

dc_935_14

**MTA
Doktori Értekezés Tézisei**

**AZ EXPLANTÁTUM ÉS AZ EXOGÉN CITOKININEK ALMA *IN VITRO*
HAJTÁSFEJŐDÉSRE KIFEJTETT HATÁSAINAK VIZSGÁLATA**

Dobránszki Judit

**Debreceni Egyetem
Agrártudományi Központ
Nyíregyházi Kutatóintézet**

2014

1. BEVEZETÉS

Az alma már a bibliai időktől végigkíséri az emberiség történelmét. Jelenleg a világon a szőlőt is megelőzve a legjelentősebb mérsékelt övi gyümölcstermő növényünk, a trópusi, szubtrópusi gyümölcsstermesztést is figyelembe véve csak a banán előzi meg. A világ almatermesztése évi 76,4 millió tonna (<http://faostat.fao.org>); a legtöbb almát jelenleg Ázsiában (55%) és Európában (26%) állítják elő.

Az alma fajtákat hagyományosan is vegetatív szaporítással, klónozással állították elő. Termesztését mindig az adott kornak megfelelő, fejlett technológiai szint kísérte, ezért nem meglepő, hogy az *in vitro* szaporításának története is az 1960-as évek végére és az 1970-es évek elejére, az *in vitro* mikroszaporítás hajnalára, nyúlik vissza (Jones, 1967; Elliott, 1972; Walkey, 1972). Az *in vitro* szaporítási technikák alkalmazása mind a kutatásban és a nemesítésben, mind a kereskedelmi célú szaporítóanyag előállításában új lehetőségeket teremtett.

A kidolgozott különböző *in vitro* szaporítási módszerek mára az almánál üzemi szaporítási technológiák részévé váltak világszerte, hiszen használatukkal számos, a hagyományos vegetatív szaporítás során fellépő hátrányt áthidalhatunk. *In vitro* szaporítással lehetővé vált (1) a vírusoktól és egyéb kórokozóktól mentes szaporítóanyag előállítása, (2) egyöntetű szaporítóanyag előállítása, (3) a szaporodási ráta – korábban elképzelhetetlen mértékű – növelése, (4) a szaporítóanyag előállítása évszaktól, helytől, klímától függetlenül; valamint (5) a termőhelynek és termesztési célnak legmegfelelőbb fajták, és (6) a nemesítés során előállított új fajták, nemesítési vonalak és variánsok gyors felszaporítása.

Az alma hosszú juvenilis periódusa, nagyfokú öninkompatibilitása és nagyfokú heterozigóta jellege miatt nemesítése hagyományos keresztezéssel, szexuális hibridizációval nagyon hosszú és költséges eljárás. A járulékos növényregenerálási módszerek kidolgozása és alkalmazása az almanemesítésben azonban új perspektívákat nyitott. Lehetővé tette a legújabb biotechnológiai módszerek, pl. az *in vitro* mutagenézis, az embriómentés, a géntranszformáció alkalmazását, a szomaklonális variánsok gyors azonosítását, felszaporítását és felhasználását a nemesítésben.

Az alma *in vitro* szaporítása, *in vitro* organogenezise a kezdetektől az intenzíven kutatott területek közé tartozott, melynek eredményeképpen mára számos alma alany és nemes fajta axilláris hajtásfejlődésére, vagy járulékos hajtásregenerációjára alapozott *in vitro* szaporítási módszert dolgoztak ki, és a mikroszaporítást befolyásoló számos biotikus és abiotikus, az *in vitro* tenyésztés során alkalmazott kémiai és fizikai tényező hatását tanulmányozták. Napjainkban az almánál előtérbe kerültek azok a kutatások, melyek az *in vitro* szaporítási módszerek hatékonyságának megőrzése, vagy javítása mellett a mikroszaporítással előállított *in vitro* növények minőségének és fiziológiai állapotának javítását célozzák meg.

Jelen disszertációban bemutatott vizsgálatok eredményei egyrészt új információkkal bővítik az alma *in vitro* szaporításával kapcsolatos elméleti ismereteinket, másrészt a gyakorlatban felhasználva hozzájárulnak az *in vitro* szaporítási módszerek finomhangolásához, a jó minőségű alma *in vitro* szaporítóanyag-előállítás hatékonyságának növeléséhez.

2. CÉLKITŰZÉS

Az alma *in vitro* szaporításával kapcsolatos kutatásokat mintegy másfél évtizede kezdtük el a Debreceni Egyetem Nyíregyházi Kutatóintézetének Biotechnológiai Laboratóriumában. Ezeknek az eredményeként számos hazai és külföldi alma nemes és alany fajtára dolgoztunk ki mikroszaporítási és járulékos hajtásregenerálási módszereket. Jelen értekezésben azokat a legújabb kísérleti eredményeinket mutatom be, melyek az *in vitro* hajtásfejlődést mind mennyiségileg, mind minőségileg befolyásolják, de melyeknek eddig a nemzetközi irodalomban is kevés figyelmet szenteltek, vagy melyeket egyáltalán nem vizsgáltak.

Ezek a vizsgálatok két fő kérdés köré szerveződtek. Az egyik kérdéskör az explantátumnak, mint a járulékos hajtásregeneráció biotikus faktorának szerepét vizsgálta a hajtásregeneráció hatékonyságában 'Royal Gala' és 'Freedom' fajtáknál. Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- 1) Megvizsgálni, hogy almánál lehetséges-e levél tTCL explantátumokon hajtásregenerációt indukálni.
- 2) Megvizsgálni, hogyan befolyásolja a hajtásregenerációs folyamatot a tTCL explantátumokon a genotípus, az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciója az *in vitro* hajtáson, a megvilágítás, a regenerációs periódus hossza, és a táptalaj citokinin tartalma. A vizsgált tényezők optimalizálása a tTCL explantátumokra.
- 3) Ellenőrizni a tTCL explantátumokon regenerálódott hajtások gyökeresedési képességét.
- 4) Előzetesen felmérni a tTCL explantátumokon regenerálódott hajtások genetikai stabilitását.
- 5) Az explantátum mérete és hajtásregenerációs képessége közötti kapcsolat feltárása és modellezése, az összefüggések matematikai leírása.

Munkánk másik része az axilláris hajtáskultúrában fejlődő hajtások egyik minőségi paraméterének, az hajtások fotoszintetikus apparátusának vizsgálatára irányult. A kísérletekben a 'Royal Gala' fajtát használtuk modell fajtaként, és az alábbi célkitűzéseink voltak:

- 6) Megvizsgálni, hogy az alma hajtástenyészetekben alkalmazott különböző típusú aromás oldalláncú citokininnek befolyásolják-e az *in vitro* hajtások klorofill tartalmát, illetve összetételét.
- 7) Megvizsgálni, hogy a különböző típusú aromás oldalláncú citokininnek befolyásolják-e az *in vitro* hajtások fotoszintetikus apparátusának működőképességét.
- 8) Bizonyítható-e összefüggés az *in vitro* alma hajtások klorofill tartalma, illetve a fotoszintetikus rendszer működőképessége között.

Hosszú távon munkánk célja, hogy feltárjuk azokat a biotikus és abiotikus faktorokat, melyek segítségével az *in vitro* szaporítás, illetve a hajtásregenerálás hatékonysága fokozható, s azok üzemi technológiákba való beépítésével az *in vitro* növények mikroszaporítása mind mennyiségileg, mind minőségileg javítható.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A KÍSÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT NÖVÉNYANYAG

Vizsgálatainkat alma (*Malus x domestica* Borkh.) nemes fajtákon végeztük. A járulékos (adventív) hajtásregenerációs kísérletekhez két modell fajtát használtunk a 'Royal Gala' és a 'Freedom' nemes fajtákat; az axilláris *in vitro* hajtások fiziológiai állapotának vizsgálatát 'Royal Gala' modell fajtán végeztük. A kísérletekhez a Debreceni Egyetem Nyíregyházi Kutatóintézet Biotechnológiai Laboratóriumában fenntartott *in vitro* alma hajtástenyészeteket használtuk.

A hajtástenyészetek *in vitro* fenntartása és a kísérletekhez való felszaporítása során MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajt használtunk. A táptalaj az MS makro-, mikroelemeken és vitaminokon kívül tartalmazott még 3% szacharózt, táptalajszilárdítóként 0,7 % agar-agart (plant cell culture tested, SIGMA[®]), valamint 1,0 mg/l BAR, 0,3 mg/l IBA és 0,2 mg/l GA₃ növekedésszabályozó anyagokat; a táptalaj pH-ját 5,7-re állítottuk be autoklávozás előtt. A tenyészetek fenntartásához, felszaporításához 400 ml-es befőttes üvegeket (75 mm átmérő, 85 mm magasság) használtunk, amibe 40 ml táptalajt öntöttünk. A tenyésztés nevelőhelyiségben történt 16 órás fotoperiódus, 105 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ megvilágítás és 22 °C mellett. A tenyészeteket 4 hetente raktuk át friss táptalajra, az átrakást és a felszaporítást többnóduszos, kb. 2 cm-es hajtásdarabok táptalajra fektetésével végeztük. A horizontálisan a táptalajra helyezett hajtásdarabokból az új *in vitro* hajtások axilláris hajtásfejlődéssel fejlődtek.

3.2. NÖVÉNYANYAG PREPARÁLÁSA AZ ALMA *IN VITRO* JÁRULÉKOS (ADVENTÍV) ÉS AXILLÁRIS HAJTÁSFEJLŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATÁHOZ

3.2.1. *In vitro* axilláris hajtások előkezelése a járulékos (adventív) hajtásregenerálási kísérletek előtt

A felszaporított *in vitro* hajtástenyészetekből származó 3 hetes, 5-7 leveles, kb. 35-40 mm hosszúságú *in vitro* hajtásokat vertikális pozícióban előkezelő táptalajra helyeztük. Az előkezelő táptalaj citokinin tartalmát a fajta számára korábban optimalizáltuk (Dobránszki és mts., 2005; Magyar-Tábori és mts., 2010), a táptalajok pontos összetételét, ezen belül a citokinin tartalmát a 3.3. fejezetben adom meg. Tenyészedeényként 400 ml-es befőttes üvegeket használtunk, 5 hajtást helyeztünk egy-egy tenyészedeénybe. Az előkezelő táptalajra helyezett hajtásokat 3 hétig neveltük nevelőhelyiségben a hajtástenyészetek fenntartása és felszaporítása során is alkalmazott tenyésztési körülmények között (ld.: 3.1. fejezet). Ezt követően végeztük el a 3 hetes, előkezelt *in vitro* hajtások leveleiből az explantátumok preparálását az adventív hajtásregenerálási kísérletekhez.

3.2.2. Explantátumok preparálása és táptalajra helyezése a járulékos (adventív) hajtásregenerálódás vizsgálatához

A kísérletekhez az előkezelt *in vitro* axilláris hajtások felső két csúcsi, teljesen kifejlett levelét használtuk, s az 1. és 2. csúcsi leveleket elkülönítetten kezeltük, vizsgálva az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciójának hatását a járulékos hajtásregenerációra. A

levéllemez csúcsi és a levélnyel felőli alapi részeit eltávolítottuk. A megmaradt levéllemezéből kétféle explantátumot preparáltunk:

- (1) konvencionális explantátum (kísérletekben kontrollként szerepel): a megmaradt levéllemez transzverzálisan kettévágtuk, s így kb. 5 mm szélességű levéllemez csíkokat kaptunk. Egy levéllemezéből így 2 db konvencionális explantátumot tudtunk készíteni.
- (2) tTCL (transverse thin cell layer) explantátum: a megmaradt levéllemez transzverzálisan kb. 0,1-0,3 mm széles csíkokra, ún, thin cell layer-ekre (TCL) vágtuk. Egy levéllemezéből így 50 db tTCL explantátumot tudtunk készíteni.

A levélexplantátumokat ezt követően regenerációs táptalajra helyeztük adaxialis oldalukkal a táptalaj felé. Konvencionális explantátum esetén egy Petri csészébe 6 db explantátumot helyeztünk, míg tTCL explantátumból 12 db-ot. Az explantátumokat 7, illetve 9 hétig (= regenerációs periódus hossza) tenyésztettük a regenerációs táptalajon.

3.2.3. Regenerálódott járulékos hajtások elongációja és gyökeresítése

A regenerálódott járulékos hajtásokat a regenerációs periódus végén (7. és 9. hét után) levágtuk a levélexplantátumokról, majd elongációs táptalajra helyeztük vertikális pozícióban, s ezen a táptalajon neveltük 4 hétig. Ezt követően a 4 hetes hajtásokat gyökérindukciós táptalajra helyeztük vertikális pozícióban, majd 5 nap után gyökérelongációs táptalajra, amelyen 2 hétig neveltük a hajtásokat. Ezt követően a meggyökeresedett hajtásokat Bolar és mts. (1998) módszere szerint akklimatizáltuk.

3.2.4. Explantátumok preparálása és táptalajra helyezése az axilláris (hónaljrügyi) hajtásfejlődés vizsgálatához

A kísérletekhez a felszaporított *in vitro* hajtástenyészetekből származó 4 hetes hajtásokat használtuk explantátumként, melyeket vertikálisan helyeztünk a táptalajra. Egy tenyészedenybe 5 hajtást állítottunk. A táptalaj összetétele megegyezett a felszaporításra használt táptalaj összetételével, kivéve a citokinin forrást. A kísérletekben alkalmazott citokinineket és mennyiségüket a 3.3. fejezetben adom meg. A hajtásokat 3 hétig neveltük nevelőhelyiségben a 3.4. fejezetben leírtak szerint.

3.3. A KÍSÉRLETEKBEN ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK, PREPARÁLÓ OLDATOK

A kísérletekben – ha másként nem jelöltem – Murashige- Skoog (MS) táptalajt alkalmaztunk, amely MS makro-, és mikroelemeket és vitaminokat tartalmazott (Murashige és Skoog, 1962). A járulékos (adventív) hajtásregeneráció előtt előkezelő táptalajt, a regenerációhoz regenerációs táptalajokat, míg az axilláris hajtásfejlődés vizsgálatához különböző citokinin összetételű táptalajokat használtunk. Az összes alkalmazott táptalaj és preparáló oldat speciális összetevőit az alábbiakban adom meg.

Előkezelő táptalaj: a járulékos (adventív) hajtásfejlődés előtt az explantátumokat szolgáltató hajtások előkezelésére alkalmaztuk. A táptalaj MS táptalaj volt, mely tartalmazott 3% szacharózt, 0,7 % agar-agart (plant cell culture tested, SIGMA), valamint 0,3 mg/l IBA és 0,2

dc_935_14

mg/l GA₃ növekedésszabályozó anyagokat. A táptalaj citokinin tartalmát az adott fajta igényeihez igazítottuk: a 'Royal Gala' hajtásokat 0,5 mg/l TOP tartalmú, míg a 'Freedom' hajtásokat 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TOP tartalmú táptalajon neveltük (Dobránszki és mts., 2005; Hudák és mts., 2005).

Regenerációs táptalaj: Az *in vitro* hajtások leveleiből preparált levéllemez explantátumok (továbbiakban: levélexplantátumok) tenyésztésére, az explantátumokon a járulékos (adventív) hajtásregenerálódás indukálására használt táptalaj. A táptalaj MS makro-, és mikroelemeket, valamint B₅ vitamint, 3% szacharózt, 0,25% Gelrite-ot (SIGMA), 0,2 mg/l NAA-t és TDZ-t tartalmazott. A táptalaj TDZ koncentrációja függött az almafajtától és az explantátum típusától. Konvencionális levélexplantátumoknál és 'Royal Gala' fajta esetén a táptalajban 0,5 mg/l TDZ, 'Freedom' fajta esetén 5,0 mg/l TDZ volt. Amikor a regenerációs táptalaj citokinin tartalmának hatását vizsgáltuk a tTCL explantátumok hajtásregenerációjára, akkor a táptalajban 7-féle TDZ koncentrációt alkalmaztunk: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; és 25,0 mg/l TDZ.

Preparáló oldat: A levélexplantátumok készítésekor alkalmaztuk. A levélexplantátumok vágását ebben az oldatban végeztük, hogy megakadályozzuk az explantátumok barnulását és elhalását. Az oldat 0,15 g/l citromsavat, 0,1 g/l aszkorbinsavat tartalmazott.

Elongációs táptalaj: A regenerálódott járulékos hajtásokat neveltük ezen a táptalajon 4 hétig a gyökeresítést megelőzően, a korábban a laboratóriumunkban végzett kísérletek eredményeire alapozva (Magyar-Tábori és mts., 2011). Összetétele megegyezik a felszaporításra használt táptalaj összetételével, azaz MS makro-, mikroelemeken és vitaminokon kívül 3% szacharózt, 0,7 % agar-agart, valamint 1,0 mg/l BAR-t, 0,3 mg/l IBA-t és 0,2 mg/l GA₃-t tartalmazott.

Gyökindukciós táptalaj: A gyökeresedés indukálására használt táptalaj. Feles töménységben tartalmazta az MS makro-, és mikroelemeket, ezen kívül tartalmazott 100 mg/l myo-inozitot, 0,5 mg/l B1 vitamint, 2 % szacharózt, 0,7% agar-agart és 2,0 mg/l IBA-t.

Gyökérelongációs táptalaj: A gyökérindukciót követően alkalmaztuk az *in vitro* gyökerek hosszanti növekedésének serkentésére. Feles töménységben tartalmazta az MS makro-, és mikroelemeket, ezen kívül 50 mg/l myo-inozitot, 3 % szacharózt, 0,7% agar-agart és 2,0 ml/l Wuxal[®]-t.

Felszaporító táptalaj: Az aromás oldalláncú citokininnek axilláris hajtásfejlődésre kifejtett hatásának vizsgálatakor alkalmaztuk; a táptalaj összetétele megegyezett az előkezelő táptalaj összetételével, kivéve a citokininnek típusát és mennyiségét. Az 1. táblázatban megadott citokinin kezeléseket alkalmaztuk a kísérletek során.

1. táblázat. Az aromás oldalláncú citokininnek *in vitro* axilláris hajtásfejlődésre kifejtett hatásának vizsgálatakor alkalmazott citokinin és koncentrációik

μM	0,5	2,0	6,0	25,0
	mg/l			
BA	0,1136	0,4545	1,3636	5,6818
TOP	0,1208	0,4831	1,4493	6,0386
2,2μM BA+TOP	0,1208	0,4831	1,4493	6,0386
BAR	0,1786	0,7143	2,1429	8,9286

Az előkezelés során, illetve az axilláris hajtásfejlődési kísérletekben, valamint a regeneránsok *in vitro* gyökereztetésekor tenyészedenként 400 ml-es befőttes üvegeket (75 mm átmérő, 85 mm magasság) használtunk, amibe 40 ml táptalajt öntöttünk, az üvegeket műanyag tetővel zártuk le. A járulékos (adventív) hajtásregenerációs kísérletekben a regenerációs táptalajt Petri csészébe öntöttük (polisztrén, 92 mm átmérő); 25 ml táptalajt Petri csészénként. A Petri csészéket oldalról folpack fóliával zártuk le.

A táptalajok pH-ját autoklávozás előtt 5,7-re állítottuk be. Az autoklávozás 121 °C-on, 0,1 MPa túlnyomáson 20 percig történt. A növekedésszabályozó anyagokat (citokininek, auxinok, illetve a GA₃) autoklávozás után adtuk a táptalajhoz steril szűrővel (Whatman 0,2 µm pórusátmérőjű cellulóz-acetát membránszűrővel).

3.4. A LABORATÓRIUMI NEVELÉS KÖRÜLMÉNYEI

A kísérletek során a növényanyag nevelésére alapvetően kétféle körülményt alkalmaztunk attól függően, hogy a kísérletek a járulékos (adventív), vagy az axilláris hajtásfejlődés vizsgálatára irányultak.

A járulékos (adventív) hajtásregenerálási kísérletekben az *in vitro* axilláris hajtások előkezelésére alkalmazott nevelési körülmények az alábbiak voltak: 16 órás fotoperiódus, 105 µmol m⁻² s⁻¹ PPF (fotoszintetikus fotonfluxus) megvilágítás és 22 °C. A levélexplantátumokat az alábbi körülmények között neveltük: 3 hétig sötétben, 24,5 °C-on termosztátban, majd a Petri csészéket áthelyeztük a nevelőhelyiségbe, ahol a hőmérséklet 22 °C, a fotoperiódus 16 órás volt. A megvilágítás erősségét 3 héten keresztül hetente emeltük: a fényre helyezést követő 1. héten 35 µmol m⁻² s⁻¹ PPF, 2. héten 70 µmol m⁻² s⁻¹ PPF, majd a 3. héttől 105 µmol m⁻² s⁻¹ PPF volt a regeneráció végéig (7 vagy 9 hét) (D+L kezelés). A dolgozatban bemutatott egyik kísérletsorozatban a tTCL explantátumok felénél nem alkalmaztunk sötétkezelést a regeneráció kezdetén. Ezeket az explantátumokat a regeneráció kezdetétől 35 µmol m⁻² s⁻¹ PPF megvilágítás mellett neveltük az első 4 hétben (L kezelés), azt követően a megvilágítási viszonyok megegyeztek a fent leírtakkal (D+L kezelés).

A járulékos hajtások gyökereztetése során a tenyésztés körülményei megegyeztek az előkezelés során alkalmazott tenyésztési körülményekkel az elongáció és a gyökérelongáció során: 16 órás fotoperiódus, 105 µmol m⁻² s⁻¹ PPF megvilágítás és 22 °C. A gyökérindukciós szakaszban a tenyészedenyeket lesötétítettük (az üvegeket fóliával körbetekertük).

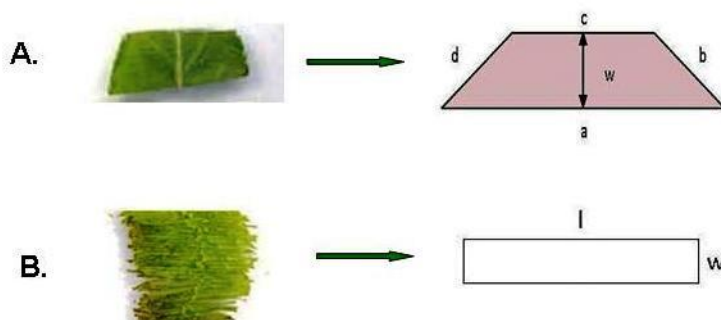
Az aromás oldalláncú citokininek axilláris hajtásfejlődésre kifejtett hatásának vizsgálatakor a hajtásokat 3 hétig neveltük nevelőhelyiségben 22 °C, 16 órás fotoperiódus, 57 µmol m⁻² s⁻¹ PPF megvilágítás mellett.

3.5. MORFOLÓGIAI PARAMÉTEREK MÉRÉSE

3.5.1. Explantátum morfológiai paramétereinek mérése

Az explantátumok preparálást követően steril körülmények között sztereomikroszkóp segítségével megmértük a preparált levéllemez explantátumok méretét a 1. ábrán bemutatott módon, valamint a levéllemez vastagságát (h) is megmértük. Explantátum típusonként (konvencionális, vagy tTCL explantátum), illetve az explantátum eredete szerint (1., vagy 2.

csúcsi levél) minimum 60 explantátum méretadatait vettük fel ismétlésenként, a méréseket legalább háromszor megismételtük.



1. ábra. Az explantátumok méretének felvétele (A) konvencionális, és (B) tTCL explantátumok esetében.

Konvencionális explantátum méreteit egy képzetben a levélexplantátumra illesztett trapéz oldal (a, b, c, d), és magasság (w) méretei alapján vettük fel.

tTCL explantátum méreteit egy képzetben a levélexplantátumra illesztett téglalap oldal (l, w) méretei alapján vettük fel. w: mindig a preparált explantátum szélessége, azaz konvencionális explantátum esetén kb. 5 mm, tTCL explantátum esetében pedig 0,1-0,3 mm. Ezeken a paramétereken kívül mértük a levéllemez vastagságát is (h) (az ábrán nem szerepel).

3.5.2. A hajtásfejlődés ideje alatt, illetve a tenyésztés végén felvett morfológiai paraméterek

A járulékos hajtásregenerálódás vizsgálata során a levélexplantátumokon a hajtások regenerációját a következő paraméterek alapján értékeltük.

Megszámoltuk a regenerációt mutató explantátumok számát, mind a kalluszfajldást, mind a hajtásregenerációt mutató explantátumok számát, és azt százalékosan adtuk meg a preparált és táptalajra helyezett explantátumokhoz viszonyítva, így kaptuk a kalluszosodási százalék (C%), illetve a hajtásregenerálódási százalék (HR%) értékeket.

Megszámoltuk a hajtásregenerációt mutató explantátumokon a regenerálódó hajtások számát, s így kaptuk a regenerálódó explantátumonkénti átlagos hajtásszámot, vagy röviden a hajtásszámot (HSZ).

A HR% és HSZ adatok, valamint az egy levélből preparált explantátumok száma alapján kiszámoltuk az egy levélre eső átlagos hajtásszámot is, azaz a levél hajtáshozamát.

A C%, HR% és HSZ adatokat minden esetben felvettük a kísérletek végén, a 7. és 9. héten, illetve a regenerációs periódus hosszának vizsgálata esetében ezen kívül a regeneráció 4., 5. és 6. hete után is. A regeneráció ideje alatt a méréseket steril körülmények között, lamináris boxban végeztük el.

A kísérletekben kezelésenként konvencionális explantátumok esetében legalább 60, tTCL explantátumok esetében legalább 120 explantátum adatait értékeltük (C%, HR%, HSZ), és három független kísérletet végeztünk.

A regenerálódott hajtások gyökeresítése során a gyökeresedett regeneránsok számát az összes regeneráns számához viszonyítottuk, és ezt százalékosan kifejezve kaptuk meg a gyökeresedési százalékot.

3.6. KLOROFILL FLUORESZCENCIA MÉRÉSE

Kísérleteinkben vizsgáltuk az aromás oldalláncú citokininek hatását az *in vitro* axilláris alma hajtások leveleinek klorofill fluoreszcenciájára. Minden esetben a 2. csúcsi kifejtett levél klorofill fluoreszcenciáját mértük. Minden kezelésből három független hajtás klorofill fluoreszcenciáját mértük meg, s a méréseket három független kísérletből megismételtük. A mérésekhez az OS5p Modulated (Opti-Sciences, USA) fluorimétert használtuk. A fluoriméter szoftverének két módszerét használtuk: az F_v/F_m protokolt, illetve a Yield (vagy $Y(II)$) protokolt.

Az F_v/F_m protokoll egy ún. sötét-adaptált teszt, amihez a leveleket a mérés előtt 30 percig lesötétítettük. Az F_v/F_m teszttel a PSII maximális potenciális kvantumhatékonyságát mérjük, amikor – a mérést megelőző lesötétítéssel elérjük, hogy – a II. fotokémiai rendszer (PSII) minden reakciócentrumba nyitott legyen (PSII elektronakceptorai oxidált állapotba kerülnek). Az F_v/F_m aránnyal becsüljük, hogy az abszorbeált fénykvantumok milyen maximális aránya képes a PSII reakciócentrumbaiban hasznosulni. A sötétadaptált levelek minimális (F_0) és maximális fluoreszcenciáját (F_m) 0,8 másodperces telítési fényfelvillanást (35W halogén lámpa, 690 nm-es szűrővel) követően mértük. A PSII változó fluoreszcenciáját ($F_v = F_m - F_0$) és a maximális kvantumhatékonyságát (F_v/F_m) a fluoriméter szoftver kiszámolta. Az adatokból kiszámítottuk a PSII fotokémiai folyamatainak maximális hatékonyságát (F_v/F_0).

A Yield protokoll, vagy $Y(II)$ teszt egy gyors, fényadaptált ún. steady-state fotoszintetikus teszt, amely méri, hogy a PSII klorofilljai által abszorbeált fény mennyiségéhez viszonyítva mennyi fényt hasznosított a PSII fotokémiai rendszer. Tulajdonképpen a PSII hatékonyságát adja meg az aktuális fotoszintetikus megvilágítási viszonyok között. A fluoriméterrel a fényadaptált levelekben az ún. steady-state fluoreszcenciát (F_s), és a maximális fluoreszcenciát (F_{ms}) mértük, amiből a szoftver kiszámolta a PSII aktuális kvantumhatékonyságát ($Y(II) = (F_{ms} - F_s) / F_{ms}$) és a becsült relatív elektrontranszport rátát (ETR).

3.7. KLOROFILL TARTALOM SPEKTROFOTOMÉTERES MEGHATÁROZÁSA

Kísérleteinkben vizsgáltuk az aromás oldalláncú citokininek hatását az *in vitro* axilláris alma hajtások leveleinek klorofill tartalmára. A klorofill tartalom meghatározásához begyűjtöttük az *in vitro* fejlődött 3 hetes almahajtások két, teljesen kifejtett csúcsi levelét, melyek 3 hetes tenyésztés során fejlődtek (Dobránszki és mts., 2002). A mintákat a klorofill tartalom meghatározásáig ultramélyhűtőben tároltuk $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

A levélminták klorofill tartalmát Felföldi (1987) spektrofotometriás módszere szerint határoztuk meg. Minden kezelésből három kivonást végeztünk. A levélmintákat (500 mg) porcelán mozsárban kevés MgO és üvegporsó vagy alt. kvarchomok segítségével, pár csepp metanollal homogenizáltuk, majd felöntöttük metanollal, első forrásig ($74\text{ }^{\circ}\text{C}$) hevítettük, hogy inaktiváljuk a klorofilláz enzimet. Ezután a mintákat szívópalackba szűrtük és újra felöntöttük metanollal. Az így elkészített pigmentkivonatot 750, 666 és 653 nm hullámhosszokon fotometráltuk (abszorbanciák: A_{750} , A_{666} , és A_{653}). A 750 nm-en mért érték a zavarosság, melynek értékét levontuk a másik két hullámhosszon mért értékekből, majd az alábbi számítás alapján meghatároztuk a pigmentkivonat klorofill a, klorofill b és klorofill a + klorofill b tartalmát:

dc_935_14

$$\text{klorofill } a = 17.12 A_{666} - 8.68 A_{653}$$

$$\text{klorofill } b = 32.23 A_{653} - 14.55 A_{666}$$

$$\text{klorofill } a + \text{klorofill } b = 2.57 A_{666} - 23.6 A_{653}$$

Ezután a pigment tartalmat átszámítottuk $\mu\text{g} / 1 \text{ g}$ levél nedves súlyra (FW).

3.8. STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS

Az adatokat Microsoft Excel 14.0 program segítségével digitalizáltuk, az adatok értékelését SPSS for Windows (13.0 és 21.0 verziók), valamint ROPstat (Varga, 2007) programcsomagokkal végeztük el. A statisztikai értékelés első lépéseként a szóráshomogenitás és normális adateloszlás feltételének teljesülését vizsgáltuk meg. Ha a feltételek teljesültek, az adatokat variancia-analízissel értékeltük. Ezt követően elvégeztük a páronkénti összehasonlítást, a járulékos hajtásregenerációs kísérletekben Tukey-tesztel ($P < 0,05$), a klorofill fluoreszcencia és klorofill tartalom mérések esetén pedig Duncan-tesztel ($P < 0,05$), mindkét esetben 95%-os szignifikancia szint mellett.

Amennyiben az adatok analízise azt mutatta, hogy a normalitás, vagy a varianciák homogenitása kritérium sérült, robosztus módszereket használtunk az adatok értékelésére. A varianciák értékelésére robosztus Welch-tesztet használtunk, azt követően a páronkénti összehasonlítást Games-Howell tesztel ($P < 0,01$) végeztük a járulékos hajtásregenerációs kísérletekben, 99%-os szignifikancia szint mellett.

A klorofill fluoreszcencia és a klorofill tartalom közötti összefüggés-vizsgálathoz a Pearson-féle korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg, annak szignifikanciáját t-próbával vizsgáltuk 95 és 91% szignifikancia szintek mellett.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A LEVÉLEXPLANTÁTUM SZEREPE AZ ALMA JÁRULÉKOS (ADVENTÍV) HAJTÁSREGENERÁCIÓJÁBAN

4.1.1. Konvencionális és tTCL explantátumok regenerációs képessége

A kísérletekben megvizsgáltuk, hogy az *in vitro* almahajtások leveleiből készített tTCL explantátumokon lehetséges-e járulékos hajtásképződést indukálni. A hagyományosan jól regenerálódó ('Royal Gala'), illetve a nehezen regenerálódó ('Freedom') almafajták eltérő regenerációs kapacitást mutattak.

A 'Royal Gala' fajtánál a regenerációs százalék a kontrol kezelésekben 100% volt, a tTCL explantátumokon az explantátum eredete szignifikánsan befolyásolta az elért HR%-ot. Míg az 1. levélről származó tTCL explantátumok esetén HR% (92-97%) nem tért el szignifikánsan a kontrol explantátumok HR% értékétől (100%), addig a 2. levélről származó tTCL explantátumok közül már szignifikánsan kevesebb tTCL mutatott hajtásregenerációt (71-78%). 'Freedom' fajta hajtásregenerációs kapacitása jelentősen kisebb volt, mint a 'Royal Gala' fajtáé. Ha az explantátumok a 2. levélről származtak, az mind a konvencionális, mind a tTCL explantátumok esetén szignifikánsan csökkentette a regenerációs százalékot; 39%-ról 25%-ra konvencionális, és 34,5%-ról 11%-ra tTCL explantátum esetén. Az 1. levélről származó explantátumok esetén a konvencionális és a tTCL explantátumok regenerációs százaléka nem tért el, viszont a 2. levélről származó explantátumok esetén HR% szignifikánsan kisebb volt a tTCL explantátumok esetében.

A hajtásregenerációt mutató explantátumokon az átlagos hajtásszám (HSZ) szintén a 'Royal Gala' fajta esetén volt nagyobb (2. a, b, e, f, i, j ábra). HSZ nagyobb volt, ha a konvencionális explantátumon indukáltuk a hajtásfejlődést, de a 2. levélről származó, és kezdetben (3 hétig) sötétben tenyésztett tTCL explantátumokon regenerálódott hajtások száma (5,1 db/explantátum) elérte az 1. levélről származó konvencionális explantátumon regenerálódó hajtások számát (5,6 db/explantátum). A 2. levélről származó tTCL explantátumok esetén a kezdeti sötétben tenyésztés elmaradása esetén a regenerálódó hajtások száma gyakorlatilag a felére csökkent (2,7 HSZ az 5,1 HSZ-vel szemben). 'Freedom' fajta esetében a tTCL explantátum alkalmazása tendenciálisan csökkentette a HSZ értékét (2,1 db/explantátum értékről 1,5 illetve 1,4 db/explantátumra) (2. c, d, g, h ábra), azonban ezt statisztikailag nem lehetett igazolni, tehát a konvencionális és a tTCL explantátumok között HSZ tekintetében nem volt különbség. Ennél a fajtánál az explantátum eredete (1. vagy 2. levélről származik) sem befolyásolta a végső HSZ értékét. A regeneráció kezdeti szakaszában a sötét kezelés elmaradása azonban teljesen gátolta a (HSZ=0) (2. k, l ábra).



2. ábra. Hajtásregeneráció ‘Royal Gala’ (a, b, e, f, i, j) és ‘Freedom’ (c, d, g, h, k, l) fajták levélexplantátumain 7 hetes tenyésztést követően. Hajtásregeneráció az 1. (a, c) és 2. (b, d) csúcsi levélről származó kontrol (konvencionális) levélexplantátumokon. Hajtásregeneráció a tTCL explantátumokon (e, f, i, j, g, h, k, l). Regeneráció az 1. csúcsi levélről származó explantátumon, ha a tenyésztés első 3 hetében sötétben végeztük a tenyésztést (D+L kezelés) (e, g), illetve, ha a kísérlet során végig fényben tenyésztettük az explantátumokat (i, k). Regeneráció az 2. csúcsi levélről származó explantátumon, ha a tenyésztés első 3 hetében sötétben tenyésztettük az explantátumokat (D+L kezelés) (f, h), illetve ha a kísérlet során végig fényben tenyésztettük az explantátumokat (j, l).

Jelen kísérletekkel nemzetközileg elsőként bizonyítottuk be, hogy levél tTCL explantátumokon járulékos hajtásfejlődés indukálható alma növény esetén (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2011) mind a hagyományosan könnyen (‘Royal Gala’), mind a nehezen (‘Freedom’) regenerálódó almafajtából. Továbbá bizonyítottuk, hogy a tenyésztés kezdetén alkalmazott fény, illetve az explantátumot szolgáltató levél pozíciója befolyásolja a tTCL explantátumok regenerációs hatékonyságát, azaz HR%, illetve HSZ értékeit.

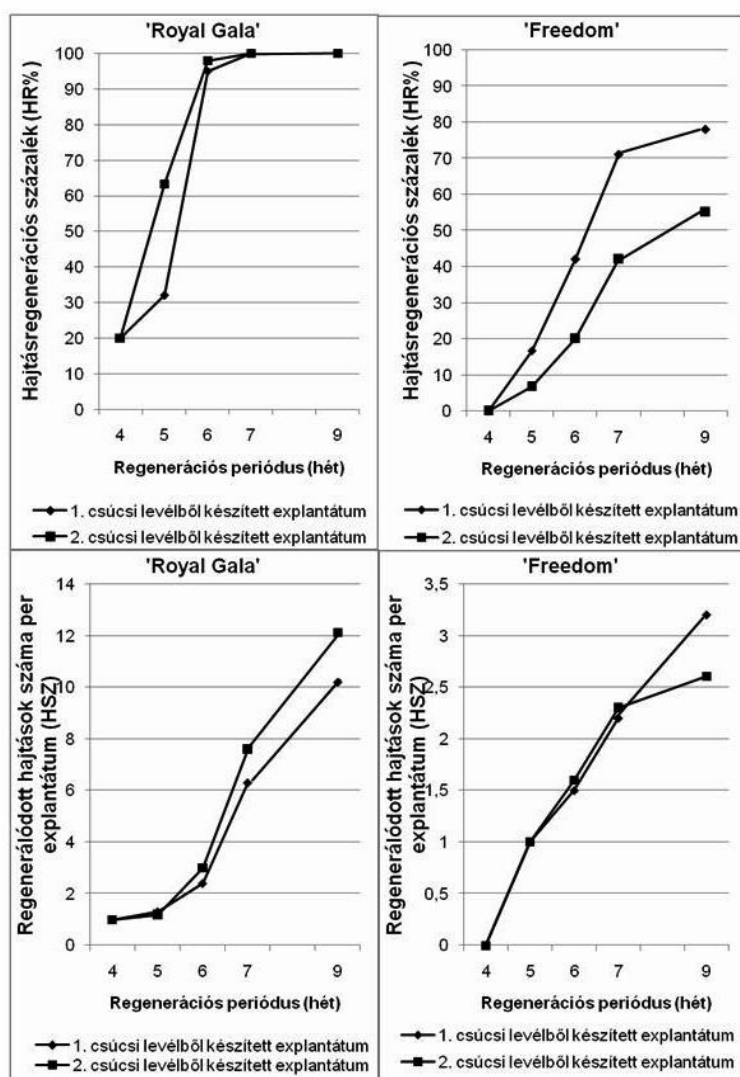
4.1.2. Az explantátum mérete, kora (levélpozíció), és kölcsönhatása a regeneráció idejével és a táptalaj citokinin tartalmával

Részletesebben vizsgáltuk az alábbi tényezők szerepét, illetve kölcsönhatását a járulékos hajtásregenerációra:

- explantátum kora, azaz 1. vagy 2. csúcsi levélről származó explantátum,
- explantátum mérete, azaz konvencionális, vagy tTCL explantátum,
- a regeneráció ideje, azaz mennyi ideig neveljük az explantátumokat a regenerációs táptalajon,
- tTCL explantátumok esetén a regenerációs táptalaj TDZ koncentrációjának hatása.

4.1.2.1. A regenerációs periódus hatása a hajtásregenerációra konvencionális levél-explantátumok esetén

A hajtásregenerációs százalék (HR%) tekintetében nyilvánvaló a fajták közötti különbség.



3. ábra. A kísérleti adatok alapján felrajzolt növekedési görbék.

A 'Royal Gala' fajtánál gyakorlatilag mindegyik explantátum hajtásregenerációt mutat már a 6. héten (HR%: 95-98%), míg Freedom fajtánál a 9. hét végén is csak az explantátumok 55, illetve 78%-án fejlődött hajtás (3. ábra). A 'Freedom' fajta esetében a mért kísérleti adatokból becsülhető, hogy a HR% a 100%-ot nem érne el a regenerációs időszak további növelése esetén sem, a várható telítési értékek 60% (a 2. levélről származó explantátumoknál), illetve 80% körül becsülhetőek (az 1. levélről származó explantátumoknál). Az explantátumonként regenerálódott hajtások száma (HSZ) a kísérletek során egyik esetben sem érte el az adatok alapján elméletileg becsülhető maximális értékeket; mivel a HSZ értékek szignifikánsan növekedtek az idő előrehaladtával (3. ábra), azaz még a növekedés logaritmikus fázisában voltak; kivéve a 'Freedom' esetében a 2. levélről származó explantátumokat, ahol a növekedés telítési fázisát már elérte a HSZ.

4.1.2.2. A regenerációs periódus és a táptalaj citokinin tartalmának hatása a hajtásregenerációra tTCL levélexplantátumok esetén

A regenerációs táptalaj TDZ koncentrációja szignifikánsan befolyásolta a tTCL explantátumok regenerációs kapacitását, kölcsönhatásban a regeneráció időtartamával (7 vagy 9 hét), az explantátum korával (1. és 2. csúcsi levélről származó explantátumok; levélpozíció) a genotípustól függően.

A járulékos hajtásregenerációra optimális TDZ koncentráció mind a genotípustól, mint az explantátum típusától függött. Figyelembe véve mind a HR%, mind a HSZ értékeket (2. táblázat), a 'Royal Gala' tTCL explantátumai számára a nagyobb TDZ koncentráció volt optimális; 5 mg/l TDZ optimum a tTCL explantátumok regenerációjakor, szemben a konvencionális explantátumok 0,5 mg/l TDZ optimumával. A 'Freedom' fajta esetében a helyzet pont fordított volt, míg a konvencionális explantátumok járulékos hajtásfejlődése 5 mg/l TDZ koncentrációjú táptalajon volt optimális, addig a tTCL explantátumok optimális hajtásregenerációját az alacsonyabb, 2,5 mg/l TDZ koncentrációjú táptalaj biztosította 7 hetes regenerációs periódus alatt. Ha a regeneráció időtartamát meghosszabbítottuk, a táptalaj optimális citokinin tartalma az explantátum korával kölcsönhatásban befolyásolta a hajtásfejlődést. 'Royal Gala' fajta tTCL explantátumainak járulékos hajtásregenerációját a táptalaj TDZ koncentrációja 0,5-2,5 mg/l intervallumban segítette a legjobban, ha az explantátumok az 1. csúcsi levélből származtak. A 2. csúcsi levélből származó tTCL explantátumok esetén azonban a táptalaj optimális TDZ tartalma 5,0 mg/l volt, hasonlóan, mint a 7 hetes tenyésztést követően. Ezzel szemben a 'Freedom' fajta járulékos hajtásregenerációjára optimális TDZ koncentráció a regenerációs periódus meghosszabbításával nem változott.

2. táblázat. A genotípus, az explantátum típusa, a táptalaj TDZ koncentrációja és a regeneráció idejének hatása a tTCL levélexplantátumok regenerációs (HR%) százaléka és a regenerálódó hajtások számára (HSZ).⁺

Levél pozíció	Explantátum típusa	TDZ mg/l (μM)	Regenerációs százalék (HR%)				Regenerálódott hajtások száma / regenerálódó explantátum (HSZ)			
			7 hetes tenyésztés után		9 hetes tenyésztés után		7 hetes tenyésztés után		9 hetes tenyésztés után	
			Royal Gala	Freedom	Royal Gala	Freedom	Royal Gala	Freedom	Royal Gala	Freedom
1. csúcsi levél	konvencionális	0,5 (2,27)	100 a	-	100 a ^{ns}	-	6,3 a	-	10,2 a ^s	-
		5,0 (22,7)	-	71 a	-	78 a ^{ns}	-	2,2 a	-	3,2 a ^s
	tTCL	0,25 (1,135)	42 bc	0 c	63 b ^{ns}	3 c ^{ns}	2,5 b	0 c	3,9 bc ^{ns}	1,5 b ^s
		0,5 (2,27)	17 bc	15 b	22 c ^{ns}	17 b ^{ns}	2,0 b	1,1 b	5,5 b ^s	1,1 b ^{ns}
		1,0 (4,54)	42 bc	3 bc	64 b ^{ns}	12 bc ^{ns}	3,5 ab	1,5 ab	6,3 b ^s	1,4 b ^{ns}
		2,5 (11,35)	60 b	52 a	73 a ^{ns}	54 a ^{ns}	4,2 ab	2,1 a	5,6 b ^{ns}	2,4 a ^{ns}
		5,0 (22,7)	58 b	35 ab	70 b ^{ns}	40 ab ^{ns}	4,4 a	1,5 ab	5,1 bc ^{ns}	2,3 a ^{ns}
		10,0 (45,4)	12 c	17 b	18 c ^{ns}	21 b ^{ns}	2,6 ab	1,5 ab	3,1 c ^{ns}	2,3 a ^{ns}
		25,0 (113,5)	0 d	5 bc	0 d ^{ns}	8 bc ^{ns}	0 c	1,5 ab	0 d ^{ns}	1,7 ab ^{ns}
	2. csúcsi levél	0,5 (2,27)	100 a	-	100 a ^{ns}	-	7,6 a	-	12,1 a ^s	-
		5,0 (22,7)	-	42 a *	-	55 a ^{ns}	-	2,3 a	-	2,6 a ^{ns}
		0,25 (1,135)	14 c *	10 b	67 b ^s	12 bc ^{ns}	1,6 c	1,8 ab *	3,4 c ^{ns}	1,9 ab ^{ns}
		0,5 (2,27)	25 bc	19 ab	29 c ^{ns}	25 b ^{ns}	3,2 b	1,5 ab	4,1 bc ^{ns}	2,2 ab ^{ns} *
		1,0 (4,54)	37 bc	8 b	43 bc ^{ns}	8 bc ^{ns}	3,2 b	1,0 b	4,9 bc ^{ns}	1,0 b ^{ns}
		2,5 (11,35)	32 bc	11 b *	50 bc ^{ns}	14 bc ^{ns} *	2,8 b	2,3 a	5,2 bc ^s	2,8 a ^{ns}
		5,0 (22,7)	88 a *	12 b	88 a ^{ns}	12 bc ^{ns} *	4,4 b	1,4 ab	6,5 b ^s	1,5 b ^{ns} *
		10,0 (45,4)	52 b *	3 bc	62 b ^{ns} *	3 bc ^{ns}	2,8 b	1,0 b	4,5 bc ^s	1,5b ^{ns} *
		25,0 (113,5)	0 d	0 c	0 d ^{ns}	0 c ^{ns}	0 d	0 c *	0 d ^{ns}	0 c ^{ns} *

⁺: Az átlagértékeket követő kis betűk a Games-Howell-teszt alapján meghatározott homogén csoportokat ($P < 0,01$) jelölik, a genotípuson és a levélpozíción belül összehasonlítva az adatokat. ^s: szignifikáns különbség a regenerációs idők (7, vagy 9 hét) között; ^{ns} nincs szignifikáns különbség. * szignifikáns különbség az 1. és a 2. levélről származó explantátumok között.

Eredményeink megerősítik, hogy az alma levéllemezből történő járulékos hajtásfejlődés számára a táptalaj optimális TDZ koncentrációja fajtától függően 0,1 és 5,0 mg/l között változik (Hanke és mts., 1991; Montecelli és mts., 2000; Magyar-Tábori és mts., 2010). A korábban más szerzők által közölt eredményeken túl kísérleteink eredményei azt is mutatták, hogy az optimális TDZ koncentráció függött a regenerációra használt explantátum típusától is mindkét vizsgált alma fajtánál. Megállapítottuk továbbá, hogy az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciója, azaz az explantátum kora a tTCL explantátumok esetén befolyásolta a regenerálódó explantátumok százalékát (HR%), de nem befolyásolta a regenerálódó explantátumokon elérhető átlagos hajtásszámot (HSZ), ha a táptalaj TDZ tartalma optimális volt (2,5 mg/l a 'Freedom' fajtánál, és 5,0 mg/l a 'Royal Gala' fajtánál).

4.1.2.3. A regenerálódott járulékos hajtások genetikai stabilitása

A különböző TDZ tartalmú táptalajon, különböző korú explantátumokon regenerálódó hajtások genetikai stabilitását előzetesen teszteltettük molekuláris, SSR módszerrel. A vizsgálatokat Prof. Dr. Kiss Erzsébet és munkatársai végezték el a Szent István Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézetében.

A vizsgálatokban kétféle kontrollt alkalmaztunk, a mikroszaporított (axilláris hajtásfejlődéssel regenerálódott) hajtásokat, illetve a konvencionális explantátumon fejlődő járulékos hajtásokat (indirekt regeneráció). Az eredmények alapján a különböző levélpozícióból származó, s így különböző korú tTCL explantátumokon eltérő TDZ koncentráció mellett indukálódott járulékos hajtások genetikailag stabilak voltak. Sem az explantátum típusa (konvencionális, vagy tTCL), sem az explantátumok kora (1. vagy 2. csúcsi levélből származó), sem a növekvő citokinin (TDZ) koncentráció nem okozott genetikai változást. Az eredmények alapján a regeneráció módja, a járulékos hajtásfejlődés sem okozott az alkalmazott molekuláris módszerrel kimutatható genetikai változást az axilláris hajtásfejlődéssel szaporított növényállományhoz képest.

4.1.2.4. A regenerálódott járulékos hajtások elongációja és gyökeresítése

A regeneránsok gyökeresítésére a korábban laboratóriumunkban kidolgozott módszert alkalmaztuk (Magyar-Tábori és mts., 2011). A 'Royal Gala' fajtánál nem okozott problémát a gyökeresedésben, hogy a hajtások járulékos regenerációval fejlődtek. A 'Royal Gala' járulékos hajtásai 75-80%-os gyökeresedést mutattak, amely megegyezik az axilláris úton fejlődött hajtások gyökeresedési kapacitásával (80%). A 'Freedom' fajta esetén azonban a regeneránsok egy része nem gyökeresedett; de a táptalaj optimális TDZ koncentrációja (2,5 mg/l) mellett, alma levél tTCL explantátumok 9 hetes regenerációja esetén fejlődő hajtások gyökeresedése az axilláris hajtások gyökeresedési százalékával megegyező, ezért az ennél a fajtánál is megfelelő volt. Ha a hajtások 2,5-10,0 mg/l TDZ tartalmú táptalajon tenyésztett tTCL explantátumokról származtak, a gyökeresedési kapacitásuk 33-40% közötti volt, ami megfelel a fajtánál az axilláris hajtások gyökeresedési képességének (40-45%). A gyökeresedett hajtásokat mindkét almafajta esetében sikeresen akklimatizáltuk (95-100%).

4.1.3. A növényi Növekedési Korrekciós Faktor (GCF) és a Geometriai Faktor (GF) fogalmának bevezetése

4.1.3.1. A GCF és GF elméleti alapjai

Ha egy explantátum regenerációs képességét akarjuk mérni, vagy különböző méretű, vagy típusú explantátumok regenerációs képességét hasonlítjuk össze, akkor kétszintű megközelítés lehetséges.

Az I. eset (explantátum-alapú összehasonlítás), amikor az egyik típusú/méretű explantátum regenerációs képességét hasonlítjuk egy másik méretű és/vagy alakú explantátum regenerációs képességéhez, például, esetünkben az almánál a fejlődő hajtások számát explantátumonként összehasonlítjuk egy regenerációt mutató hagyományos levél explantátum és egy regenerációt mutató tTCL levélexplantátum esetében. A II. eset (kiindulási szerv/szövet-alapú összehasonlítás), amikor a kiindulási szerv (vagy szövet) új szerv (célszerv, pl. hajtás, gyökér, PLB vagy embrió) hozamát hasonlítjuk össze. Kísérleteinkben az alma levél hajtáshozamát hasonlítottuk össze hagyományos és tTCL explantátumok használata esetén; azaz, azt vizsgáltuk mennyi új hajtást lehet nyerni, ha a levélből hagyományos, és mennyit, ha tTCL explantátumokat preparálunk. Az I. esetben, az explantátum-alapú összehasonlításnál, csak a regenerációt mutató explantátumokat vesszük figyelembe az összehasonlításnál, ez más szóval az explantátum új szerv hozamát jelenti. Ha a célunk az - és gyakorlatban általában erről van szó -, hogy megtaláljuk azt a megfelelő explantátum méretet (és alakot), amikor a legnagyobb hatékonysággal tudunk új szerveket (esetünkben pl. hajtásokat) regenerálni, akkor azt is figyelembe kell vennünk, hogy a preparált explantátumok hány százaléka képes regenerációra (R%), azaz nem csak a regenerációt mutató explantátumokat vesszük figyelembe, ez a II. eset, vagyis a kiindulási szerv/szövet-alapú összehasonlítás, azaz a kiindulási szerv/szövet új szerv hozama.

A fenti elméleti megfontolások alapján az előző fejezetekben bemutatott kísérletek eredményeire is alapozva a kísérleti eredmények értékeléséhez és összehasonlításához bevezettük a Növekedési Korrekciós Faktort (GCF) és a Geometriai Faktor (GF) fogalmakat. A Növekedési Korrekciós Faktor (GCF) egy arányszám, amely azt kifejezi ki, hogy hányszor több új (cél) szerv (hajtás, gyökér, szometikus embrió, PLB stb.) regenerálható egy kiindulási szervből, vagy szövetből két különböző méretű és/vagy alakú explantátumot alkalmazó módszer összehasonlításakor. Az explantátum-alapú összehasonlításnál (I. eset) az explantátum regenerációs kapacitásának van egy komponense, amely csak az explantátum alakjától és méretétől függ, és az explantátum felülete és/vagy térfogata alapján számítható. Ez a tényező a Geometriai Faktor (GF). A 3. táblázatban bemutatom, hogyan közelíthető a különböző explantátum típusok alakja egyszerű mértani (geometriai) testekkel, illetve ez alapján hogyan számítható a felületük és a térfogatuk. Az explantátumok felületének és a térfogatának szerepe van a GF számításában attól függően, hogy a regeneráció csak az epidermális és szubepidermális szövetekből történik (epidermális felületet és a térfogatot vesszük figyelembe), vagy részt vesznek a folyamatban a mezofillum sejtjei is (a teljes felületet és a térfogatot vesszük figyelembe).

3. táblázat. A különböző alakú TCL és konvencionális explantátumok becsült felszíne és a térfogata a geometriai alakjuk alapján becsülve.

Mértani test	Felszín (A)	Epidermisszel borított felszín (A_{epid})	Térfogat (V)	Explantátum típus
Téglatest (Téglalap alapú hasáb)	$A = 2 h(l+w) + 2 lw$	2 lw (tTCL esetén) lw (ITCL esetén)	$V = lwh$	tTCL levélből**; ITCL bármely szervből
Henger/korong	$A = 2 \pi r(h+r)$	$2 \pi rh$	$V = r^2 \pi h$	Konvencionális szárexplantátumok; tTCL gömbölyű, vagy hengeres szervekből, pl. szár, gyökér, levélnyel stb.
Félhenger	$A = \pi r(h+r)$	πrh	$V = (r^2 \pi h)/2$	Konvencionális szárexplantátumok; tTCL gömbölyű, vagy hengeres szervekből, pl. szár, gyökér, levélnyel stb.
Trapéz alapú hasáb*	$A = h(a+b+c+d) + w(a+c)$	$2 w(a+c)$	$V = h(w(a+c)/2)$	Konvencionális levélexplantátum
Gömb (félgömb)	$A = 3 \pi r^2$	$2 \pi r^2$	$V = 2/3 \pi r^3$	Egész, vagy fél-PLB, SAM
*: a, b, c, d: konvencionális levélexplantátumok esetén a trapéz alap oldalai, ahol a és c a szemben lévő oldalak (az explantátum vágási felületei) ld.: 12. és 13. ábra. ** Noha a levélexplantátumokból készített tTCL explantátumok szintén trapéz alakú hasákkal közelíthetők meg elméletileg, a gyakorlatban a nagyon kis méretük miatt a trapézalapú hasáb paraméterei nem mérhetőek. Ezért ebben az esetben téglatestet használunk a felület és a térfogat becslésére. (w: explantátum szélessége, vagy vastagsága). PLB = protokormszerű test (protocorm-like body); SAM = hajtáscsúcs merisztéma (shoot apical meristem)				

dc_935_14

A két faktor közötti kapcsolatot a különböző méretű és/vagy alakú explantátumok R%-ainak (regenerálódó explantátumok százaléka) hányadosa adja, figyelembe véve az explantátumok számát is, amelyek az adott kiindulási szervből, szövetből készíthetők; konvencionális és TCL explantátumok összehasonlítása esetén az alábbi módon:

$$R\%_{\text{conv}} / n R\%_{\text{TCL}},$$

ahol n = a konvencionális (conv.) explantátumból elméletileg preparálható TCL explantátumok száma.

A regenerációt számos egyéb tényező és körülmény (faj, fajta, táptalaj összetétele, egyéb *in vitro* körülmények a regeneráció során) is befolyásolja, melyek hatását 'k' faktorként összegezve, a GCF és GF között az összefüggést az alábbiakban adhatjuk meg:

$$GCF = \frac{n R\%_{\text{TCL}}}{R\%_{\text{conv}}} k GF$$

A 'k' értékét minden olyan *in vitro* kísérleti körülmény befolyásolhatja, melyet az *in vitro* kísérletek beállítása során módosítunk, amennyiben azok hatással vannak a regenerációs kapacitásra (pl. táptalaj összetevők, vagy fizikai tényezők, mint pl. a megvilágítás, vagy a hőmérséklet).

4.1.3.2. A GCF és GF gyakorlati alkalmazása alma modell növényen

A GCF és GF gyakorlati alkalmazását a jelen dolgozatban bemutatott kísérleti adatok (4. táblázat) felhasználásával mutatom be a vizsgált két almafajtánál ('Royal Gala', 'Freedom').

GF – definíciójából adódóan – arányos a két explantátum típuson mérhető hajtásszámok (HSZ_{TCL} és $HSZ_{\text{conv.}}$) hányadosával az alábbi összefüggés szerint:

$$HSZ_{\text{TCL}} = GF k HSZ_{\text{conv.}}$$

Mivel irodalmi adatokból ismert, hogy mind az epidermális/szubepidermális, mind a mezofillum sejtek részt vesznek alma levéllemezből történő hajtásregenerációjában, ezért a GF számításakor az explantátum teljes felületét (A_{conv} és A_{TCL}), valamint térfogatát (V_{conv} és V_{TCL}) vettük figyelembe. A GF (=GF_{conv.-tTCL}) kiszámítása a két explantátum (jelölés alsó indexben: conv.: konvencionális explantátum; tTCL: tTCL explantátum) felület és térfogat arányának hányadosával történt (3. táblázatot is figyelembe véve):

$$GF(= GF_{\text{conv.-tTCL}}) = \frac{\frac{A_{\text{conv}}}{V_{\text{conv}}}}{\frac{A_{\text{TCL}}}{V_{\text{TCL}}}} = \frac{\frac{h_{\text{conv}}(a+b+c+d) + w_{\text{conv}}(a+c)}{h_{\text{conv}} \frac{w_{\text{conv}}(a+c)}{2}}}{\frac{2h_{\text{TCL}}(1+w_{\text{TCL}}) + 2lw_{\text{TCL}}}{lw_{\text{TCL}} h_{\text{TCL}}}}$$

Mivel GF független minden más kísérleti körülménytől (faj, fajta, *in vitro* tenyésztés fizikai és kémiai feltételei), csak az explantátum alakja és mérete határozza meg, ezért a fenti összefüggés minden esetben igaz és a fenti képlettel kiszámítható GF értéke, ha

1.) trapéz alapú hasáb alakú explantátumot hasonlítunk téglalap alapú hasáb alakú explantátumhoz, és

2.) a szervregeneráció – megtartva a kiindulási feltételt – mind az epidermisz/szubepidermisz, mind a mezofillum sejtekből kiindul.

4. táblázat. A mért (HSZ, SR%) és a számított (GF, k, GCF) paraméterek alma regenerációs kísérletekből

Fajta	Explantátum típusa	Az explantátumot szolgáltató levél pozíciója	HSZ Regenerálódott hajtások száma / explantátum					GF (Geometriai Faktor)	k (korrekciós faktor)					SR% (hajtást regeneráló explantátumok százaléka)					GCF (Növényi Növekedés Korrekciós Faktor)				
mintavétel (hetek)			4	5	6	7	9		4	5	6	7	9	4	5	6	7	9	4	5	6	7	9
Royal Gala	konvencionális	1. csúcsi levél	1,0	1,3	2,4	6,3	10,2	0,4712	2,1	1,6	1,6	1,5	1,1	20	32	95	100	100	18,8	16,8	10,9	10,1	8,8
		2. csúcsi levél	1,0	1,2	3,0	7,6	12,1	0,5192	1,9	2,1	1,3	1,1	1,0	20	63,3	98	100	100	10,0	9,0	5,9	12,7	11,8
	tTCL	1. csúcsi levél	1,0	1,0	1,8	4,4	5,1						15	28	55	58	70						
		2. csúcsi levél	1,0	1,3	2,1	4,4	6,5						8	21	33	88	88						
Freedom	konvencionális	1. csúcsi levél	0,0	1,0	1,5	2,2	3,2	0,5328	0,0	1,8	1,5	1,8	1,4	0	16,7	42	71	78	0,0	25,7	15,2	17,5	13,0
		2. csúcsi levél	0,0	1,0	1,6	2,3	2,6	0,5299	0,0	0,0	1,2	1,9	2,0	0	6,8	20	42	55	0,0	0,0	3,9	6,5	6,9
	tTCL	1. csúcsi levél	0,0	1,0	1,2	2,1	2,4						0	18	32	52	54						
		2. csúcsi levél	0,0	0,0	1,0	2,3	2,8						0	0	5	11	14						

Behelyettesítve az alma levélexplantátumokra vonatkozó GF-et, általánosan:

$$\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = GCF \frac{HR\%_{conv}}{n HR\%_{tTCL}} = k GF,$$

$$\text{azaz } \frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = GCF \frac{HR\%_{conv}}{n HR\%_{tTCL}} = k \frac{\frac{A_{conv}}{V_{conv}}}{\frac{A_{tTCL}}{V_{tTCL}}}.$$

A Növekedési Korrekciós Faktor (GCF) és a Geometriai Faktor (GF) fogalmának bevezetésével lehetővé válik nemcsak a tTCL és konvencionális explantátumok, de bármely kiindulási szervből vagy szövetből származó két különböző alakú vagy méretű explantátum regenerációs kapacitásának összehasonlítása mind azonos, mind különböző kísérleti körülmények között. Lehetővé válik a különböző módszerek összehasonlítása is azonos alakú és méretű explantátum használata esetében.

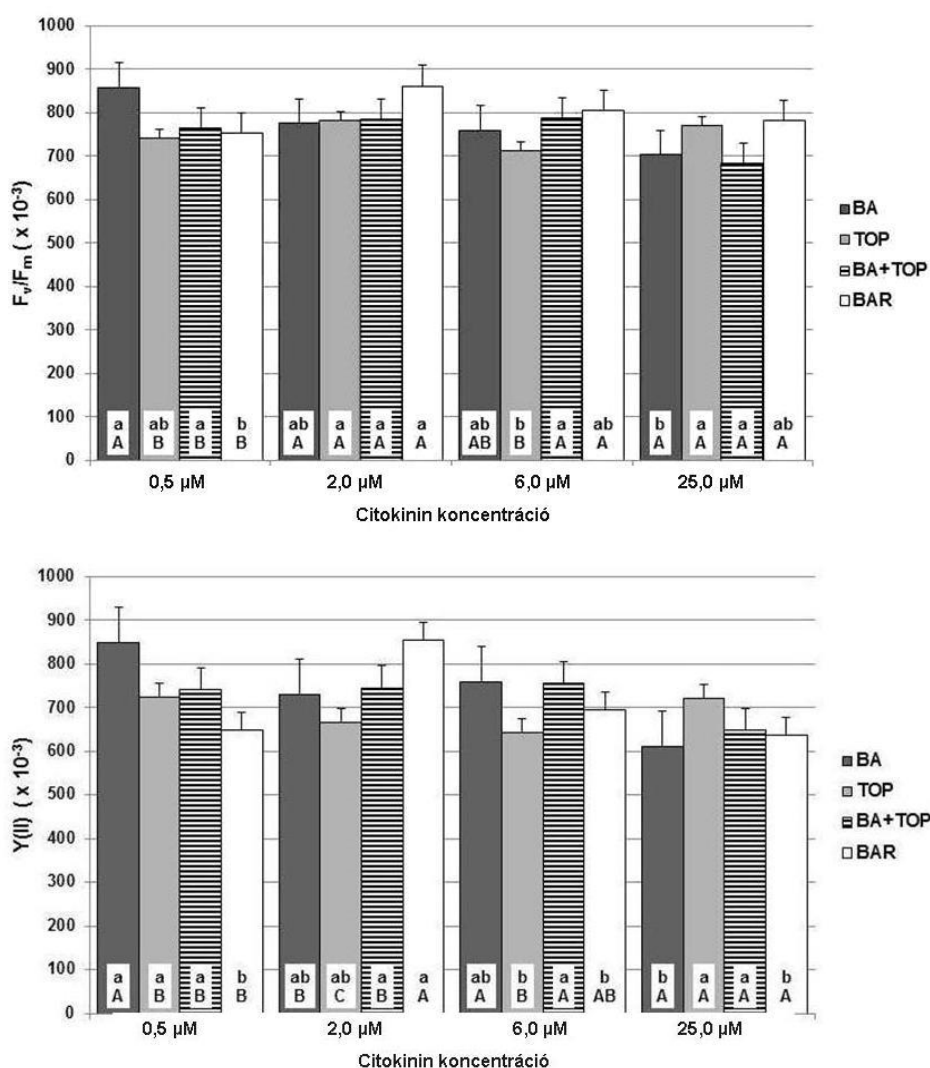
4.2. AROMÁS OLDALLÁNCÚ CITOKININEK HATÁSA AXILLÁRIS *IN VITRO* HAJTÁSOK FOTOSZINTETIKUS APPARÁTUSÁNAK MŰKÖDÉSÉRE ALMA NÖVÉNYBEN

4.2.1. Aromás oldalláncú citokininnek hatása az *in vitro* alma levelek klorofill fluoreszcenciájára

A táptalaj citokinin tartalma befolyásolta mind a sötét-, mind a fényadaptált levelek klorofill fluoreszcenciáját a táptalajhoz adott citokinin típusától és az alkalmazott koncentrációtól függően (4. ábra).

Ha a táptalaj citokinin forrása BA volt, a II. fotokémiai rendszer (PSII) maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m) és a fotokémiai folyamatok maximális hatékonysága (F_v/F_0) is a legalacsonyabb BA tartalom (0,5 μM) esetén volt a legnagyobb. A BA koncentrációjának növelésével mind az F_v/F_m , mind a F_v/F_0 értékei csökkentek. BAR tartalmú táptalajon fejlődött hajtásoknál a legnagyobb F_v/F_m értéket 2,0 μM BAR alkalmazása esetében mértük. A TOP tartalmú táptalajon fejlődött növények F_v/F_m , és F_v/F_0 értékei nem tértek el szignifikánsan a BA tartalmú táptalajon fejlődött növények esetén mért értékektől, kivéve a legalacsonyabb TOP koncentrációt, ahol F_v/F_m , és F_v/F_0 szignifikánsan alacsonyabb volt, mint BA esetében.

A TOP alkalmazott koncentrációi jelentősen befolyásolták a klorofill fluoreszcenciát. F_v/F_m , és F_v/F_0 6,0 μM TOP esetében volt a legalacsonyabb, viszont a F_v/F_0 értéke szignifikánsan a legnagyobb volt 2,0 μM TOP esetén. A BA és TOP kombinált alkalmazása a táptalajban szignifikáns eltérést az F_v/F_m értékekben nem okozott.



4. ábra. A II. fotokémiai rendszer (PSII) maximális (F_v/F_m) és aktuális ($Y(II)$) kvantumhatékonysága a 'Royal Gala' különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak fény-adaptált leveleiben. Az oszlopokon belüli betűk a Duncan-teszt alapján meghatározott statisztikailag homogén csoportokat ($P \leq 0,05$) jelölik; a különböző kis betűk azonos citokinin típusok koncentrációi közötti, míg a különböző nagy betűk azonos citokinin koncentrációknál a citokinin típusok közötti szignifikáns eltéréseket jelölik.

Az F_v/F_m értékei 0,683-0,861 között változtak a különböző citokinin kezelésektől függően. Ezek a klorofill fluoreszcencia értékek nagyságrendileg megegyeznek más növényfajoknál szabadföldön mért optimális fluoreszcencia értékekkel (0,79-0,84) (Bolhar-Nordenkamp és mts., 1989; Triques és mts., 1997). Az eredmények jelzik, hogy a 3 hetes *in vitro* alma hajtások fotoszintetikus apparátusa működőképes, de a PSII maximális potenciális kvantumhatékonysága (F_v/F_m) és fotokémiai folyamatainak maximális hatékonysága (F_v/F_0) függ az *in vitro* tenyésztés során a táptalajhoz adott citokininnek típusától és mennyiségétől is.

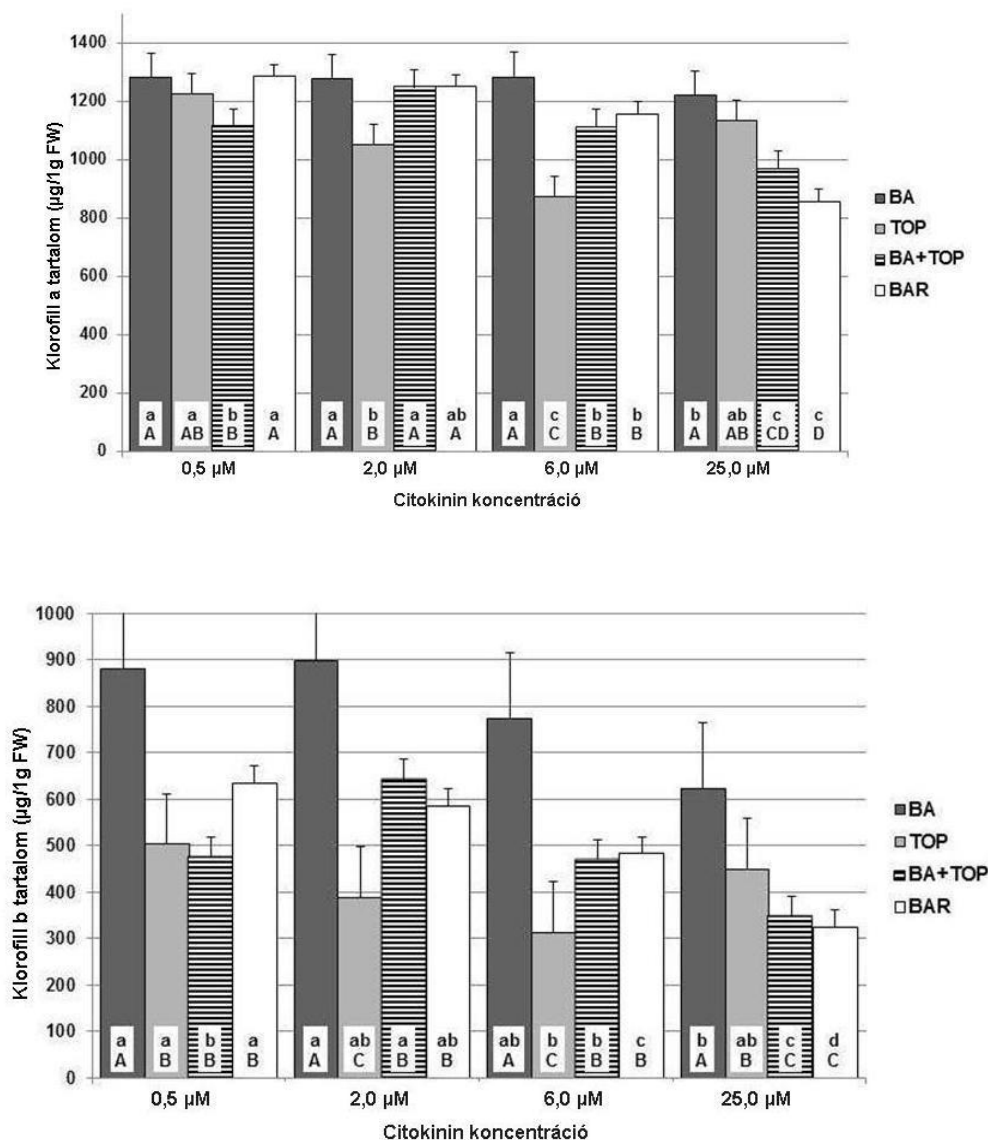
$Y(II)$ és ETR citokinin koncentrációtól függő változása hasonló volt, mint az F_v/F_m esetében, amikor BA-t, vagy BAR-t tartalmazott a táptalaj. $Y(II)$ és ETR a BA koncentráció növekedésével csökkentek, illetve BAR alkalmazása esetén a legmagasabb értéküket 2,0 µM citokinin koncentrációnál érték el. Ha a táptalaj citokinin forrása TOP volt, akkor az axilláris

dc_935_14

alma hajtáskultúráknál szokásosan alkalmazott koncentrációk (2,0 és 6,0 μM) esetében szignifikánsan volt a legalacsonyabb Y(II) és ETR.

4.2.2. Aromás oldalláncú citokininek hatása az *in vitro* alma levelek klorofill tartalmára

A különböző típusú citokinineknek az összklorofill tartalomra kifejtett hatása függött az alkalmazott citokinin koncentrációtól, minden vizsgált koncentrációnál akkor volt a legnagyobb, ha a hajtások BA-t tartalmazó táptalajon fejlődtek.



5. ábra. A 'Royal Gala' különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak első két, teljesen kifejlett csúcsi levelében mért *klorofill a* és *klorofill b* tartalom ($\mu\text{g} / 1\text{g FW}$). Az oszlopokon belüli betűk a Duncan-teszt alapján meghatározott statisztikailag homogén csoportokat ($P \leq 0,05$) jelölik; a különböző kis betűk azonos citokinin típusok koncentrációi közötti, míg a különböző nagy betűk azonos citokinin koncentrációknál a citokinin típusok közötti szignifikáns eltéréseket jelölik.

Hasonlóan, a *klorofill a* (1220-1282 $\mu\text{g}/1\text{g}$ levél nedves súly (FW)) és *klorofill b* (623-898 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW) (5. ábra) tartalom is a BA alkalmazását követően volt a legnagyobb, míg a *klorofill a* / *klorofill b* aránya a legkisebb (1,42-1,958). A táptalaj BA, illetve BAR

dc_935_14

koncentrációjának növelésével a *klorofill a* / *klorofill b* aránya is nőtt, azonban a legnagyobb *klorofill a* / *klorofill b* arányt 2,0 és 6,0 μM TOP alkalmazása esetében érték el (2,706 és 2,804). A *klorofill b* tartalomban a citokinin kezelésekre bekövetkező változás mértéke (65%) mintegy kétszerese volt a *klorofill a* tartalomban (34%) bekövetkezett változás mértékéhez képest.

A klorofill tartalom és a klorofill fluoreszcencia paraméterek közötti összefüggés statisztikai analízisének eredményeit az 5. táblázatban foglaltam össze.

A korrelációanalízis eredményei bizonyították, hogy sem a *klorofill a* és a *klorofill b* pigmentek mennyisége, sem az aránya nem befolyásolta a II fotokémiai rendszer (PSII) maximális teljesítőképességét – sem a PSII maximális kvantumhatékonyságát (F_v/F_m), sem a PSII fotokémiai folyamatainak maximális hatékonyságát (F_v/F_0).

A klorofilok mennyisége és a PSII aktuális fényviszonyok közötti kvantumhatékonysága ($Y(II)$) között azonban közepesen pozitív, de szignifikáns ($P < 0,05$) összefüggést mutattunk ki. A korrelációs együttható *klorofill a* esetén $r=0,545$, *klorofill b* esetén $r=0,535$, az összklorofill tartalomra vizsgálva pedig $r=0,561$. A rendszer aktuális kvantumhatékonysága ($Y(II)$) és a *klorofill a* / *klorofill b* aránya között szintén közepes, de negatív összefüggést lehetett igazolni ($r = -0,515$; $P < 0,05$).

5. táblázat. A klorofill tartalom és a klorofill fluoreszcencia paraméterek közötti összefüggés vizsgálata (Pearson-féle korrelációs együtthatók)

	<i>klorofill b</i>	<i>klorofill a</i>	<i>klorofill a/b</i>	F_v/F_m	F_v/F_0	$Y(II)$
	<i>a+b</i>					
<i>klorofill a</i>	0,847**	0,950**	-0,817**	0,374	0,360	0,545*
<i>klorofill b</i>	-	0,970**	-0,989**	0,389	0,424	0,535*
<i>klorofill a+b</i>	-	-	-0,951**	0,398	0,412	0,561*
<i>klorofill a/b</i>	-	-	-	-0,392	-0,427	-0,515*
F_v/F_m	-	-	-	-	0,952**	0,791**
F_v/F_0	-	-	-	-	-	0,780**
Az összefüggés szignifikáns : $P < 0,05$, illetve ** : $P < 0,01$ szinten						

A korrelációanalízis eredményei szerint az *in vitro* alma hajtások klorofill tartalma alapján a fotoszintetikus rendszer általános állapotára, és maximális teljesítőképességére jelen eredményeink szerint nem következtethetünk.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Bebizonyítottuk, hogy járulékos *in vitro* hajtásfejlődés indukálható alma növény esetében tTCL explantátumokon, mind egy hagyományosan könnyen regenerálódó ('Royal Gala'), mind a hagyományosan nehezen regenerálódó fajta ('Freedom') esetében.
- 2) Bizonyítottuk, hogy a regeneráció kezdeti szakaszában alkalmazott fény – genotípustól függő mértékben – befolyásolja a tTCL explantátumok regenerációját. A 'Freedom' fajta esetében a regenerációs szakasz elején alkalmazott fénykezelés a hajtásfejlődést a tTCL explantátumokon teljesen gátolta.
- 3) Igazoltuk, hogy az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciója – genotípustól függő mértékben – befolyásolta a tTCL explantátumok hajtásregenerációját; a fiatalabb levelekből készített tTCL explantátumok hajtásregenerációs képessége nagyobb volt.
- 4) Megállapítottuk, hogy a regenerációs periódus hossza mind a konvencionális, mind a tTCL explantátumok regenerációs kapacitását – mind a hajtásregenerációs százalékot, mind az explantátumonkénti átlagos hajtásszámot – befolyásolja. Hatása függ a genotípustól, az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciójától, az explantátum méretétől és a táptalaj citokinin tartalmától. A regeneráció optimális időtartamának meghatározásához ezért mind a biotikus (genotípus, explantátum), mind az abiotikus (*in vitro* tenyésztés fizikai és kémiai feltételei) tényezőket figyelembe kell venni.
- 5) Optimalizáltuk a táptalaj TDZ koncentrációját a tTCL explantátumok igényeihez mindkét vizsgált almafajta esetében. Az optimális TDZ koncentráció függött az explantátum méretétől (konvencionális, vagy tTCL explantátum), a regenerációs idő hosszától és a genotípustól. A táptalaj optimális TDZ koncentrációja alma levél tTCL explantátumok 9 hetes regenerációja esetén 2,5 mg/l a 'Freedom' fajtánál, és 5,0 mg/l a 'Royal Gala' fajtánál.
- 6) Előzetes vizsgálati eredményeink (SSR analízis) alapján a fejlődött járulékos hajtások genetikailag stabilak voltak. Sem az explantátum típusa (konvencionális, vagy tTCL), sem az explantátumok kora (1. vagy 2. csúcsi levélből származó), sem a növekvő citokinin (TDZ) koncentráció nem okozott genetikai változást az axilláris hajtásfejlődéssel szaporított növényállományhoz képest.
- 7) Bevezettük, definiáltuk és matematikailag leírtuk a növekedési korrekciós faktor (GCF) és a geometriai faktor (GF) fogalmakat, és leírtuk a GCF és GF faktorok közötti összefüggést:

$$\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = GCF \frac{R\%_{conv}}{n R\%_{tTCL}}; \frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = k GF;$$

$$\text{valamint } GCF = \frac{n R\%_{tTCL}}{R\%_{conv}} k GF ,$$

dc_935_14

ahol n: a konvencionális explantátumból elméletileg preparálható tTCL explantátumok száma, R%: a konvencionális (conv.) és a tTCL explantátumok regenerációs százaléka, HSZ: a konvencionális és tTCL explantátumokon mért átlagos hajtásszám (esetünkben hajtás, egyébként bármely célszerv), k: korrekciós faktor

- 8) Meghatároztuk, hogy a GF számításához bármely növényi kiindulási szervből, szövetből preparált explantátum esetén mely explantátum típus mely egyszerű geometriai testtel közelíthető.
- 9) Meghatároztuk alma konvencionális és tTCL levéllemez explantátumokra a GF számítását, figyelembe véve az explantátumok teljes felületét és térfogatát az alábbi összefüggéssel:

$$GF(= GF_{conv.-tTCL}) = \frac{\frac{A_{conv}}{V_{conv}}}{\frac{A_{tTCL}}{V_{tTCL}}} = \frac{\frac{h_{conv}(a+b+c+d) + w_{conv}(a+c)}{h_{conv} \frac{w_{conv}(a+c)}{2}}}{\frac{2h_{tTCL}(1+w_{tTCL}) + 2lw_{tTCL}}{lw_{tTCL} h_{tTCL}}}$$

Mivel GF független minden más kísérleti körülménytől (faj, fajta, *in vitro* tenyésztés fizikai és kémiai feltételei), csak az explantátum alakja és mérete határozza meg, ezért a fenti összefüggés minden esetben igaz és a fenti képlettel kiszámítható GF értéke, ha

- ♦ trapéz alapú hasáb alakú explantátumot hasonlítunk téglalap alapú hasáb alakú explantátumhoz, és
- ♦ a szervregeneráció – megtartva a kiindulási feltételt – mind az epidermisz/szubepidermisz, mind a mezofillum sejtekből kiindul.

- 10) A két új fogalom (GCF, GF) alkalmazásával egy explantátum regenerációs kapacitását összehasonlíthatjuk egy másik kísérletből, más növény fajból/fajtából, vagy laboratóriumból származó explantátum regenerációs kapacitásával, feltéve, hogy ismerjük az explantátum alakját és méreteit, illetve, hogy az explantátum mely szövettájakból történik az új szerv regenerációja. Mivel GF csak az explantátum alakjától és méretétől függ, ha a regeneráció azonos szövettájból indul ki, ezért a GCF és GF alkalmas arra is, hogy különböző növényfajok azonos alakú és méretű explantátumainak regenerációs kapacitását összehasonlítsuk.
- 11) Az almával végzett kísérletek eredményeivel bemutattuk, hogy a megfelelő explantátum megválasztása (tTCL a konvencionális helyett), és a táptalaj citokinin tartalmának optimalizálása együttesen azt eredményezte, hogy a konvencionális explantátumhoz viszonyítva fajtától függően a regenerációs kapacitást 11,8-13-szorosra tudtuk növelni.
- 12) Bizonyítottuk, hogy a táptalajhoz adott aromás oldalláncú citokininek – típusuktól és a táptalajhoz adott koncentrációjuktól függően – befolyásolják az *in vitro* alma hajtások PSII rendszerének maximális kvantumhatékonyságát (F_v/F_m) és a fotokémiai folyamatainak maximális hatékonyságát (F_v/F_0), valamint az aktuális kvantumhatékonyságát ($Y(II)$) is, s így befolyásolják a fotoszintetikus rendszerük működőképességét.

- 13) Bebizonyítottuk, hogy a táptalaj citokinin tartalma (a citokinin típusa és koncentrációja) befolyásolta az *in vitro* alma hajtások leveleinek klorofill tartalmát, különösen a *klorofill b* pigment mennyiségét. Igazoltuk, hogy eltérő citokinin tartalmú táptalajon fejlődő *in vitro* alma hajtások leveleiben eltérő a *klorofill a* és a *klorofill b* aránya.
- 14) A korrelációanalízis eredményei bizonyították, hogy sem az *in vitro* almahajtások leveleiben lévő klorofill pigmentek mennyisége, sem a *klorofill a* és *klorofill b* aránya nem befolyásolta a II. fotokémiai rendszer maximális teljesítőképességét (F_v/F_m , F_v/F_0), ezért az *in vitro* alma hajtások klorofill tartalma alapján a fotoszintetikus rendszer általános állapotára, és maximális teljesítőképességére nem következtethetünk. A klorofilok mennyisége ($r=0,561$; $P < 0,05$) és aránya ($r=-0,515$; $P < 0,05$) befolyásolta a II. fotokémiai rendszer aktuális fényviszonyok közötti kvantumhatékonyságát.

AZ MTMT ADATBÁZIS LEZÁRÁSÁT KÖVETŐEN AKTUALIZÁLT TUDOMÁNYMETRIAI ÉRTÉKEK:

Kumulatív impakt faktor: **48,337**

Független hivatkozások: **214**

Hirsch-index: **8**

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN PUBLIKÁLT KÖNYVEK, KÖNYVFEJEZETEK:

1. Jámborné Benczúr E, Dobránszki J. (szerk.) Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2005. pp. 324. ISBN 963 286 1515
2. Dobránszki J, Jámborné Benczúr E. Szöveti változások a mikroszaporítás során. In: Jámborné Benczúr E. és Dobránszki J. (szerk.) Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2005. ISBN 963 286 1515 p.76-85.
3. Dobránszki J. Mikrooltás. In: Jámborné Benczúr E. és Dobránszki J. (szerk.) Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2005. ISBN 963 286 1515. p108-112.
4. Dobránszki J. Alma. In: Jámborné Benczúr E. és Dobránszki J. (szerk.) Kertészeti növények mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2005. ISBN 963 286 1515 p.118-122.
5. Dobránszki J. – Jámbor-Benczúr, E. (2006) Micrografting. In: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* (1st Edition), Teixeira da Silva JA (ed), Global Science Books, London, UK, Volume II. pp. 355-359. ISBN:978-4-903313-03-0.
6. Dobránszki J (szerk.). Aromatic cytokinins applied exogenously in plant tissue culture. University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences, Research Institute of Nyíregyháza, Hungary, 2014. ISBN 978-963-473-704-9 pp. 100.
7. Dobránszki J. Cytokinins – importance, structure, effects *in vitro*. In: Dobránszki J (szerk.). Aromatic cytokinins applied exogenously in plant tissue culture. University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences, Research Institute of Nyíregyháza, Hungary, 2014. ISBN 978-963-473-704-9. p.5-22.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN IMPAKTFAKTOROS FOLYÓIRATBAN PUBLIKÁLT KÖZLEMÉNYEK: (kumulatív impaktfaktoruk: 21,370)

1. Galli Z, Halász G, Kiss E, Heszky LE, Dobránszki, J. Molecular Identification of Commercial Apple Cultivars with Microsatellite Markers. HortScience. 2005; 40(7):1974-1977. **IF:0,574**
2. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Teixeira da Silva JA, Bulley SM, Hudák I.: *In Vitro* Shoot Regeneration in Apple - Role of Cytokinins. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2010; 101(3): 251–267. **IF:1,243**
3. Dobránszki J., Teixeira da Silva J.A. Micropropagation of apple - a review. Biotechnology Advances. 2010; 28(4): 462-488. **IF:7,6**
4. Dobránszki J., Teixeira da Silva J.A. Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple. Scientia Horticulturae. 2011; 127(3): 460-463. **IF:1,527**

5. Magyar-Tábori K., Dobránszki J., Hudák I., Effect of cytokinin content of the regeneration media on in vitro rooting ability of adventitious apple shoots. *Scientia Horticulturae*. 2011; 129(4): 910-913. **IF:1,527**
6. Dobránszki J, Teixeira da Silva JA. *In vitro* shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 2013; 88(1): 60-66. **IF:0,509**
7. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2013; 32(4): 922-943. **IF:2,058**
8. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. How Timing of Sampling Can Affect the Outcome of the Quantitative Assessment of Plant Organogenesis *Scientia Horticulturae*. 2013; 159:59-66. **IF:1,504**
9. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. Dissecting the Concept of the Thin Cell Layer: Theoretical Basis and Practical Application of the Plant Growth Correction Factor to apple, cymbidium and Chrysanthemum. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2014; 33: 881-895. **IF:2,058**
10. Dobránszki J, Mendler-Drienyovszki N. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*. 2014; 171: 1472-1478. **IF:2,77**

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN NEM IMPAKTFAKTOROS, LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN PUBLIKÁLT KÖZLEMÉNYEK IDEGEN NYELVEN:

1. Dobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Bubán T, Szalai J, Lazányi J. *In vitro* shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinin and auxin. *International Journal of Horticultural Science*. 2000; 6(1): 36-39.
2. Dobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Bubán T, Szalai J, Lazányi J. Single and dual effects of different cytokinins on shoot multiplication of different apple scions. *International Journal of Horticultural Science*. 2000; 6(4): 76-78.
3. Dobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Lazányi J. New *in vitro* micrografting method for apple by sticking. *International Journal of Horticultural Science*. 2000; 6(4): 79-83.
4. Dobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Bubán T, Szalai J. Influence of aromatic cytokinins on shoot multiplication and their post-effects on rooting of apple cv. Húsvéti rozmaring. *International Journal of Horticultural Science*. 2000; 6(4): 84-87.
5. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Jámber-Benczúr E, Lazányi J. Role of cytokinins in shoot proliferation of apple *in vitro*. *Analele Universitatii din Oradea*. 2001; TOM VII: 17-24.
6. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Jámber-Benczúr E, Bubán T, Lazányi J, Szalai J, Ferenczy A. Post-effects of cytokinins and auxin-levels of proliferation media on rooting ability of *in vitro* apple shoots (*Malus domestica* Borkh.) 'Red Fuji'. *International Journal of Horticultural Science*. 2001; 7(3-4): 26-29.
7. Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Kiss E, Lazányi J, Bubán T. Effects of conditioning of apple shoots with meta-topolin on the morphogenic activity of *in vitro* leaves. *Acta Agronomica Hungarica*. 2002; 50(2): 117-126.

8. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Jámbor-Benczúr E. High *in vitro* shoot proliferation in the apple cultivar Jonagold induced by benzyladenine-analogues. *Acta Agronomica Hungarica*. 2002; 50(2): 191-195.
9. Dobránszki J, Hudák I, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Galli Zs, Kiss E. Effects of different cytokinins on the shoot regeneration from apple leaves of 'Royal Gala' and 'M.26'. *International Journal of Horticultural Science*. 2004; 10(1): 69-75.
10. Dobránszki J, Jámbor-Benczúr E, Reményi ML, Magyar-Tábori K, Hudák I, Kiss E, Galli Zs. Effects of aromatic cytokinins on structural characteristics of leaves and their post-effects on subsequent shoot regeneration from *in vitro* apple leaves of 'Royal Gala'. *International Journal of Horticultural Science*. 2005; 11 (1): 41-46.
11. Galli Zs, Halász G, Kiss E, Dobránszki J, Heszky L. Molecular Fingerprinting of Commercial Apple Cultivars. *Hungarian Agricultural Research*. 2005; 14(3): 4-8.
12. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. The Plant Growth Correction Factor I. The Hypothetical and Philosophical Basis. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 2011; 5(1): 73-74.
13. Dobránszki J, Mender-Drienyovszki N. Cytokinins affect the stomatal conductance and CO₂ exchange of *in vitro* apple leaves. *International Journal of Horticultural Science*. 2014; 20 (1-2): 25-28.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN NEM IMPAKTFAKTOROS, LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN PUBLIKÁLT KÖZLEMÉNYEK MAGYAR NYELVEN:

1. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Ferenczy A, Jámbor-Benczúr E, Lazányi J. Citokinin- és auxin szintek szerepe a Red Fuji és a McIntosh almafajták mikroszaporításában. *Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények. Acta Agraria Debreceniensis* 2001; 1: 53-59.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN PUBLIKÁLT TELJES TERJEDELMŰ KONFERENCIAKÖZLEMÉNYEK IDEGEN NYELVEN:

1. Dobránszki J, Hudák I, Magyar-Tábori K, Galli Z, Kiss E, Jámbor-Benczúr E. How can different cytokinins influence the process of shoot regeneration from apple leaves in 'Royal Gala' and 'M.26'. (eds.: Fári GM, Holb I, Bisztray GyD) *Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium*: 2006; 725(1), 191-196. ISBN: 90 6605 719 X
2. Galli Z, Halász G, Kiss E, Dobránszki J, Heszky L. Using SSR markers to distinguish apple cultivars. (eds.: Fári GM, Holb I, Bisztray GyD) *Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium*: 2006; 725(2), 669-672. ISBN: 90 6605 719 X

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN PUBLIKÁLT TELJES TERJEDELMŰ KONFERENCIAKÖZLEMÉNYEK MAGYAR NYELVEN:

1. Dobránszki J, Magyar-Tábori K. Új mikrooltási módszer kidolgozása. *Innováció, a Tudomány és a Gyakorlat Egysége az Ezredforduló Agráriumában. Kertészet* 2002. április 11-12., Debrecen. 2002; 35-38.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Debreceni Egyetem ATK Nyíregyházi Kutatóintézet egykori és jelenlegi igazgatóinak, Dr. Lazányi Jánosnak, Dr. Tőgyi Sándornak és Dr. Zsombik Lászlónak, hogy a DE ATK Nyíregyházi Kutatóintézet Biotechnológiai Laboratóriumában folyó kutatási tevékenységet mindenkor támogatták.

Kiemelt köszönet illeti az értekezésben bemutatott kutatómunkában közvetlenül résztvevő kutatótársaimat, akikkel együtt gondolkodhattam, s akik nélkül a dolgozatban bemutatott eredmények nem születhettek volna meg. Köszönöm Dr. Jaime A. Teixeira da Silva (Japán) együttműködését a TCL explantátumok vizsgálatát célzó kutatásokban; sokéves együttműködésünket számos rangos nemzetközi folyóiratban megjelent közlemény fémjelzi. Köszönöm Mendlerné Dr. Drienyovszki Nóra (DE ATK Nyíregyházi Kutatóintézet) alkotó együttműködését az *in vitro* alma hajtások fotoszintetikus apparátusának vizsgálatát célzó kutatásokban, akivel közös eredményeinket szintén elismert hazai és nemzetközi szaklapokban, illetve könyvfejezetekben közzéltük.

Szeretném megköszönni a több évre visszanyúló együttműködést, a folyamatos szakmai és emberi támogatást Dr. Heszky László professzornak, valamint Dr. Kiss Erzsébet professzor asszonynak (SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet), aki a regenerált alma hajtások - az értekezésben bemutatott - molekuláris vizsgálatában is segítségemre volt.

Köszönet illeti a DE ATK Nyíregyházi Kutatóintézet Biotechnológiai Laboratóriumainak minden munkatársát, akik a kísérletek kivitelezésében és az adatok feldolgozásában segítségemre voltak. Kiemelt köszönetemet szeretném kifejezni Márföldiné Gyurján Zsuzsannának a steril laboratóriumi munkák, Dr. Hudák Ildikónak és Magyariné Dr. Tábori Katalinnak a biokémiai paraméterek mérése során nyújtott technikai segítségükért, Szűcsné Kertész Máriának a több ezer adat digitalizálásában nyújtott segítségéért.

Hálásan köszönöm Jámborné Dr. Benczúr Erzsébet (BCE Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszék) több évtizedes barátságát és kutatási együttműködését, önzetlen támogatását és azt, hogy az 1990-es években ráirányította figyelmemet az *in vitro* almakutatásokra. Közös munkánkat több hazai és nemzetközi közlemény és sikeres közös kutatási projekt jelzi.

Köszönetemet szeretném kifejezni a BCE Gyümölcstermő Növények Tanszéke több volt, és jelenlegi munkatársának, Dr. Papp Jánosnak, Dr. Tóth Magdolnának, Hevesi Lászlóné Dr.-nak, Dr. Szalai Józsefnek (BCE Növényélettan Tanszék), és az Újfehértói Gyümölcstermésztési Kutató és Szaktanácsadó Kht. kutatóinak, Dr. Bubán Tamásnak és Dr. Szabó Tibornak, akikkel almakutatás témakörben az évek során együtt dolgozhattam. Köszönöm Dr. Ferenczy Antalnak (BCE Biometria és Agrárinformatika) a hasznos konzultációkat és segítséget a biometriai értékelés témakörében.

A több mint másfél évtizede folytatott *in vitro* alma kutatásokat az OTKA (T-030103, T-037251, M-041429) és a Phare (HU9705-0303-0003-V0077) elnyert pályázatai támogatták. Külön köszönöm a Nemzeti Kiválóság Program Szentágothai János Tapasztalt Kutatói Ösztöndíj támogatását a 2013-2014 években.

Szeretném megköszönni családomnak a mindenkori támogatást és türelmüket.