptalajokat teszteltünk. Elsőként a már ismertetett módon sterilizett, hámozott magokat csíráztattuk *in vitro* négyféle táptalajon, melyek MS makro- és mikroelemeket (Murashige és Skoog, 1962); az előbbit és 3 mg/l 2,4-D-at (Sigma Co.); Knop-oldatot; valamint sterilizett csapvizet tartalmaztak, 1 % agarral (Reanal) kiegészítve. A hormonmentes tápközegeken 5-6, az auxint tartalmazón 12-14 nap elteltével vált lehetővé a mezokotil szegmentek, valamint hajtáscsúcs merisztémák izolálása.

Az explantátumokat MS (Murashige és Skoog, 1962) és B5 (Gamborg et al., 1968) alap-táptalajokra tettük, amelyek 0,2 mg/l BAP-t (Sigma Co.) és 1,0 mg/l 2,4-D-at (Sigma Co.) tartalmaztak, 10 g/l aktív szénnel (Reanal) és 0,8 % agarral (Reanal) kiegészítve. A kész tápközegekből 8-8 ml-t adagoltunk egy-egy 25×90 mm-es üvegampullába, majd 121 °C-on, 100 kPa nyomáson 15 percig steriliztük, előtte a pH-értéket 5,8-ra kalibráltuk.

A 4 hétig tartó tenyésztés során (24±1 °C-on, 16 órás megvilágítással, 125  $\mu$ M/m<sup>2</sup>/s fényintenzitáson) folyamatosan értékeltük a tenyészetek minőségi változásait.

A következő kísérletben üvegházban nevelt 'Lippói', és 'Kornberger' fajták 4-7 mm-es éretlen zöld magvaiból izolált embriókból indukáltuk a kultúrákat. A zöld hüvelyeket

sterileztük: először 30 mp-ig 70 %-s etanolban, majd 10 percig 2 %-os NaCl-ban. A háromszori steril desztillált vizes öblítés után preparáltuk ki az embriókat.

Táptalajként MS (Murashige és Skoog, 1962) alaptáptalajt használtunk, 3 % szacharóz (Reanal) és 0,8 % agar (Reanal) kiegészítéssel. A növekedés szabályozók közül BAP-t és IES-at (Sigma Co.) használtunk, 0 – 0,5 – 1,0 – 2,5 – 2,0 mg/l koncentrációkban. A két hormon összes lehetséges kombinációját felállítva 25-féle tápközeget teszteltünk. A pH-értéket autoklávozás előtt 5,8-ra állítottuk be, sterilizés 121 °C-on, 100 kPa nyomáson, 15 percig történt.

Az embriókat sötétben, 24±1 °C-on, 6 hétig inkubáltuk, 25×90 mm-es üveg ampullákban levő 8 ml-nyi táptalaj felszínén. A tenyésztési idő elteltével mértük a kultúrák friss tömegét, értékeltük minőségi változásait.

Harmadik kísérletünkben a polivinil-pirrolidon (PVP) (Fluka Polyvinylpyrrolidon K 30), hatását vizsgáltuk lóbab szövettenyészetekre. *In vitro* nevelt csíranövények hajtáscsúcs-, allelél- és sziklelél merisztémáiból, valamint epi-, mezo- és hipokotil régióiból indukáltuk a tenyészeteket.

MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajt használtunk 3 % szacharóz (Reanal), 0,8 % agar (Reanal), 0,175 mg/l IES (Sigma Co.) és 2,25 mg/l BAP (Sigma Co.) kiegészítéssel. Az adagolt PVP mennyiségét a 4. táblázat mutatja. A tenyészeteket 28×90 mm-es üvegampullákban, 8 ml-nyi táptalaj felszínén inkubáltuk. A tápközeg pH-ját sterilizés előtt 5,8-ra kalibráltuk, autoklávozás 121 °C-on, 100 kPa nyomáson, 15 percig történt.

A 16 órás megvilágítással, 125 µM/m<sup>2</sup>/s fényintenzitáson, 24±1 °C-on való 8 hetes tenyésztés után mértük a friss tömeget, értékeltük a tenyészetek hajtás és kallusz produkcióját. Az adatok matematikai-statisztikai értékelését Sváb (1981) alapján végeztük, hasonlóan az előző kísérletekhez.

4. táblázat

A PVP mennyisége a táptalajokban

Táptalaj jele	PVP (mg/l)
MS0	0
MS1	10
MS2	100
MS3	500
MS4	1000
MS5	2000

### 3.4 Mikroszatellita és RAPD markerek azonosítása

Növényi anyag: öt lóbabfajta ('Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', 'Vica') és egy nemesítési vonal ('Fehérvirágú') genomikus DNS izolálása során a friss, fiatal levelek (kb. 1 g) présnedvét (Leaf Squeezer) 800 µl 0,2 %-os 2-merkaptotanol tartalmú kivonó pufferbe vettük fel. A kivonó puffer összetétele (1000 ml-ben): 6,05 g Tris (pH = 8), 9,316 g EDTA, 0,189 g O-fenatrolin, 58,0 g NaCl, 10 g CTAB (pH = 8), 2% merkaptotanol. (A molekuláris biológiai vizsgálatok során használt vegyszerek a Sigma Co.-tól származtak, kivéve azokat, amelyeknél külön megemlítem a forrást.)

DNS extrakció: az 1 g növényi anyaghoz 700 µl DNS extraháló puffert alkalmaztunk. A DNS precipitátumok (TE pufferben) RN-áz kezelését, és az OD260 UV spektrofotometriás koncentráció meghatározását követően 4 µl DNS mennyiséget alkalmaztunk PCR reakciónként.

PCR reakció: a reakcióelegy az alábbi komponenseket tartalmazta mintánként 25 µl végtérfogatban:

- (1) 15,625 µM dNTP keverék (dATP : dGTP : dCTP : dTTP = 1:1:1:1),
- (2) 0,05 µM MgCl<sub>2</sub>,
- (3) 0,3 µl (1,5 U) Taq-polimeráz (Promega Co.),
- (4) 20 pM primer,
- (5) 4 µl (20 nM) minta-DNS.

Oligonukleotid primerek: az ismétlődő DNS szekvenciákban előforduló genetikai polimorfizmusok felismerésére az alábbi, 16-18 bp hosszúságú primereket (SZBK, Szeged, Bottka S. szintetizálta): (GACA)<sub>4</sub>, CA(GACA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>CA, (ACTG)<sub>4</sub>, míg a random polimorfizmusok elemzésére a 10 bp hosszúságú OP/A-11, OP/B-1, OP/B-3, OP/B-5, OP/B-7, OP/B-11 és OP/B-12 (OPERON Sci.) primereket alkalmaztuk.

PCR reakció: a Coy TempCycler II Multicycler (model 1100) PCR készülékben az alábbi lépéseket alkalmaztuk: (1) 94 °C-os előciklus, a primer és a minta DNS denaturálására, 4 percig; (2) 94 °C, 20 másodpercig, a DNS denaturálására; (3) 40 °C, 20 másodpercig, primer bekapcsolódására; (4) 72 °C, 1,5 percig, a DNS lánc szintézisre; (5) 72 °C, 5 percig, a végső DNS szintézis tökéletes befejezéséhez, illetve (6) az ezt követő automatikus 4 °C-ra történő lehűtéssel. A 2-4 ciklust 40-szeres ismétléssel alkalmaztuk.

Gélelektroforézis: a PCR-ezett mintákat agaróz-gélelektroforézissel szeparáltuk, 1,6 %-os agaróz (Serva Co.), 80 V feszültség, 2 órás futtatási idő, 1×TAE puffer, valamint molekulatömeg-marker (350-1484 bázispár) alkalmazásával.



Képfeldolgozás: a mintákat addig futtattuk amíg a színmarker (brómfenolkék) a kívánt távolságot el nem érte. A gélbe kevert etidium-bromid interkalálódott a DNS bázisok közé és UV megvilágítás hatására narancsszínű fluoreszcenciát adott. A gélelektroforézis eredményeiről Polaroid felvételeket készítettünk, melyek képi utófeldolgozását Microsoft-Ansel programmal végeztük. A gélek kiértékelésénél csak a vizuálisan jól elkülönülő, karakteresen megjelenő DNS sávokat vettük figyelembe.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A genotípus hatása a hajtáscsúcs *in vitro* fejlődésére

Különböző genotípusokat teszteltünk a hajtásindukció, illetve ebből kifolyólag az *in vitro* tenyésztésre való alkalmasság tekintetében. A 8 hetes tenyésztési idő elteltével megszámláltuk a hajtásokat, mértük a kultúrák friss tömegét, értékeltük a hajtás- és kalluszindukció gyakoriságát, valamint a tenyészetek fejlettségét. Az átlagértékeket és gyakorisági százalékokat az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat

A genotípus hatása hajtásmerisztéma tenyészetek fejlődésére

Fajta	Hajtás (db)	Friss tömeg (mg)	Hajtás-képzés gyakorisága (%)	Hajtás-fejlettség	Kallusz-képzés gyakorisága (%)	Kallusz-fejlettség
MINOR	1,7±1,4	253,2	92,8	+	50,0	+
VICA	1,8±1,0	142,1	100,0	+	15,8	+
ERNA	1,4±0,9	128,2	94,7	+	23,7	+
ÓVÁRI-137	1,5±1,0	161,4	97,7	++	47,7	+
ALFRED	1,4±0,9	204,8	100,0	+++	9,1	+
DINO	1,5±0,9	133,6	100,0	++	59,0	+
KU-22	1,0±0,3	145,0	95,6	+	63,0	+
LIPPÓI	2,0±0,9	288,5	100,0	+++	52,5	+
KAROLA	1,1±0,5	253,7	96,3	++	44,4	+
VF1 809682	1,2±0,5	246,4	100,0	++	45,5	+
JASNY II.	1,1±0,6	278,0	95,0	++	50,0	+

(- = nincs elváltozás; + = gyengén; ++ = közepesen; +++ = jól fejlett tenyészet)

A legtöbb hajtást a 'Lippói' fajtánál kaptuk (2,0±0,9 db), legkevesebbet a 'KU-22' (1,0±0,3 db) genotípusnál. A hajtásfejlődés gyakoriságát tekintve nem találtunk lényeges eltéréseket az egyes fajták között (92,8-100 %). A hajtásfejlettséget vizsgálva csak a 'Lippói'-nál és 'Alfred'-nél kaptunk jól fejlett tenyészeteket (+++), gyenge hajtások differenciálódtak a 'Minor', 'Vica', 'Erna' és 'KU-22' genotípusoknál (+). A friss tömegeket értékelve szintén a 'Lippói' fajta volt a legjobb (288,5 mg), míg a 'Dino'-nál mértük a legkisebb (133,6 mg) tömeget: A kalluszosodás gyakorisága a 'KU-22'-nél volt a

legnagyobb (63,0 %), legkevesebb az 'Alfred'-nál (9,1 %). A kalluszok fejlettségét minden genotípusnál azonosnak találtuk (+). Mivel kísérletünk célja elsődlegesen a hajtásindukció volt, ezért a táptalajhoz csak citokinint (BAP) adagoltunk, ami a kalluszfejlődés alacsony intenzitását eredményezte. Ugyanígy a gyökérindukciót sem tartottuk vizsgálati szempontnak, de meg kell említenem, hogy az 'Alfred' fajtánál 16,0 %-os gyakorisággal átlag 8,8 db, jól fejlett (+++) gyökeret kaptunk.

## **4.2 A 6-benzil-amino-purin (BAP) és auxinok hatása a különböző eredetű merisztémák fejlődésére**

### *4.2.1 A BAP hatása a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D) jelenlétében*

A 8 hetes tenyésztési idő elteltével mértük a kultúrák friss tömegét, a kezelésenkénti hajtásszámot, értékeltük a hajtások fejlettségét (1-től 5-ig terjedő skálán). A kapott adatokat háromtényezős, véletlen blokkelrendezésű kísérletek variancia-analízisével értékeltük (Sváb 1981). A matematikai-statisztikai elemzés variancia- és eredménytáblázatát a 6-8. táblázatok foglalják össze.

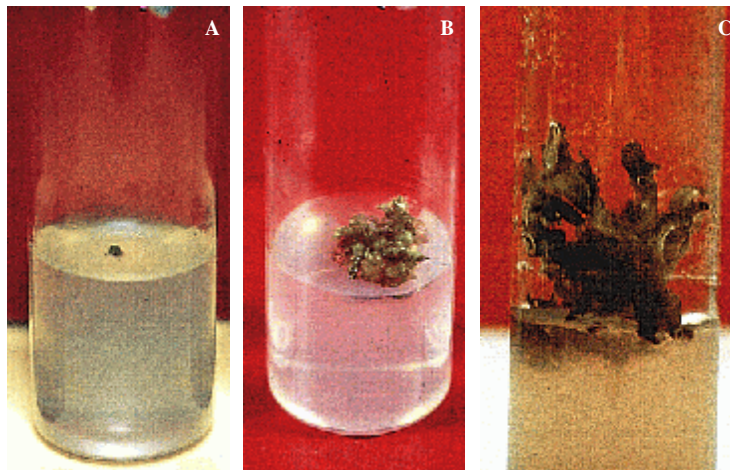
A *friss tömegeket* értékelve legnagyobb átlagtömeget az allevél merisztéma eredetű, 1 mg/l BAP-nal kiegészített táptalajon (424,3 mg), míg a legkisebbet a hormonmentes tápközegen mértük (1,8 mg). A varianciatáblázatból látható, hogy a kombinációk között  $P = 0,1$  %-os valószínűségi szinten (\*\*\*) szignifikáns különbséget találtunk, bármely két kombináció között az  $SZD_{5\%} = 44,6$  mg. A BAP kezelések között a 2,4-D átlagában az  $SZD_{5\%} = 22,3$  mg. A két hormonkezelés közti eltérés szintén  $P = 0,1$  %-os szinten szignifikáns (\*\*\*)

A *hajtásszámot* értékelve az allevél eredetű merisztémáknál kaptuk a legtöbbet (4,1 db), 0,1 mg/l BAP-nal kiegészített táptalajon. A hormonmentes, valamint csak 2,4-D-at tartalmazó tápközegen nem tapasztaltunk hajtás multiplikációt. A friss tömeg adatokhoz hasonlóan az egyes kombinációk, valamint a két hormon között  $P = 0,1$  %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések, az általános  $SZD_{5\%} = 0,51$  db-al, míg a BAP kezelések között a 2,4-D átlagában az  $SZD_{5\%} = 0,26$  db-bal.

A *hajtásfejlettség* adataiból kitűnik a regenerált hajtások gyenge fejlettsége, csupán az 1,0 mg/l BAP-t tartalmazó tápközegeken figyeltünk meg a többihez képest fejlettebb hajtásokat (3,0 érték). Jóllehet a kezeléseket tekintve itt is  $P = 0,1$  %-os szinten szignifikáns

az eltérés, de a két hormon hatását tekintve erre a paraméterre már nem tapasztalható különbség. Bármely kombinációt tekintve az  $SZD_{5\%} = 1,2$ -vel.

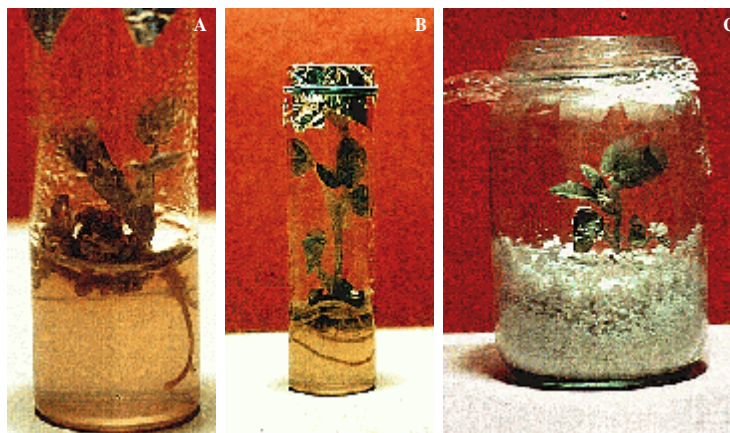
Az eredménytáblázatokban szereplő átlagadatok alapján mindhárom -hajtáscsúcs, allevél és sziklevel- merisztémát figyelembe véve az 1,0 mg/l-es BAP kiegészítés volt a leghatásosabb a 2,4-D függvényében.



3. ábra: Merisztémák fejlődése a BAP és auxin kombinációk hatására.

a) frissen izolált allevél merisztéma

b) - c) hajtásmultiplikáció a BAP - IES hormon kiegészítésű MS táptalajon



4. ábra: Növényregeneráció hajtáscsúcs merisztéma tenyészetekben.

a) - b) gyökérfejlődés hormonmentes MS táptalajon,

c) regenerált növény edzetése Knop-oldatos perlitben.

## 6. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek friss tömegére 2,4-D függvényében

6/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	1233958	143		
Kezelés	1160805	47	24697	***
Eredet (A)	688	2	344	NS
BAP (B)	268330	3	89443	***
2,4-D (C)	217072	3	72357	***
A × B	3615	6	602	NS
A × C	10893	6	1815	*
B × C	645523	9	71724	***
A × B × C	14681	18	815	NS
Hiba	73152	96	762	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

6/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

<b>Hajtáscsúcs</b>						
2,4 D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	2,2	33,6	322,6	42,5	100,2	
0,1	3,2	64,8	72,7	61,4	50,5	
1	25,5	31,9	43,7	17,8	29,7	
10	6,6	55,5	8,9	24,3	23,8	
Átlag	9,4	46,5	112,0	36,5		
<b>Allelevél</b>						
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,8	44,9	424,3	68,3	134,8	
0,1	3,4	59,1	54,6	43,1	40,0	
1	31,5	18,2	30,6	17,8	24,5	
10	5,9	46,1	11,5	29,1	23,2	
Átlag	10,7	42,1	130,3	39,6		
<b>Sziklevél</b>						
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	2,1	43,4	419,7	44,1	127,3	
0,1	5,3	40,1	50,2	28,9	31,3	
1	27,0	16,9	53,5	17,4	28,7	
10	7,7	94,0	13,9	28,0	35,9	
Átlag	10,5	48,8	134,3	29,6		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 11,2 mg A1B1-A1B2: 22,3 mg

B1-B2: 12,9 mg A1C1-A1C2: 22,3 mg

C1-C2: 12,9 mg B1C1-B1C2: 25,8 mg

Általános: 44,6 mg

7. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek hajtásfejlődésére 2,4-D függvényében

7/A: varianciatáblázat (paraméter: *hajtásszám*, db)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	88,05	143		
Kezelés	78,34	47	1,67	***
Eredet (A)	0,07	2	0,04	NS
BAP (B)	20,59	3	6,86	***
2,4-D (C)	16,66	3	5,55	***
A × B	0,31	6	0,05	NS
A × C	0,22	6	0,04	NS
B × C	40,11	9	4,46	***
A × B × C	0,38	18	0,02	NS
Hiba	9,71	96	0,1	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

7/B: eredménytáblázat (paraméter: *hajtásszám*, db)

<i>Hajtáscsúcs</i>						
2,4 D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	3,8	2,3	1,8	2,2	
0,1	1,0	1,1	1,6	1,8	1,4	
1	1,0	1,3	1,9	2,1	1,6	
10	1,0	1,1	1,4	1,9	1,4	
Átlag	1,0	1,8	1,8	1,9		
<i>Allelevél</i>						
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	4,2	1,9	1,7	2,2	
0,1	1,0	1,4	1,6	2,0	1,5	
1	1,0	1,5	2,0	2,1	1,7	
10	1,0	1,1	1,3	1,9	1,3	
Átlag	1,0	2,0	1,7	1,9		
<i>Sziklevél</i>						
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	1,0	4,0	2,0	1,7	2,2	
0,1	1,0	1,3	1,7	2,0	1,5	
1	1,0	1,2	2,0	1,9	1,6	
10	1,0	1,1	1,2	1,8	1,3	
Átlag	1,0	1,9	1,7	1,9		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 0,13 db

A1B1-A1B2: 0,26 db

B1-B2: 0,15 db

A1C1-A1C2: 0,26 db

C1-C2: 0,15 db

B1C1-B1C2: 0,30 db

Általános: 0,51 db

## 8. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek fejlettségére 2,4-D függvényében

8/A: varianciatáblázat (paraméter: *hajtasbonítás*, 1-5)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	117,30	143		
Kezelés	63,30	47	1,34	***
Eredet (A)	0,51	2	0,25	NS
BAP (B)	38,69	3	12,89	***
2,4-D (C)	11,80	3	3,93	***
A × B	1,93	6	0,32	NS
A × C	1,15	6	0,19	NS
B × C	7,47	9	0,83	NS
A × B × C	1,73	18	0,09	NS
Hiba	53,99	96	0,56	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

8/B: eredménytáblázat (paraméter: *hajtasbonítás*, 1-5)

<i>Hajtáscsúcs</i>						
2,4 D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	2,3	3,0	2,6	2,2	
0,1	1,0	1,3	1,6	2,3	1,5	
1	1,0	1,3	2,3	2,6	1,8	
10	1,0	1,0	1,3	2,0	1,3	
Átlag	1,0	1,5	2,0	2,4		
<i>Allelevél</i>						
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	2,6	3,0	2,6	2,3	
0,1	1,0	1,6	2,0	2,3	1,7	
1	1,0	1,6	2,6	1,6	1,7	
10	1,0	1,3	1,6	1,6	1,4	
Átlag	1,0	1,8	2,3	2,0		
<i>Sziklevél</i>						
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	1,0	2,6	2,6	2,3	2,1	
0,1	1,0	2,0	2,3	2,6	2,0	
1	1,0	1,6	2,3	2,3	1,8	
10	1,0	1,3	1,6	2,3	1,5	
Átlag	1,0	1,9	2,2	2,4		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 0,30

A1B1-A1B2: 0,60

B1-B2: 0,35

A1C1-A1C2: 0,60

Általános: 1,20

C1-C2: 0,35

B1C1-B1C2: 0,70

#### 4.2.2 A BAP hatása az *a*-naftilecetsav (NES) jelenlétében

A kísérlet értékelése megegyezik a 4.3.1 pontban leírtakkal. A biometriai elemzés variancia- és eredmény-táblázatát a 9-11. táblázatok foglalják össze.

A *friss tömegeket* értékelve legnagyobb átlagtömeget a 0,1 mg/l BAP-t és 1,0 mg/l NES-at tartalmazó tápközegen, allevél eredetű merisztémáknál mértük (631,7 mg). A legkisebb tömegeket ennél a kísérletnél is a hormonmentes táptalajon kaptuk (1,0 mg). A varianciatáblázatból látható, mind a kombinációk, mind pedig a BAP kezelések között a NES átlagában  $P = 0,1$  %-os valószínűségi szinten szignifikáns a különbség. Az  $SZD_{5\%} = 108,2$  mg bármely két kombináció között, míg a BAP kezelések között a NES átlagában az  $SZD_{5\%} = 54,1$  mg.

A *hajtásszámot* értékelve az allevél eredetű merisztémáknál kaptuk a legtöbbet (4,5 db), 0,1 mg/l BAP-t tartalmazó táptalajon. Az előző paraméterhez hasonlóan az egyes kombinációk, valamint a hormonok között  $P = 0,1$  %-os szinten szignifikánsak az eltérések, az általános  $SZD_{5\%} = 0,56$  db-bal, a BAP kezelések között a NES átlagában pedig az  $SZD_{5\%} = 0,28$  db-bal. Az auxint is tartalmazó tápközegen hajtás multiplikációt a 0,1 és 1,0 mg/l NES-val kiegészített táptalajoknál figyeltünk meg nagyobb gyakorisággal.

A *hajtásfejlettség* adataiból látható a regenerált hajtások közepes fejlettsége, ami azonban jobb az előző hormonkombinációnál megfigyelteknél. A legfejlettebb hajtásokat a sziklevél és allevél merisztéma eredetű tenyészeteknél kaptuk a 0,1 mg/l BAP-t, valamint az 1,0 mg/l BAP-t és 1,0 mg/l NES-t, illetve 10 mg/l BAP-t és 0,1 mg/l NES-t tartalmazó táptalajokon (3,3 érték). A kezeléseket tekintve itt is  $P = 0,1$  %-os valószínűségi szinten szignifikáns az eltérés, de a két hormon között már csak  $P = 10$  %-os szinten. Az  $SZD_{5\%} = 1,2$ -vel bármely két kombináció között. Mindhárom merisztémánál az 1,0 mg/l-es BAP kiegészítés volt a legjobb a NES függvényében.



## 9. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek friss tömegére a NES függvényében

9/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	3907511	143		
Kezelés	3477674	47	73993	***
Eredet (A)	36126	2	18063	*
BAP (B)	1309745	3	436581	***
NES (C)	684665	3	228221	***
A × B	239179	6	39863	***
A × C	137429	6	22904	***
B × C	804613	9	89401	***
A × B × C	265913	18	14772	***
Hiba	429836	96	4477	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

9/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

<b>Hajtáscsúcs</b>					
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag
	0	0,1	1	10	
0	1,8	47,2	106,8	44,8	125,5
0,1	2,6	46,8	249,5	77,4	94,1
1	18,0	253,9	466,7	286,9	256,4
10	34,4	243,8	438,3	93,4	202,5
Átlag	14,2	147,9	390,3	125,7	
<b>Allelevél</b>					
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag
	0	0,1	1	10	
0	1,0	61,3	378,3	47,0	121,9
0,1	1,2	77,8	105,6	102,1	71,8
1	40,4	631,7	333,4	266,9	318,1
10	34,6	113,0	79,3	95,1	80,5
Átlag	19,3	220,9	224,2	127,9	
<b>Sziklevél</b>					
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag
	0	0,1	1,0	10	
0	1,1	60,4	454,2	37,1	138,2
0,1	2,2	111,1	100,5	72,3	71,5
1	24,8	472,2	402	169,9	217,2
10	31,1	141,7	99,2	112,2	96,2
Átlag	14,8	196,4	214	97,9	

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 27,0 mg A1B1-A1B2: 54,1 mg

B1-B2: 31,3 mg A1C1-A1C2: 54,1 mg

C1-C2: 31,3 mg B1C1-B1C2: 62,5 mg

Általános: 108,2 mg

10. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek hajtásfejlődésére a NES függvényében

10/A: varianciatáblázat (paraméter: *hajtásszám*, db)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	96,66	143		
Kezelés	85,12	47	1,81	***
Eredet (A)	0,44	2	0,22	NS
BAP (B)	34,83	3	11,61	***
NES (C)	11,3	3	3,66	***
A × B	3,14	6	0,52	***
A × C	2,28	6	0,38	**
B × C	26,89	9	2,99	***
A × B × C	6,25	18	0,35	***
Hiba	11,54	96	0,12	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

10/B: eredménytáblázat (paraméter: *hajtásszám*, db)

<i>Hajtáscsúcs</i>						
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	4,3	2,7	2,0	2,5	
0,1	1,0	1,8	2,7	2,3	1,9	
1	1,9	2,4	2,3	2,3	2,2	
10	1,2	1,8	2,3	1,8	1,8	
Átlag	1,3	2,6	2,5	2,1		
<i>Allevél</i>						
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	4,5	3,7	2,1	2,8	
0,1	1,0	3,2	2,3	2,7	2,3	
1	1,4	1,9	2,5	2,4	2,0	
10	1,3	1,5	1,8	2,1	1,7	
Átlag	1,2	2,8	2,6	2,3		
<i>Sziklevél</i>						
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	1,0	3,2	2,7	2,3	2,3	
0,1	1,6	2,2	2,0	2,6	2,1	
1	1,9	1,8	2,4	2,5	2,2	
10	1,3	1,6	2,1	2,2	1,8	
Átlag	1,5	2,2	2,3	2,4		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 0,14 db

A1B1-A1B2: 0,28 db

B1-B2: 0,16 db

A1C1-A1C2: 0,28 db

C1-C2: 0,16 db

B1C1-B1C2: 0,32 db

Általános: 0,56 db

## 11. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek fejlettségére a NES függvényében

11/A: varianciatáblázat (paraméter: *hajtásbonítás*, 1-5)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	117,5	143		
Kezelés	65,15	47	1,38	***
Eredet (A)	3,18	2	1,59	+
BAP (B)	40,68	3	13,56	***
NES (C)	1,74	3	0,58	NS
A × B	2,37	6	0,39	NS
A × C	0,81	6	0,13	NS
B × C	9,61	9	1,06	+
A × B × C	6,73	18	0,37	NS
Hiba	51,99	96	0,54	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

11/B: eredménytáblázat (paraméter: *hajtásbonítás*, 1-5)

<i>Hajtáscsúcs</i>						
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	3,0	2,3	2,3	2,1	
0,1	1,3	2,0	2,3	1,6	1,8	
1	1,3	2,0	2,6	2,3	2,0	
10	1,3	2,0	2,3	2,0	1,9	
Átlag	1,2	2,2	2,4	2,0		
<i>Allelevél</i>						
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	3,3	2,0	2,6	2,2	
0,1	1,0	1,6	2,6	3,0	2,0	
1	1,6	2,6	3,3	2,3	2,5	
10	1,6	1,6	2,6	2,6	2,1	
Átlag	1,3	2,3	2,6	2,6		
<i>Sziklevél</i>						
NES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	1,0	2,6	2,6	2,6	2,2	
0,1	1,3	2,0	2,3	3,3	2,2	
1	1,6	2,0	3,3	3,0	2,5	
10	1,3	2,6	3,0	2,6	2,4	
Átlag	1,3	2,3	2,8	2,9		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 0,29

A1B1-A1B2: 0,59

B1-B2: 0,34

A1C1-A1C2: 0,59

Általános: 1,18

C1-C2: 0,34

B1C1-B1C2: 0,68

#### 4.2.3 A BAP hatása az indol-3-ecetsav (IES) jelenlétében

Az előző két kísérlethez hasonlóan a 8 hetes tenyésztési idő elteltével mértük a kultúrák friss tömegét, a kezelésenkénti hajtásszámot, 1-5 skálán értékeltük a hajtások fejlettségét. Az adatokat háromtényezős, véletlen blokk elrendezésű kísérletek variancia-analízisével értékeltük. A variancia- és eredménytáblázatokat a 12-14. táblázatok foglalják össze.

A legnagyobb *friss tömeget* a sziklevel merisztéma eredetű tenyészeteknél, 1,0 mg/l BAP-nal és 1,0 mg/l IES-val kiegészített táptalajon mértük (784,8 mg). A legkisebb tömegeket ebben az esetben is a hormonmentes tápközegeken kaptuk (0,7 mg). Az egyes kombinációk, valamint a BAP kezelések között az IES átlagában  $P = 0,1$  %-os valószínűségi szinten szignifikáns a különbség. Az  $SZD_{5\%} = 85,5$  mg bármely két kombináció között, míg a BAP kezelések között az IES átlagában  $SZD_{5\%} = 42,8$  mg.

A legtöbb *hajtást* az 1,0 mg/l BAP-t és 10 mg/l IES-at tartalmazó táptalajon, hajtáscsúcs eredetű merisztémáknál kaptuk (6;5 db) (3. ábra). A csak kis mennyiségű (0,1 mg/l) auxinnal kiegészített tápközegen nem tapasztaltunk hajtás multiplikációt. Az előző paraméterhez hasonlóan az egyes kombinációk, valamint a hormonok között  $P = 0,1$  %-os szinten szignifikánsak az eltérések, az általános  $SZD_{5\%} = 1,09$  db, a BAP kezelések között az IES átlagában pedig az  $SZD_{5\%} = 0,54$  db.

A *hajtásfejlettség* adatait értékelve megállapíthatjuk, hogy ebben a kísérletben is közepesen fejlett hajtásokat kaptunk. A legfejlettebb hajtásokat mindhárom merisztémánál az 1,0 mg/l BAP-nal és különböző koncentrációjú IES-val kiegészített táptalajokon figyeltük meg (1,6-3,3 érték). A hajtáscsúcs merisztémáknál már a 0,1 mg/l BAP is hatásosnak bizonyult, az auxinokkal kombinálva (2,6-3,3 érték). Az egyes kombinációk között  $P = 0,1$  %-os, a két növekedés szabályozó között  $P = 5$  %-os szinten szignifikáns a különbség. Az  $SZD_{5\%} = 1,2$ -vel bármely két kombináció között.

Az eredménytáblázatok átlagadataiból látható, hogy mindhárom merisztémát együttesen értékelve az 1,0 mg/l-es BAP kiegészítés volt a leghatásosabb az IES függvényében.

## 12. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek friss tömegére az IES függvényében

12/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	4772318	143		
Kezelés	4503594	47	95821	***
Eredet (A)	65441	2	32720	***
BAP (B)	1661967	3	553989	***
IES (C)	422949	3	140983	***
A × B	86246	6	14374	***
A × C	284434	6	47405	***
B × C	1118848	9	124316	***
A × B × C	863705	18	47983	***
Hiba	268724	96	2799	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

12/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

<b>Hajtáscsúcs</b>					
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag
	0	0,1	1	10	
0	1,7	30,2	682,8	87,6	200,6
0,1	2,9	201,2	90,9	262,3	139,3
1	20,0	121,2	315,0	461,2	229,5
10	24,7	81,9	340,7	163,5	152,7
Átlag	12,3	108,8	357,4	243,7	
<b>Allelevél</b>					
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag
	0	0,1	1	10	
0	0,8	33,6	426,6	97,0	139,5
0,1	1,6	193,6	179,2	186,1	140,1
1	32,4	69,4	70,1	461,3	158,3
10	19,7	55,0	202,2	97,7	93,6
Átlag	13,6	87,9	219,5	210,5	
<b>Sziklevél</b>					
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag
	0	0,1	1,0	10	
0	0,7	30,3	243,1	82,4	89,1
0,1	1,6	155,2	121,8	119,2	99,5
1	19,9	68,6	784,8	445,9	329,8
10	16,4	36,2	36,6	48,5	34,4
Átlag	9,6	72,6	296,6	174	

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 21,4 mg A1B1-A1B2: 42,8 mg

B1-B2: 24,7 mg A1C1-A1C2: 42,8 mg

C1-C2: 24,7 mg B1C1-B1C2: 49,4 mg

Általános: 85,5 mg

## 13. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek hajtásfejlődésére az IES függvényében

13/A: varianciatáblázat (paraméter: *hajtásszám*, db)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	263,61	143		
Kezelés	219,92	47	4,67	***
Eredet (A)	12,48	2	6,24	***
BAP (B)	93,56	3	27,85	***
IES (C)	7,34	3	2,44	**
A × B	13,61	6	2,26	***
A × C	16,84	6	2,8	***
B × C	60,38	9	6,7	***
A × B × C	25,67	18	1,42	***
Hiba	43,68	96	0,45	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

13/B: eredménytáblázat (paraméter: *hajtásszám*, db)

<i>Hajtáscsúcs</i>						
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	4,6	1,5	1,6	2,2	
0,1	1,0	4,0	1,8	2,0	2,2	
1	1,9	4,3	4,0	2,0	3,1	
10	1,6	4,0	6,5	2,3	3,4	
Átlag	1,4	4,2	3,4	2,3		
<i>Allevél</i>						
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	4,6	1,4	1,5	2,1	
0,1	1,0	3,9	2,5	2,4	2,5	
1	1,6	2,1	4,6	2,3	2,7	
10	1,7	1,7	2,7	1,3	1,8	
Átlag	1,3	3,1	2,8	1,9		
<i>Sziklevél</i>						
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	1,0	3,7	1,5	1,6	2,0	
0,1	1,0	2,7	2,9	1,7	2,1	
1	1,7	1,7	3,7	2,4	2,4	
10	1,4	1,4	2,2	2,2	1,8	
Átlag	1,3	2,4	2,6	2,0		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 0,27 db

A1B1-A1B2: 0,54 db

B1-B2: 0,31 db

A1C1-A1C2: 0,54 db

C1-C2: 0,31 db

B1C1-B1C2: 0,63 db

Általános: 1,09 db

## 14. táblázat

A BAP hatása a különböző eredetű merisztéma tenyészetek fejlettségére az IES függvényében

14/A: varianciatáblázat (paraméter: *hajtásbonítás*, 1-5)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	148,65	143		
Kezelés	91,32	47	1,94	***
Eredet (A)	4,76	2	2,38	*
BAP (B)	51,46	3	17,15	***
IES (C)	3,24	3	1,08	NS
A × B	6,84	6	1,14	+
A × C	4,90	6	0,81	NS
B × C	12,17	9	1,35	*
A × B × C	7,93	18	0,44	NS
Hiba	57,33	96	0,59	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

14/B: eredménytáblázat (paraméter: *hajtásbonítás*, 1-5)

<i>Hajtáscsúcs</i>						
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	3,0	3,3	2,0	2,3	
0,1	1,0	3,3	2,0	3,0	2,3	
1	1,0	2,6	2,0	3,0	2,2	
10	1,3	3,0	3,3	2,0	2,3	
Átlag	1,0	3,0	2,6	2,5		
<i>Allelevél</i>						
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1	10		
0	1,0	2,0	3,0	2,3	2,0	
0,1	1,0	2,0	2,0	3,3	2,0	
1	1,3	3,0	3,3	3,3	2,7	
10	1,3	2,6	3,3	1,6	2,2	
Átlag	1,1	2,4	2,9	2,6		
<i>Sziklevél</i>						
IES (mg/l)	BAP (mg/l)				Átlag	
	0	0,1	1,0	10		
0	1,0	2,3	2,6	2,0	2,0	
0,1	1,0	1,3	1,6	1,6	1,4	
1	1,3	2,0	3,0	1,6	2,0	
10	1,6	2,3	3,0	2,0	2,2	
Átlag	1,2	2,0	2,5	1,8		

SZD<sub>5%</sub>:

A1-A2: 0,31

A1B1-A1B2: 0,62

B1-B2: 0,36

A1C1-A1C2: 0,62

C1-C2: 0,36

B1C1-B1C2: 0,72

Általános: 1,24

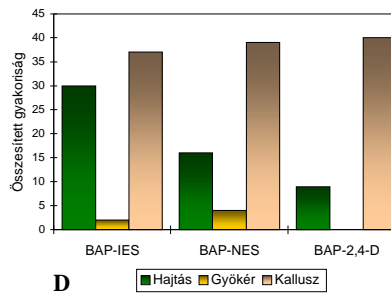
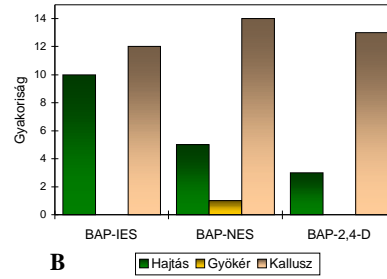
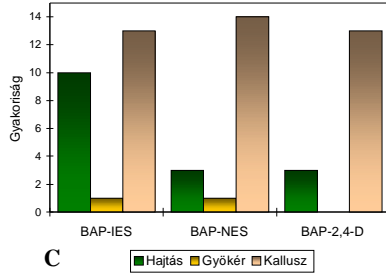
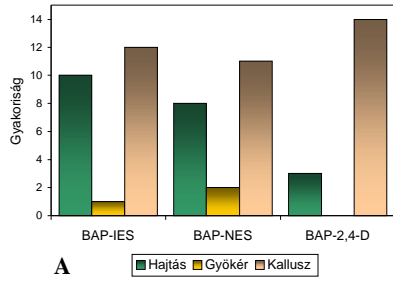
#### 4.2.4 A hajtáscsúcs, allelél és sziklelél merisztémák fejlődése *in vitro*

Az előző fejezetekben külön-külön részleteztük az egyes hormonkombinációk és koncentrációk hatását. Célszerűnek tartjuk azonban az eltérő eredet alapján történő értékelést is, azaz van-e különbség a növény különböző részeiről származó merisztémák *in vitro* reakciója között.

Mivel a citokinin és auxinok kombinációja révén csak citokinint és csak auxint tartalmazó táptalajokat is használtunk, a tenyésztés során hajtás-, gyökér- és kalluszindukciót tapasztaltunk. A tisztán citokinines kultúráknál hajtásorganizációt és -multiplikációt, a tisztán auxinosoknál gyökérorganizációt és kalluszindukciót figyeltünk meg. A magas citokinin és alacsony auxin koncentráció hatására nőtt a regenerált hajtások száma a hormonmentes kontrollhoz képest. Az előbbi fordítottjánál -alacsony citokinin, magas auxin koncentráció- fokozott kalluszindukciót, valamint néhány esetben gyökérorganizációt tapasztaltunk (4. ábra). A magas citokinin és magas auxin koncentrációnál több hajtást kaptunk a kontrollal összehasonlítva, a hajtások alapi részén intenzív kalluszosodást is megfigyeltünk. Az egyes merisztémák *in vitro* differenciációs és dedifferenciációs gyakoriságát az adatok grafikus ábrázolása szemlélteti (5. ábra).

A tenyészetek minőségi változásait vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a legtöbb hajtást a BAP-IES kombinációnál kaptuk, mindhárom eredetnél 10-10 esetben. A gyökérképzés szempontjából legjobbnak a BAP-NES kombinációt találtuk, összesen 4 esetben. A kalluszindukciót tekintve nincs lényeges eltérés sem az egyes hormonkombinációk, sem az egyes explantátumok között. A szervorganizációval összehasonlítva a kalluszindukciókat legnagyobb eltérést a 2,4-D-t tartalmazó táptalajokon tapasztaltunk.





5. ábra: A BAP hatása a merisztéma tenyészetek fejlődésére különböző auxinok kombinációjában.  
 a) hajtáscsúcs merisztéma,  
 b) allel merisztéma,  
 c) sziklel merisztéma,  
 d) az izolátumok szerinti összesített gyakoriság.

### 4.3 Kallusz- és organogenezis indukció érett sziklevel tenyészetekben

A tenyésztési idő (8 hét) elteltével értékeltük a kultúrák hajtás-, gyökér- és kalluszindukcióját, bonitáltuk azok fejlettségét (15. táblázat). Mértük a tenyészetek friss tömegét, az adatokat kéttényezős, véletlen blokkrendezű kísérletek variancia-analízisével értékeltük (Sváb 1981) (16. táblázat).

Kísérletünkben a legtöbb hajtásos tenyészetet (42,2 %) az 1,0 mg/l BAP-t és 1,0 mg/l IVS-at tartalmazó táptalajon, míg legkevesebbet (8,0 %) az 1,5 mg/l IVS-at, tartalmazón kaptuk (6. ábra). A legintenzívebb gyökérindukciót (92,7 %) az 1,0 mg/l IVS-nál, a leggyengébbet (2,0 %) 0,5 mg/l BAP-nál tapasztaltuk. A csak citokininnel kiegészített tápközegeken figyeltük meg a legkevesebb (1,0 mg/l BAP - 3,0 %; 1,5 mg/l BAP - 3,0 %), gyengén fejlett gyökeret, ezért a gyökérszám értékelésénél figyelmen kívül hagytuk. A kalluszindukciót tekintve a legtöbb kalluszos tenyészetet (88,7 %) a 1,5 mg/l BAP-t és 1,0 mg/l IVS-at, míg a legkevesebbet (7,0 %) a 0,5 mg/l IVS-at tartalmazó táptalajon kaptuk. Sziklevelenként a legtöbb hajtást ( $5,5 \pm 2,6$  db) az 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IVS koncentrációknál, legkevesebbet ( $1,3 \pm 0,5$  db) az 1,5 mg/l IVS koncentrációnál kaptuk. A gyökérbépzés szempontjából legjobbnak a 0,5 mg/l IVS-at ( $3,0 \pm 2,1$  db), legrosszabbnak a 0,5 mg/l BAP-t és 0,5 mg/l IVS-at ( $1,1 \pm 0,3$  db) tartalmazó táptalajt tartjuk. A legfejlettebb hajtásokat (++++) a hormonmentes és a csak auxinnal kiegészített tápközegeken tapasztaltuk. A legjobban fejlett gyökereket (++++) szintén az előbbi két táptalajon figyeltük meg.

A friss tömegeket értékelve láthatjuk, hogy  $P = 0,1$  %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések a kezelések között, az  $SZD_{5\%} = 0,31$  g, míg a BAP kezelések között az IVS átlagában  $SZD_{5\%} = 0,15$  g. A legnagyobb átlagtömeget (3,55 g) a 0,5 mg/l IVS-val, legkisebbet (2,29 g) az 1,5 mg/l BAP-nal kiegészített tápközegen mértük.



6. ábra: Hajtásmultiplikáció a sziklevél eredetű tenyészeteken 1,0 mg/l BAP és 1,0 mg/l IES hatására B5 tápközegen.

15. táblázat

A BAP-IVS kombinációk hatás a hajtás-, gyökér- és kalluszindukció mértékére sziklevél eredetű tenyészetekben

Táptalaj jele	Hajtás %	Gyökér %	Kallusz %	Hajtás (db)	Fejlettség g	Gyökér (db)	Fejlettség g
SZ0	19,7	80,3	39,	1,8±1,0	+++	2,8±2,2	++
SZ1	13,8	2,0	79,3	3,1±1,7	++	-	-
SZ2	36,2	3,0	63,9	4,6±2,6	++	-	-
SZ3	17,2	3,0	65,5	5,2±3,2	++	-	-
SZ4	39,2	91,2	7,0	2,1±1,0	++	3,0±2,1	+++
SZ5	18,0	13,1	36,1	3,5±1,3	++	1,1±0,3	+
SZ6	30,1	22,2	44,4	4,8±2,0	++	1,7±0,7	+
SZ7	23,3	21,6	43,3	5,5±2,6	++	1,2±0,1	+
SZ8	27,3	92,7	12,7	2,5±1,2	+++	2,8±1,7	++
SZ9	19,3	43,8	54,4	2,8±2,1	++	1,4±0,6	+
SZ10	42,1	24,6	75,4	3,9±2,0	++	1,4±0,6	+
SZ11	39,6	9,0	88,7	4,8±3,5	++	1,2±0,4	+
SZ12	8,0	78,0	18,0	1,3±0,5	+++	2,5±1,9	++
SZ13	19,0	11,9	45,2	2,3±1,2	++	1,8±0,8	+
SZ14	26,4	28,3	84,9	4,9±2,1	+++	1,2±0,6	+
SZ15	25,4	43,6	87,3	2,9±1,4	++	1,4±0,6	+

(- = nincs elváltozás, + = gyengén, ++ = közepesen, +++ = jól fejlett tenyészet)

## 16. táblázat

A BAP-IVS kombinációk hatása a sziklevel eredetű tenyészetek friss tömegére

16/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, g)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	557,78	799		
Kezelés	78,94	15	5,26	***
IVS (A)	18,82	3	6,27	***
BAP (B)	36,82	3	12,27	***
A × B	23,29	9	2,58	***
Hiba	478,83	784	0,61	

(\*\*\*)P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, <sup>†</sup>P= 10 %, NS= nem szignifikáns)16/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, g)

BAP (mg/l)	IVS (mg/l)				Átlag
	0	0,5	1,0	1,5	
0	2,92	3,55	3,26	2,83	3,14
0,5	2,42	2,64	2,46	2,64	2,54
1,0	2,69	2,98	2,88	2,98	2,88
1,5	2,29	2,74	3,00	3,14	2,79
Átlag	2,58	2,98	2,90	2,90	

SZD<sub>5%</sub>: A1-A2: 0,15 g

B1-B2: 0,15 g

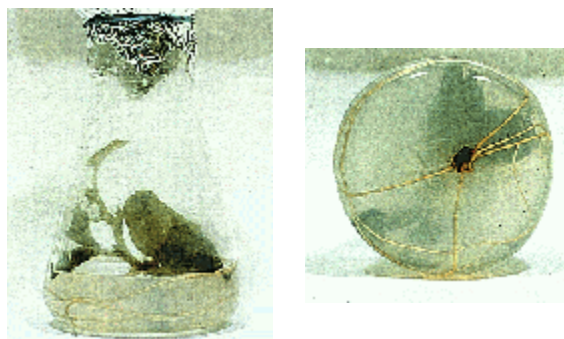
A1B2-A2B1: 0,31 g

**4.4 A nodális szegmentekre alapozott klónozás lehetősége**

Az izolálás után 12-14 nappal mind a hajtáscsúcsok, mind a nodális szegmentek esetében megfigyelhettük a bazális rész elkalluszosodását. A hajtáscsúcsok megnyúltak, majd gyökeret fejlesztettek. A nodális szegmenteken található rügyből (második allevrügy) hajtás fejlődött a legtöbb tenyészetben. Gyakori volt a szár megfeketedése (nekrózisa), a fenolok oxidációja miatt. A gyökérfejlődés gyakoriságát a 17. táblázat szemlélteti.

Az adatokból látható, hogy nincs lényeges eltérés a módosított MS és az MS alaptáptalaj között. A fajtákat összehasonlítva mindkét tápközegen szintén nincsenek nagy eltérések a gyökeresedési gyakoriságokban (45,9 % - 54,9 %). Az első gyökerek megjelenési idejét tekintve 'Lippói', 'Kornberger' és 'Óvári-137' a fajták sorrendje (7. ábra).

A gyökeres dugványokat a talajba való kiültetés előtt edzettük. A növénykéek sterilizált, feles makro- és mikroelem koncentrációjú, tiamint , inozitot tartalmazó MS oldattal átitatott perlitbe kerültek. Az edényekben fokozatosan csökkentettük a fóliaborítást. A 2-3 hetes edzés után a növényeket talajba kiültetve, üvegházban neveltük fel. A túlélési ráta alacsony volt, az ismételt jelentkező nekrozis miatt.



7. ábra: Gyökérfejlődés nodális szegmensen ('Lippói' fajta) 0,186 mg/l NES-val kiegészített MS táptalajon.

17. táblázat

A táptalaj és a genotípus hatása a nodális szegmentek gyökeresedésére

Táptalaj	Fajta	Nodális szegmentek (db)	Első gyökerek megjelenése (nap)	Gyökeres tenyészetek (db)	Gyökérképzés gyakorisága (%)
MS	Lippói	96	15	52	54,1
	Kornberger	82	21	43	52,4
	Óvári-137	93	23	45	48,4
mód. MS	Lippói	69	16	32	46,4
+ 10 %	Kornberger	142	20	78	54,9
aktív szén	Óvári-137	85	22	39	45,9

#### 4.5 Izolátumfüggő kalluszindukció

Kallusztenyésztési kísérleteinkben különböző izolátumokat és táptalaj összetevőket teszteltünk. Mivel majdnem minden vizsgálat során *in vitro* csíráztatott növényekkel dolgoztunk, először a csíráztatásra használt tápközegeket értékeltük. Az adatokat a 18. táblázat tartalmazza.

18.táblázat

A tápoldat hatása a lóbab csíráztatására *in vitro*

Tápoldat	Magok száma (db)	Kicsírázott magok (db)	Csírázási %	Megjegyzés
MS	300	280	93,3	Életképes csíranövény
MS + 3 mg/l 2,4-D	300	262	87,3	Torz csíranövény
Knop-oldat	300	294	98,0	Életképes csíranövény
Sterilezett csapvíz	300	274	91,3	Életképes csíranövény

Életképes növényeket kaptunk a hormonmentes táptalajokon, a legnagyobb csírázási százalékot (98,0) a Knop-oldaton figyeltük meg. A 2,4-D-at tartalmazó tápközegen torz, elkalluszosodott gyököcskéjű, gyengén fejlett hajtású növényképek fejlődtek.

Ezt követően tovább vizsgáltuk a 2, 4-D hatását az *in vitro* tenyésztés során. A 4 hetes tenyésztés alatt folyamatosan értékeltük a kultúrákat. A friss tömegeket Duncan-féle többszörös terjedelem próbával értékeltük, amit széles körűen használnak a nemzetközi szövettenyésztési szakirodalomban. A megfigyelt és mért adatokat a 19. táblázat szemlélteti.

19. táblázat

A csíráztatás során adagolt 3 mg/l 2,4-D hatása a csíranövény eredetű izolátumokon a kalluszfejlődésre

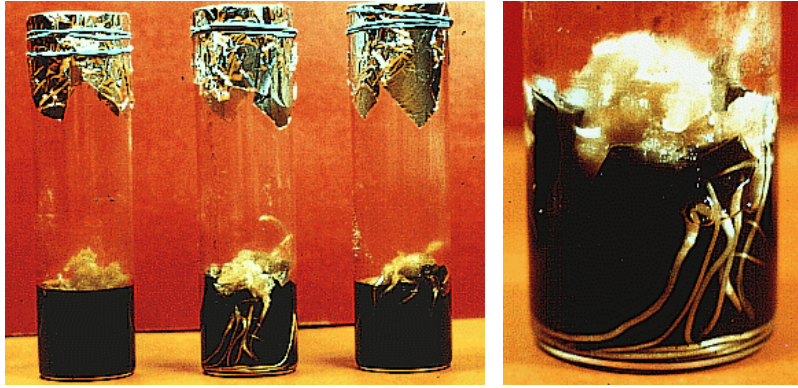
2,4-D a csíráztatás során	Táptalaj	Explantátum	Izolátumok száma (db)	Kalluszindukció gyakorisága (%)	Kallusztípus **	Gyökeresedés (%)	Friss tömeg (mg) ***
+	MS + kiegészítők *	mezo- kotil	78	91,0	K S	59,0	1091,3± 116,2 <sup>a</sup>
+		hajtás- csúcs	89	80,1	K Z	41,2	709,0± 70,5 <sup>c</sup>
-	MS + kiegészítők *	mezo- kotil	80	85,0	L Z	47,2	901,4± 66,6 <sup>b</sup>
-		hajtás- csúcs	93	77,4	L S Z	38,7	368,6± 49,4 <sup>d</sup>
+	B5 + kiegészítők *	mezo- kotil	91	94,5	K S	54,9	1056,3± 107,3 <sup>a</sup>
+		hajtás- csúcs	87	86,2	K S Z	44,8	694,7± 48,0 <sup>c</sup>
-	B5 + kiegészítők *	mezo- kotil	90	82,2	L Z	48,9	932,7± 48,0 <sup>b</sup>
-		hajtás- csúcs	92	75,0	L Z	35,9	414,8± 52,3 <sup>d</sup>

(\* Kiegészítők: 0,2 mg/l BAP + 1,0 mg/l 2,4-D + 1 % aktív szén)

(\*\* Kallusztípusok: K= kompakt, tömör; L= laza; S= sárga; Z= zöld)

(\*\*\* Az azonos betűvel jelölt átlagértékek szignifikánsan nem különböznek egymástól, SZD5%= 48,1 mg)

A csíráztató tápközegbe adagolt 2,4-D hatására a 10-14 nap alatt fejlődött növények erősen deformáltak voltak. Mind a mezo-kotil, mind a hajtás eredetnél intenzív kalluszosodást figyelhettünk meg. Az egyes alaptáptalajok között nincs jelentős eltérés, azonban az MS-en valamivel nagyobb értékeket kaptunk, mindegyik paraméternél. A mezo-kotil szegmentek kalluszindukciós gyakorisága meghaladta a hajtáscsúcsokét. A friss tömegeket értékelve P= 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések, az SZD<sub>5%</sub>= 48,1 g. A tenyészetek indítása előtt adagolt auxin hatására jelentősen nőtt a kultúrák tömege. A kalluszsövet jellegét vizsgálva a 2,4-D-n csíráztatott explantátumoknál kompakt, tömör, míg a hormonmentes közegen csíráztatottnál laza szerkezetet tapasztaltunk. A gyökeresedési százalékokban szintén jelentős eltérést figyeltünk meg az auxin előzetes adagolására (8. ábra).



8. ábra: Gyökérindukció a csíráztatás során 2,4-D-val előkezelt növények hajtáscsúcs merisztéma eredetű kalluszain.

Következő kísérletünkben 'Lippói' és 'Kornberger' fajták éretlen embrióiból indukáltunk tenyészeteket, a merisztéma tenyésztésnél legjobbnak talált BAP-IES hormonkombinációval. A két fajtát külön-külön értékeltük, mértük a kultúrák, friss tömegét, az adatokat kéttényezős, véletlen blokkelrendezésű kísérletek varianciaanalízisével értékeltük (Sváb 1981). A biometriai elemzés variancia- és eredménytáblázatát a 20-21. táblázatok foglalják össze.

A tenyészetek minőségi változásait tekintve megállapíthatjuk, hogy a csak citokinint tartalmazó táptalajon az embriók először megnyúltak, majd ezt követően elkalluszosodtak, a csak auxint tartalmazón pedig a növekedési fázis nélkül elkalluszosodtak. Az alacsony BAP és magas IES szintek hatására laza szerkezetű kalluszsövet fejlődött az izolátumokon, míg a magas BAP és alacsony IES koncentrációk tömörebb kalluszt indukáltak. A szomatikus embriogenezisre utaló embriogén gömbök megjelenését a BAP:IES = 2:1 aránynál tapasztaltunk.

A friss tömeg adatokat értékelve látható, hogy a Lippói fajtánál a legnagyobb átlagtömeget (1452,0 mg) az 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IES kezelés, a legkisebbet a hormonmentes kontroll (20,4 mg) adta. A 'Kornberger' fajtánál legjobbnak a 2,0 mg/l-es BAP (1121,0 mg), legrosszabbnak az 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IES kezelés (80,0 mg/l) bizonyult. Mindkét genotípusnál  $P=0,1$  %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések, a 'Lippói'-nál  $SZD_{5\%}=400,1$  mg, a 'Kornberger'-nél  $SZD_{5\%}=304,3$  mg.



## 20. táblázat

A BAP-IES kezelés hatás a kalluszindukcióra a 'Lippói' fajta éretlen embrió eredetű tenyészeiben

20/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	102314505	249		
Kezelés	44303191	24	1845966	***
BAP (A)	16629540	4	4157385	***
IES (B)	7605191	4	1901297	***
A × B	20068459	16	1254278	***
Hiba	58011313	225	257828	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, †P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

20/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

IES (mg/l)	BAP (mg/l)					Átlag
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0	20,4	607,0	648,5	1160,0	1428,0	772,7
0,5	92,0	40,0	1452,0	487,0	695,0	553,2
1,0	37,7	645,0	740,0	694,0	29,5	429,2
1,5	67,0	238,0	165,0	282,0	587,0	267,8
2,0	82,5	751,0	558,0	963,0	883,0	647,5
Átlag	59,9	465,2	712,7	717,2	724,5	

SZD<sub>5%</sub>: A1-A2: 200,1 mg

B1-B2: 200,1 mg

A1B2-A2B1: 400,1 mg

## 21. táblázat

A BAP-IES kezelés hatás a kalluszindukcióra a 'Kornberger' fajta éretlen embrió eredetű tenyészeiben

21/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	523567846	249		
Kezelés	18803746	24	783489	***
BAP (A)	6531742	4	1632935	***
IES (B)	4285562	4	1071390	***
A × B	7986441	16	499152	***
Hiba	33553099	225	149124	

(\*\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, †P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

21/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

IES (mg/l)	BAP (mg/l)					Átlag
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0	200,0	496,0	574,0	991,0	1121,0	646,4
0,5	88,0	217,0	656,0	80,0	344,0	277,0
1,0	264,0	402,0	404,0	586,0	667,0	464,6
1,5	165,0	476,0	589,0	551,0	207,0	397,0
2,0	148,0	287,0	116,0	715,0	778,0	408,8
Átlag	173,0	375,6	467,8	584,6	623,4	

SZD<sub>5%</sub>: A1-A2: 152,1 mg

B1-B2: 152,1 mg

A1B2-A2B1: 304,3 mg

Az egyes hormonhatások vizsgálata után a tápközegbe adagolt adszorbens hatását teszteltük. A lóbab szövettenyészeteknél problémát jelentenek a különböző fenolszármazékok, melyek az izolátumok, vagy a tenyészetek nekrozisához vezetnek. Kísérletünkben a nagy molekula súlyú (~40000) PVP adszorbens különböző koncentrációit használtuk. Merisztéma (hajtáscsúcs, allevél, sziklevél) és differenciált szövet (epi-, mezo- és hipokotil) eredetű tenyészetek hajtás- és kalluszprodukciónak értékeltük (9. ábra). A friss tömeg adatokat itt is kéttényezős, véletlen blokkrendezésű kísérletek varianciaanalízisével elemeztük (Sváb 1981).

A 22. táblázatból látható, hogy a hajtásprodukciónak tekintve mindhárom merisztémánál az MS2 jelű táptalaj volt a legjobb (100 mg/1 PVP): hajtáscsúcs -  $2,6 \pm 1,3$  db; allevél -  $1,6 \pm 1,1$  db; sziklevél -  $1,8 \pm 1,8$  db. A legkevesebb hajtást a 2000 mg/1 PVP kiegészítésű táptalajokon figyeltük meg, ami még a kontrollnál is kevesebb volt.

22. táblázat

A PVP hatása a különböző eredetű merisztémák hajtásorganizációjára

Táptalaj	Hajtáscsúcs	Allevél	Sziklevél
	Hajtás (db)		
MS0	$1,4 \pm 1,0$	$1,6 \pm 1,0$	$1,4 \pm 1,2$
MS1	$2,2 \pm 2,0$	$1,5 \pm 1,2$	$1,8 \pm 1,5$
MS2	$2,6 \pm 1,3$	$1,6 \pm 1,1$	$1,8 \pm 1,8$
MS3	$1,4 \pm 0,6$	$1,3 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,7$
MS4	$2,0 \pm 1,2$	$1,4 \pm 0,7$	$1,7 \pm 1,5$
MS5	$1,6 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,5$

A friss tömeg adatokat értékelve a merisztémánál  $P = 5$  %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések az egyes kezelések, valamint PVP koncentrációk között (23. táblázat). A kombinációk közt az  $SZD_{5\%} = 148,1$  mg. A legnagyobb átlagtömeget 10 mg/1 PVP kiegészítéssel kaptuk ( $313,8$  mg), hajtáscsúcs merisztémából. A legkisebbet ( $59,5$  mg) allevél merisztémánál, 2000 mg/1 PVP-nál mértük. A differenciált szöveteket tartalmazó explantátumokból kiindulva csupán az eredetek között találtunk  $P = 10$  %-os szinten szignifikáns eltéréseket. A legnagyobb átlagtömeget itt is a 10 mg/1 PVP-nál mértük ( $328,4$  mg), mezokotil szegmentekből kiindulva. A legkisebbet ( $140,0$  mg) szintén a 2000 mg/1 PVP-t tartalmazó MS5 jelű táptalajon figyeltünk meg mezokotil eredeteknél (24. táblázat).

## 23. táblázat

A PVP hatása a különböző eredetű merisztémák kalluszosodására

23/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	23187276	377		
Kezelés	1833750	17	107867	*
PVP (A)	737941	5	147588	*
Eredet (B)	269637	2	134818	NS
A × B	826171	10	82617	NS
Hiba	21353525	360	59315	

(\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

23/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Eredet	Táptalaj						Átlag
	MS0	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	
HCS	202,8	313,8	158,1	129,0	164,7	130,9	183,2
AL	86,1	133,3	282,1	122,4	72,3	59,5	126,0
SZL	90,0	152,9	199,0	63,8	74,7	182,8	127,2
Átlag	126,3	200,0	213,1	105,1	103,9	124,4	

SZD<sub>5%</sub>: A1-A2: 85,5 mg (HCS= hajtáscsúcs; AL= allevél; SZL= sziklevel)

B1-B2: 60,4 mg

A1B2-A2B1: 148,1 mg

## 24. táblázat

A PVP hatása a csíranövény különböző szöveteinek kalluszindukciójára

24/A: varianciatáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Tényező	SQ	FG	MQ	
Összes	28030049	377		
Kezelés	1485696	17	87393	NS
PVP (A)	187386	5	37477	NS
Eredet (B)	395228	2	197614	+
A × B	903080	10	90308	NS
Hiba	26544353	360	73734	

(\*\*P= 0,1 %, \*\*P= 1 %, \*P= 5 %, +P= 10 %, NS= nem szignifikáns)

24/B: eredménytáblázat (paraméter: *friss tömeg*, mg)

Eredet	Táptalaj						Átlag
	MS0	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	
EPIK	193,0	186,1	140,4	155,2	141,9	194,2	168,5
MEZOK	273,8	328,4	188,0	192,8	317,1	140,0	240,0
HIPOK	210,9	218,0	319,0	300,0	177,6	176,6	233,7
Átlag	225,9	244,2	215,8	216,0	212,2	170,3	

SZD<sub>5%</sub>: A1-A2: 95,3 mg (EPIK= epikotil; MEZOK= mezokotil; HIPOK= hipokotil)

B1-B2: 67,4 mg

A1B2-A2B1: 165,1 mg

#### **4.6 Lóbabfajták jellemző RAPD mintázata 3'- ill. 5'-végen horgonyzott SSR/ISSR és OPERON primerek esetén**

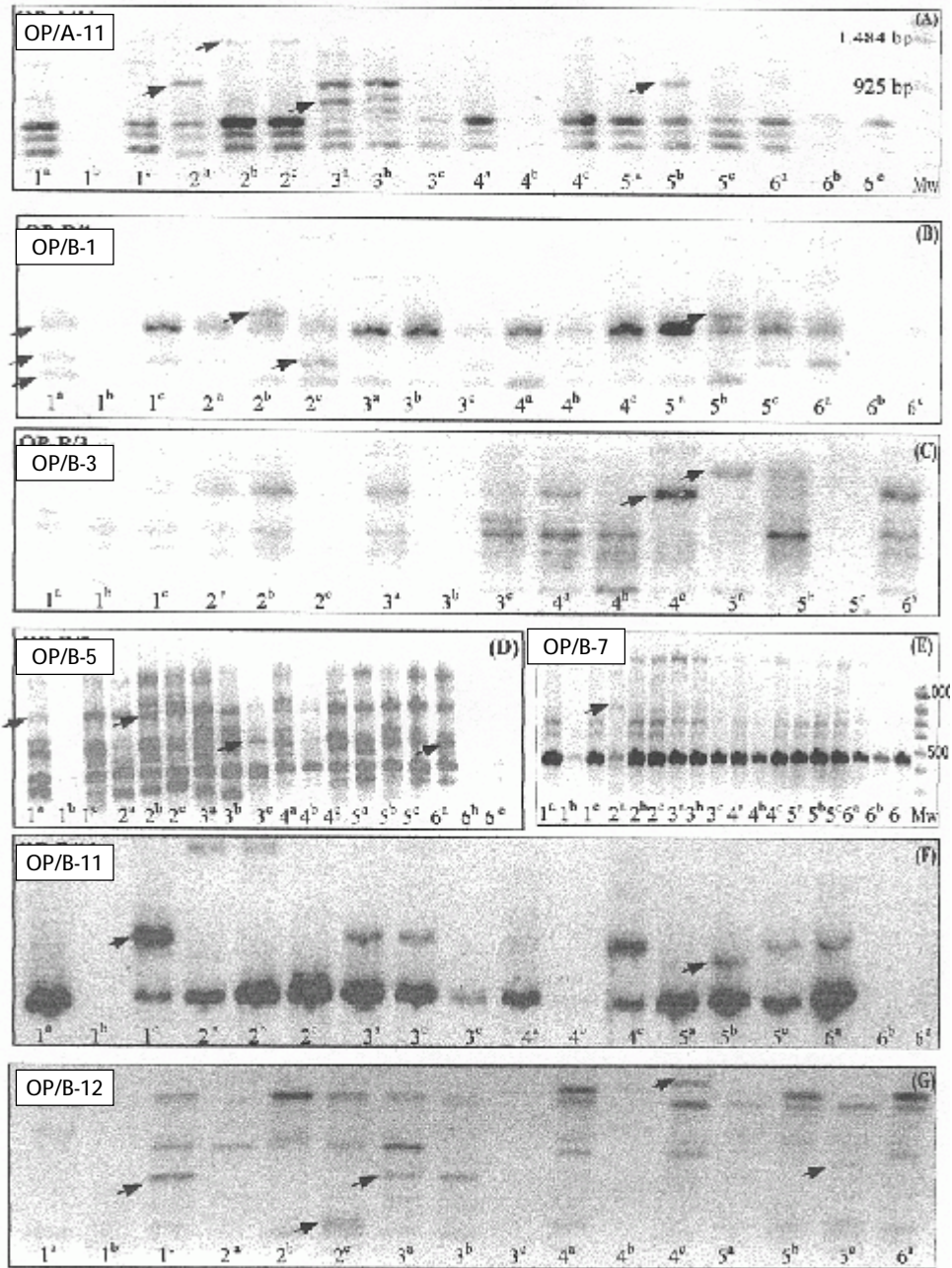
A RAPD elemzések során az OP/A-11, OP/B-1, OP/B-3, OP/B-5, OP/B-7, OP/B-11 és OP/B-12 primereket használtuk, a gélelektroforézis során a vizuálisan jól elkülöníthető sávokat (DNS fragmentumok) vettük figyelembe. A primerekkel generált PCR fragmentum mintázat elemzéséből megállapítható (10. ábra), hogy az egy nemesítési vonal és az öt fajta között sikerült kimutatni genetikai polimorfizmust.

A DNS fragmentumok hosszúságát az OP/A-11 primerrel adott mintázat jelzi, egy rendkívül rövid, kb. 250 bp hosszú fragmentumtól a közel 1400 bp hosszúságú fragmentekig (10.a ábra). A legmonomorfabb mintázatot az OP/B-11 primer három fragmentummal mutatta (10.c ábra). Rendkívül magas fragmentum számot eredményezett az OP/A-11 (10.a ábra) és OP/B-5 (10.d ábra). A legmegbízhatóbb polimorfizmust az OP/A-11 primerrel sikerült kimutatni.

A mikroszatellita primerek alkalmazásával közel azonos fragmentum számot sikerült kimutatni, mint a RAPD primerekkel (11. ábra). A módszer érzékenységét mutatja, hogy szinte mindegyik mikroszatellita primerrel sikerült eltérő DNS mintázatot meghatározni.

Az ábrákból látható, hogy a lóbab genotípusok különböznek egymástól. A legvariabilisabb mintázatot a 'Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', mutatja, nemcsak az operon (10. ábra), hanem a mikroszatellita primerek (11. ábra) tekintetében. Az ISSR mikroszatellita primerekkel végzett elemzések közül a CA(GACA)<sub>4</sub> primerrel egyértelmű monomorf, míg a (GACA)<sub>4</sub>CA primerrel polimorf mintázatot kaptunk (11.a-b ábra). Hasonló variabilitásra utal az OP/A-11 operon és a (GACA)<sub>4</sub> SSR primer (10.a és 11.c ábra).

A sávmintázatok elemzése során kitűnt, hogy az RAPD primerek esetében a 2-300 bp-től csaknem 1400 bp-ig terjedő fragmentumok hossza (10. ábra), míg a mikroszatellita primerek által felismert lókuszok csak elvétve érik el, ill. haladják meg az 1000 bp-t (11. ábra). (Markert nem minden primer mellett futtattunk, de következetesen azonos körülményeket biztosítottunk, így ezt minden fényképről megállapíthattuk.) Néhány esetben az egyes genotípusokon belül a minták között is eltéréseket kaptunk, ami a növények egyedi variabilitására utalt (10.f-g ábra).



10. ábra: Lóbabfajták RAPD-PCR elemzése OPERON primerekkel.

1. 'Fehérvirágú'

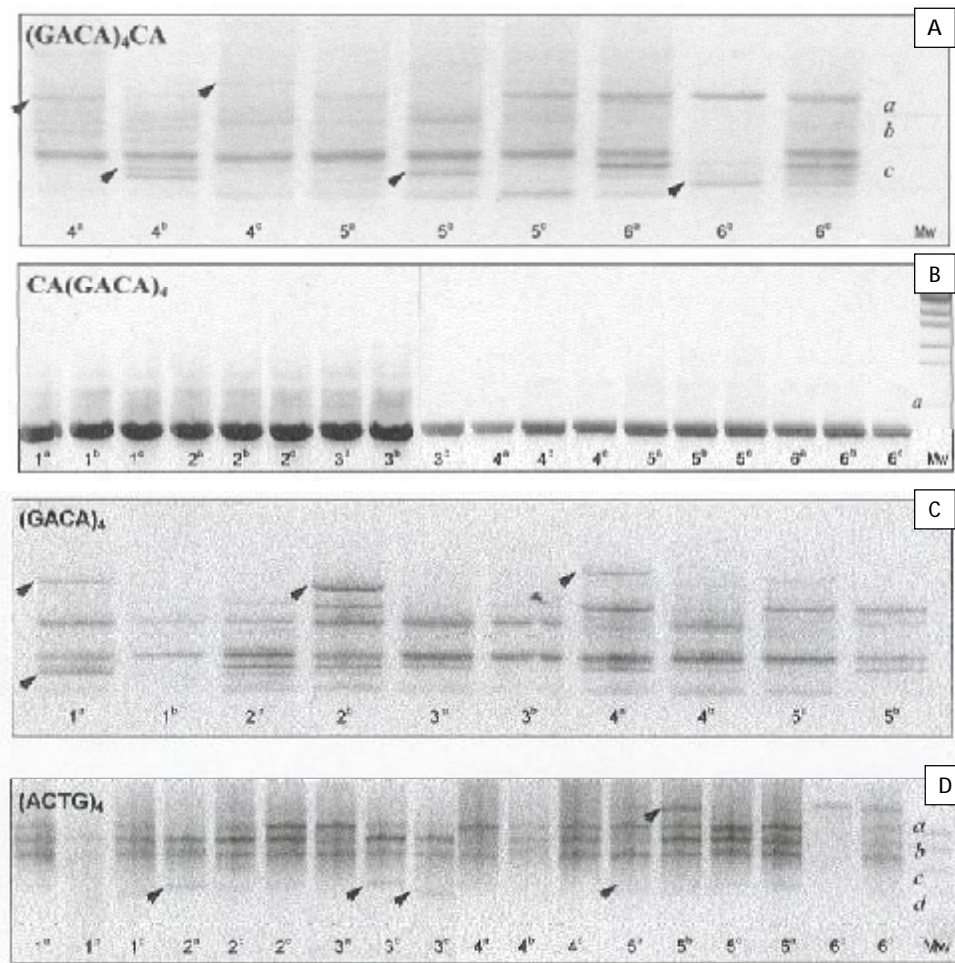
2. 'Jasny II.'

3. 'Lippói'

4. 'Minor'

5. 'Óvári-137'

6. 'Vica'



11. ábra: Lóbabfajták mikroszatellita-PCR elemzése ISSR/SSR primerekkel.

1. 'Fehérvirágú'

2. 'Jasny II.'

3. 'Lippói'

4. 'Minor'

5. 'Óvári-137'

6. 'Vica'

#### 4.7 Új tudományos eredmények

Az elvégzett vizsgálataink alapján a következő új tudományos eredményeket kaptuk:

##### 1. A genetikai háttér és az *in vitro* tenyésztés kapcsolata:

A vizsgált 11 genotípus közül elsősorban a nagymagvú csoportba tartozó 'Lippói' és 'Alfred' fajtákból javasoljuk *in vitro* tenyészetek indítását, fenntartását.

##### 2. Hormonkombinációk hatása a lóbab különböző eredetű merisztémáinak fejlődésére:

A hajtáscsúcs és allevél merisztéma eredetű kultúráknál növény regeneráció céljából a BAP-IES kombinációt tartjuk megfelelőnek. Az optimális hormon koncentráció BAP esetében 1,0 mg/l, az IES-nál 1,0-10 mg/l. A hajtásokat hormonmentes MS alaptápközegen gyökerezettük.

Az auxinok hatását értékelve merisztéma eredetű tenyészetekben a BAP-nal kombinálva, kalluszindukcióra a 2,4-D-t, gyökérindukcióra a NES-t, hajtásregenerációra az IES-t javasoljuk.

##### 3. Organogenezis érett sziklevek *in vitro* kultúráiban:

Az érett sziklevel eredetű kultúráknál a BAP-IVS kombináció sikerrel alkalmazható a mikroszaporítási és transzformációs vizsgálatok során.

##### 4. Klónozás lehetősége nodális szegmentek felhasználásával:

A nodális szegmentekre alapozott klónozás 50 %-os hatékonyságát az alkalmazott táptalaj további módosításával fokozni lehet.

##### 5. Kalluszindukció eltérő izolátumokon:

Az *in vitro* csíráztatás során adagolt auxin intenzív kalluszindukciót eredményez. A BAP-IES kombináció 2:1 arányban embriogén kalluszindukcióhoz járult hozzá a fejletlen embrió eredetű kultúrákban.

A lóbab sejt- és szövettenyészetek fejlődését gátló polifenolok kiküszöbölésére merisztéma eredetű tenyészeteknél maximum 100 mg/l PVP kiegészítést tartunk megfelelőnek.

##### 6. Lóbabfajták összehasonlító molekuláris elemzése:

Az öt lóbabfajta ('Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', 'Vica') és egy nemesítési vonal ('Fehérvirágú') oligonukleotid primerekkel (SSR/ISSR: (GACA)<sub>4</sub>, CA(GACA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>CA, (ACTG)<sub>4</sub>; RAPD: OP/A-11, OP/B-1, OP/B-3, OP/B-5, OP/B-7, OP/B-11 és OP/B-12) végzett vizsgálatainkból megállapítottuk:

- a felszaporított DNS-fragmentumok molekulatömegének változatosságát;

- az OP/A-11, (GACA)<sub>4</sub> és (GACA)<sub>4</sub>CA primereknél kapott polimorf mintázat alkalmas fajták azonosítására, molekuláris markerek előállítására;
- a CA(GACA)<sub>4</sub> monomorf mintázatot adott, ezáltal lehetővé teszi a lóbab és más *Vicia* fajok közötti rokonság meghatározását;
- néhány esetben az egyedi variabilitás nagyobb volt, mint a fajták közötti eltérés, ami a faj genetikai hátterének nagyfokú plaszticitására utal.

Elvégzett kísérleteink nem terjedtek ki a növényi sejt- és szövettenyésztés valamennyi területére, csupán a gyakorlati szempontból legjelentősebb kultúrákat -merisztéma eredetű tenyészetek, sejt kultúrák (kalluszok)- vizsgáltuk. Az elvégzett molekuláris genetikai elemzések kiindulási alapul szolgálnak -újabb primerek bevonásával- a hazai lóbabfajták összehasonlításához, azonosításához, szabadalmazásához.



## 5. MEGVITATÁS

### 5.1 Merisztéma és hajtáskultúrák

#### 5.1.1 Merisztéma

A *Fabaceae* családba tartozó fajok szövettenyésztése közismerten nehéz. A kultúrákból történő növény regenerációt számos tényező befolyásolja, legfontosabb közülük az adott faj genotípusa, valamint a tenyésztés körülményei, elsősorban a táptalaj összetétele. Ennek megfelelően a merisztéma eredetű kultúrákban először az *in vitro* tenyésztés szempontjából legalkalmasabb lóbab genotípusokat választottuk ki. A 11 tesztelt fajta közül a nagymagvú csoportba tartozó 'Lippói'-t és 'Alfred'-ot találtuk tenyésztésre legalkalmasabbnak. Bár az egyes paramétereket tekintve nincs nagy eltérés az egyes fajtacsoportok -nagy- és kismagvúak- között, a szubjektív értékelés alapján azonban mindenképpen a már említett két genotípussal célszerű szövettenyészetekben foglalkozni. A lóbab nemesítésben ma a magméret csökkentése az egyik cél, ennek megfelelően a nagymagvú fajták több „vad” gént hordozhatnak, amelyek között az *in vitro* reakcióért felelőseket is találhatunk. Az irodalmakban még nem találtam hasonló magyarázatot a genotípus és a szövettenyészetek kapcsolatának ilyen értelmezésére.

A táptalaj összetevők közül döntően a növekedés szabályozó anyagok befolyásolják az *in vitro* kultúrák fejlődését. A vizsgálatokban a növényi hormonok két csoportját, az auxinokat és citokinineket teszteltük. A BAP hatását értékelve különböző auxinok függvényében megállapíthatjuk, hogy az optimális koncentráció az 1,0 mg/l-es volt. Hasonló eredményről számolt be Bieri (1985), amikor a citokinint önmagában adagolta. A háromféle auxin közül kalluszindukcióra a 2,4-D, gyökérindukcióra a NES, hajtás-organizációra az IES fejtett ki kedvező hatást, a BAP-nal kombinálva. Az irodalmi adatok főleg a BAP-NES kombinációt javasolják, eltérő koncentrációkban (Galzy és Hamoui, 1981, Tejklova et al., 1984, Schulze et al., 1985, Fakhrai et al., 1989) a merisztéma eredetű tenyészeteknél a redifferenciáció indukciója céljából. Kísérleteinkben a BAP-IES kombinációt találtuk megfelelőnek, Busse-Eisenreich (1986) eredményeivel megegyezően. A merisztémák eredete hatást gyakorolt a tenyészetek fejlődésére, hajtásindukciójára. Az előbbi szerző allelél merisztémákból indukált tenyészeteknél, Fakhrai et al. (1989) sziklevél náduszokon kapta a legtöbb hajtást. A vizsgálatok eredményei alapján -az összes paramétert együtt értékelve- a hajtásprodukciónak szempontjából hajtáscsúcs  $\geq$  allelél  $>$  sziklevél merisztéma a sorrend, ami az irodalmi adatokkal ellentétes irányú. A kallusz- és gyökérindukciót tekintve nincs eltérés az egyes eredetek között. A regenerált hajtások

gyökereztetésére a hormonmentes MS tápközeget találtuk megfelelőnek. Amennyiben mégis szükséges, NES kiegészítéssel fokozni lehet a gyökérképzést, az irodalmak alapján.

### 5.1.2 Sziklevel

A sziklevel nóduszok magas regenerációs potenciálját már számos növényfajnál tapasztalták. Mante et al. (1989) először a *Prunus* fajoknál, majd a szójánál figyelte meg az érett sziklevek proximális végén az adventív hajtás csúcs redifferenciációt, az embriók eltávolítása után. A módszer lehetőséget ad az egyszerű mikroszaporításra, illetve a hozzákapcsolható genetikai transzformációkra. A BAP és IVS kombináció hatását értékelve érett, embrió nélküli lóbab sziklevelekre, a szójánál tapasztalt eredményeket kaptuk. A két hormon együttesen, illetve a BAP önmagában a hajtásindukcióhoz járult hozzá, míg csak IVS adagolásával gyökérfejlődést figyeltünk meg. A jelenség az említett sziklevel régió magas regeneratív képességére utal, az itt található sejtekből hajtás vagy gyökér differenciálódik a külső hormonadagolás hatására.

A hajtások gyökereztetése ebben az esetben is hormonmentes alaptáptalajon -B5 (Gamborg et al., 1968)- történt. Az IVS gyökérképzésre gyakorolt hatását értékelve a hormon hajtáskultúráknál -merisztéma vagy hajtás eredettel- is alkalmazható.

Mivel a növényregeneráció megbízhatóan nem alkalmazható ennél a fajnál, célszerűnek tartjuk a nagy regeneratív képességgel bíró -pl. sziklevel merisztéma- szövetek transzformációját. A fentiekben leírt módszer megfelelő alapot ad pl. a herbicid rezisztens növények előállítására.

### 5.1.3 Nodális szegment

A lóbab hajtástenyésztés technikája különösen jelentős lehet a hímsterilitás, a kórokozók elleni rezisztencia vizsgálata során. Kísérletünkben 50 % körüli gyakorisággal kaptunk gyökeres hajtásokat, az aktív szén ebben az esetben nem fokozta a gyökér indukciót, jóllehet a nodális szegmentek bazális része kevésbé nekrotizálódott. A táptalajba adagolt auxin -NES- mennyiségének növelésével fokozni lehet a hormonhatást, amit az aktív szén korlátoz. A fajták között nem tapasztaltunk jelentős eltérést, azonban a nagymagvú fajtacsoportba tartozó 'Lippói' gyökér regenerációja volt a leggyorsabb, ami a merisztéma tenyészeteknél már említett genombeli különbségekből származhat.

## 5.2 Szomatikus kallusztenyészet

A lóbabnál, más növényfajokhoz hasonlóan, a növény minden részéből magas exogén auxin koncentráció hatására kallusztenyészetek indukálhatók. Az *in vitro* aszeptikus körülmények fokozása érdekében célszerű felszínileg sterilizett magvakból nevelt csíranövényekből kiindulni a kísérletek során. Vizsgálatainkban Busse-Eisenreich (1986) eredményeivel megegyezően az agar-aggarral szilárdított Knop-oldatot találtuk megfelelőnek. Az oldat egyszerű összetétele biztosította a csíranövények kielégítő fejlődését, nem volt szükséges a hozzá képest jóval összetettebb, költségesebb hormonmentes MS (Murashige-Skoog, 1962) tápközegre.

A csírázás során adagolt auxin -2,4-D- hatására fejlődött torz csíranövényekből nyert izolátumokon intenzív kalluszképződést figyeltünk meg a mezokotil és hajtáscsúcs eredetknél. Roupakias (1985) eredményeihez hasonlóan a gyökér regeneráció a kalluszindukció után nem sokkal bekövetkezett mezokotil explantátumokon. A hajtáscsúcs merisztémákból származó tenyészetek minden esetben zöld színűek és laza szerkezetűek maradtak, amiből a redifferenciációs képességre következtethetünk, míg a 2,4-D-s táptalajon csíráztatott, előkezelt növények kultúráinál kapott kompakt, sárga kalluszokon csak a már említett gyökérindukciót sikerült előidézni. A hormon előkezelés tehát kedvezően befolyásolta a kalluszindukciót, lehetővé téve ezáltal a szomatikus sejttenyészetek tanulmányozását.

Az éretlen embrió eredetű tenyészetek kedvelt objektumai a szomatikus variabilitás és a szomatikus embriógenesis vizsgálatoknak. A BAP-IES kombinációt tesztelve a 2:1 aránynál tapasztaltuk az embriogén kalluszok megjelenését. Az irodalmi adatok elsősorban a 2,4-D hasonló hatását említik (Cioni et al. 1978, Pevalek et al. 1980, Jelaska et al. 1981), önmagában vagy citokininnel -KIN, BAP- kombinált adagolással. A hormonok szomatikus embriógenesis indukcióra gyakorolt hatását éretlen embrióknál a szikleveleknél tapasztalt, az 5.1.2 fejezetben leírt magas redifferenciációs potenciállal lehet magyarázni. A két fajtát - 'Lippói', 'Kornberger'- összehasonlítva itt is a nagymagvúnál figyeltünk meg intenzíven fejlődő kultúrákat.

A lóbab szövettenyészetekben tapasztalt polifenolok okozta nekrosis kiküszöbölése céljából elsősorban aktív szenet használnak adszorbensként (Martin et al. 1979, Selva et al. 1989). Más növényfajoknál már sikerrel alkalmaztak antioxidánsot -pl. aszkorbinsav-, valamint egyéb nagy molekulásúlyú adszorbenseket -pl. PVP-. Vizsgálatunk során a maximum 100 mg/l-es PVP kiegészítést tartottuk megfelelőnek, nagyobb koncentrációknál az adszorbens csökkentette a hormonok -BAP és IES- hatását. A PVP használatát kisméretű

izolátumoknál -merisztémáknál- tartjuk célszerűnek, mivel ilyen esetben a polifenol szintézis kisebb mértékű.

A szomatikus kallusztényészetek gyakorlati jelentősége elsősorban a regenerált növények révén realizálódik. A kísérletekben csak elenyésző számban kaptunk értékelhető növényeket. A vizsgált módszerek tökéletesítése szükséges a megbízhatóság fokozása érdekében.

### 5.3 Mikroszatellit- és RAPD-PCR vizsgálat

Napjainkra több mint 50 PCR-alapú eljárást dolgoztak ki az egyedi ill. fajok közötti DNS-szintű genetikai különbségek (polimorfizmus) kimutatására. Mindhárom felhasznált módszer -RAPD-PCR, SSR-PCR és ISSR-PCR- technikailag megegyezik, az eltérés a primerek alkalmazásában van:

1. RAPD-PCR: egy 10 bázis hosszúságú, tetszőleges bázis sorrendű oligonukleotid primer kerül alkalmazásra, többnyire az OPERON cég terméke. Ezekkel a primerekkel a vizsgált genom bármely részén előforduló, az alkalmazott primerrel komplementer DNS szakaszok kimutathatók.

2. mikroszatellit-PCR:

a) az SSR-PCR során a cél az ismétlődő DNS szakaszok variabilitásának kimutatása, amely során maga a primer egy rövid, tandem ismétlődő szekvenciájú. Így pl. a  $(GACA)_4$  és  $(ACTG)_4$  primerek tehát felismerik a növényi DNS mintában levő komplementer  $(CTGT)_n$  és  $(TGAC)_n$  szakaszokat és az ezekben előforduló változékonyságot.

b) az ISSR-PCR során, az SSR-PCR módszer hiányosságait sikerült kiküszöbölni, mert egy SSR-primer egyetlen DNS szakaszcól is több másolatot készíthet, attól függően, hogy ugyanannak a mikrosatellita szakasznak melyik pontjáról kezdődik a szintézis az alkalmazott ciklusok során. Ezzel számos fragmentum (band) készülhet egyetlen szakaszcól is, mintha azok a genom különböző lókuszaik lennének. Az ISSR-primereket ezért 5', 3', vagy mindkét végükön történő meghosszabbítással (horgonyozva) elérhető, hogy a primer közvetlenül a vizsgált genom mikrosatellita szakaszának elejétől kezdje a szintetizálást. A módszer további előnye, hogy az egyes PCR-fragmentumok hosszából következtetni lehet a genom mikrosatellita lókuszaikra, mert az 5' végen meghosszabbított primerek mindig hosszabb fragmentumot eredményeznek, mint az ugyanolyan bázissorrendű, de 3'-végen meghosszabbított ISSR-primerek.

Az egy-primeres reakciókban (SPAR - Single Primer Amplification Reaction), ahova mindhárom alkalmazott módszer tartozik, annyi PCR-fragmentum képződik, amennyi helyen (lókusz) fordul elő a vizsgált genomban az alkalmazott primerrel komplementer, de különböző hosszúságú DNS szekvencia. Tehát minden PCR-fragmentum szekvencia sorrendje azonos, csak a hosszukban mutatnak eltérést. Az öt lóbab genotípussal végzett vizsgálatainkból megállapítottuk:

1. a felszaporított DNS-fragmentumok molekulatömegének változatosságát;
2. az OP/A-11, (GACA)<sub>4</sub> és (GACA)<sub>4</sub>CA primereknél kapott polimorf mintázat alkalmas fajták azonosítására, molekuláris markerek előállítására;
3. a CA(GACA)<sub>4</sub> monomorf mintázatot adott, ezáltal lehetővé teszi a lóbab és más *Vicia* fajok közötti rokonság meghatározását;
4. néhány esetben az egyedi variabilitás nagyobb volt, mint a fajták közötti eltérés, ami a faj genetikai hátterének nagyfokú plaszticitására utal.

Az elvégzett molekuláris genetikai vizsgálatok kiindulási alapul szolgálnak -újabb primerek bevonásával- a hazai lóbabfajták összehasonlításához, azonosításához, szabadalmazásához.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növénynemesítésben és -termesztésben használatos klasszikus genetikai (nemesítési) módszerek már nem mindig elégítik ki a jövő igényeit. Ennek megfelelően minőségi ugrást jelenthet a növényi biotechnológiai (sejt- és szövettenyésztési) és géntechnológiai módszerek kidolgozása, alkalmazása az abrakhüvelyes növények közül a lóbabnál (*Vicia faba* L.) is. A *Fabaceae* családba tartozó fajok szövettenyésztését a rekalcitráns (nehezen tenyészthető) szóval jellemezhetjük.

A **merisztéma eredetű *in vitro*** lóbab kultúrákban 11 fajtát teszteltünk. Közülük a nagymagvú csoportba tartozó 'Lippói'-t és 'Alfred'-ot találtuk tenyésztésre legalkalmasabbnak. A táptalaj összetevők közül a tenyészetek fejlődése szempontjából döntő jelentőségű auxinokat és citokinineket vizsgáltuk. A BAP hatását értékelve különböző auxinok függvényében megállapítottuk, hogy az optimális koncentráció 1,0 mg/l. A háromféle auxin közül kallusz indukcióra a 2,4-D-t, gyökérindukcióra a NES-t, hajtás organizációra az IES-t javasoljuk a BAP-al kombinálva. A merisztéma eredetű tenyészeteknél redifferenciáció indukciója céljából a BAP-IES kombinációt találtuk megfelelőnek. A merisztémák eredete befolyásolta a tenyészetek fejlődését. Eredményeink alapján -az összes paramétert együtt értékelve- hajtásprodukciónak szempontjából hajtáscsúcs  $\geq$  allelél  $>$  sziklevel merisztéma a sorrend. A kallusz- és gyökérindukciónak tekintve nem tapasztaltunk eltérést az egyes explantátumok között. A regenerált hajtások gyökereztetését hormonmentes MS tápközegen végeztük. Az érett, embrió nélküli lóbab szikleveleken BAP és IVS kombináció, valamint a BAP önmagában adagolva hajtás-, az IVS pedig gyökérfejlődést indukált. A nodális szegmentekre alapozott lóbab hajtás tenyészeteket vizsgálva 50 %-os gyakorisággal kaptunk gyökeres hajtásokat. A tápközegben levő aktív szén nem fokozta a gyökérindukció mértékét. A fajták között nem tapasztaltunk jelentős eltérést, azonban nagymagvú fajtacsoportba tartozó 'Lippói' gyökér regenerációja volt a leggyorsabb.

**Szomatikus kallusz tenyészeteket** indukáltunk felszínileg sterilizett magvakból, agar-agarral szilárdított Knop-oldaton nevelt csíranövényekből kiindulva. A csírázás során adagolt auxin -2,4-D- hatására fejlődött torz csíranövényekből nyert izolátumokon intenzív kalluszképződést figyeltünk meg a mezokotil és hajtáscsúcs eredeteknél. A hajtáscsúcs merisztémáknál zöld színű, laza szerkezetű kalluszsövetet kaptunk. A 2,4-D-s táptalajon csíráztatott explantátumokon kompakt, sárga kallusz fejlődött, amelyen néhány esetben gyökerek fejlődtek. A BAP-IES kombinációt tesztelve 2:1 aránynál tapasztaltuk embriogén

kalluszok megjelenését. A két fajtát -'Lippói', 'Kornberger'- összehasonlítva a nagymagvúnál figyeltünk meg intenzíven fejlődő kultúrákat. A lóbab szövettenyészetekben polifenolok okozta nekrosis kiküszöbölése céljából a maximum 100 mg/l-es PVP kiegészítést tartjuk megfelelőnek.

**Mikroszatellit- és RAPD-PCR módszerrel** végeztük el öt lóbabfajta ('Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', 'Vica') és egy nemesítési vonal ('Fehérvirágú') molekuláris jellemzését 12 oligonukleotid primerrel. A felszaporított DNS-fragmentumok molekula tömege változatos volt. Az OP/A-11, (GACA)<sub>4</sub> és (GACA)<sub>4</sub>CA primereknél kapott polimorf mintázat alkalmas fajták azonosítására, molekuláris markerek előállítására. A CA(GACA)<sub>4</sub> monomorf mintázatot adott, lehetővé téve a lóbab és más *Vicia* fajok közötti rokonság meghatározását. Néhány esetben az egyedi variabilitás nagyobb volt, mint a fajták közötti eltérés, ami a faj genetikai hátterének nagyfokú plaszticitására utal.

## SUMMARY

Traditional breeding methods used in recent classical plant breeding are not always met the demand of future needs. Elaboration and use of modern methods in plant biotechnology and gene technology for plant breeding could be a giant leap in grain legumes, such as faba bean (*Vicia faba* L.). As a member of the *Fabaceae* plant family it is one of the recalcitrant plants *in vitro*.

The effects of different culture conditions on meristem cultures of faba bean (genotypes, isolates, content of plant hormones in culture media) were examined. *In vitro* cultures were successfully initiated from the variety 'Lippói' and 'Alfred', among the tested 11 genotypes, they belong to the large-seeded variety group. After evaluation of BA combined with different auxins on meristem cultures we have stated: callus induction was made with the combination of 2,4-D, root induction was made with NAA and shoot regeneration occurred using IAA together with BA. In order to regenerate plants initiated from shoot tip and cataphyll meristems BA and IAA growth regulators are needed. The optimum concentrations are: 1.0 mg/l BA and 1.0-10 mg/l IAA. The origin of explants have an effect on *in vitro* reaction. Most of the shoots were developed on shoot tip meristem explants. Lower regeneration capability was determined on cataphyll and cotyledon meristems. There was no significant difference among the explants on callus and root production. Root induction of regenerated shoots was done on hormone-free MS medium. The combination of BA and IBA in cultures derived from mature cotyledons can successfully be implemented in micropropagation and genetic transformation as multiplied shoots were developed at different BA and IBA levels in culture media. BA alone have induced shoot development, while IBA alone was responsible for root organogenesis. The 50 % efficiency of *in vitro* cloning based on nodal segments must be improved by the modification of culture medium. Activated carbon supply was not necessary for root development. There was not any significant difference among the tested genotypes, but root regeneration was the fastest in 'Lippói' variety.

Somatic callus cultures were initiated from *in vitro* grown seedlings on agar-agar solidified Knop nutrient solution. External synthetic auxin (2,4-D) supply during *in vitro* germination led to intensive callus induction on mezocotil and shoot tip meristems. Green, friable calli were developed on shoot meristems and compact, yellow calli were obtained on



explants derived from seedlings grown on culture medium with 2,4-D. The combination of BA and IAA in 2:1 ratio increased the embryogenic type callus development in cultures derived from immature embryos. The large-seeded 'Lippói' variety have produced well growing callus cultures. In order to eliminate the effect of phenolic compounds addition of 100 mg/l PVP was useful in *Vicia faba in vitro* cell and tissue cultures.

After the study of five faba bean variety ('Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', 'Vica') and one breeding line ('Fehérvirágú') with oligonucleotid (SSR/ISSR: (GACA)<sub>4</sub>, CA(GACA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>CA and (ACTG)<sub>4</sub>; RAPD: OP/A-11, OP/B-1, OP/B-3, OP/B-5, OP/B-7, OP/B-11 and OP/B-12) primers we have stated:

- it was a molecular weight variation of the amplified DNA fragments,
  - the polymorphic patterns obtained with OP/A-11, (GACA)<sub>4</sub> and (GACA)<sub>4</sub>CA primers are suitable for identification of varieties (genotypes) and for molecular markers,
  - the monomorphic pattern of CA(GACA)<sub>4</sub> serves as a tool for the comparison of faba bean and its wild relatives,
  - sometimes the variability of single plants was higher than within genotypes: it is a sign of the high plasticity of *Vicia faba* genome.

## IRODALOMJEGYZÉK

- ABRAHAM, S., NAIR, A.S., NAIR, R.B. (1992). Cytological abnormalities induced by magnesium sulphate in callus cultures of *Vicia faba*. *Cytologia*, 57, 373-375.
- ARAGAO, F.J.L., BARROS, L.M.G., BRASILEIRO, A.C.M., RIBEIRO, S.G., SMITH, F.D., SANFORD, J.C., FARIA, J.C., RECH, E.L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 142-150.
- AUBRY, A.M., DUTUIT, P., THIELLEMENT, H., BERVILLÉ, A. (1975). Propagation végétative de la féverole (*Vicia faba*) a partir de fragments de tiges. *Ann. Amélior. Plantes*, 25, 225-229.
- BANERJI, M., CHATTERJEE, A. (1988). Effect of gamma-irradiation and subsequent recovery *in vitro*. *Cytologia*, 53, 457-463.
- BARCELO, P., MARTIN, A. (1990). The identification of faba bean (*Vicia faba* L.) trisomics by translocation tester set. *Euphytica*, 47, 45-48.
- BÄUMLEIN, H., MÜLLER, A.J., SCHIEMANN, J., HELBING, D., MANTE-UFFEL, R., WOHUS, U. (1987). A legumin B gene of *Vicia faba* is expressed in developing seeds of transgenic tobacco. *Biol. Zbl.*, 106, 569-575.
- BHOJWANI, S.S., RAZDAN, M.K. (1983). *Plant Tissue Culture: Theory and practice*. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 502.
- BHOJWANI, S.S., DHAWAN, V., COCKING, E.C. (1986). *Plant Tissue Culture: A classified bibliography*. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 789.
- BIERI, U. (1985). Sprossspitzenkultur bei der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Diss. ETH Nr. 7686. Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, 1-61.
- BINDING, H., NEHLS, R. (1978a). Regeneration of isolated protoplasts of *Vicia faba* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 88, 327-332.
- BINDING, H., NEHLS, R. (1978b). Somatic cell hybridization of *Vicia faba*+*Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.*, 164, 137-143.
- BUSSE-EISENREICH, G. (1986) *In vitro* cultivation of *Vicia faba* and induction of morphogenesis. *Biol. Zentralbl*, 105, 97-104.
- BUSSE-EISENREICH, G., KUNZE, I. (1989). Rooting method for *Vicia faba* shoots regenerated from *in vitro* propagated meri stems. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 184, 333-336.
- CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B.J., GRESHAFT, P.H. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9, 553-557.
- CHAKRABORTY, S., ROY, S.C. (1985). Effect of adenine on regeneration of *Vicia faba* in tissue culture. *Current Science, India*, 54, 758-760.
- CHIEN, A., EDGAR, D.B., TRELA, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J.Bact.*, 127, 1550-0557.
- CHUANG, C.C., OUYANG, T.W., CHIA, H., CHOU, S.M., CHING, C.K. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press, Peking, 32-65.
- CIONINI, P.J., BENNICI, A., D'AMATO, F. (1978). Nuclear cytology of callus induction and development *in vitro*. I. Callus from *Vicia faba* cotyledons. *Protoplasma*, 96, 101-112.

- CUBERO, J.I. (1974). On the evolution of *Vicia faba* L. Theor. Appl. Genet., 45, 47-51.
- DANIEL, G. (1986). Untersuchungen zur in-vitro-Vermehrung der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch, 63, 945-949.
- DEÁK, M., KISS, G.B., KONCZ, C., DUDITS, D. (1986). Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Plant Cell Reports, 5, 97-100.
- DUDITS, D., HESZKY, L. (1990). Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- DUDITS, D., HESZKY, L. (2000). Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest.
- DUDITS, D., MALIGA, P., FARKAS, G. (1979). Növényi sejtgenetikai és szövettényészeti módszerek alkalmazása. Biológiai Tanulmányok, 6, Akadémiai Kiadó, Budapest, 200.
- DUDITS, D., PRAZNOVSZKY, T. (1985). Intergeneric gene transfer by protoplast fusion and uptake of isolated chromosomes. In: ZAITLIN, M., DAY, P., HOLLANDER, A. (eds): Biotechnology in Plant Sciences, Academic Press, New York, 115-127.
- FAKHRAI, H., FAKHRAI, F., EVANS, P.K. (1989). *In vitro* culture and plant regeneration in *Vicia faba* subsp. Equina (var. Spring Blaze). J. Exp. Bot., 40., 813-817.
- FERNANDEZ-ROMERO, M.D., ORTEGA, M.D., CUBERO, J.I. (1990) Obetencion de callos a partir de hojas de *Vicia faba* L. Investigacion Agraria, Produccion y Proteccion Vegetales, 5, 193-203.
- FROLOVA, L. (1986). Cytogenetic characteristics of a cell population of *Vicia faba in vitro*. Biol. Zentralbl., 105, 105-111.
- FUCHS, J., PICH, U., MEISTER, A., SCHUBERT, I. (1994). Differentiation of field bean heterochromatin by *in situ* hybridization with a repeated Fok I sequence. Chromosome Res., 2, 25-28.
- GALZY, R., HAMOUI, M. (1981). Induction de l'organogénese sur des cals de *Vicia faba* minor provenant d'apex. Canad. J. Bot., 59, 203-207.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50, 151-198.
- GEBRE-MEDHIN, G., TRÄNKNER, A., WELTZIEN, H.C. (1988). *In vitro* regeneration of *Vicia faba* L. FABIS Newsletter, 21, 14-16.
- GOLYSHKINA, L.V., GOLYSHKIN, L.V. (1987). Culturing isolated anthers of faba beans in relation to haploid induction. Gametnaya i zigotnaya selektsiya rastenii. Respublikanskaya konferentsiya, 23 iyunya, 1986., 145-147.
- GRANT, M.E., FULLER, K.W. (1968). Tissue culture of root cells of *Vicia faba*. J. Exp. Bot., 19, 667-680.
- GRIGA, M. (1988). Studium rozdielu v regeneracni schopnosti u ruznych genotypu *Vicia faba* L. v meristemove kulture *in vitro*. Rostlinna Vyroba, 34, 613-626.
- GRIGA, M., KLENOTICOVA, H. (1994). Plant regeneration in callus cultures of faba bean (*Vicia faba* L.). Rostlinna-Vyroba, 40, 697-709.
- GRIGA, M., KUBALÁKOVÁ, M., TEJKLOVÁ, E. (1987). Somatic embryogenesis in *Vicia faba* L. Pl. Cell Tiss., 9, 667-680.
- GYULAI, G., DWEIKAT, I., JANOVSZKY, J., OHM, H., KISS, E., SHARMA, H., HESZKY, L.E. (1996). Application of ISSR/SSR-PCR for genome analysis of *Agropyron*, *Bromus*, and *Agropyron* × *Bromus*. Proc. 20<sup>th</sup> EUCARPIA Congress, 25-30.
- HAGEGE, D., HAGEGE, I. (1985). Isolement de protoplastes du mesophylle de *Vicia faba* L. Effet de differents facteurs du milieu d'incubation sur le nombre de protoplastes obtenus. Actes de l'Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II, 5, 7-11.

- HAMMAD, A.H.A. (1996). Regeneration of some bean cultivars via *in vitro* organogenesis after irradiation by gamma rays. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 34, 1117-1122.
- HAMMATT, N., GHOSE, T.K., DAVEY, M.R. (1986). Regeneration in Legumes. In: VASIL, I.K. (ed.): *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. 3. *Plant Regeneration and Genetic Variability*. Academic Press Inc., Orlando, 67-95.
- HELLER, R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.*, 14, 1-223.
- HERSCOVICH, S., TALLMAN, G., ZEIGER, E. (1992). Long-term survival of *Vicia* guard cell protoplasts in cell culture. *Plant Science*, 81, 237-244.
- HESZKY, L., DUDITS, D. (szerk.) (1986). *Növényi biotechnológia. A 2. Növényi Sejtgenetikai és Szövettenyésztési Szimpózium előadásai*. OMIKK-OMFB, Budapest.
- HESZKY, L., MOLNÁR, Z., MANNINGER, S. POCSAI, K., HOLLY, L. (1988). A biotechnológiai módszerek kutatásának és alkalmazásának helyzete a lóbab (*Vicia faba* L.) nemesítésében. *Növénytermelés*, 37, 71-81.
- HINCHEE, M.A.W., CONNOR-WARD, D.V., NEWELL, C.A., MCDONNELL, R.E., SATO, S.J., GASSER, C.S., FISCHHOFF, D.A., RE, D.B., FRALEY, R.T., HORSCH, R.B. (1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Tech*. 6, 915-921.
- HU, J., QUIROS, C. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.*, 10, 505-511.
- IVERS, D.R., PALMER, R.G., FEHR, W.R., (1974). Anther culture in soybeans. *Crop Sci.*, 14, 891-893.
- JÄKEL, L., KNÖSCHE, R., GÜNTHER, G. (1990). Zytologische Untersuchungen an Gewebekulturen von *Pisum sativum* L. und *Vicia faba* L., kultiviert auf herbizidhaltigen Selektivmedien. *Biol. Zentralbl.*, 109., 159-167.
- JÁNOSSY, A. (szerk.) (1971). *A Vicia-fajok termesztése és nemesítése (bükkönytermesztés)*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 247.
- JELASKA, S., PEVALEK, B., PAPES, D., DEVIDÉ, Z. (1981). Developmental aspects of long-term callus culture of *Vicia faba* L. *Protoplasma*, 105, 285-292.
- JELENIC, S., MITRIKESKI, P.T., PAPES, D., JELASKA, S. (2000). *Agrobacterium*-mediated transformation of broad bean *Vicia faba* L. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 167-172.
- JHA, T.B., ROY, S.C. (1982). Chromosomal behaviour in cultures of *Vicia faba*. *Cytologia*, 47, 465-470.
- KAJDI, F. (2001). Lóbab. In: *Alternatív növények termesztése I. Szerk.: Radics L., Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest*.
- KAO, K.N., MICHAYLUK, M.R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajstana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* (Berl.), 126, 105-110.
- KHALAFALLA, M.M., HATTORI, K. (2000). Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. *Plant Growth Regulation*, 32, 59-63.
- KNOP, W. (1865). *Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen*. *Landw. Vers. Sta.*, 7, 93.
- LAZARIDOU, T.B., ROUPAKIAS, D.G., ECONOMOU, A.S. (1993). Embryo rescue in *Vicia faba* and *Vicia narbonensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 297-301.
- LI, Y.G., TANNER, G.J., DELVES, A.C., LARKIN, P.J. (1993). Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (alfalfa, lucerne) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin). *Theor. Appl. Genet.*, 87, 455-463.

- LINK, W., DIXKENS, C., SINGH, M., SCHWALL, M., MELCHINGER, A.E. (1995). Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 27-32.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
- MANTE, S., SCORZA, R., CORDTS, J. (1989). A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv. Bragg. *In Vitro Cell. Biol.*, 25, 385-388.
- MARÓTI, M. (1976). A növényi szövettenyésztés alapjai. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- MARÓTI, M. (1981). A növényi szövettenyésztés biológiája. in: CSABA, GY. (szerk.): A biológia aktuális problémái. 23, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 95-174.
- MARTIN, C., CARRÉ, M., DUC, G. (1979). Note sur les cultures de tissus de féverole (*Vicia faba* L.). Bouturage, culture de cals, culture de méristèmes. *Ann. Amélior. Plantes*, 29, 277-287.
- MESTER, Zs. (1998). A zöld pántlikafű (*Phalaris arundinacea* L.) szomaklónok szelekciója és genetikai jellemzése. Diplomadolgozat, GATE MTK, Gödöllő.
- MINOL, K. (1996). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Gassen K.G., Gentechnik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, 292-298.p.
- MITCHELL, J.P., GILDOW, F.E. (1975). The initiation and maintenance of *Vicia faba* tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 34, 250-253.
- MOHAMED, M.F., READ, P.E., COYNE, D.P. (1992). Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 117, 668-672.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, XX, 335-350.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- MÜNTZ, K., BÄUMLEIN, H., BASSÜNER, R., MANTENFELL, R., PÜCHEL, H., SCHMIDT, P., WEBER, E., WOBUS, U., (1980). Biosynthesis and deposition of globulin in the cotyledons of developing *Vicia faba* seeds. in: Abstract 6<sup>th</sup> EMBO Annual Symp. Heidelberg, 21-22.
- NENZ, E., PUPILLI, F., DAMIANI, F., ARCIONI, S. (1996). Somatic hybrid plants between the forage legumes *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 183-189.
- OELCK, M.M., SCHIEDER, O. (1983). Genotypic differences in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 91, 312-321.
- PAN, C.G., ZHAO, Z.S., ZHAO, C.S., CHEN, D.X. (1986). The effect of concentrations of hormones in combination on the culture of leaves *in vitro* from broad bean. *J. Shanghai Agr. Coll.*, 4, 107-114.
- PAN, C.G., ZHAO, Z.S., ZHAO, C.S., HUANG, D.L., CHEN, D.X. (1985). *In vitro* culture of leaves from broad bean. *J. Shanghai Agr. Coll.*, 3, 105-106.
- PAPES, D., JELASKA, S., PEVALEK, H., TOMASEO, M., DEVIDÉ, Z. (1978). Triploidy in callus culture of *Vicia faba* L. investigated by the Giemsa-1-banding technique. *Experimentia*, 34, 1016-1017.
- PARATASILPIN, T. (1984). A note on haploidy. in: CHAPMAN, G.P., TARAWALI, S.A. (eds.): Systems for cytogenetic analysis in *Vicia faba* L. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht-Boston-Lancaster, 145-148.
- PEVALEK, B., JELASKA, S., PAPES, D., DEVIDÉ, Z. (1980). Growth regulators requirement for the initiation of *Vicia faba* callus tissue. *Acta Bot. Croat.*, 39, 51-57.

- PHILLIPS, G.C., COLLINS, G.B. (1979). *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.*, 19, 59-64.
- PICH, U., SCHUBERT, I. (1993). Polymorphism of legumin genes in inbred lines of *Vicia faba*. *Biol. Zent. Bl.*, 112, 342-350.
- PUPILLI, F., BUSINELLI, S., CARCERES, M.E., DAMIANI, F., ARCIONI, S. (1995). Molecular, cytological and morpho-agronomical characterization of hexaploid somatic hybrids in *Medicago*. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 347-355.
- RAINA, S.N., OGIHARA, Y. (1995). Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in 49 *Vicia* species. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 477-486.
- RAMSAY, G., KUMAR, A. (1990). Transformation of *Vicia faba* cotyledon and stem tissues by *Agrobacterium rhizogenes*: infectivity and cytological studies. *J. Exp. Bot.*, 41, 841-847.
- REDA, A.A., EL-KAZZAZ, A.A., GHANEM, S.A., EL-BAHR, M.K. (1997). A study of some factors affecting callus induction of Egyptian *Vicia faba* L. in tissue culture. *Bulletin of the National-Research Centre Cairo*, 22, 189-199.
- REITER, R.S., WILLIAMS, I., FELMANN, K., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 1477-1481.
- ROUPAKIAS, D.G. (1985). Callus formation and plant regeneration from explants of *Vicia faba* L. and *Vicia narbonensis* L. *FABIS Newsletter*, 11, 9-11.
- ROUPAKIAS, D.G. (1986). Interspecific hybridization between *V. faba* and *V. narbonensis*: prospects and limitations. in: HORN, W., JENSEN, C.J., ODENBACH, W., SCHIEDER, O. (eds.): *Genetic manipulation in plant breeding*. Walter de Gruyter and Co., Berlin-New York, 203-205.
- RÖPER, W. (1979). Growth and cytology of callus and cell suspension cultures of *Vicia faba* L. *Z. Pflanzenphysiol*, 93, 245-257.
- RÖPER, W. (1981). Callus formation from protoplasts derived from cell suspension cultures of *Vicia faba* L. *Z. Pflanzenphysiol*, 101, 75-78.
- SAKER, M.M., REDA, A.A., MOHAMED, A.E., EL-BAHR, M.K., EL-KAZZAZ, A.A. (1999). Induction of embryogenic callus and plant regeneration in faba bean. *Egyptian Journal of Agronomy*, 21, 87-97.
- SALBACH, I., WADDELL, D., PICKARDT, T., SCHIEDER, O., MÜNTZ, K. (1995). Stable expression of the sulphur-rich 2S albumin gene in transgenic *Vicia narbonensis* increases the methionine content of seeds. *J. Plant Physiol.*, 145, 674-681.
- SAMBROOK, J., FITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor - New York.
- SAYEGH, A.J. (1988). A protocol for faba bean (*Vicia faba* L.) micropropagation from seedlings. *FABIS Newsletter*, 21, 12-13.
- SCHENK, R.V., HILDEBRANDT, A.C. (1972). Medium and techniques for the induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50, 199-204.
- SCHIEHMANN, J., EISENREICH, G. (1989). Transformation of field bean *Vicia faba* L. cells: expression of a chimaeric gene in cultured hairy roots and root-derived callus. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 185, 135-140.
- SCHNABL, H., MAHAWORASILPA, T.L., COSTER, H.G.L., KELLER, A. (1998). Production of hybrid cells from single protoplasts of sunflower hypocotyl and broad bean guard cells by electrical fusion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55, 59-62.
- SCHULZE, S., GRUNEWALDT, J., SCHMIDT, H. (1985). Zur *in vitro* Regeneration von *Vicia faba* L. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 94, 244-250.

- SELVA, E., STOUFFS, B., BRIQUET, M. (1989). *In vitro* propagation of *Vicia faba* L. by micro-cutting and multiple shoot induction. *Pl. Cell Tiss.*, 18, 167-179.
- SVÁB, J. (1981). Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 557.
- TAHA, R.M., FRANCIS, D. (1990). The relationship between polyploidy and organogenetic potential in embryo- and root-derived tissue cultures of *Vicia faba* L. *Pl. Cell Tiss.*, 22, 229-236.
- TAO, Y.M. (1991). Study of the effect of NAA on seed callus induction of *Vicia faba* L. *J. Shanghai Agric. Coll.*, 9, 113-119.
- TEGEDER, M., GEBHARDT, D., SCHIEDER, O., PICKARDT, T. (1995). Thidiazuron induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos. In: *Proc. 2<sup>nd</sup> Eur. Conf. Grain Legumes*, AEP, 430-431.
- TEJKLOVÁ, E., GRIGA, M., NOVÁK, F.J. (1984). Hormonální regulace rustu vzrostných vrcholu bobu obecného (*Vicia faba* L.) v kultuře *in vitro*. *Rostlinná. Vyroba*, 30, 543-550.
- THYNN, M., WERNER, D. (1987). Plantlet regeneration and somatic differentiation in faba bean (*Vicia faba* L.) from callus culture of various explants. *Angewandte-Botanik*, 61, 483-492.
- THYNN, M., WOLFF, A., GÖRGE, E., WERNER, D. (1989). Low concentration of phytoalexins correlate with resistance in regenerated plants from meristem cultures of *Vicia faba* L. *Z. Naturforsch.*, 44c, 237-242.
- TORRES, A.M., WEEDEN, N.F., MARTIN, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 937-945.
- VAN HEUSDEN, A.W., BACHMANN, K. (1992). Genotype relationships in *Microseris-Elegans* (*Asteraceae*, *Lactuceae*) revealed by DNA amplification from arbitrary primers RAPDs. *Plant. Syst. Evol.*, 179, 221-233.
- VASIL, I.K. (ed.) (1986). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press, Orlando-San Diego- New York-Austin-London-Montreal-Sydney-Tokyo-Toronto, 657.
- VASIL, I.K. (ed.) (1984). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 1. Laboratory procedures and their applications. Academic Press, Orlando-San Diego- New York-Austin-London-Montreal-Sydney-Tokyo-Toronto, 825.
- VASIL, I.K. (ed.) (1985). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 2. Cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation. Academic Press, Orlando-San Diego- New York-Austin-London-Montreal-Sydney-Tokyo-Toronto, 330.
- VENKETESWARAN, S. (1962). Tissue culture studies of *Vicia faba* L. I. Establishment of culture. *Phytomorphology*, 12, 300-306.
- VENKETESWARAN, S. (1963). Tissue culture studies of *Vicia faba* L. II. Cytology. *Caryologia*, 16, 91-100.
- WEI, Z.M., XU, Z.H. (1993). Plant regeneration from protoplasts of immature cotyledons of *Vicia faba*. *Plant Physiology Communications*, 29, 17-19.
- WILLIAMS, J.G., KUBLIK, A.R., LIUAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18, 6531-6535.
- YAMAMOTO, K.C. (1984). A note on interspecific hybridization between *Vicia narbonensis* and its related species. in: CHAPMAN, G.P., TARAWALI, S.A. (eds.): *Systems for cytogenetic analysis in Vicia faba* L. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht-Boston-Lancaster, 141-142.
- ZAGORSKA, N., DIMITROV, B. (1995). Induced androgenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell Reports*, 14, 249.

- ZHANG, D.L., LIN, J. LIU, L., LI, L. (1986). Callus induction, culture and chromosome aberration of *Vicia faba*. Acta Genetica Sinica, 13, 423-429.
- ZIETKIEWICZ, E, RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction. Genomics, 20, 176-183.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának, hogy lehetővé tette az értekezés munkáinak elvégzését.

Köszönettel tartozom Prof. Ördög Vince, egyetemi tanár, dékánnak, a Növényélettani és Növényi Biotechnológia Tanszék vezetőjének a dolgozatban leírt kísérleti körülmények biztosításáért.

Köszönetem fejezem ki Dr. Gyulai Gábor, egyetemi docensnek, a biológiai tudomány kandidátusának, témavezetőmnek a kísérletek elvégzése és értékelése, valamint az értekezés elkészítése során nyújtott segítségért.

Köszönöm Heszky László, az MTA levelező tagjának, a Szent István Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszéke és a Növénynevelés és Biotechnológia Doktori Program vezetőjének, hogy a program keretében lehetővé tette a PhD értekezésem elkészítését.

Végül, de nem utolsósorban, ezúton köszönöm a NYME MÉK Növényélettani és Növényi Biotechnológia Tanszék, valamint a SZIE Genetika és Növénynevelés Tanszék valamennyi dolgozója segítségét.