

Baranyai Andrea

A som és a homoktövis mikroszaporítása

Micropropagation of *Cornus mas* and *Hippophae rhamnoides*

Kísérleteinkben sikerült megoldani a som és a homoktövis hajtáscsúcs kultúrából történő in vitro szaporításának egyes lépéseit. Az alkalmazott táptalajok az egyes növényeknél nagyon eltérőek voltak (DCR, BTM) az alkalmazott hormonszint tekintetében a BAP bizonyult megfelelőnek. A kultúrák indítását, felszaporítását sikerült megoldanunk, jelenleg a gyökereztetési kísérletek folynak.

Kulcsszavak: in vitro szaporítás, táptalaj, som, homoktövis, gyökereztetés

Tissue culture techniques have been used to establish and maintain shoot tip culture of *Cornus mas* and *Hippophae rhamnoides*. The aim of this study was to establish a partial method to rapid and large scale multiplication of this species. The shoot tips cultured on nutrient medium (DCR, BTM) supplemented with BAP formed shoots, but further are necessary for rooting.

Keywords: in vitro propagation, nutrient, *Cornus mas*, *Hippophae rhamnoides*, rooting

1. Bevezetés

Figyelmünk azért fordult a roboráló növények (a som és a homoktövis) felé mert ezzel a területtel hazánkban nagyon kevesen foglalkoznak.

A rendelkezésre álló külföldi irodalom is elég kevés, csak néhány fajjal foglalkoznak (*Arnica montana*, *Menta* fajok, *Echinaceae*, stb.).

A som a nehezen szaporítható fajok közé tartozik. A homoktövissel már többen foglalkoztak, de elsősorban filogenetikai vonatkozásban (Sun, K, 2002) illetve, csak részleges eredményt értek el. (Kovács E., 1989).

Kiinduló pontként figyelembe vettünk néhány fontosabb gyógynövényt, amelyeket in vitro tenyésztésbe vittek:

- *Arnica montana*, (Cassels, A. C. 1999),
- *Valeriana jatamansi* (Kaur. 1999)

Mivel sem a som sem a homoktövis mikroszaporításával kapcsolatban nem találtunk számottevő szakirodalmat célul tűztük ki, hogy megoldjuk mindkét faj in vitro tenyésztését.

A som dugványról és magról is nehezen szaporítható ezért itt nemcsak a fajták és szelektált klónok felszaporítása volt a cél, hanem hogy egyáltalán megfelelő mennyiségű szaporítóanyagot tudjunk előállítani.

A homoktövis dugványok elég jól gyökeresednek, itt a fajták és klónok felszaporítása volt a cél.

Ezeknek, mint adaptogén növényeknek nagyon fontos a roboráló szerepük, és mint termesztésbe vont növények, a mikroszaporításnak gyakorlati jelentősége is van.

2. Anyag és módszer

2.1 Kiinduló alapanyag

Kísérleteinket 2011 szeptemberében kezdtük, tehát a legkedvezőtlenebb időpontban, mert ilyenkor megváltozik a fás szárú növények endogén hormonszintje. (Tudjuk, hogy a fás szárú növények ilyenkor már készülnek nyugalmi állapotba vonulni, kultúrába vitelük optimális időpontja a tél vége, tavasz eleje lett volna, mikor a mélynyugalmi állapotuk vége felé járnak, és csak kényszer nyugalmi állapotba vannak.)

A kiinduló szaporítóanyagot Kozák Antal rákóczi falvai kertész biztosította számunkra. A somnál a kiinduló alapanyag a kertjében található vadsom volt, homoktövissnél a kiinduló alapanyag a *Hippophae rhamnoides* var. *carpatica* két éves gyökeres dugványa. 2012 januárjában a som és a homoktövis esetében már fajtákat indítottunk, ezek a növények már ekkorra átestek a nyugalmi állapotba. A som esetében 3 fajtát állítottunk be a kísérletbe: a bolgár tűz, a jolico, és a *macrocarpa* fajtákat (homoktövissnél több orosz fajtát ill. német porzós és termős fajtákat a homoktövis kétlakisága miatt).

2.2 Tenyészetek létrehozása, a mikroszaporítás szakaszai

A rügykultúrák fertőtlenítési menete: négyszeres hígítású hypo 5 percre, előtte 30 mp 70 %-os alkoholos oldat, majd 4x5 perces steril vizes kimosás. A fertőtlenítés után mikroszkóp alatt leszedtük a rügypikkelyeket és minden esetben merisztémát (0.1-0.3 mm) helyeztünk el az alaptáptalajra. Az alkalmazott alaptáptalajok MS, (Murashige-Skoog, 1962), DCR (Gupta - Durzan, 1985) és BTM (Chalupa, 1981) valamint, ezek különböző hígításai voltak. A tenyészeteket fényszobában tartottuk, 23 Co-on, 16 órás megvilágítás, és 8 órás sötét periódus mellett.

2.3 Som (*Cornus mas*) steril kultúra létrehozása

A somnál a rügypikkelyek eltávolítása után a csúcsrügyből és az oldalrügyekből vegyesen preparáltuk ki a merisztémát.

Fontos volt, hogy a rügpikkelyek eltávolítása után a merisztémát körbevevő seprúszerű képleteket is eltávolítsuk, mert ezek hajtást gátló anyagot tartalmaznak. A vadsomnál és a fajtánál is fontos volt ezt a műveletet elvégeznünk.

A fertőtlenített rügek 70%-a steril maradt. Az alaptáptalajokhoz különböző hormonokat adtunk, benzyladenint, illetve gibberellint a nyugalmi állapot megtörésére. Mint az eredményekből kiderült a somnál az alacsonyabb sótartalmú táptalaj vált be (DCR) és az alkalmazott hormonok közül egyedül a gibberellin volt hatásos, citokinin tartalmú táptalajon a merisztémák nem indultak meg, nem fejlődtek hajtássá. (1. táblázat)

Alkalmazott táptalaj	Differenciálódott merisztémák aránya %
MS+BA 0.2 mg/l	20
MS+GA 1 mg/l	35
DCR+BA 0.2 mg/l	22
DCR+ GA 1mg/l	80

1. táblázat: Vadsom merisztémák megindulási aránya kipreparált merisztémák %-ban (20db/kísérlet)

A következő kísérletben már a hideghatáson átesett fajtákat indítottuk, de itt már a tapasztalatok alapján csak a DCR+GA 1 mg/l tartalmú táptalajra tettük le a merisztémákat. A fertőtlenítés fajtától függően 80-90%-os sterilitást biztosított. A megindult merisztémák arányát a letett merisztémákhoz viszonyítva.

A letett fajták közül a macrocarpa reagált legjobban, a táptalajon ennek a fajtának voltak a legszebb, legjobban megindult merisztémái.

A kísérletekből egyértelműen kiderült, hogy a DCR jobb táptalaj a somnál, mint az MS. Érdekes, hogy próbáltuk a BTM-et is mint alaptáptalajt (ez összetételében hasonlít a DCR-hez), de egyértelműen a DCR volt a jobb. Az 1-2-3 számú fényképeken a kipreparált és letett merisztémákat látjuk.



1. kép: Merisztémából differenciálódott rügy



2. kép: Megindult hajtáscsúcskultúrák



3. kép Differenciálódott macrocarpa merisztéma

1.4 Felszaporítási fázis

A szaporító táptalajt ennek megfelelően választottuk ki, az alaptáptalaj a DCR volt, az alkalmazott hormon a benzylaminopurin 0.2-0.6 mg/l cc.-ban. A kísérletek során kiderült, hogy az alacsonyabb cc. a jó, magasabb BA üvegesedést eredményezett, és ha MS volt az alaptáptalaj a növények kisebbek voltak, nem fejlődtek úgy, mint a DCR táptalajon.

Alkalmazott táptalaj	BA 0.2 mg/l	BA 0.6mg/l
DCR	3.8	1.4
MS	1.5	1.2

2. táblázat: Vadsom szaporodási rátája DCR táptalajon különböző BAP cc. mellett (4x25 növény)

A fajták szaporodási rátája egyértelműen alacsonyabb volt, mint a vadsomé, ez utóbbi esetében volt olyan lombik ahol 3 növényről 18 db oldalhajtást tudunk leszedni. Hozzá kell tennem, hogy a kiindulási táptalaj után (DCR+ 1mg/l GA) még egyszer ugyanerre a táptalajra kell tenni a növényeket, amennyiben rögtön BAP-t tartalmazó táptalajra tesszük, a növények rosszul reagálnak, kell még egy elongációs fázis a gibberellint tartalmazó táptalajon, hogy további szubkultúrálásra alkalmas növényeket kapjunk.

Amennyiben kevés auxint (0.01 mg/l) NES-t illetve IVS-t adtunk a táptalajhoz a növények felüvegesedtek.

A 4-5 -6 számú fényképeken szépen szaporodó vadsom növényeket látunk.

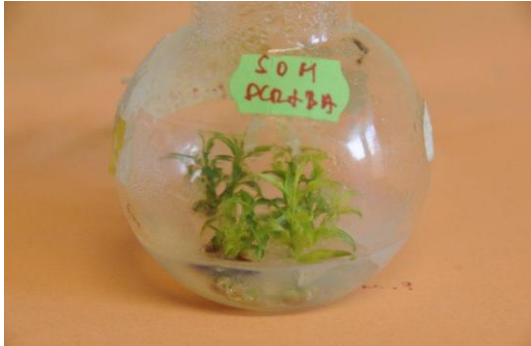
A somnál nemcsak de novo képződtek hajtások, hanem egyrészt a főhajtáson lévő alvó rügyek is kihajtottak, másrészt, amint a 4. számú képen is látható, hogy a kis növényen képződött oldalhajtások oldalrügyei is kihajtanak. Ezeket úgynevezett nyugtató táptalajra tesszük DCR+GA 0.1mg/l, ahol megnyúlnak, így alkalmasakká válnak további passzálásra.(5. kép)



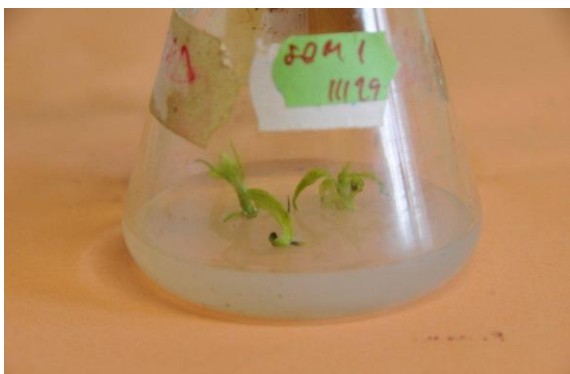
4. kép: Járulékos és axilláris rügyek kihajtása in vitro tenyésztett somon



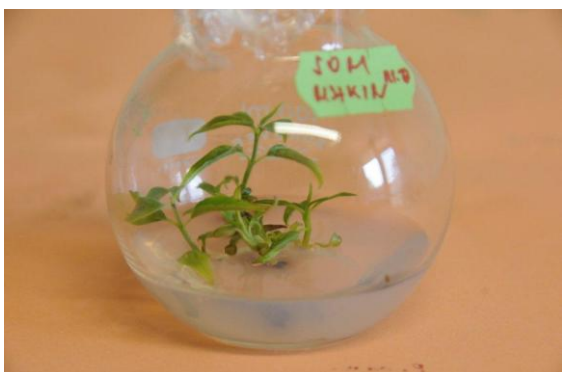
5. kép: Meghosszabbított somhajtások



6. kép: Szaporodó vad som Erlenmayer lombikban az optimális táptalajon



7. kép: Szaporodó bolgártűz



8. kép: MS+KIN tartalmú táptalajon lévő gyengébben fejlődő vad somhajtás.

1.5 Gyökereztetés

A gyökereztetést nehezen tudtuk megoldani. A kísérletek során a szakmában eddig használt összes gyökereztetési eljárást kipróbáltuk. A makro- és mikroelemeket felére, háromnegyedére csökkentése, cukor csökkentése 1%-ra, auxinok

alkalmazása IVS,IES,NES/0.01-0.5mg/l, aktív szén, pH levele 4.8-ra, eddig mind eredménytelen volt. (A som dugványról is nehezen gyökeresedik)

Az úgynevezett pulse kezelés sem vezetett eredményre.(Nagy adag auxin tartalmú táptalajon 2-3 napos inkubálás, majd hormonmentes táptalajra történő letétel.)

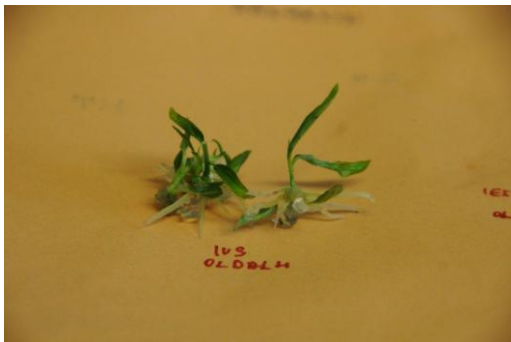
2012 márciusában Marks,T és Simpson,S /2000/ kísérletei alapján új módszert próbáltunk ki. A gyökereztetésre letett növényeket 3 csoportba osztottuk, úgy mind a gyökereztetésre letett osztódó növény főhajtásának felső 2-2.5 cm-es része, a levágott főhajtás alsó része, a harmadik csoportba az oldalhajtásokat tettük le gyökereztető táptalajra.

Három különböző gyökereztető táptalajt használtunk,:

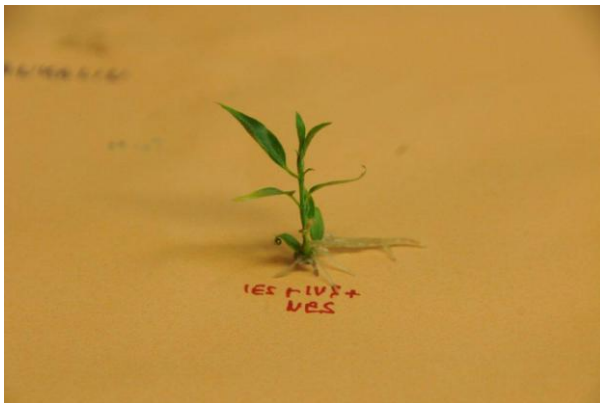
- a) 10mg/l NES,
- b) 10mg/l IVS, ill.
- c) IVS+IES+NES 3+3+3 mg/l kombinációja.

A hormontartalmú táptalajokon 1 hétig voltak a növények, majd hormonmentes DCR alaptáptalajra tettük őket. A gyökereztetést a 28. napon néztük. /alaptáptalajra történő áttétel után/

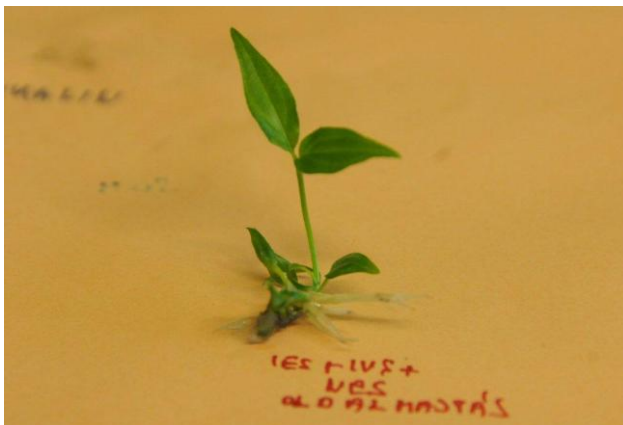
A leggyökeresedett növényeket vizuálisan értékelve egyértelműen az auxin kombináció volt a legjobb, ezen a táptalajon igazi gyökerek fejlődtek, a másik két táptalajon az erősen elkalluszosodott alapból eredtek az úgynevezett léggökerek, ezeket a növényeket nem is lehetett akklimatizálni. A NES-en lévő növények kallusza egyébként fehér volt, az IVS-en lévőké pedig zöld. A leggyökeresedett növényeket aztán sikeresen akklimatizáltuk.



9. kép: IVS-en leggyökeresedett oldalhajtás



10. kép: A 3 különböző auxin tartalmozó táptalajra letett főhajtás.



11. kép: A 3 különböző auxin tartalmozó táptalajra letett leggyökeresedett oldalhajtás



12. kép: Két akklimatizált somhajtás

A gyökereztetési kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a legeredményesebb kezelés, ha 3 különböző auxint tartalmazó táptalajra tesszük le a szaporodó som oldalhajtásait, illetve a főhajtást, egyhetes inkubáció után hormonmentes alaptáptalajra visszatéve kb. 3 héten belül szépen legyökeresedett somhajtásokat kapunk, amelyeket sikeresen akklimatizálhatunk.

1.6 Homoktövis steril kultúra létrehozása

A homoktövisnél a kísérletek a *carpatica* alfajjal indultak meg, ezeket jól sikerült fertőtleníteni, a letett explantok 80%-a steril maradt.

Az indító táptalajnak itt a BTM bizonyult a legjobbnak, szintén GA kiegészítésével, a BA itt sem eredményezte a letett merisztémák hajtássá történő fejlődését

Alkalmazott táptalaj	Hajtássá fejlődött %-ban
MS+BA 0.2 mg/l	12
MS+GA 1mg/l	23
BTM+BA 0.2mg/l	37
BTM+GA 1mg/l	86

3. táblázat: A *Hippophae rhamnoides* var. *carpatica* merisztémák hajtássá fejlődési aránya a letett merisztémák %-ában különböző táptalajokon (20 kipreparált merisztéma)

A következő kísérletsorozatban már fajtákat vontunk be, nevezetesen a Jantarnaja, Obilnaja, Csunszkaja nevű orosz fajtákat, ill. egy német porzós és termős fajtát. Ezeket már csak a BTM+1mg/l GA-t tartalmazó táptalajra tettük.

Ha az alaptáptalajokhoz auxint adtunk kis mennyiségben/0.001mg/l/ ez is üvegesedést okozott, ha a BTM helyett DCR-t alkalmaztunk az sem volt jobb, a homoktövis számára az optimális táptalaj a BTM. A *carpatica* mellett az orosz fajtákat ill. a német porzós és termős fajtákat is ezen a táptalajon indítottuk.



13. kép *Hippophae rhamnoides* var. *carpatica* hajtáscsúcs



14. kép: Jantarnaja fajta kipreparált merisztéma

A következő fázisban még egyszer BTM+1mg/l GA-t tartalmazó táptalajra kell tenni a növényeket, utána jöhet a szaporító táptalaj BAP hozzáadásával.

1.7 Felszaporítási fázis

A homoktövis felszaporítását a BTM+0.2mg/l BAP tartalmú táptalajon végeztük, ha növeltük az alkalmazott BAP szintet, vagy alacsonyabb cc.-ju auxinnal egészítettük ki (0.001mg/l NES vagy IVS), vagy alaptáptalajt változtattunk (MS,DCR) a szaporodási ráta lecsökkent, a növények nem fejlődtek

Volt olyan lombik ahol 14 növényről 40 oldalhajtást szedtünk le, itt hozzáteszem, hogy vertikálisan is lehet osztani a növényeket, ill. az alapi kalluszt levágva és szaporító táptalajra téve újabb hajtásokat nyerünk.



15. kép: Szaporodó carpatica fajta



16. kép: Alapi kallszúból fejlődő növények



17. kép: Szaporodó német porzós növények

MS tartalmú táptalajon a növények kisebbek voltak, ha megemeltük a BAP szintjét, bármelyik táptalajnál erős kallszosodás indult meg. A homoktövisnél BTM+0.2 mg/l táptalaj tökéletes a klónok felszaporítására.

A fajták szaporodása között nem találtunk szignifikáns különbséget, egyedül a német fajtáknál a termős növény egyértelműen nagyobb szaporodást ért el, mint a porzós.

1.8. Gyökereztetés

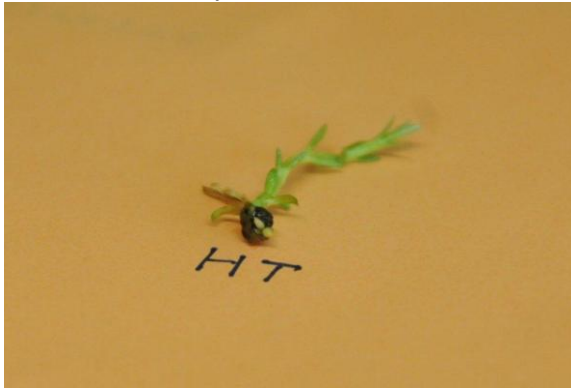
A somhoz hasonlóan itt is még megoldásra váró probléma a gyökereztetés. A növények annyira érzékenyek hogy AC (aktív szén) illetve 0.5 mg/l IVS-t tartalmazó táptalajon el is haltak a növények, a táptalaj bármilyen megváltoztatására a növények deformálódtak, vagy nem gyökeresedtek le. 10 mg/l IES alkalmazása után gyökérprimódiomok, gyökerek jelentek meg a homoktövis hajtásokon.

A somhoz hasonlóan itt is kipróbáltuk az úgynevezett pulse kezelést, vagyis nagy koncentrációjú auxin tartalmú táptalajon tartottuk a növényeket egy hétig, majd hormonmentes alaptáptalajra tettük vissza őket, és a 28. napon értékeltük a gyökerezését.

A kezelések a következők voltak:

- a) BTM+ 10mg/l NES,
- b) 10 mg/l IES,
- c) NES+IVS+IES 3+3+3 mg/l.

Itt csak a fő és oldalhajtásokat tettük le.



18. kép: Gyökérprimordiumok a carpaticán
2. Eredmények

A homoktövisnél, és a somnál sikerült kidolgoznunk az indító- és a felszaporító táptalajt mind a vad, mind a kultúrfajok esetében. Az alkalmazott alaptáptalajok az egyes növényeknél nagyon eltérőek voltak (MS, DCR, BTM) az alkalmazott hormonszint (GA, BA) tekintetében már nem adódtak nagy különbségek. A gyökereztetésnél nehezebb volt eredményt elérnünk, mert a som és a homoktövis a szokásos gyökereztetési eljárásokra nem reagált.

A somnál az indító táptalaj DCR+1mg/l GA, a felszaporító a DCR+0.2 mg/l BAP. A leggyökeresedett növényeket vizuálisan értékelve egyértelműen az auxin kombináció volt a legjobb, ezen a táptalajon igazi gyökerek fejlődtek, a másik két táptalajon az erősen elkalluszosodott alpból eredtek az úgynevezett léggökerek, ezeket a növényeket nem is lehetett akklimatizálni.

A homoktövisnél az indító a BTM+1mg/l GA, a szaporító a BTM+0.2mg/l BAP. 10 mg/l IES alkalmazása után gyökérprimódiumok, gyökerek jelentek meg a homoktövis hajtásokon.

Bármilyen változtatás akár az alaptáptalajnál akár az alkalmazott hormontípusban illetve annak mennyiségben rontja a növények vigorát és szaporodási rátáját. A gyökereztetés megoldása után lehetővé válik, hogy ezeknél a fontos adaptogén növényeknél a nemesítő által szelektált klónokat gyorsan, rövid idő alatt nagy mennyiségben átadjuk a termesztésnek, ill. a som esetében lehetővé tegyük /mivel dugványról és magról is nehezen szaporítható/, hogy nagyobb arányban vonják be a termesztésbe.

Felhasznált irodalom

- (1) Cassels,A.C.et.al (1999) Establishment of plantation fro micropropagated Arnica chamissionis a pharmaceutical substitute for the endangared A.montana. Plant Cell, Tissue and Organ culture vol.56 No.2 139-144
- (2) Chalupa,V.(1981) Clonal propagation of broadleaved forest trees. Comm. Inst. For. Res. Cech. 12 255-271
- (3) Gupta, P. K. - Durzan,D.J. (1985) Shoot multiplicattion from mature Douglas fir. Pl. Cell. Report 4. 177-179
- (4) Kaur, R. et. al (1999) In vitro propagation of Valeriana jatamansii Plant Cell, Tissue and Organ culture 59 3 227-229
- (5) Kovács, E. (1989) Homoktövis in vitro és in vivo szaporítása Diploma dolgozat Kertészeti Egyetem
- (6) Marks,T-Simpson,S./2000/: Interaction of explant type and indole-3-butyric acid during rooting in vitro in a range of difficult and easy-to-root woody plants.. Plant Cell Tissue and Organ Culture 62 65-74
- (7) Murashige,T. – Skoog. F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobocco tissue culture. Physiol. Plant 15 473-479
- (8) Sun, K. et. al (2002) Molecular phylogenetics of Hippophae L. based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. Plant Syst. Evol. 235 121-134