Szent István Egyetem
Gödöllő

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

Doktori értekezés tézisei

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 Növénynemesítés Tanszék,
Gödöllő, 2103

Doktori program

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

Témavezető:

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

Gödöllő, 2002.

Jóváhagyta:

……..	…….
Dr. Virányi Ferenc, DSc	Dr. Gyulai Gábor egyetemi docens
iskolavezető	témavezető

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A lóbab (*Vicia faba* L.) az egyik legrégebben termesztett kultúrnövény. 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 biotechnológiát megalapozó ismeretek részleges hiánya, a gazdasági jelentőségből fakadó perifériks helyzete végül is azt eredményezte, hogy napjainkban kevés kísérletes eredményt közöltek a lóbab biotechnológiájával kapcsolatban. Abból a célból, hogy a génsebészeti, 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. A lóbab esetében gyakorlatban is alkalmazható, kész növény – sejt – növény rendszerekkel egyik ploidszinten sem rendelkezünk.

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. 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 kapcsoltsági fokának megállapítására rendelkezésre állnak RFLP és PCR markerek. A hazai, köztermesztésben levő fajtákról azonban még nincs információ e téren.

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 sejtkultúrák (kallusztenyészetek) létesítése;*
- *PCR-technikára alapozott genom összehasonlítás néhány genotípusnál.*

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Merisztématenyésztés

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 Termesztés-technológiai Állomásáról származtak. A hajtáscsúcs merisztémákat *in vitro* nevelt csíra-növényekből izoláltuk. A csíráztatás előtt meghámoztuk a rnagvakat a maghéjban felhalmozódott fenolvegyületek kiküszöbölése céljából. Csíráztatásra agarral szilárdított Knop-oldatot használtunk. A növényeket 5-6 napig, 16 órás megvilágítással, 125 $\mu M/m^2/s$ fényintenzitáson, 24±1 °C-on neveltük. Táptalajként B5-t (Gamborg-1968) használtunk 0,5 μM/1 BAP, 2 % szacharóz és 0,8 % agar kiegészítéssel. A pH-értéket autoklávozás előtt 5,8-ra állítottuk be. A hajtáscsúcsból kipreparált 1-1,5 mm-es merisztémákat üveg-ampullákban levő táptalaj felszínére tettük, majd a csíráztatás során alkalmazott körülményeken inkubáltuk. Értékeltük a tenyészetek minőségi változásait: bonitáltuk a hajtás- és kallusz növekedést, mértük a friss tömeget.

A következő kísérletünkben az *in vitro* tenyésztésre, legalkalmasabb genotípussal ('Lippói') teszteltük a különböző hormonösszetételű táptalajokat. Aszeptikusan nevelt 5-6 napos csíranövényekből izoláltunk hajtáscsúcs, allevél és sziklevél merisztémákat. Tápközeg: MS (Murashige-Skoog-1962) alaptáptalaj, citokininnel (BAP) és auxinokkal (IES, NES, 2,4-D), 3 % szacharózzal és 0,8 % agarral kiegészítve. Minden egyes hormont 0 – 0,1 – 1,0 – 10 mg/1-es törnénységben használtunk. Az auxinokat az összes lehetséges módon kombináltuk a BAP-nal, így 46-féle tápközeget vizsgáltunk. A sterilezést fentieknek megfelelően végeztük. A kipreparált 1-1,5 mm-es merisztémákat üvegampullákban levő táptalaj felszínére tettük, majd inkubáltuk őket az előző kísérletben leírt körülményeken. Az értékelés során mértük a friss tömeget, a kezelésenkénti hajtásszámot, bonitáltuk a kultúrák fejlettségét és megállapítottuk az optimális citokinin-auxin kombinációt.

Mivel az érett sziklevél eredetű kultúráknál járulékos merisztémákból történt a hajtás-organizáció, ezért ezt is itt említjük meg. Vizsgálatunkban a 'Lippói' fajtát használtuk. A magokat felszínileg sterileztük, majd 24 órán át steril desztillált vízben áztattuk. A maghéj eltávolítása után óvatosan elkülönítettük egymástól a két sziklevelet, majd levágtuk róluk az embriót. Az explantátumokat üvegampullákban levő B5 táptalajra izoláltuk, 2 % szacharóz, 0,8 % agar és különböző koncentrációjú BAP, valamint IVS kiegészítéssel. A

tápközeget autoklávozással sterileztük, előtte a pH-értéket 5,8-ra kalibráltuk. A tenyészeteket -fejlődéstől függően- 6-8 hétig inkubáltuk. 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) gyökereztettük. Gyökereztetés után a növényeket Knop-oldattal átitatott perlitben edzettük a talajba kiültetés előtt, 3-4 hétig, 20-22 °C-on, 16 órás megvilágítással. A vizsgálatok adatait variancia-analízissel értékeltük.

2.2 Hajtástenyésztés

Kísérletünkben három fajtát használtunk ('Lippói', 'Kornberger', 'Óvári-137'). Aszeptikusan nevelt (2.1 pont) 5-6 napos csíranövények szárát elvágtuk a második nódusz alatt, amikor a harmadik internódium láthatóvá vált. A hajtáscsúcsot, valamint a kétnóduszos szárat külön-külön gyökereztető tápközegre tettük. A táptalaj módosított MS volt (MS makro-, Heller mikroelemek), 0,186 mg/1 (1 μM) NES, 10 g/1 aktív szén, 3 % szacharóz és 0,8 % agar kiegészítéssel. Vizsgáltuk még az MS alaptáptalajt is a fenti kiegészítőkkel. A tápközeget üvegampullákba és 100 ml-es bőszájú Erlenmeyer-lombikokba adagoltuk. Autoklávozás előtt a pH-értéket 5,8-ra állítottuk be. A szervtenyészeteket 16 órás megvilágítással, 125 $\mu M/m^2/s$ fényintenzitáson, 24±1 °C-on 7-8 hétig inkubáltuk, a gyökérfejlődés intenzitásától függően. A tenyésztési idő elteltével értékeltük a gyökérorganizáció gyakoriságát.

2.3 Kallusztenyésztés

Különböző izolátumokat és táptalajokat teszteltünk. Elsőként a már ismertetett módon steri1ezett, hámozott magokat csíráztattuk *in vitro* négyféle táptalajon, melyek MS makro- és mikroelemeket; az előbbit és 3 mg/1 2,4-D-t; Knop-oldatot; valamint sterilezett csapvizet tartalmaztak, 1 % agarral 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 és B5 táptalajokra izoláltuk, amelyek 0,2 mg/1 BAP-t és 1,0 mg/1 2,4-D-at tartalmaztak, 10 g/l aktív szénnel és 0,8 % agarral kiegészítve. A kész, autoklávozott tápközegeket üvegampullákba adagoltuk, előtte a pH-értéket 5,8-ra kalibráltuk. A 4 hétig tartó tenyésztés során folyamatosan értékeltük a tenyészetek minőségi változásait.

A következő kísérletben üvegházban nevelt 'Lippói', és 'Kornberger' fajták 4-7 mm-es éretlen zöld magvaiból izolált embriókból indukáltunk kultúrákat. A zöld hüvelyeket felszínileg sterileztük, kipreparáltuk az embriókat. Táptalajként MS-t használtunk, 3 % szacharóz és 0,8 % agar kiegészítéssel. A növekedés szabályozók közül BAP-t és IES-at 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. Az embriókat sötétben, 24±1 °C-on, 6 hétig inkubáltuk, majd mértük a kultúrák friss tömegét, értékeltük minőségi változásaikat.

Harmadik kísérletünkben a polivinil-pirrolidon (PVP), hatását vizsgáltuk lóbab szövettenyészetekre. *In vitro* nevelt csíranövények hajtáscsúcs, allevél és sziklevél merisztémáiból, valamint epi-, mezo- és hipokotil régióiból indukáltuk a tenyészeteket. MS táptalajt használtunk 3 % szacharóz, 0,8 % agar, 0,175 mg/l IES és 2,25 mg/l BAP kiegészítéssel. Az adagolt PVP mennyisége 0 – 10 – 100 – 500 – 1000 és 2000 mg/l volt. Nyolc hétig inkubáltuk a tenyészeteket, majd mértük a friss tömeget, értékeltük a tenyészetek hajtás és kallusz produkcióját. Az adatokat variancia-analízissel értékeltük.

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 friss, fiatal levelek (kb. 1 g) présnedvéből 2-merkaptoetanolos kivonó pufferrel. DNS extrakció: 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 $MgCl_2$,

(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 16-18 bp hosszúságú primereket: $(GACA)_4$, $CA(GACA)_4$, $(GACA)_4CA$, $(ACTG)_4$, 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 reakciót követően a PCR-ezett mintákat agaróz-gélelektro-

forézissel szeparáltuk. A gélek kiértékelésénél csak a vizuálisan jól elkülönülő, karakteresen megjelenő DNS sávokat vettük figyelembe.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A genotípus hatása a hajtáscsúcs *in vitro* fejlődésére

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).

3.2 A 6-benzil-amino-purin (BAP) és auxinok hatása a különbő eredetű merisztémák fejlődésére

3.2.1 A BAP hatása a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D) jelenlétében

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 kombinációk, valamint a két hormon között P = 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikáns különbséget találtunk. 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-t tartalmazó tápközegen nem tapasztaltunk hajtás multiplikációt. A kombinációk, valamint a két hormon között P = 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések. A *hajtásfejlettség* adataiból kitűnt 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). A kezeléseket tekintve itt is P = 0,1 %-os szinten szignifikáns az eltérés, de a két hormon között már nem tapasztalható különbség. Az átlagadatok alapján mindhárom -hajtáscsúcs, allevél és sziklevél- merisztémát figyelembe véve az 1,0 mg/l-es BAP kiegészítés volt a leghatásosabb a 2,4-D függvényében.

3.2.2 A BAP hatása az α-naftilecetsav (NES) jelenlétében

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). Mind a kombinációk, mind pedig a BAP kezelések között a NES átlagában P = 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikáns a különbség. 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 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 kezeléseket tekintve itt is P = 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikáns az eltérés, de a két hormon között már csak P = 10 %-os szinten. Mindhárom merisztémánál az 1,0 mg/l-es BAP kiegészítés volt a legjobb a NES függvényében.

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

A legnagyobb *friss tömeget* a sziklevél 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. A legtöbb *hajtást* az 1,0 mg/l BAP-t és 10 mg/l IES-t 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. 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. Az egyes kombinációk között P = 0,1 %-os, a két növekedés szabályozó között P = 5 %-os szinten szignifikáns a különbség. A merisztémákat együttesen értékelve az 1,0 mg/l-es BAP kiegészítés volt a leghatásosabb az IES függvényében.

3.2.4 A hajtáscsúcs, allevél és sziklevél merisztémák fejlődése in vitro

Az előzőekben 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. A magas citokinin és magas auxin koncentrációnál több hajtást kaptunk a kontrollal összehasonlítva, a hajtások alapi részén intenzív kalluszosodást is megfigyeltünk. 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 hormon-kombinációk, sem az egyes explantátumok között. A szervorganizációval összehasonlítva a kalluszindukciókat legnagyobb eltérést a 2,4-D-t tartalmazó táptalajokon tapasztaltunk.

3.3 Kallusz- és organogenezis indukció érett sziklevél tenyészetekben

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. 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. 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±2,6 db) az 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IVS koncentrációknál, legkevesebbet (1,3±0,5 db) az 1,5 mg/l IVS koncentrációnál kaptuk. A gyökérképzés szempontjából legjobbnak a 0,5 mg/l IVS-at (3,0±2,1 db), legrosszabbnak a 0,5 mg/l BAP-t és 0,5 mg/l IVS-at (1,1±0,3 db) tartalmazó táptalajt tartjuk. A friss tömegeket értékelve P = 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az

eltérések a kezelések között. 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.

3.4 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 allevélrügy) hajtás fejlődött a legtöbb tenyészetben. Gyakori volt a szár megfeketedése (nekrózisa), a fenolok oxidációja miatt. Lényeges eltérést nem tapasztaltunk 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.

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

3.5 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. Életképes növényeket kaptunk a hormonmentes táptalajokon, a legnagyobb csírázási százalékot (98,0 %) a Knop-oldaton figyeltük meg. A csíráztató tápközegbe adagolt 2,4-D hatására a 10-14 nap alatt fejlődött növények erősen deformáltak voltak. Mind a mezokotil, 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 mezokotil szegmentek kalluszindukciós gyakorisága meghaladta a hajtáscsúcsokét. A friss tömegeket értékelve P = 0,1 %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések. A tenyészetek indítása előtt adagolt auxin hatására jelentősen nőtt a kultúrák tömege. A kalluszszövet 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.

Következő kísérletünkben 'Lippói' és 'Kornberger' fajták éretlen embrióiból indukáltunk tenyészeteket, a merisztéma tenyésztésnél legjobbnak talált BAP-IES hormonkombinációval. 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 el-kalluszosodtak. Az alacsony BAP és magas IES szintek hatására laza szerkezetű kalluszszövet fejlődött az izolátumokon, míg a magas BAP és alacsony IES koncentrációk tömörebb kalluszt indukáltak. A szomatikus embriógenezisre utaló embriogén gömbök megjelenését a BAP:IES = 2:1 aránynál tapasztaltunk.

Az egyes hormonhatások vizsgálata után a tápközegbe adagolt adszorbenst teszteltük. A lóbab szövettenyészeteknél problémát jelentenek a különbözö fenolszármazékok, melyek az izolátumok, vagy a tenyészetek nekrózisához vezetnek. Kísérletünkben a nagy molekula súlyú (~40000) PVP adszorbens különböző koncentrációit használtuk. A hajtásprodukciót tekintve mindhárom merisztémánál a 100 mg/1 PVP adta a legtöbb hajtást: hajtáscsúcs- 2,6±1,3 db; allevél- 1,6±1,1 db; sziklevél- 1,8±1,8 db. A friss tömeg adatokat értékelve a merisztémáknál P = 5 %-os valószínűségi szinten szignifikánsak az eltérések az egyes kezelések, valamint PVP koncentrációk között.

3.6 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, 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 jelezte, egy rendkívül rövid, kb. 250 bp hosszú fragmentumtól a közel 1400 bp hosszúságú fragmentekig. A legmonomorfabb mintázatot az OP/B-11 primer három fragmentummal mutatta. Rendkívül magas fragmentum számot eredményezett az OP/A-11 és OP/B-5. A legmegbízhatóbb polimorfizmust az OP/A-11 primerrel sikerült kimutatni. A mikroszatellita primerek alkalmazásával közel azonos fragmentum számot sikerült kimutatni, mint a RAPD primerekkel. A módszer érzékenységét mutatja, hogy szinte mindegyik mikroszatellita primerrel sikerült eltérő DNS mintázatot meghatározni. A legvariabilisabb mintázatot a 'Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', mutatja, nemcsak az operon, hanem a mikroszatellita primerek tekintetében. Az ISSR mikroszatellita

primerekkel végzett elemzések közül a CA(GACA)$_4$ primerrel egyértelmű monomorf, míg a (GACA)$_4$CA primerrel polimorf mintázatot kaptunk. Hasonló variabilitásra utal az OP/A-11 operon és a (GACA)$_4$ SSR primer. A sávmintázatok elemzése során kitűnt, hogy a RAPD primerek esetében a 2-300 bp-tól csaknem 1400 bp-ig terjed fragmentumok hossza, míg a mikroszatellita primerek által felismert lókuszok csak elvétve érik el, ill. haladják meg az 1000 bp-t. Néhány esetben az egyes genotípusokon belül a minták között is eltéréseket kaptunk, ami a növények egyedi variabilitására utalt.

3.7 Új tudományos eredmények

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 gyökereztettük.

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 sziklevelek *in vitro* kultúráiban:

Az érett sziklevél 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: $(GACA)_4$, $CA(GACA)_4$, $(GACA)_4CA$, $(ACTG)_4$; 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, $(GACA)_4$ és $(GACA)_4CA$ primereknél kapott polimorf mintázat alkalmas fajták azonosítására, molekuláris markerek előállítására;
- a $CA(GACA)_4$ 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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1 Merisztéma és hajtáskultúrák

4.1.1 Merisztéma

A *Fabaceae* családba tartozó fajok szövettenyészeteiből történő növény regenerációját 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.

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. 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 a merisztéma eredetű tenyészeteknél a redifferenciáció indukciója céljából. Kísérleteinkben a BAP-IES kombinációt találtuk megfelelőnek. A merisztémák eredete hatást gyakorolt a tenyészetek fejlődésére, hajtásindukciójára. A vizsgálatok eredményei alapján -az összes paramétert együtt értékelve- a hajtásprodukció szempontjából hajtáscsúcs >= allevél > 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 megfelelőnek találtuk.

4.1.2 Sziklevél

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 sziklevél 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- 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. sziklevél merisztéma- szövetek transzformációját. A fentiekben leírt módszer megfelelő alapot ad pl. a herbicid rezisztens növények előállítására.

4.1.3 Nodális szegment

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.

4.2 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 sterilezett magvakból nevelt csíranövényekből kiindulni a kísérletek során, amelyeket agar-agarral szilárdított Knop-oldaton csíráztatunk. Az oldat egyszerű összetétele biztosította a csíranövények kielégítő fejlődését, nem volt szükséges a hozzá képest jóval összetettebb, költségesebb hormonmentes MS tápközegre.

A csírázás során adagolt auxin -2,4-D- hatására fejlődött torz csíranövényekből nyert izolátumokon intenzív kalluszképződést figyeltünk meg a mezokotil és hajtáscsúcs eredeteknél. 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-as 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 embriógenezis 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, önmagában vagy citokininnel -KIN, BAP- kombinált adagolással. A hormonok szomatikus embriógenezis indukcióra gyakorolt hatását éretlen embrióknál a szikleveleknél tapasztalt, az 4.1.2 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 nekrózis kiküszöbölése céljából elsősorban aktív szenet használnak adszorbensként. Más növényfajoknál már sikerrel alkalmaztak antioxidánsot -pl. aszkorbinsav-, valamint egyéb nagy molekulasúlyú 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 kallusztenyészetek 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.

4.3 Mikroszatellit- és RAPD-PCR vizsgálat

Öt lóbabfajta ('Jasny II', 'Lippói', 'Minor', 'Óvári-137', 'Vica') és egy nemesítési vonal ('Fehérvirágú') molekuláris jellemzését végeztük el 12 oligonukleotid primerrel. Vizsgálatainkból megállapítottuk:

1. a felszaporított DNS-fragmentumok molekulatömegének változatosságát;

2. az OP/A-11, $(GACA)_4$ és $(GACA)_4CA$ primereknél kapott polimorf mintázat alkalmas fajták azonosítására, molekuláris markerek előállítására;

3. a $CA(GACA)_4$ 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.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

5.1 Folyóirat cikkek

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.

Molnár,Z. (1991). Borsó (*Pisum sativum* L.) szövettenyésztési vizsgálatok. I. Genotípusok in vitro tesztelése. Acta Ovariensis, 33., 11-19.

Molnár,Z. (1991). Borsó (*Pisum sativum* L.) szövettenyésztési vizsgálatok. II. Auxinok hatása a gyökérindukcióra. Acta Ovariensis, 33., 3-9.

Molnár,Z. (1993). Az *in vitro* mikroszaporítási módszerek jelentõsége a lóbab (*Vicia faba* L.) és borsó (*Pisum sativum* L.) nemesítésében. Acta Agronomica Óváriensis, 35., 119-123.

Molnár,Z. (1998). The effect of culture media and explant type on the in vitro cultures of peas (*Pisum sativum* L.). Acta Agronomica Óváriensis, 40., 1-6.

5.2 Konferenciák

Molnár,Z. (1991). Lóbab (*Vicia faba* L.) szövettenyésztési vizsgálatok. Magyar Tudományos Akadémia Növénynemesítési Bizottsága, "A biotechnológiai eredmények alkalmazásának helyzete a magyar növény-nemesítésben" Szimpózium (Budapest) 1991. november 28.

Molnár,Z. (1994). Borsó (*Pisum sativum* L.) genotípusok in vitro tesztelése. "Növénynemesítési Tudományos Napok '93" Konferencia (Budapest) 1994. január 11-12.

Molnár,Z. (1994). Genotype dependent morphogenesis in *Pisum sativum* L. tissue cultures. Abstract - 9th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, July 3-8, 1994, Brno, Czech Republic.

Molnár,Z. (1994). Görögszéna (*Trigonella foenum-graecum* L.) sejtszuszpenziók vizsgálata. V. Magyar Növényélettani Kongresszus, Szeged, 1994. július 11-15.

Molnár,Z. (1995). Faba beans (*Vicia faba* L.) and peas (*Pisum sativum* L.) cell and tissue culture studies. Conference on Plant In Vitro Culture, September 1-3, 1995, Mosonmagyaróvár.

Molnár,Z. (1995). Effect of benzylamino purine (BAP) and some auxins on meristem cultures of faba beans (*Vicia faba* L.). Recent Advances in Plant Biotechnology, October 2-6, 1995, Nitra, Slovak Republic.

Molnár,Z. (1996). Különbözõ hormonkombinációk hatása a lóbab merisztéma kultúráiban *in vitro*. "III. Növénynemesítési Tudományos Napok '95" Konferencia, 1996. január 22-23., Budapest.

Molnár,Z. (1996). The effect of plant hormones on in vitro morphogenesis of *Digitalis lanata* Ehrh. Conference on "Progress in Plant Sciences from Plant Breeding to Growth Regulation", June 17-19, 1996, Mosonmagyaróvár.

Molnár,Z. (1997). A táptalajok és explantátumok hatása a borsó *in vitro* tenyészeteire. VI. Magyar Növényélettani Kongresszus, Budapest, 1997. június 30.

Molnár,Z. (1997). Tissue culture studies in pea (*Pisum sativum* L.). Recent Advances in Plant Biotechnology, Molecular Biology for Agriculture, Symposium, August 25-29, 1997, Ceske Budejovice, Czech Republic.

Molnár,Z. (1998). Különböző táptalajok és izolátumok hatása a borsó *in vitro* tenyészeteire. "IV. Növénynemesítési Tudományos Napok '95" Konferencia, 1998. január 28-29., Budapest.

Molnár,Z. and Gyulai G. (1998). Microsatellite-PCR and RAPD analysis of faba bean varieties. 2nd Conference on "Progress in Plant Sciences from Plant Breeding to Growth Regulation", June 15-17, 1998, Mosonmagyaróvár.

Molnár,Z. (1998). Effect of different plant hormones on in vitro regeneration of *Pisum sativum* L. 2nd Conference on "Progress in Plant Sciences from Plant Breeding to Growth Regulation", June 15-17, 1998, Mosonmagyaróvár.

Molnár,Z. (1998). Microsatellite-PCR and RAPD analysis of six faba bean varieties. 2nd International Symposium of Plant Biotechnology, October 4-8, 1998, Kyiv, Ukraine.

Molnár,Z., Gyulai,G. (1999). Mikroszatellita és RAPD markerek azonosítása lóbab (*Vicia faba* L.) fajtáknál. VII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Budapest, 1999. január 17-20.

Molnár,Z., Gyulai,G. (1999). Mikroszatellita- és RAPD-polimorfizmus lóbab (*Vicia faba* L.) fajtákban.) V. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 1999. március 9.

Molnár,Z. (2000). Biotechnológiai módszerek alkalmazásának lehetőségei a lóbab nemesítésében. VI. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2000. március 8-9. 101.

Molnár,Z., Ördög,V. (2000). Introduction of microalgal suspensions into the *in vitro* cultures of higher plants. In: Pulz, O., Ördög V., Tredici, M. and Skulberg, O. (Eds.): Proceedings of the 4th European Workshop "Biotechnology of Microalgae", 29-30 May, Bergholz-Rehbrücke (Germany).

Molnár,Z. (2000). Effects of carbohydrates on *in vitro* morphogenesis of pea tissues. 12th Congress of the FESPP, Budapest, August 21-25, 2000. Plant Physiology and Biochemistry, 38: s18.

Molnár,Z., Jäger,K. (2001). Effects of microalgal suspensions on *in vitro* tissue cultures of higher plants.- Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil-Systems. 20-22 June 2001. Mosonmagyaróvár (Hungary).

Molnár,Z., Jäger,K., Barnabás,B., Ördög,V. (2001). Growth promoting effects of microalgal and cyanobacterial suspensions on tissue cultures of pea and maize. 4th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology, Plant Molecular Biology For The New Millennium, 17-21 September 2001, Trebon, Czech Republic.