

dc_935_14
Akadémiai Doktori Értekezés

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

Dobránszki Judit



Debreceni Egyetem
Agrártudományi Központ
Nyíregyházi Kutatóintézet

2014

*„Felfedezni valamit annyit tesz,
mint látni, amit mindenki lát,
és közben arra gondolni, amire
még senki.”*

Szent-Györgyi Albert

Tartalom

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. AZ <i>IN VITRO</i> MIKROSZAPORÍTÁS ÉS JELENTŐSÉGE ALMÁNÁL	9
2.2. AZ <i>IN VITRO</i> HAJTÁSFEJLŐDÉS LEHETSÉGES ÚTJAI ALMÁNÁL	10
2.3. EXPLANTÁTUM – A JÁRULÉKOS HAJTÁSREGENERÁLÓDÁS BIOTIKUS TÉNYEZŐJE	12
2.3.1. Az explantátum eredete	13
2.3.1.1. Genotípus	13
2.3.1.2. Az explantátumot szolgáltató szerv	13
2.3.1.3. Az explantátum pozíciója és kora	17
2.3.2. Az explantátum mérete és a preparálás módja	18
2.3.2.1. Konvencionális explantátumok	19
2.3.2.2. TCL explantátumok	20
2.4. A HAJTÁSFEJLŐDÉST SZABÁLYOZÓ ABIOTIKUS FAKTOROK	24
2.4.1. Citokininek – a hajtásfejlődés kulcshormonjai	26
2.4.1.1. A citokininek kémiai szerkezete	27
2.4.1.2. A citokonininek szerkezete és hatásmechanizmusa közötti összefüggések aromás odalláncú citokininek esetében	30
2.4.1.3. Citokonininek szerepe az alma axilláris és a járulékos hajtásfejlődésében	33
2.5. AZ <i>IN VITRO</i> KÖRNYEZET HATÁSA A HAJTÁSOK FOTOSZINTETIKUS RENDSZERÉRE	45
3. CÉLKITŰZÉS	49
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	51
4.1. A KÍSÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT NÖVÉNYANYAG	51
4.2. NÖVÉNYANYAG PREPARÁLÁSA AZ ALMA <i>IN VITRO</i> JÁRULÉKOS (ADVENTÍV) ÉS AXILLÁRIS HAJTÁSFEJLŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATÁHOZ	52
4.2.1. <i>In vitro</i> axilláris hajtások előkezelése a járulékos (adventív) hajtásregenerálási kísérletek előtt	52
4.2.2. Explantátumok preparálása és táptalajra helyezése a járulékos (adventív) hajtásregenerálódás vizsgálatához	52
4.2.3. Regenerálódott járulékos hajtások elongációja és gyökeresítése	53
4.2.4. Explantátumok preparálása és táptalajra helyezése az axilláris (hónaljrügyi) hajtásfejlődés vizsgálatához	53
4.3. A KÍSÉRLETEKBEN ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK, PREPARÁLÓ OLDATOK	54

dc_935_14

4.4. A LABORATÓRIUMI NEVELÉS KÖRÜLMÉNYEI	56
4.5. MORFOLÓGIAI PARAMÉTEREK MÉRÉSE	57
4.5.1. Explantátum morfológiai paramétereinek mérése	57
4.5.2. A hajtásfejlődés ideje alatt, illetve a tenyésztés végén felvett morfológiai paraméterek	57
4.6. KLOOROFILL FLUORESZCENCIA MÉRÉSE	58
4.7. KLOOROFILL TARTALOM SPEKTROFOTOMÉTERES MEGHATÁROZÁSA	59
4.8. STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS	60
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	61
5.1. A LEVÉLEXPLANTÁTUM SZEREPE AZ ALMA JÁRULÉKOS (ADVENTÍV) HAJTÁSREGENERÁCIÓJÁBAN	61
5.1.1. Konvencionális és tTCL explantátumok regenerációs képessége	61
5.1.2. Az explantátum mérete, kora, és kölcsönhatása a regeneráció idejével és a táptalaj citokinin tartalmával	66
5.1.2.1. A regenerációs idő hatása a hajtásregenerációra konvencionális levélexplantátumok esetén	66
5.1.2.2. A regenerációs idő és a táptalaj citokinin tartalmának hatása a hajtásregenerációra tTCL levélexplantátumok esetén	72
5.1.2.3. A regenerálódott járulékos hajtások genetikai stabilitása	80
5.1.2.4. A regenerálódott járulékos hajtások elongációja és gyökeresítése	83
5.1.3. A Növényi Növekedési Korrekciós Faktor (GCF) és a Geometriai Faktor (GF) fogalmának bevezetése	84
5.1.3.1. A GCF és GF elméleti alapjai	84
5.1.3.2. A GCF és GF gyakorlati alkalmazása alma modell növényen	89
5.2. AROMÁS OLDALLÁNCÚ CITOKININEK HATÁSA AXILLÁRIS <i>IN VITRO</i> HAJTÁSOK FOTOSZINTETIKUS APPARÁTUSÁNAK MŰKÖDÉSÉRE ALMA NÖVÉNYBEN	99
5.2.1. Aromás oldalláncú citokininek hatása az <i>in vitro</i> alma levelek klorofill fluoreszcenciájára	99
5.2.2. Aromás oldalláncú citokininek hatása az <i>in vitro</i> alma levelek klorofill tartalmára	104
6. KIEMELT ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	109
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	112
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	128
MELLÉKLETEK	130

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke

2iP: N⁶-(Δ^2 -isopentenil) adenin

2OHBAR: 6-(2-hidroxi-benzilamino) purin ribozid

A: felszín, az explantátum becsült felszíne

A_{epid}: az explantátum epidermisszel borított felszíne

BA: benzil-adenin

BA3OG: 3-O-glükózid-N⁶-benzil-adenin

BAR: benzil-adenin-ribozid

C%: explantátumok kalluszosodási százaléka

ETR: elektrontranszport ráta

F_v/F₀: PSII fotokémiai folyamatainak maximális hatékonyságát

F_v/F_m: a PSII maximális potenciális kvantumhatékonysága

GA₃: gibberellinsav

GCF: Növekedési Korrekciós Faktor

GF: Geometriai Faktor

HR%: regenerálódó explantátumok százaléka

HSZ: átlagos hajtásszám / regenerálódó explantátum

IBA: indol-3-vajsav

ISSR: inter-simple sequence repeat, molekuláris diagnosztikus teszt

KIN: kinetin, 6-furfuril-aminopurin

KINR: kinetin-ribozid

ITCL: néhány sejtrétegből álló, 0,2-0,5 mm-től 1-2 mm vastagságúra metszett explantátum (longitudinal thin cell layer), ha a preparálás hosszirányban történt

meta-TOP (3OHBA, TOP): meta-topolin (6-(3-hidroxibenzilamino) purin

NAA: 1-naftil-ecetsav

orto-TOP (2OHBA): orto-topolin (6-(2-hidroxibenzilamino) purin

PLB: protokormszerű test (protocorm-like body);

PPF: fotoszintetikus fotonfluxus

PSII: fotoszintézis II. fotokémiai rendszere

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA, molekuláris diagnosztikus teszt

RUBISCO: ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz

SAM: hajtáscsúcs merisztéma (shoot apical meristem)

SSR: Simple Sequence Repeat, molekuláris diagnosztikus teszt

dc_935_14

TCL: néhány sejtrétegből álló, 0,2-0,5 mm-től 1-2 mm vastagságúra metszett explantátum (thin cell layer)

TDZ: thidiazuron

TOP (meta-TOP): meta-topolin (6-(3-hidroxibenzilamino) purin

TOPR: meta-topolin-ribozid

tTCL: néhány sejtrétegből álló, 0,2-0,5 mm-től 1-2 mm vastagságúra metszett explantátum, ha keresztirányban történt a preparálás (transverse thin cell layer)

V: térfogat, az explantátum becsült térfogata

Y(II): a PSII klorofilljai által abszorbeált fény mennyiségéhez viszonyítva mennyi fényt hasznosított a PSII fotokémiai rendszer adott fényviszonyok között.

ZEA: zeatin, N⁶-(4-hidroxil-3-metilbut-2-enil) adenin

ZEAR: zeatin-ribozid

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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. AZ *IN VITRO* MIKROSZAPORÍTÁS ÉS JELENTŐSÉGE ALMÁNÁL

A növények *in vitro* szaporítása, mikroszaporítása során a növényi szomatikus sejtek, szövetek, illetve szervek tenyésztését végezzük azzal a céllal, hogy – a konvencionális szaporításhoz képest – a lehető legrövidebb idő alatt a kiindulási növényekkel azonos genetikai állományú utódnövényeket állítsunk elő nagy mennyiségben. Ez tulajdonképpen nem más, mint *in vitro*, mesterségesen kontrollált, steril körülmények között végzett klónozás. Az alma mikroszaporításának számos előnye van a hagyományos (klonális, vagy magoncokra alapozott) szaporításhoz képest. A hagyományos szaporításhoz képest sokkal több utódnövény állítható elő adott időn belül; egész évben, folyamatosan állíthatunk elő növényeket; lehetővé válik egészséges, kórokozóktól mentes szaporítóanyag előállítása; új genotípusok gyors felszaporítása; steril klónok, fajták szaporítóanyag előállítása.

Az *in vitro* szaporítás lehetőségét a növényi sejtek toti-, illetve multipotenciája adja; azaz, hogy a növényi sejtek, szövetek, szervek, illetve a belőlük preparált explantátumok megfelelő *in vitro* körülmények között képesek a teljes növény (totipotencia), vagy bármely növényi szerv (organogenezis; multipotencia) regenerációjára (Reinert és Backs, 1968; Vasil és Vasil, 1972; Verdeil és mts. 2007; George, 2008). A mikroszaporításnak 4 fő szakaszát különítjük el, melyeket röviden Jámborné Benczúr (2005) George és Debergh (2008) és Dobránszki és Teixeira da Silva (2010) munkái nyomán mutatok be:

1. szakasz: *In vitro* tenyészet létrehozása. Ebben a szakaszban a növények megfelelő részeit (sejt, szövet, szerv) az *ex vitro* környezetből *in vitro* környezetbe visszük. Ebben a szakaszban két célt kell egyidejűleg megvalósítani. Egyrészt a növényanyag felületi sterilizálásával el kell érni, hogy steril tenyészetek jöjjenek létre; másrészt a tenyészetbe vitt növényi részeknek a mesterséges körülmények között képeseknek kell lenniük a növekedésre. Ehhez sok esetben, így almánál is, szükséges az 1. szakasz előtt egy ún. 0., vagy előkészítő szakasz beiktatása, mikor az anyanövények fizikai és/vagy kémiai előkezelésével elérjük, hogy az anyanövényről izolált növényi részből sikeresen létrehozzuk a steril, növekedésre képes *in vitro* tenyészetet.

2. szakasz: *Hajtássokszorozás szakasza.* (Szinonim kifejezések: szaporítás, vagy felszaporítás szakasza). Ebben a szakaszban az a cél, hogy minél rövidebb idő alatt új hajtások fejlődését indukáljuk, azaz megsokszorozzuk a hajtásokat. Ennek a sikere

számos tényezőtől függ, mint pl. a fajtól, fajtától, a táptalaj organikus és anorganikus alkotóitól és a tenyésztés fizikai körülményeitől, valamint a hajtásindukció alkalmazott módjától (ld. később).

3. szakasz: Gyökeresítési szakasz. Az előző szakaszban előállított *in vitro* hajtások gyökeresítése a szakasz célja. A gyökeresítés előtt szükséges lehet egy ún. elongációs szakasz beiktatása, ha az előző szakaszban előállított hajtások mérete nem megfelelő a gyökeresítéshez. Az *in vitro* hajtások gyökeresítése történhet *in vitro* és *in vivo* körülmények között is. A gyökeresítés sikere szintén hasonló tényezőktől függ, mint a hajtássokszorozásé, pl. a faj, fajta, a táptalaj organikus és inorganikus alkotói és a tenyésztés fizikai körülményei, valamint a hajtássokszorozási szakaszban alkalmazott körülmények, pl. táptalajkomponensek, utóhatása.

4. szakasz: Akklimatizációs szakasz. Ebben a szakaszban a meggyökeresített *in vitro* hajtásokat (*in vitro* növények) az *in vitro* környezetből „visszaszoktatjuk” a természetes körülmények közé. A kereskedelmi célú mikroszaporításnak ez egyik kulcsfontosságú lépése, mert esetleges kudarca, vagy alacsony hatékonysága esetén minden addigi munkánk kárba vész. A mikroszaporítással előállított növények mixotrófok, azaz *in vitro* körülmények között nem teljesen autotróf életmódot folytatnak, részben a táptalajba adott szénhidrátok, részben a tenyészédényekben levő alacsony CO₂ koncentráció, és a tenyésztés során alkalmazott alacsony fényintenzitás miatt. Továbbá a mesterséges körülmények egyik nem kívánt mellékhatása, hogy az *in vitro* növények különböző morfológiai és fiziológiai módosulásokat szenvednek, melyek miatt nem képesek az *in vitro* környezetből kikerülve azonnal a vízháztartásuk szabályozására. Az akklimatizáció során tehát a legfontosabb célunk, hogy addig, amíg a növények már teljesen autotróf, fotoszintézisre alapozott életmódra és a vízháztartásuk szabályozására képessé válnak, elérjük, hogy minél kisebb veszteséggel túléljék a növények az *in vitro* környezetből az *ex vitro* környezetbe való átmenetet.

2.2. AZ *IN VITRO* HAJTÁSFEJLŐDÉS LEHETSÉGES ÚTJAI ALMÁNÁL

Az *in vitro* almahajtások indukciója és fejlődése a mikroszaporítás 1. és 2. szakaszában történik, módszerét tekintve alapvetően kétfajta lehet (George és Debergh, 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010) attól függően, hogy az új hajtások növekedése és fejlődése milyen növényi részből (szövetek, szerv) indul ki.

(1) *Az új hajtások fejlődése axilláris (hónaljrügyi), vagy csúcsi rügyekre alapozott.*

Az új hajtások a kiindulási hajtásban már meglévő (ún. pre-existing) merisztémákból indulnak ki. Lehetséges változatai: a merisztématenyészet; a hajtás-, vagy hajtáscsúcsstenyész; és a nodális tenyészetek, amikor egy-, vagy többnódusos hajtásdarabokkal végezzük a hajtások szaporítását. A merisztéma és hajtáscsúcsstenyészeket általában a tenyészetek indításánál alkalmazzuk alma esetében (1. szakasz); míg a hajtástenyészet és a többnódusos tenyészetek az alma hajtássokszorozási szakaszának (2. szakasz) jellemző tenyészetek. Számos axilláris hajtásfejlődést alkalmazó mikroszaporítási módszert dolgoztak ki alma nemes és alany fajtákra (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010).

(2) *Az új hajtások fejlődése járulékos hajtásokkal történik (organogenezis, járulékos hajtásregenerálódás).*

A járulékos hajtások már differenciálódott szomatikus szövetekből, szervekből preparált növényi részeken, explantátumokon fejlődnek; vagy (i) közvetlenül az explantátumok felületén előzetes kalluszfejlődés nélkül (direkt organogenezis), vagy közvetetten, amikor a hajtások fejlődését kalluszfejlődés előzi meg, s a hajtások a kalluszsejtekből fejlődnek (indirekt organogenezis). Alma esetén az organogenezis mindkét formáját (direkt és indirekt) leírták, s előfordulásuk genotípus-függő volt (Dufour, 1990; Korban és msai, 1992; Pawlicki és Welandar, 1994; Gercheva és mts., 2000; Magyar-Tábori és mts., 2010).

Az organogenezis számos belső és külső faktortól függő fejlődési folyamat. Sugiyama (1999) az organogenezis 3 fázisát különítette el a folyamatnak a speciális növekedésszabályozó anyagra való igénye alapján:

- (1) *Kompetencia, vagy alkalmasság* (dedifferenciálódás): amikor a sejtek képesek a szervindukció hormonális jeleire reagálni. Ha egy sejt megszerezte az organogenikus kompetenciát, akkor dedifferenciálódásról beszélünk (Sugiyama, 1999; Howell és mts., 2003).
- (2) *Determináció, vagy elköteleződés*: amikor az explantátum kompetens sejtjei egy adott szerv fejlődése irányába elköteleződnek. Ezt a folyamatot külsőleg adagolt (exogén) specifikus növényi növekedésszabályozó anyagokkal jól irányíthatjuk.
- (3) *Morfogenezis*: az adott szerv fejlődése és növekedése. Ez a folyamat már exogén növekedésszabályozó anyagoktól függetlenül is lejátsszódik.

A járulékos hajtásokkal való szaporítás esetén, főleg ha a hajtásfejlődést kalluszosodás előzi meg (indirekt organogenezis), a genetikai változás valószínűsége megnő a merisztémára alapozott hajtásfejlődéshez képest, mivel megnő a szomaklonális variabilitás valószínűsége (Son és mts., 1993; Karp, 1995; Abeyaratne és mts., 2004; Bordallo és mts., 2004; George és Debergh, 2008). Ha hosszú ideje fenntartott kallusztenyészetekből indukáljuk a hajtások fejlődését, vagy ha a hajtások alapi részén fejlődő kalluszokat felhasználjuk a hajtásindukcióra, a szomaklonális variáció lehetőségét tovább növeljük (George, 1996; Pontaroli és Camadro, 2005; George és Debergh, 2008). Ennek oka, hogy feltehetően a merisztéma sejtjeinek a genetikai kontrollja szigorúbb, mint a többi szövet sejtjeié (De Klerk, 1990; Caboni és mts., 2000a). Noha többen beszámoltak arról, hogy hajtáscsúcs- és hajtástenyészetekkel végzett mikroszaporítás esetén a fajtaazonosság nem sérült (Pierik, 1991; Wang és Charles, 1991; McMeans és mts., 1998), a szomaklonális variabilitás előfordulása azonban az axilláris hajtásfejlődés esetében sem zárható ki elvben (Jain, 2001). Mivel a fajtaazonosság a kereskedelmi célú szaporításnak egyik fontos minőségi kritériuma, ezért az utódnövények genetikai stabilitását ellenőrizni kell. Az utódnövények genetikai vizsgálatára alma esetében többféle molekuláris módszert is alkalmaztak, pl. RAPD (Modgil és mts., 2005a) vagy ISSR markereket (Pathak és Dhawan, 2010).

2.3. EXPLANTÁTUM – A JÁRULÉKOS HAJTÁSREGENERÁLÓDÁS BIOTIKUS TÉNYEZŐJE

Az explantátum, vagyis az a növényi rész, amelyből az új hajtások fejlődését *in vitro* körülmények között indukálni akarjuk, a szövettenyésztés biotikus tényezője és egyben sikerének egyik kulcsfaktora is. A hajtásindukció sikerét az alma axilláris hajtástenyészetek esetén is nagyban befolyásolja az explantátum helyes megválasztása (Modgil és mts., 1999; Dobránszki és mts., 2000a; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010), járulékos hajtásregeneráció esetében pedig az explantátum megválasztásának még meghatározóbb szerepe van. Ennek ellenére az *in vitro* kémiai és fizikai faktorok hatását a járulékos hajtásregeneráció folyamatára sokkal kiterjedtebben tanulmányozták, mint az explantátum hatását. Amikor az explantátum hatásáról beszélünk egy *in vitro* rendszerben, akkor tulajdonképpen több tényező kumulatív hatását vesszük figyelembe. Hiszen az explantátum jelenti a fajt, fajtát, amelyből származik. Ugyanígy azt a növényi szövetet, szervet, amelyből preparáltuk, sőt hatását az is befolyásolja, hogy az anyanövény adott szerve milyen korú, vagy pl. levél-, vagy szárexplantátum esetén a hajtás mely pozíciójáról származó levélből

preparáltuk az explantátumot. Továbbá szerepe van az explantátum organogenikus képességében annak is, hogy milyen méretű explantátumot preparáltunk, illetve milyen volt a preparálás módja.

2.3.1. Az explantátum eredete

2.3.1.1. Genotípus

Az alma hajtásfejlődése *in vitro* körülmények között nagyfokú genotípus-függőséget mutat mind az axilláris hajtásfejlődés (Lane és Looney 1982; Lane és McDougald, 1982; Fasolo és Predieri, 1990; Yepes és Aldwinckle, 1994a; Karhu, 1995; Dobránszki és mts., 2000b,c; Kovalchuk és mts., 2009; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010), mind a járulékos hajtásregenerálódás során (Welander, 1988; Fasolo és mts., 1989; Korban és mts., 1992; Standardi és Houshmand 1992; Sarwar és Skirvin 1997; Yepes és Aldwinckle 1994b; Kamboj és mts., 1999; Dobránszki és mts., 2002; Magyar-Tábori és mts., 2010) (1. táblázat). A rendelkezésünkre álló irodalmi adatok alapján ezért egyes fajtákat könnyen, míg más fajtákat nehezen regenerálódó fajtáknak tekintünk (Magyar-Tábori és mts., 2010).

2.3.1.2. Az explantátumot szolgáltató szerv

Az 1. táblázatban összefoglaltam az alma járulékos hajtásregenerációs kísérletekben használt explantátumokat, eredetük szerint. Noha az irodalmi adatokat összevetve megállapítható, hogy a legtöbb fajtánál a levélexplantátumokból lehetett a legnagyobb hatékonysággal járulékos hajtásregenerációt indukálni, több kísérlet is történt más explantátum típusok alkalmazására. Néhány szerző (Belaizi és mts., 1991; Liu és mts., 1998; Bommineni és mts., 2001; 1. táblázat) sikeresen indukálta a járulékos hajtásregenerációt internodiális szárdarabokon. A szárexplantátumok regenerációs kapacitása azonban sokkal kisebb volt, mint a levélexplantátumok használatával elérhető regenerációs kapacitás. Welander (1988) összehasonlítva a szár-, és levélexplantátumok regenerációs képességét, megállapította, hogy míg a levélexplantátumokon fajtától függően 6,4-16,3 db hajtást lehetett regenerálni, a szárexplantátumokon a hajtásregeneráció 5% volt 'McIntosh Wijcik' fajtánál, 'Åkerö', 'McIntosh', 'Gravenstein' és 'M.26' esetén pedig organogenezist egyáltalán nem lehetett indukálni.

Mikroszaporított növények (*Malus prunifolia* Borkh. var. *ringo* Asami) gyökérexplantátumairól Masuda és mts. (1988) sikeresen indukálták járulékos hajtások regenerálódását.

1.táblázat. Az alma járulékos hajtásregenerációja során használt explantátumok

Alma fajta/genotípus	Az explantátum és eredete	Hajtásregenerációs válasz (HSZ:hajtásszám/explantátum; HR%: regenerálódó explantátumok százaléka)	Irodalom
Greenleeves, Tuscan, M.9, M.25	<i>in vitro</i> hajtások levelei; levélkorongok	Greenleeves: HR%: 90%; HSZ: 4-7; HR%: 60% a Tuscannál, 8% M.9-nél és 21% M.25-nél, HSZ:1-2	James és mts., 1988
Malling Greensleeves	levélkorongok	HR%: 54%; HSZ: 1,8	Ongjanov, 1988
Spartan, M.9, MM.106	levelekből izolált protoplasztok	M.9: kalluszok 40%-a regenerálódott, HSZ 1-2; MM.106: kalluszok 60%-a regenerálódott, HSZ: 8; Spartan kalluszok 10%-a regenerálódott.	Patat-Ochatt és mts., 1988
Åkerö, McIntosh, McIntosh Wijcik, Gravenstein, M.26	levéldarabok	HSZ: 6,4 (Åkerö), 8,2 (McIntosh), 11,4 (McIntosh Wijcik), 7,3 (Gravenstein), 16,3 (M.26)	Welandar, 1988
McIntosh, Triple Red Delicious, Paladino Spur McIntosh	levél	HSZ: 9,3 (McIntosh), 6,1 (Triple Red Delicious), 6,3 (Paladino Spur McIntosh)	Fasolo és mts., 1989
M.26	levél	Több, mint 14 hajtás explantátumonként	Predieri és Fasolo,1989
Gala	levél, levelekből származó kallusz	HSZ: 14,2 a levélexplantátumon,; 9,8 a kalluszon	Dufour, 1990
Gala, Royal Gala, Jonagold	levél	HR%: 90,6% (Gala), 92,8% (Royal Gala), 73,3% (Jonagold)	Sriskandarajah és mts., 1990
M.9, M.26, M.27, Golden Delicious, Priscilla, Florina	levél	HSZ: 7,0 (M.9), 6,1 (M.26), 4,0 (M.27), 1,7 (Priscilla), 17,7 (Florina). A Golden Deliciousnál a táptalaj citokinin tartalmától függően, 5 mg/l BA estében HR%: 33% és HSZ: 3,0; míg 0,2 mg/l TDZ-nél 75% HR% és 2,6 HSZ	Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990

Golden Delicious	nóduszok közötti szárdarabok	HSZ: 2,5; HR%: 22,9%	Belaizi és mts., 1991
McIntosh, Royal Gala, Gala, Dayton, Golden Delicious, M.7, Macspur	levél	HR%: 67% és HSZ: 3,5 (McIntosh), 100% (Royal Gala), 50% (Gala), 55,5% (Dayton), 28% (Golden Delicious, 19,8% (M.7), 24% (Macspur)	Korban és mts., 1992
M.26	levél	HSZ: 6,5	Famiani és mts., 1994
Gloster	sziklevél és embrió tengely az érett embrióból	HSZ: 6,6	Keulemans és de Witte, 1994
Jork 9	levéldarabok	HSZ: 1,95	Pawlicki és Welandar, 1994
Golden Delicious, Liberty, McIntosh, M.26	levéldarabok	HSZ: 7,3 (Golden Delicious), 5,9 (Liberty), 7,6 (McIntosh), 15,6 (M.26)	Yepes és Aldwinckle, 1994b
Jork 9	levéldarabok	HSZ: 3,4	Caboni és mts., 1996
M.26	levél	HSZ: 8,6	Ferradini és mts., 1996
Nezalezhnist, Idared, Florina	levél	HR%: 67% (Nezalezhnist), 72% (Idared), 80% (Florina)	Bartish és Korkhovoi, 1997
McIntosh, Macspur, Wijcik	levéldarabok	HSZ: 5,9 (McIntosh), 6,0 (Macspur), 10,0 (Wijcik)	Sarwar és Skirvin, 1997
Royal Gala	szár internódusz darabok (etiolált hajtásból)	Az 1. (fiatalabb) szár internódusz 2-, 8-, és 73-szor több hajtást regenerált, mint a 2., 3. és 4. internódusz; a HR% 93%, 87%, 37% és 17% volt az 1., 2., 3., és 4. internóduszon. Az etioláció pedig 7-szeresére növelte hajtásszámot az 1. internódusz használata esetén, HSZ: 68,8	Liu és mts., 1998
Jork 9, McIntosh, Gala	levéldarabok	HSZ: 4,5 (Jork 9), HR%: 76% (McIntosh). Gala fajtánál a táptalaj citokinin tartalmától függően, HR% 54% 22 µM BA, és 58% 1,0 µM TDZ esetében	Caboni és Tonelli, 1999
Jork 9, M.26, Gala, McIntosh	hajtáscsúcs	HSZ: 50,0 (Jork 9), 48,3 (M.26), 46,1 (Gala), 44,2 (McIntosh)	Caboni és mts., 2000b

Granny Smith, Morspur Golden, Starkrimson	levéldarabok	HR%: 87% (Granny Smith), 53% (Morspur Golden), 100% (Starkrimson)	Gercheva és mts., 2000
Gala	csúcsi levél	HSZ: 4,1; HR%: 95,3%	Montecelli és mts., 2000
Gale Gala	szár szeletek <i>in vitro</i> hajtásokból	HR%: 36,8%; HSZ: 19,5/szár	Bommineni és mts., 2001
Jork 9	hajtáscsúcsok	HSZ: 28; HR%: 100%	D'Angeli és mts., 2001
Royal Gala	levéldarabok	HSZ: 15,1; HR%: 100%	Dobránszki és mts., 2002
Fuji 2001	levél	HR%: 100%	Qin és mts., 2002
Topred	levél	HSZ: 10,0; HR%: 98%	Yancheva és mts., 2003
M.26	levéldarabok	A táptalaj citokinin tartalmától függően, 18,2 µM BAR-nál HSZ: 3,22; HR%: 76,5%, 21,44 µM TOPR-nál HSZ: 3,18; HR%: 54,6%	Dobránszki és mts., 2004
Bramley	levélkorongok	HSZ: 1,0	McAdam-O'Connell és mts., 2004
MM.106	levél	HSZ: 10,8	Modgil és mts., 2005b
Gami Almasi	<i>in vitro</i> hajtások levelei	HR%: 94%	Rustae és mts., 2007
Hanfu	levél	HSZ: 19,47	Ou és mts., 2008
P.16, P.22, P.59, M.26	levél	HR%: 15.6% (P.16), 22.8% (P.22), 16.4% (P.59), 37,2% (M.26)	Orlikowska és mts., 2010
Rövidítések: BA: benzil-adenin, BAR: benzil-adenin-ribozid; TOPR: meta-topolin-ribozid, TDZ: thidiazuron			

Caboni és mts. (2000b) 'Jork 9', 'M.26', 'Gala és 'McIntosh' fajták hajtáscsúcsaiból sikeresen regeneráltak hajtásokat. D'Angeli és mts. (2001) megállapították, hogy 'Jork 9' almafajta vegetatív hajtáscsúcsai nagy organogén kapacitást mutattak, több hajtást regeneráltak, mint a szárexplantátumok. A vegetatív hajtáscsúcsok organogén potenciáljukat több hónapon át megőrizték, míg a levélexplantátumok 90 napon át voltak képesek új hajtások regenerálására.

2.3.1.3. Az explantátum pozíciója és kora

A levél száron elfoglalt eredeti pozíciója befolyásolta a levélexplantátumokon a járulékos hajtásregenerációt. A levelek regenerációs kapacitása a szár csúcsától a szár alap felé fokozatosan csökkent, a csúcsi 3-4 levélből preparált explantátumokon regenerálódott a legtöbb járulékos hajtás (Fasolo és mts., 1989).

A levél kora is befolyásolta a járulékos hajtásregenerációt. Általában elmondható (Welander, 1988; Fasolo és mts., 1989; Famiani és mts., 1994), hogy a fiatal, kifejlett levelek mutatták a legnagyobb organogén kapacitást. Az organogenezis szempontjából az a legkedvezőbb, amikor a levelekben még nem differenciálódott az oszlopos és szivacsos parenchima; később a levelek organogén potenciálja csökken (Dufour, 1990; Welander, 1988; Welander és Maheshawaran, 1992). Az általunk végzett szövettani vizsgálatok később igazolták, hogy a levelek szöveti differenciálódását a táptalajhoz adott exogén citokininek is befolyásolják (Dobránszki és mts., 2005; Magyar.Tábori és mts., 2010), melyeknek utóhatása volt a levelek regenerációs kapacitására. A juvenilis, illetve kevésbé differenciált szöveti szerkezetű levelekről preparált explantátumokon a regenerálódott hajtások száma szignifikánsan nagyobb volt, és csökkent a regenerálódott hajtások hiperhidratációja.

James és mts. (1988), valamint James és Dandekar (1991) kísérleteiben a gyökeres *in vitro* hajtásokról származó gyűjtött levelek nagyobb hatékonysággal regenerálódtak, mint a nem gyökeres hajtásokról származó levelek. Bulley és James (2004) megállapították, hogy a gyökeres hajtásokról származó levelek szövetei egységesebbek voltak, és a kísérletek ismételhetősége is jobb volt.

A levélexplantátumok regenerációs képességét az is befolyásolta, hogy ab-, vagy adaxiális pozícióban helyezték a táptalajra; több hajtás regenerálódik, ha az explantátumokat az abaxiális felszínnel felfelé helyezzük a táptalajra (Welander, 1988; Gamage és Nakanishi, 2000; Dobránszki és mts., 2002, 2005, 2006).

2.3.2. Az explantátum mérete és a preparálás módja

Az explantátumot szolgáltató levelek eredeti mérete hatással volt a belőlük preparált explantátumok regenerációs képességére. Az optimális levélméret azonban genotípus-függő volt. Swartz és mts. (1990) kísérleteiben 'Gala' fajtánál a 0,7-1,0 cm, Welander és Maheshawaran (1992) kísérleteiben 'M.9' alanyánál a 3 cm, 'Ottawa' fajtánál a 0,5-0,7 cm, míg Yepes és Aldwinckle (1994b) kísérleteiben 'M.26' alanyánál és 'McIntosh' fajtánál az 1,0-1,5 cm volt az optimális levélméret. Sarwar és Skirvin (1997) vizsgálataiban a 'Wijcik' fajta jobban regenerálódott, ha az explantátumok nagyobb (15-18 mm szélességű) levélből származtak, míg a 'McIntosh' és 'Macsur' fajtáknál a kisebb levélméret (5-8 mm) volt a kedvezőbb.

A levelek regenerációs kapacitása – a levél fejlettségének megfelelően – a levélcsúcstól a levél alapi része felé nő, és több hajtás regenerálódik a levéllemez alapi és a középső részén, mint a levélcsúcsi részen (Welander, 1988; Dufour, 1990; Sriskandarajah és mts., 1990; Yepes és Aldwinckle 1994b; Caboni és mts., 1996). Sarwar és Skirvin (1997) kísérleteiben a levéllemez középső részéből preparált explantátumok regenerálódtak a legnagyobb mértékben, és a regenerálódott járulékos hajtások száma is ezeken az explantátumokon volt a legnagyobb. Több hajtás regenerálódott a vágási élek mentén, mint a levél felületén 'McIntosh' fajta 3 változatának tanulmányozása során. A szerzők feltételezték, hogy ez összefüggésben lehet azzal, hogy a levéllemez középső részéből preparált explantátumoknak két vágási felületük volt (a csúcsi és alapi rész esetén csak egy-egy), s ez elősegítette a regenerációs táptalajból a tápanyagok és növényi növekedésszabályozó anyagok felvételét.

A regenerálódó hajtások eredete nemcsak a fajtól, de attól is függ, hogy mely szervből, szövetből preparáltuk az explantátumot. Dufour (1990) vizsgálataiban a 'Gala' almafajta levélexplantátumaiban a regeneráció 5. napjától a dedifferenciálódott parenchima sejtekből kiinduló regenerációt figyelt meg. Pawlicki és Welander (1994) 'Jork 9' fajtát tanulmányozva mind a mezofillum, mind az epidermális sejtekből kiinduló regenerációt írt le. Yancheva és mts. (2003) a regeneránsok két típusát különítette el. A korán (az első 14 nap folyamán) regenerálódó hajtások az explantátum felületéről, az epidermális és szubepidermális sejtréteg sejteiből, a később regenerálódó hajtások azonban a belső sejtrétegből származtak.

2.3.2.1. Konvencionális explantátumok

Az explantátum preparálásának módja hatással van az explantátumból kiinduló hajtásregeneráció hatékonyságára. Konvencionálisan a levelekből vagy levélkorongokat (James és mts., 1988; Ongjanov, 1988; McAdam-O'Connell és mts., 2004) vágta ki, vagy különböző levéldarabokat. A levéldarabokat, vagy levélcsíkokat a levéllemezek longitudinális (hosszirányú, a levéltengellyel párhuzamos), vagy transzverzális (keresztirányú, a levéltengelyre merőleges) feldarabolásával (James és mts., 1988; Welander, 1988; Dufour, 1990; Sriskandarajah és mts., 1990; Yepes és Aldwinckle 1994b; Caboni és mts., 1996; Sarwar és Skirvin, 1997) nyerték.

James és mts. (1998) összehasonlították a 7 mm átmérőjű levélkorongok és a longitudinális, illetve transzverzális vágással létrehozott különböző szélességű levélcsíkok regenerációs kapacitását. A levélcsíkok szélességét pontosan nem adták meg közleményükben. A különböző szélességű levélcsíkokat a levéllemez longitudinális, illetve transzverzális vágásával alakították ki; longitudinális vágással 3 levélcsíkot, transzverzális vágással 3, és 5 levélcsíkot egy-egy levéllemezből. A levélcsíkok regenerációs kapacitása nagyobb volt, mint a levélkorongoké; a regenerációs százalékot a csíkokra vágással 52,1%-ról 89,2%-ra tudták növelni, a regenerálódó hajtások számát pedig megduplázták (a hajtásszám 2,68-ról 5,36-ra nőtt).

Sok esetben jellemző volt, hogy felhasználták a transzverzálisan elvágott levelek csúcsi, középső és alapi részét is (Welander, 1988; Dufour, 1990; Sriskandarajah és mts., 1990; Yepes és Aldwinckle 1994b; Caboni és mts., 1996; Sarwar és Skirvin, 1997).

Korábbi regenerációs kísérleteinkben az tapasztaltuk – Skirvin és Srawar (1997) megfigyeléseivel összhangban –, hogy a levéllemez középső részéből preparált explantátumok regenerálódtak a legnagyobb mértékben. Ezért a regenerációs kísérleteinkben (Dobránszki és mts., 2002, 2005, Magyar-Tábori és mts., 2010) a levelek csúcsi és alapi részét levágtuk, ezt regenerációra nem használtuk fel. A levéllemez középső részéből transzverzális irányú vágást követően két levélexplantátumot nyertünk.

A konvencionális levélexplantátumok mérete általában 1-8 mm közötti, bár az esetek többségében csak becslésekkel élhetünk, mivel a közlemények döntő többségében az explantátumok pontos méretét nem adják meg. Mivel mind az eredeti levél, mind a belőle készült explantátum mérete hatással van a regenerációra, ezért a pontos explantátum méretek ismerete nélkül a regenerációs eredmények korrekt összehasonlítása sem lehetséges.

2.3.2.2. TCL explantátumok

A TCL rövidítés az angol „thin cell layer” kifejezésből ered, s olyan „vékony” explantátumot jelöl, melyet valamely differenciálódott szövetből, vagy szervből izoláltak és egy, vagy csak néhány sejtrétegből áll (Tran Thanh Van, 1973). Két típusát különböztetjük el attól függően, hogyan preparáltuk a TCL explantátumot az eredeti szövetből, vagy szervből. Ha a preparálás hosszirányban történt, longitudinális TCL-ről (rövidítve: lTCL), ha keresztirányban történt a preparálás, akkor transzverzális TCL-ről (rövidítve: tTCL) beszélünk. Az lTCL explantátum tartalmazhat egyféle sejtípust, pl. epidermiszsejtek egy rétegeből áll (monolayer), vagy lehet 3-6 rétegű, pl. kortikális sejtek 3-6 rétegét tartalmazó. A tTCL explantátum mindig többféle sejtípust tartalmaz. A TCL explantátum szélessége (vagy vastagsága) ennek megfelelően 0,2-0,5 mm-től 1-2 mm-ig terjedhet.

Az *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., az oroszlánszáj (*Anthirrhinum majus* L.), a krizantém (*Dendranthema grandiflora*), a *Lilium longiflorum* Thunb. és a dohány (*Nicotiana tabacum* L.) klasszikus modell növények voltak a TCL explantátumokkal végzett kutatásokban.

Az utóbbi évtizedekben a TCL explantátumokat számos növényfaj esetén alkalmazták sikeresen *in vitro* mikroszaporításra (Malabadi és Teixeira da Silva, 2011; Teixeira da Silva és Dobránszki, 2013a), és géntranszformációra (Teixeira da Silva és Tanaka, 2010, 2011; Teixeira da Silva és mts., 2011; Teixeira da Silva 2013; Teixeira da Silva és Dobránszki, 2013a), mesterséges mag előállítására (Sharma és mts., 2013), krioprezervációra, *in vitro* szelekcióra (Kozgar és Kahn, 2012).

A 2. táblázat – Teixeira da Silva és Dobránszki (2013a) összefoglaló munkája alapján – rövid áttekintést ad azokról a növényfajokról, melyek dísznövényként, vagy mezőgazdasági haszonnövényként jelentősek, s amelyeknél az utóbbi 20 évben sikeresen alkalmazták a TCL explantátumokat, a mikroszaporítási és regenerálási munkákban. A TCL explantátumokat korábban alma regenerációs kísérletekben nem alkalmazták.

2. táblázat. Dísz- és haszonnövények, melyeknél sikeresen alkalmaztak TCL explantátumokat *in vitro* organogenezis és/vagy embriogenezis indukálására (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2013a alapján)

Növénycsoport	Fajok/hibridek
Orchideák	<i>Aranda Deborah</i> <i>Spathoglottis plicata</i> <i>Rhynchostylis gigantea</i> <i>Cymbidium aloifolium</i> (L.) Sw. <i>Dendrobium nobile</i> Lindl. Hibrid <i>Doritaenopsis</i> (<i>Doritis</i> × <i>Phalaenopsis</i>) New candy × <i>D.</i> (Mary Anes × Ever spring) Hibrid <i>Cymbidium</i> cv. Twilight Mon ‘Daylight’ <i>Dendrobium candidum</i> Wall ex Lindl. <i>Cymbidium bicolor</i> <i>Eria dalzelli</i> <i>Aerides maculosum</i> <i>Liparis elliptica</i> <i>Dendrobium draconis</i> <i>Dendrobium gratiosissimum</i> Hibrid <i>Cymbidium</i> cv. Sleeping Nymph <i>Coelogyne cristata</i> Lindl. <i>Paphiopedilum</i> Deperle és <i>P. Armeni</i> White <i>Xenikophyton smeeanum</i> <i>Renanthera</i> Tom Thumb ‘Qilin’
Egyéb dísznövények	afrikai ibolya (<i>Saintpaulia ionantha</i> H.Wendl.) amarantusz (<i>Amaranthus edulis</i> Speg.) begónia (<i>Begonia rex</i> Putz.) tárnicsfélék (<i>Gentiana</i> spp.) muskátlí hibridek (<i>Pelargonium</i> x <i>hortorum</i>) kardvirágfélék (<i>Gladiolus</i> spp.) papagáj virág (<i>Heliconia psittacorum</i> L.f.) édes nőszirm (<i>Iris pallida</i>) petúnia (<i>Petunia hybrida</i>) rózsa (<i>Rosa hybrida</i>) dísznapraforgó (<i>Helianthus annuus</i> L.) <i>Torenia fournieri</i> Lind.

	tea (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) golgotagyümölcs (<i>Passiflora edulis</i> Sims.) <i>Citrus</i> sp. Gloxínia (<i>Sinningia speciosa</i> Baill.) gerbera (<i>Gerbera jamesonii</i> Hooker f.)
Szántóföldi növények és zöldségek	közönséges bab (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) tehénborsó [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp] fehérvirágú csillagfűrt (<i>Lupinus albus</i> L.) gyöngycsillagfűrt (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.) <i>Lycopersicon</i> fajok: <i>L. cheesmanii</i>, <i>L. chilense</i>, <i>L. chmielewskii</i>, <i>L. hirsutum</i>, <i>L. parviflorum</i>, <i>L. peruvianum</i>, <i>L. pimpinellifolium</i> paradicsom (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) repce (<i>Brassica napus</i> L.) rizs (<i>Oryza sativa</i> L.) szeszám (<i>Sesamum indicum</i> L.) cirok [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] spenót (<i>Spinacia oleracea</i> L.) cukornád (<i>Saccharum</i> spp. interspecifikus hibridek)
Gyógynövények	<i>Ceropegia</i> fajok Ceyloni spenót [<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.] hamis százszorszép (<i>Eclipta alba</i> L.) ginzeng (<i>Panax</i> sp.) <i>Acmella oleracea</i> L. közönséges orbáncfű (<i>Hypericum perforatum</i> L.)
Fásszárú növények	citrom [<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.] édes narancs [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.] <i>Pinus</i> fajok: <i>P. kesiya</i>, <i>P. roxburghii</i>, <i>P. wallichiana</i>, <i>P. sylvestris</i>, <i>P. pinea</i>, <i>P. patula</i> and <i>P. pinaster</i> afrikai olajpálma (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) barackpálma (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.

A TCL explantátumok előnye a konvencionális, „vastagabb” explantátumokkal szemben az organogenezis (és embriogenezis) szempontjából általánosan az alábbiakban foglалható össze (Tran Thanh Van, 2003 nyomán):

- a) Az organogenezist befolyásoló endogén anyagok mennyisége, s így hatásuk is lecsökken TCL explantátumok használata esetén a hagyományos „vastagabb” explantátumokhoz viszonyítva.
- b) A táptalaj komponensek, azaz a tápanyagok és növekedésszabályozó anyagok transzportja egyszerűbb, a célsejtek/organogén válaszra képes sejtek nagyobb hányadát éri el, mint „vastagabb” explantátumok esetén, ahol csak a vágási felülettől számított néhány sejtrétegig hatolnak be a táptalajkomponensek.
- c) A TCL explantátumokban a célsejtek és a preparálás során sebzett sejtek szoros kapcsolatban állnak egymással. A sebzés az explantátum preparálása során hozzájárul a kalluszosodáshoz és a differenciálódás megindulásához. A sebzés egy stressz-választ indukál, és a sebzés során felszabaduló sejtfalkomponenseknek, oligoszacharidoknak szerepe van a differenciálódásban.
- d) A morfogenezis számos növényfaj esetén hamarabb bekövetkezik, mint konvencionális explantátumok használata esetében, és a morfogenezis (organogenezis, vagy embriogenezis) gyakorisága is jóval nagyobb. Az organogén választ adó sejtek aránya az explantátum össz-sejtszámához viszonyítva nagyobb, mint konvencionális explantátumokban.
- e) A TCL explantátumok „vékonysága” miatt a morfogenezis, az organogenezis célsejtjeinek és differenciálódásuknak a megfigyelése sokkal könnyebb, és a növényanyag megsemmisítése nélkül véghezvihető, markerekkel való megjelölése lehetséges.

2.4. A HAJTÁSFEJLŐDÉST SZABÁLYOZÓ ABIOTIKUS FAKTOROK

Az axilláris hajtások sokszorozódását és növekedését, valamint a járulékos hajtások regenerációját az *in vitro* környezetben a táptalajalkotók és a fizikai körülmények módosításával szabályozhatjuk.

A táptalajkomponenseket tekintve meghatározó szerepe van a táptalaj só-, vitamin-, szénhidrát és növekedésszabályozó anyag összetételének. A leggyakrabban használt táptalaj Murashige-Skoog (MS) (Murashige és Skoog, 1962) sókat – makro-, és mikroelemeket – tartalmazott, de más táptalajok sikeres alkalmazásáról is beszámoltak. Van Nieuwkerk és mts. (1986) sikeresen alkalmazták a Linsmayer-Skoog (Linsmayer és Skoog, 1965) táptalajt, Muleo és Morini (2006, 2008) a DKW (Driver és Kuniyuki, 1984) táptalajt. Ciccoti és mts. (2008, 2009) kísérleteiben a QL (Quorin és Lepoivre, 1977) táptalaj két genotípus ('D2212', 'H0801'), a DKW táptalaj egy genotípus ('4608') hajtássokszorozódását növelte az MS táptalajhoz viszonyítva. A járulékos hajtásregenerációs táptalajban több szerző alkalmazta az N6 (Chu és mts., 1975) sóösszetételt (Fasolo és mts., 1989; Swartz és mts., 1990; Yepes és Aldwinckle, 1994b), vagy az N6 makroelemek sóit kombinálva LS mikroelemek sóival (Liu és mts., 1998).

A táptalaj vitamin komponensei többfélék voltak. Az MS vitaminok mellett számos más vitamin-összetételt alkalmaztak sikerrel; a leggyakrabban Staba (1969) (Sriskandarajah és mts. 1990), LS (Dufour, 1990; Baraldi és mts., 1991) és – főleg a járulékos hajtásregeneráció során – B5 (Gamborg és mts., 1968) (Bommineni és mts., 2001; Liu és mts., 2009; Nabeela és mts., 2009), vagy WPM (Lloyd és McCown, 1981) vitaminokat (Orlikowska és mts., 2010).

A szénhidrátok a táptalajban energiaforrások, ozmotikus regulátorok és szénforrások is. A génexpresszió szabályozásával a növekedési és fejlődési folyamatokat befolyásolják (Borges de Paiva Neto és Campos Otoni, 2003; Gibson, 2004; Zhou és mts., 2006; Thorpe és mts., 2008). A leggyakrabban a szacharózt használták 3% koncentrációban alma axilláris, vagy járulékos hajtástenyészeteiben. Alma esetén azonban ismert, hogy a speciális szénhidrát metabolizmusa miatt a fotoszintézis fő produktumai a szacharóz és a szorbitol, s a szénhidrátok növényen belüli szállítása 60%-ban szorbitol útján történik (Loescher és Everard, 1996; Noiraud és mts., 2001). Így nem meglepő, hogy több kutató is sikeresen növelte a hajtássokszorozódást szorbitol táptalajban való használatával (Pua és Chong, 1984, 1985; Welander, 1989; Karhu, 1995, 1997; Sotiropoulos és mts., 2006; Bahmani és mts., 2009).

A hajtások indukciója, fejlődése és növekedése szabályozása szempontjából a táptalaj legfontosabb komponensei a növekedésszabályozó anyagok. A hajtásfejlődéshez a táptalaj citokinin túlsúlya szükséges, de fontos komponensei a táptalajnak az auxinok és a gibberellinsav. A hajtásfejlődés és regeneráció szempontjából a citokinek és auxinok aránya döntő fontosságú (Yepes és Aldwinckle, 1994a,b; Ward és Leyser, 2004; Van Staden és mts., 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010). A növekedésszabályozó anyagok, elsősorban a citokinin szerepét külön alfejezetben (2.4.1. alfejezet) tárgyalom részletesen.

A fejlődési és növekedési folyamatokat a táptalajhoz adott egyéb organikus és anorganikus anyagok is módosíthatják. Alma hajtástenyészetekben sikeresen alkalmazták a kálium humátot (Baraldi és mts., 1991), a morfolino-etán-szulfonsavat (Nabeela és mts., 2009), a nátrium nitroprusszidot (Han és mts., 2009), és a triakontanolt (Tantos és mts., 2001) a hajtások számának növelésére és a hajtások hosszanti növekedésének serkentésére.

Szilárdító anyagként a leggyakrabban agar-agart, a hajtásregenerációs táptalajban pedig phytagelt alkalmaznak (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010). Különböző galaktomannánok, xiloglükánok, guar gumi, vagy phytagel egyedüli, vagy kombinált használatával egyes esetekben a hajtások szaporodását fokozni, és minőségét javítani lehetett (Bommineni és mts., 2001; Lima-Nishimura és mts., 2002; Babbar és mts., 2005; Lucyszyn és mts., 2005; Dobránszki és mts., 2011).

A tenyésztés fizikai faktorainak szintén fontos szerepe van a fejlődési folyamatok szabályozásában. A fény, azaz a megvilágítás periódusa, intenzitása és hullámhossza, vagy éppen a hiánya (ld. sötét kezelések) befolyásolja a morfogenezist (Noiton és mts., 1992; Marin et al., 1993; Schaefer és mts., 2002; Zandrea és mts., 2006; Muleo és Morini, 2006, 2008;). Általában a hajtássokszorozás során folyamatos, vagy 16 órás fotoperiódust alkalmaztak, a megvilágítás erőssége $38-105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF (fotoszintetikus fotonfluxus) és az alkalmazott fény hullámhossza 400-700 nm tartományban volt (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010). A járulékos hajtásregeneráció kezdeti szakaszában a regenerálódó hajtások számát és a regenerációs százalékot növelte, ha kezdetben 2-3 hetes sötét kezelést alkalmaztak, majd a fényintenzitást fokozatosan emelték (Fasolo és mts., 1989; Predieri és Fasolo, 1989; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Famiani és mts., 1994).

A tenyésztés során alkalmazott hőmérséklet hatását kevésbé tanulmányozták. A legtöbb esetben 22-26 °C között végezték a tenyésztést (Jones és mts., 1977; Snir és Erez, 1980; Werner és Boe, 1980; Zimmerman és Fordham, 1985; Van Nieuwkerk és mts., 1986; Webster és Jones, 1989; Noiton és mts., 1992; Marin és mts., 1993; Yepes és Aldwinckle,

1994a,b; Wang és mts., 1994; Karhu, 1995, 1997; De Klerk és mts., 1997; Grant és Hammatt, 1999; Modgil és mts., 1999; Dobránszki és mts., 2000 a, b, c; Litwińczuk, 2000; Bommineni és mts., 2001; Magyar-Tábori és mts., 2001 a, 2002; Mouhtaridou és mts., 2004; Lucyszyn és mts., 2005; Liu és mts., 2009), vagy a fotoperiódushoz igazítva ciklikus 28/22, vagy 24/22 °C hőmérsékleti körülményeket biztosítottak a tenyésztés során (Lane és Looney, 1982; Lane és McDougald, 1982; Welander, 1985).

Egyéb fizikai tényezők, mint a relatív nedvességtartalom a tenyészedényekben, illetve a petri csészékben, az edények gázfázisában az etilén és a CO₂ koncentrációja, szintén befolyásolja a hajtások növekedését és fejlődését. Predieri és mts. (1991) a CO₂ koncentráció (200 ml CO₂ / nap injektálása a tenyészetekhez) emelésének stimuláló hatását mutatták ki 'Gala' fajta hajtássokszorozódásában a táptalaj csökkentett szacharóz tartalma (1%) és 30 μM s⁻¹ m² értékről 70 μM s⁻¹ m²-ra megnövelt megvilágítása mellett. Li és mts. (2001) kimutatták, hogy a CO₂ koncentráció növelése (1000 μmol mol⁻¹-ra) a hajtások tömegét, és a hajtásokon fejlődő levelek számának növekedését váltotta ki.

2.4.1. Citokininek – a hajtásfejlődés kulshormonjai

A citokininek növényi hormonok, illetve növekedésszabályozó anyagok (Werner és mts., 2001; Howell és mts., 2003; Schmölling, 2004; Ferreira és Kieber, 2005; Sakakibara, 2006; Rijavec és Dermastia, 2010), s mint ilyenek a növényekben kémiai messengerként működve a növekedési és fejlődési folyamatok szabályozásában vesznek részt. A citokinint, mint jelet a membránok hisztidin kinázai (hibrid típusú szenzor kináz) érzékelik, s a jel átvitele a növényekben egy többlépéses foszforátviteli mechanizmussal történik (1. számú melléklet) (Schmölling, 2004; Ferreira és Kieber, 2005; Hwang és Sakikabara, 2006; Rijavec és Dermastia, 2010). Az elsőként felfedezett citokinin a kinetin volt (Miller és mts., 1955a, 1955b).

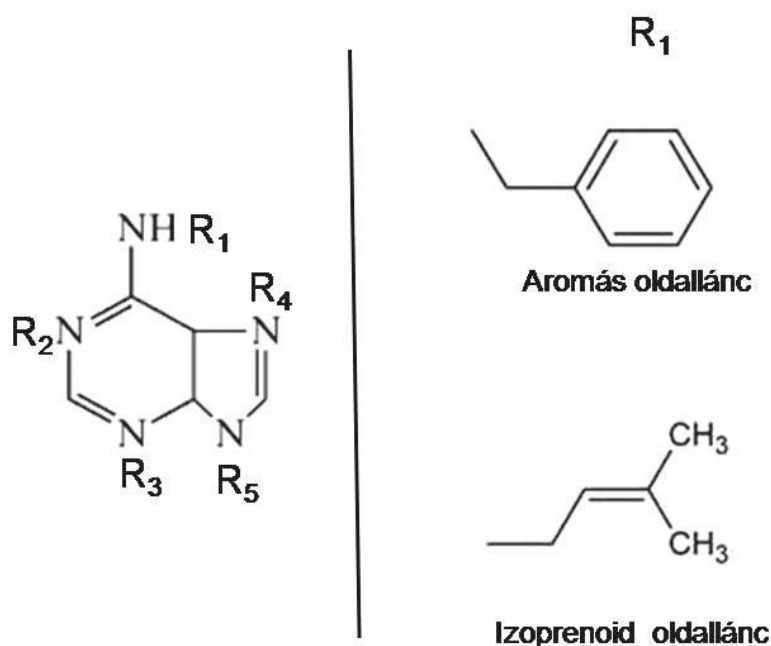
A citokininek az *in vitro* hajtásfejlődés kulshormonjai, a táptalajhoz adott citokininekkal *in vitro* körülmények között a sejtosztódás, a hajtásindukció, a hajtások differenciálódása és növekedése szabályozható. Pontosabban fogalmazva a szövettenyészetben kiváltott fejlődési és növekedési válaszok a citokininek egyéb hormonok és növekedésszabályozó anyagok, főleg auxinok, egyensúlyától függenek. Az egyensúlyt nemcsak a táptalajhoz adott növekedésszabályozó anyagok mennyisége befolyásolja, hanem a tenyésztett növényi rész endogén hormon tartalma is. A citokininek által kiváltott főbb hatások szövettenyészetben a következők (Van Staden és mts., 2008 alapján):

- sejtosztódás serkentése (a citokininek szükségesek a mitózisban részvevő proteinkomponensek szintéziséhez)
- járulékos hajtásrügyek és hajtások indukciója és növekedése
- *in vitro* hajtások morfológiája és fiziológiai állapota (hajtások minősége)
- serkenti az axilláris hajtások növekedését, és szaporodását (apikális dominancia csökkentő hatása révén)
- gyökeresedés gátlása; nagy citokinin szint gátolja, vagy késlelteti mind a gyökerek indukcióját, mind a növekedését
- szomatikus embriogenezis; nagy citokinin szint gátolja az embriogenezis folyamatát

Az eltérő szerkezetű citokininek metabolizmusa, szövettényészetben a táptalajból való felvétele, a növényben való szállítása, receptorai, percepciója és szignál transzdukciós folyamatai, s ezáltal a szövettényészetekben a növény, illetve növényi rész növekedésére és fejlődésére kifejtett hatásai is eltérőek (Mok és mts., 1978; Mok és Mok, 2001; Werbrouck és mts., 1996; Strnad és mts., 1997; Podwyszynska és mts., 2000; Wojtania and Gabryszewska, 2001; Dobránszki és mts., 2002, 2004, 2005; Schmölling, 2004; Hwang és Sakakibara, 2006; Sakakibara, 2006; Aremu és mts., 2012a). Hatásuk függ a növény fajtától, genotípusától, a szövettényészetben a tenyésztett szövet, vagy szerv típusától és attól is, hogy a növény, vagy növényi rész mely fejlődési állapotában alkalmazzuk.

2.4.1.1. A citokininek kémiai szerkezete

Kémiai szerkezetét tekintve a citokininek N⁶-os pozícióban oldalláncot hordozó adenin származékok. Az oldalláncuk szerkezete alapján két nagy csoportra lehet osztani a természetesen is előforduló citokinineket: izoprenoid, vagy izoprén oldalláncú és aromás oldalláncú citokininekre (Kakimoto, 2003; Schmölling, 2004; Sakakibara, 2006) (1. ábra).



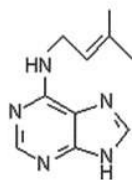
1. ábra. A citokininek alapszerkezete és két fő csoportja az N⁶ pozícióban lévő oldallánc szerkezeti típusa alapján (R₁) (Dobránszki, 2014)

Az izoprenoid típusú citokinineket tovább csoportosíthatjuk az oldallánc szerkezete alapján. Egyik csoportjuk izopentenil típusú, mint az N⁶-(Δ^2 -isopentenil) adenin (2iP). Másik csoportjuk hidroxilált izopentenil, vagy más néven zeatin típusú, és a láncban lévő kettős kötés miatt kétféle, *cis*z vagy *transz* konfigurációban fordulhat elő. Ilyen típusú a zeatin, kémiai nevén N⁶-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) adenin (2. ábra).

Az aromás oldalláncú citokinineknek szintén több típusát különböztetjük meg az N⁶ pozícióban lévő oldallánc szerkezete alapján. A természetben előforduló formái a benzil-adenin (BA), annak a hidroxilált analógjai, a topolinok, mint az orto-topolin (6-(2-hidroxibenzilamino) purin; orto-TOP, 2OHBA) vagy a meta-topolin (6-(3-hidroxibenzilamino) purin; meta-TOP, 3OHBA), illetve ezek metoxi-származékai (orto-metoxitopolin és meta-metoxitopolin) (2. ábra.).

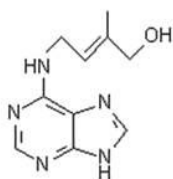
IZOPRENOID OLDALLÁNCÚ
CITOKININEK

Izopentenil típusú

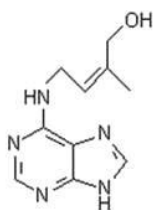


2iP

Hidroxilált izopentenil típusú



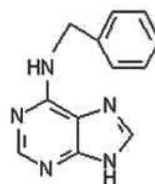
transz-Zeatin



cisz-Zeatin

AROMÁS OLDALLÁNCÚ
CITOKININEK

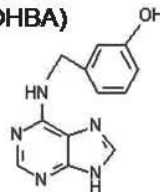
Benzil-adenin



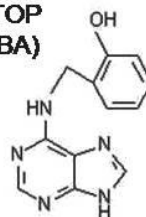
BA

Hidroxilált származékok- topolinok

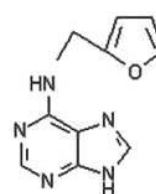
meta-TOP
(3OHBA)



orto-TOP
(2OHBA)



Kinetin

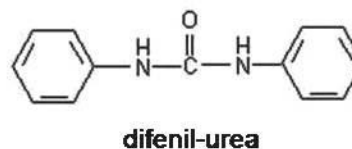
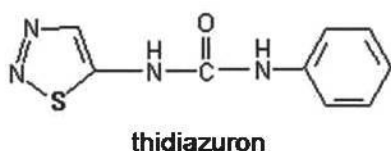


Kin

2. ábra. Az izoprenoid és aromás oldalláncú citokininek típusai az N⁶ pozícióban lévő oldallánc kémiai szerkezete alapján (Dobránszki, 2014)

A kinetin (6-furfuril-aminopurin) szintén az aromás oldalláncú citokininek csoportjába sorolható, növényi szövettenyészetekben használt aktív citokinin, de nincs bizonyíték növényekben való természetes előfordulására (Kamínek és mts., 2000; Schmölling, 2004; Sakakibara, 2006) (2. ábra).

A növényi sejt- és szövettenyészetekben gyakran használunk fenilurea típusú citokinineket is, pl. a thidiazuront (TDZ), vagy a difenil-ureát. Ezek növényi szövettenyészetben nagyon aktívak növekedésszabályozó anyagok, a morfogenezist szabályozzák, de a természetben nem fordulnak elő (3. ábra).



3. ábra. Szintetikus, fenil-urea típusú citokininek (Dobránszki, 2014)

Alma axilláris és járulékos hajtásindukciójára a szintetikus TDZ mellett aromás oldalláncú citokinineket használunk, mivel az izoprenoid típusú citokininek alma esetén alacsony hatékonyságúak (Dobránszki és mts., 2006). Ezért a következő alfejezetekben az aromás oldalláncú citokininek főbb hatásait mutatom be.

2.4.1.2. A citkonininek szerkezete és hatásmechanizmusa közötti összefüggések aromás oldalláncú citokininek esetében

A citokininek szintjét az intakt növényben a bioszintetikus és degradációs folyamatok szabályozzák. A citokininek bioszintézise főként a gyökércsúcsokban történik, de a szállítószövetekben, a hajtáscsúcsokban, az érő embrióban és egyéb szervekben is kimutatták a bioszintézisüket (Kakimoto, 2003; Schmölling, 2004). Az izoprenoid típusú citokininek bioszintetikus és degradációs folyamatai jól ismertek (Schmölling, 2004; Sakakibara, 2006; Hwang és Sakakibara, 2006). Az aromás oldalláncú citokininek szerepe a növényekben legalább olyan jelentős, mint az izoprenoid citokinineké (Strnad, 1996; Strnad és mts., 1997; Sáenz és mts., 2003), azonban a bioszintézisükkel és lebontásukkal kapcsolatos információink jelenleg még meglehetősen hiányosak (Van Staden és mts., 2008). Receptoraik, biokémiájuk, biológiai aktivitásuk az izoprenoid citokininekétől eltérő. A növényben metabolizmusuk során interkonverziós és konjugációs folyamatok révén kialakuló különböző formáiknak is eltérő a biológiai aktivitása (Strnad és mts., 1997; Werbrouck és mts., 1996; Schmölling, 2004; Hwang és Sakakibara, 2006; Sakikabara, 2006; Aremu és mts., 2012a)

In vitro tenyészetekben a hajtások indukcióját, differenciálódását és növekedését a táptalajhoz adott (exogén) citokininekkal válthatjuk ki (George és Debergh, 2008; Van Staden és mts., 2008). Az aromás oldalláncú citokininek aktivitása a kémiai szerkezetükkel szoros kapcsolatban áll. A szabad bázisok (nukleobázisok) a biológiailag legaktívabb formáik, s ezek szintjét a növényben a bioszintézis, és/vagy – szövettenyészetben – a táptalajból való felvétel mellett az aktív formának (nukleobázis) a konjugált formákból való felszabadulásának, az

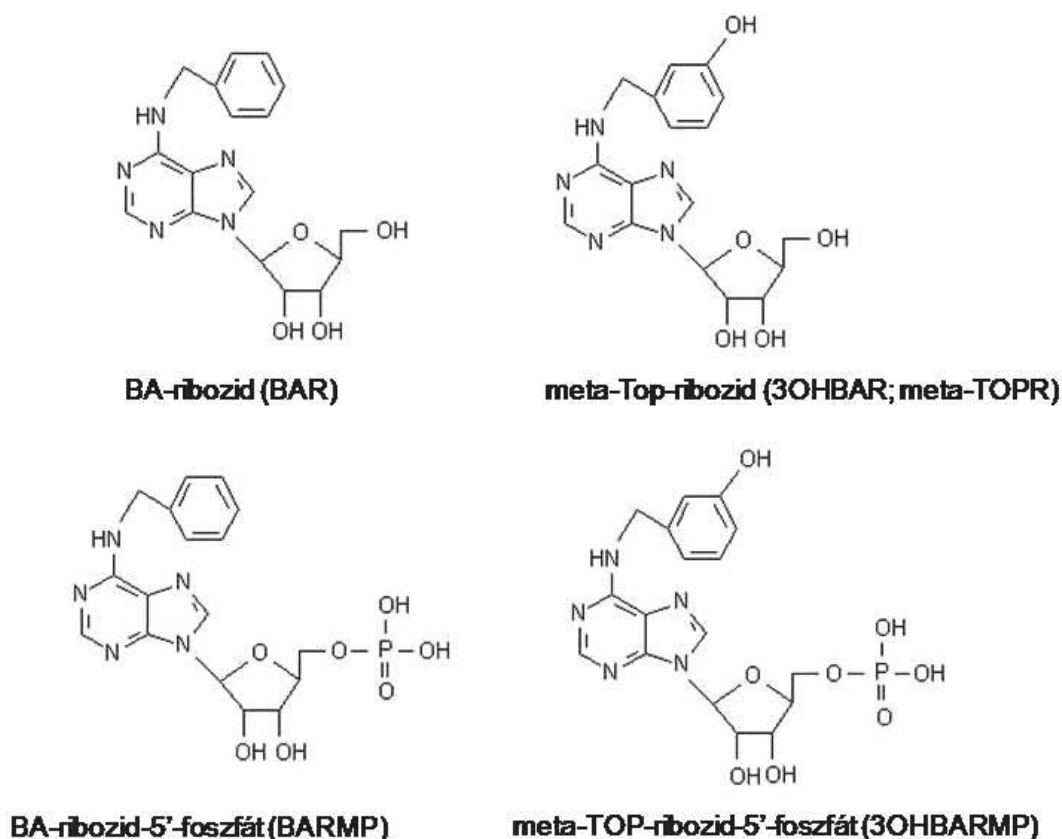
inaktív formák képződésének és a lebontási folyamatoknak a mértéke szabályozza (Schmülling, 2004; Hwang és Sakakibara, 2006; Sakakibara, 2006; Aremu és mts., 2012a).

A konjugáció két fő formáját különíthetjük el. A konjugáció érintheti az adenin gyűrűt, és az oldalláncot. Az adenin gyűrű részhez általában különböző cukrok, cukor-foszfátok, vagy aminosavak (főként az alanin) kapcsolódhatnak. A konjugáció a gyűrű több helyén is bekövetkezhet, a konjugáció potenciális helyeit az 1. ábrán R₂-R₅ helyek mutatják.

Az adenin gyűrű N¹ pozíciója a citokininek aktív helye, ezért ennek a helynek a módosítása az aktivitásuk elvesztésével, vagy csökkenésével jár (Matsubara, 1980) attól függően, hogy mely szubsztituens kötődik ide (R₂ pozíció); a leggyakoribb szubsztituens a metil-tiol csoport (-SCH₃).

Az N³ pozícióban (1. ábra: R₃ pozíció) konjugált citokininek inaktív formák, de könnyen hidrolizálhatók, ezért azokat a citokininek átmeneti tároló formáinak tekinthetjük (Schmülling, 2004). Jó példa erre a triakantin, mely egy N³ pozícióban szubsztituált adenin származék, amiből az autoklávozás hatására felszabaduló aktív forma növényi szövettenyészetben nagy aktivitást mutat (Leonard és Henderson, 1975).

Ha az adenin gyűrű N⁹ pozíciójába (1. ábra: R₅ pozíció) β-D-ribóz, vagy β-D-ribóz-5'-foszfát kapcsolódik, akkor a nukleobázisnál kisebb aktivitású ribozidok, vagy ribotidok alakulnak ki (4. ábra). A citokininek a növényekben ribozidok formájában szállítódnak vagy a szelektív transzport rendszerek segítségével, vagy diffúzióval (Sakakibara, 2006). A ribozidok és nukleobázisok közötti átalakulás reverzibilis folyamat, a ribozidokból az aktív nukleobázisok könnyen felszabadulnak, tehát a szállítás után könnyen aktív forma alakul ki belőlük. Mivel a ribozidok és a ribotidok N⁹ pozícióban konjugált származékok, ezért egyéb, az N⁹ pozíciójú konjugációktól, pl. glükolizációtól ezek a formák védettek.



4. ábra. A benzil-adeninből és a meta-topolinból az adenin gyűrű N⁹ pozíciójába β-D-ribóz, vagy β-D-ribóz-5'-foszfát kapcsolódásával kialakuló ribozidok (nukleozidok) és ribotidok (nukleotidok) (Dobránszki, 2014)

Ha az adenin gyűrűhöz az N³, N⁷, N⁹ pozícióban (1. ábra: R₃ R₄ R₅ pozíciók) β-D-glükóz (N-glükolizáció), vagy N⁹ pozícióban alanin kapcsolódik, irreverzibilis vagy átmenetileg inaktív formák alakulnak ki (Werbrouck és mts., 1996; Schmölling, 2004; Sakakibara, 2006); a folyamatokat a glükozil-transzferáz és glükozidáz enzimek katalizálják (Sakakibara és mts., 2005). Ha a β-D-glükóz, vagy az alanin a citokininek N⁷, vagy N⁹ pozíciójához kapcsolódik, kémiaiilag stabil vegyületek alakulnak ki, a folyamat gyakorlatilag irreverzibilis, ezért ezek a vegyületek biológiailag inaktívak (Schmölling, 2004). Werbrouck és mts. (1996) vizsgálataiból azonban kiderült, hogy a folyamat nem teljesen irreverzibilis, az aktív nukleobázis ezekből a vegyületekből lassan felszabadulhat, s ez tehető felelőssé számos, szövettényészetben tapasztalt káros mellékhatásért/utóhatásért is (ld. később, 2.4.1.3. fejezet).

A citokinineknek azonban nemcsak az adenin gyűrűjében, hanem az oldalláncán – természetes körülmények között előforduló, vagy szintetikusán előállított – módosult formái is ismertek, és szintén eltérő biológiai aktivitással rendelkeznek.

Az oldallánc O-glükolizációja, mely során β -D-glükóz kapcsolódik az N⁶ oldallánc hidroxil csoportjához, 3-O-glükozid-N⁶-benzil-adenin (BA3OG) kialakulását eredményezi. β -D-glükóz helyett β -D-xilóz is kapcsolódhat ebbe a pozícióba az oldallánchoz, O-xilozidokat kialakítva. A β -glükozidázok segítségével az O-glükozidokból az aktív forma könnyen felszabadul, ezért az O-glükozidokat szintén a citokininek tároló formáinak tekintjük (Schmüllig, 2004; Sakakibara, 2006).

Az oldallánc hidroxilálásával kialakuló hidroxilált benzil-adenin származékok, a topolinok. A topolinok a növényekben természetesen is előforduló citokininek (Strnad és mts., 1997; Werbrouck és mts., 1996; Schmüllig, 2004; Sakakibara, 2006), melyek szövettényésztésben is nagy biológiai aktivitást mutatnak (Werbrouck és mts., 1996, Podwyszynska és mts., 2000; Wojtania and Gabryszewska, 2001; Dobránszki és mts., 2002, 2004, 2005; Aremu és mts., 2012a). Elsőként az orto helyzetben hidroxilált benzil-adenin származékot, a 6-(2-hidroxi-benzilamino) purin N⁹ ribozidját (2OHBAR) izolálták nyárfa leveléből. A hidroxil csoport előfordulhat orto, meta és para helyzetben is, s ez a vegyület biológiai aktivitására is hatással van. Legaktívabb a meta pozícióban hidroxilált benzil-adenin, a meta-topolin (meta-TOP, későbbiekben a disszertációban TOP), a legkisebb aktivitású a para pozícióban hidroxilált származék (Aremu és mts., 2012a).

2.4.1.3. Citkonininek szerepe az alma axilláris és a járulékos hajtásfejlődésében

Noha mind az axilláris hajtások növekedésének és proliferációjának indukciója és stimulálása, mind pedig a járulékos hajtásregeneráció sikere a táptalajhoz adott növekedésszabályozó anyagok (elsősorban a citokininek és az auxinok) egyensúlyától függ, a fejlődési folyamatok fő irányítója a citokinin (Yepes és Aldwinckle, 1994a,b; Ward és Leyser, 2004; Van Staden és mts., 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010). A citokininek ezért mind az axilláris, mind a járulékos hajtástenyészetek táptalajának nélkülözhetetlen komponensei.

Alma hajtástenyészetek táptalajában a leggyakrabban benzil-adenint (BA), kinetint (KIN), vagy főleg a járulékos hajtásregeneráció indukálására thidiazuront (TDZ) használtak, mivel ezeknek a citokinineknek nagy a stabilitása és hatékonyan képesek a hajtások regenerációját, növekedését és proliferációját indukálni (Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Huetteman és Preece, 1993; Barciszewski és mts., 1999; Ďurkovič és Mišalová, 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010) (3. és 4. táblázat).

3. táblázat. A táptalajban alkalmazott citokininek hatása az axilláris alma hajtások sokszorozódására és növekedésére

Fajta/klón	Citokinin	Egyéb növekedésszabályozó anyagok	Hajtások sokszorozódása (multiplikációs ráta) és hossza *	Irodalom
<i>A táptalaj egyféle citokinint tartalmazott és más növekedésszabályozó anyagot nem tartalmazott</i>				
M.27, M.9	10 µM BA	-	M.27: 7,54, M.9: 3,91	Lane és McDougald, 1982
M.26, Macspur	5 µM BA	-	M.26: 3,41, Macspur: 4,56	
Åkerö	4,4 µM BA	-	4,9; 1,6 cm	Welander, 1985
Golden Delicious	1 mg/l BA	-	4,8	Baraldi és mts., 1991
<i>A táptalaj kétféle citokinint tartalmazott és más növekedésszabályozó anyagot nem tartalmazott</i>				
Tydemán's Early Worchester	2 µM BA + 7,5 µM KIN	-	5-10	Modgil és mts., 1999
<i>A táptalaj egyféle citokinint tartalmazott és tartalmazott más növekedésszabályozó anyagot is</i>				
Gala	0,1 µM TDZ	0,5 µM IBA,	10,6; 2,3 cm	Van Nieuwkerk és mts., 1986
	1,0 µM TDZ	1,4 µM GA ₃	10,0; 2,4	
	10,0 µM TDZ		8,5; 2,8 cm	
	4,4 µM BA		8,0; 5,1 cm	
Granny Smith	0,7 mg/l BA	0,1 mg/l IBA	7,5; 2,7 cm	Abdul-Kader és mts., 1992
Mutsu	1,0 mg/l BA		10,4; 3,6 cm	
Spur Golden Delicious	0,5 mg/l BA		7,7; 4,9 cm	
Julyred	0,7 mg/l BA	0,1 mg/l IBA	9-11	Lászlóffy és mts., 1992
Greenleaves	4,4, vagy 8,8 µM BA	0,5 mg/l IBA	6,8, vagy 6,9; 1,8, vagy 0,98 cm	Marin és mts., 1993
Tuscan	8,8 µM BA		9,8; 1,58 cm	

Empire		0,1 mg/l IBA +	6,7; 2,0 cm	Yepes és Aldwinckle, 1994a
Freedom		0,5 mg/l GA ₃	6,6; 2,0 cm	
Golden Delicious			9,0; 2,0 cm	
Jonathan			2,5; 2,8 cm	
Liberty			7,0; 2,3 cm	
Malling 7A			11,6; 1,5 cm	
Malling 26			5,3; 1,3 cm	
Mutsu			8,2; 2,1 cm	
Rome Beauty	1 mg/l BA		6,3; 1,2 cm	
McIntosh		0,1 mg/l IBA	6,6; 2,1 cm	
Summerland McIntosh			7,8; 1,5 cm	
Idared		1,0 mg/l IBA + 0,1 mg/l GA ₃	5,0; 2,3 cm	
<i>Malus prunifolia xanthocarpa</i>			6,6; 2,1 cm	
McIntosh	13,3 µM BA	0,5 µM IBA	4,1	Karhu, 1997
MM.26	0,5 mg/l BA	0,1 mg/l IBA +	7,7; 3,19 cm	Dobránszki és mts., 2000b
MM.106		0,2 mg/l GA ₃	6,9; 3,99 cm	
JTE-H	1,0 mg/l BAR		9,5; 2,21 cm	
		0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l GA ₃	9,9; 1,96 cm	
Jonagold	1,0 mg/l BAR	0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l GA ₃	6,5	Dobránszki és mts., 2000c
MM.106	0,5 mg/l BA	0,1 mg/l IBA + 1,0 mg/l GA ₃	6,76; 2,73 cm	Sharma és mts., 2000

MM.106		0,1, vagy 0,3 mg/l IBA + 0,2	7,0	Zaid és mts., 2000
EM7	0,5, vagy 1,0 mg/l	mg/l GA ₃	5,0	
M.26	BA		10,0	
JTE-H	3,5 mg/l TOP	0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l GA ₃	13,3; 1,26 cm	Magyar-Tábori és mts., 2001a
Jonagold	5,0 mg/l TOP	0,1 mg/l IBA +	6,9; 2,09 cm	Magyar-Tábori és
	2,0 mg/l BAR	0,2 mg/l GA ₃	5,9; 2,19 cm	mts., 2002
MM.111	1,0 mg/l BA	0,5 mg/l GA ₃	5,0; 1-4 cm	Kaushal és mts., 2005
M.27	4,44 µM BA	1,47 µM IBA + 0,58 µM GA ₃	5,0	Al-Rihani és mts., 2005
<i>Malus sieboldii</i>			3,3; 2,8 cm	Ciccoti és mts., 2008,
4551 (Laxton's Superb x <i>M.</i> <i>sieboldii</i>)	4,44 µM BA	0,25 µM IBA +	3,7; 3,3 cm	2009
4556 (Laxton's Superb x <i>M.</i> <i>sieboldii</i>)		0,28 µM GA ₃	4,6; 2,4 cm	
D2118 (szabad beporzású)			3,5; 2,2 cm	
D2212 (Laxton's Superb x <i>M.</i> <i>sieboldii</i> szabad beporzású)			3,3; 2,3 cm	
H0801 (4556 x M9)			3,9; 2,6 cm	
H0901 (4556 x M9)			4,9; 2,2 cm	
H0909 (4556 x M9)			4,4; 2,7 cm	
4608 (<i>M. purpurea</i> cv. Eleyi x <i>M.</i> <i>sieboldii</i>)			4,3; 2,3 cm	

Gi 477/4 (4608 szabad beporzású)			3,4; 1,3 cm	
C14907 (4608 szabad beporzású)			5,7; 2,0 cm	
Golden Delicious			4,8; 2,4 cm	
Sukari	4,44 μ M BA	1,47 μ M NAA + 0,58 μ M GA ₃	6,0	Ali Bacha és mts., 2009
Golden Delicious	4,44 μ M BA	1,47 μ M NAA + 0,58 μ M GA ₃	3,5; 2,0 cm	Al-Tiawni és mts., 2009
Golden Delicious	2,0 mg/l TDZ	0,2 mg/l NAA	4,0	Nabeela és mts.,
MM.111			4,1	2009
<i>A táptalaj kétféle citokinint tartalmazott és tartalmazott más növekedésszabályozó anyagot is</i>				
Jonagold	0,5 mg/l BA + 1,5	0,3 mg/l IBA +	6,3	Dobránszki és mts.,
Galaxy	mg/l KIN	0,2 mg/l GA ₃	10,9	2000c
Prima	1,0 mg/l BA + 1,0		8,1	
Galaxy	mg/l KIN		10,4	
Húsvéti rozmaring			6,2; 4,48 cm	Dobránszki és mts., 2000a
*: amelyik adat az eredeti közleményben fellelhető volt. BA: benzil-adenin, BAR: benzil-adenin-ribozid, GA ₃ : gibberellinsav, IBA: indol-3- vajsav, NAA: naftil-ecetsav; KIN: kinetin, TDZ: thidiazuron, TOP: meta-topolin				

Mind a BA, mind a TDZ esetében – főként, ha nagy koncentrációban alkalmazták a hajtások indukciójára, és a hajtássokszorozódás hatékonyságának növelésére – káros mellékhatásokat, és utóhatásokat is kimutatta több kutató is. A leggyakrabban előforduló káros mellék-, vagy utóhatások a következők voltak:

- morfológiai abnormalitások a hajtások fejlődése, és növekedése során, pl. a hajtások hiperhidratációja, rozetta-típusú hajtásnövekedés, a hajtáscsúcsok elhalása, a hajtások korai előregedése (Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; összefoglaló áttekintés: Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010; Aremu és mts., 2012a,b),
- káros utóhatások megjelenése a következő szaporítási ciklusban, illetve a járulékos hajtásregeneráció során (Werner és Boe, 1980; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; összefoglaló áttekintés: Ďurkovič és Mišalová, 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010),
- káros utóhatás a gyökeresedési és akklimatizálási szakaszokban, a gyökeresedés gátlása és a túlélési arány csökkenése (Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Webster és Jones, 1991; Schmidt és Waldemaier, 1992; Kiss és mts., 1994, 1997; Jámbor-Benczúr és mts., 2001; Magyar-Tábori és mts., 2001b; Zobayed és mts., 2001; összefoglaló áttekintés: Ďurkovič és Mišalová, 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010; Magyar-Tábori és mts., 2011; Aremu és mts., 2012a).

A 3. táblázat összefoglaló áttekintést ad a táptalajban alkalmazott citokinineknek az axilláris hajtássokszorozódásra és növekedésre kifejtett hatásairól. A 3. táblázatban feltüntetett adatok alapján világosan látható, hogy a különböző alma fajták hajtássokszorozódási és növekedési válasza a citokininekre erősen fajtafüggő, ezért az optimális citokinin típus és koncentráció kiválasztásakor az adott fajta igényeit kell figyelembe venni (Welander, 1985; Yepes és Aldwinckle, 1994a; Karhu, 1995; Dobránszki és mts., 2000b,c; Magyar-Tábori és mts., 2001a; Magyar-Tábori és mts., 2002; Kovalchuk és mts., 2009).

A legtöbb esetben a BA-t alkalmazták citokininforrásként, általában 0,5-2,0 mg/l koncentráció tartományban (Baraldi és mts., 1991; Marin és mts., 1993; Yepes és Aldwinckle, 1994a; Dobránszki és mts., 2000b; Sharma és mts., 2000; Kaushal és mts., 2005). A hajtásszám és a hajtáshossz között erős negatív korrelációt figyelt meg Welander (1985) és

Marin és mts. (1993), valamint nagy (8,8 és 17,6 μM) BA koncentrációk esetében a hajtások nemcsak rövidek voltak, hanem meg is vastagodtak, és megcsavarodtak.

Yepes és Aldwinckle (1994a) kísérleteikben konstans BA koncentrációt alkalmazva megállapították, hogy a táptalajban lévő gibbrellinsav (GA_3) és indol-3-ajsav (IBA) aránya szabályozta a hajtások hosszát, az IBA koncentráció növelése elősegítette a hajtások megnyúlását, de csak GA_3 jelenlétében.

A TDZ 0,1-10 μM koncentrációban stimulálta a hajtássokszorozódást, de ez a hatása nem volt jelentősen jobb, mint a 4,4 μM BA hatása (Van Nieuwkerk és mts., 1986), viszont a levelek kisebbek voltak, mint BA tartalmú táptalajokon fejlődő hajtások levelei. A TDZ tartalmú táptalajon nagy hajtáscsokrok fejlődése volt megfigyelhető, melyekben a hajtások egy jelentős része járulékos hajtás volt.

Több esetben próbálkoztak BA származékok alkalmazásával. Benzil-adenin-ribozid (BAR) és meta-topolin (TOP) alkalmazásával számos almafajta ('MM.106', 'JTE-H', 'Jonagold') esetén lehetett javítani a szaporodási rátát, valamint csökkenteni lehetett a hajtássokszorozódás és a hajtáshossz közötti negatív korreláció mértékét; a BA esetén tapasztalt 41-52%-ról 33,5-35,2%-ra (Dobránszki és mts., 2000b; Magyar-Tábori és mts., 2001a, 2002).

BA és KN együttes alkalmazása a táptalajban több fajta ('Tydeman Early Worchester', 'Galaxy', 'Prima', 'Húsvéti rozmaring') esetén is javította a hajtássokszorozódás mértékét, míg más fajtáknál nem ('Jonagold'), valamint a fejlődő hajtások hosszabbak voltak, mint BA egyedüli alkalmazása esetén (Modgil és mts., 1999; Dobránszki és mts., 2000a,c).

Az alma járulékos hajtásregenerációs kísérletekben a táptalajban alkalmazott citokinin kezelésekről a 4. táblázat ad áttekintést. Az optimális citokinin kezelés erősen fajtafüggő volt (Fasolo és mts., 1989; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Korban és mts., 1992; Yepes és Aldwinckle, 1994b; Sarwar és Skirvin, 1997; Caboni és Tonelli, 1999).

A genotípusok nagy részében a BA 22,0 μM koncentrációnál indukálta leghatékonyabban a járulékos hajtásregenerációt. Egyes fajtáknál azonban ('Toscan', 'M9', 'M25', 'Malling Greensleeves', 'Marubakaido', 'Hanfu') az alacsonyabb (10 μM körüli érték), míg másoknál ('Florina', 'Golden Delicious', 'Empire') a magasabb (30 μM körüli érték) BA koncentráció bizonyult hatékonynak. Ha a táptalaj TDZ-t tartalmazott, a legtöbb genotípus számára az alacsony 5 μM alatti TDZ koncentráció volt a megfelelő, bár egyes fajtáknál ('M7', 'Paladino Spur McIntosh', 'Macspur', 'Gala', 'Strakrimson') 10 μM feletti TDZ volt szükséges a járulékos hajtásregenerációra. A 'Royal Gala', 'Dayton', 'Granny

Smith' and 'Galaxy' fajták jól regenerálódtak széles TDZ tartományban, míg a 'Jork 9' fajta széles BA tartományban.

Hanke és mts. (1991) kísérleteiben 'Alkmene', 'Greensleaves', 'Idared' és 'M9' fajták hajtásregenerációját vizsgálták BA, ZEA és TDZ esetében. Megállapították, hogy a ZEA nem alkalmas hajtásregeneráció indukálására, mivel az explantátumokon csak kalluszosodás történt, hajtásfejlődés nem.

A BA és TDZ mellett különböző BA származékokat is hatékonyan lehetett alkalmazni a járulékos hajtások regenerálására. Dobránszki és mts. (2004) különböző BA származékokat (BAR, TOP, TOPR, KIN, KINR) és izoprenoid [zeatin (ZEA) és N⁹ ribozidja (ZEAR)] citokinineket tesztelt a 'Royal Gala' és az 'M.26' fajták hajtásregenerációjában. Megállapították, hogy a KIN, és az izoprenoid citokininek aktivitása nagyon alacsony volt, hajtásregeneráció indukálására nem alkalmasak almánál. Az aromás citokininek N⁹ ribozidjai, a BAR kivételével, 17-23 µM koncentrációban alkalmazva a hajtásregenerációban hasonló, vagy jobb hatékonyságot mutattak, mint a nem ribozid formák 22-30 µM koncentráció tartományban alkalmazva. Míg a 'Royal Gala' fajtánál a 2,27 µM TDZ bizonyult a leghatékonyabbnak, addig az 'M.26' fajtánál a 18,2 µM BAR, vagy a 21,44 µM TOPR.

A járulékos hajtásregenerációt szignifikánsan befolyásolja annak a táptalajnak a citokinin tartalma – mind a típusa, mind az alkalmazott koncentrációja –, melyen a járulékos hajtásregeneráció explantátumait szolgáltató hajtás fejlődött (Swartz és mts., 1990; Famiani és mts., 1994; Ferradini és mts., 1996; Sriskandrajah és Goodwin, 1998; Dobránszki és mts., 2002; Hudák és mts., 2005; Magyar-Tábori és mts., 2010). Ezért több kutató sikeresen javította a hajtásregeneráció hatékonyságát, ha a járulékos hajtásregeneráció előtt egy előkezelést iktatott be (5. táblázat).

Az előkezelő táptalaj citokinin tartalma – BA, TOP, KIN 2-9 µM tartományban vizsgálva – befolyásolta a fejlődő új levelek szöveti szerkezetét és ultrastruktúráját (Dobránszki és mts., 2005; Magyar-Tábori és mts., 2010). A levél szöveti szerkezete és a levélexplantátumok hajtásregenerációs válasza összefüggött. Fajtától függően a TOP, KIN, vagy a BA + TOP kombinált kezelések eredményeként kialakuló fiatal, kevésbé differenciált szerkezetű levelekről nyert explantátumokon a regenerálódó hajtások száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a BA tartalmú táptalajon fejlődött leveleké, és sok esetben a hiperhidratációjuk mértéke is csökkent.

4. táblázat. Áttekintés az alma járulékos hajtásregenerációja során alkalmazott citokinin kezelésekről

Alma fajta/genotípus	Optimális citokinin kezelés (citokinin típusa és koncentrációja)	Hajtásregenerációs válasz (HSZ:hajtásszám/explantátum; HR%: regenerálódó explantátumok százaléka)	Irodalom
Tuscan, M.9, M.25	2,0 mg/l BA	HR%: 60% a Tuscanmál, 8% M.9-nél és 21% M.25-nél, HSZ:1-2	James és mts., 1988
Malling Greensleeves	2,0 mg/l BA	HR%: 54%; HSZ: 1,8	Ongjanov, 1988
Åkerö, McIntosh, McIntosh Wijcik, Gravenstein, M.26	22 µM BA	HSZ: 6,4 (Åkerö), 8,2 (McIntosh), 11,4 (McIntosh Wijcik), 7,3 (Gravenstein), 16,3 (M.26)	Welandar, 1988
McIntosh, Triple Red Delicious, Paladino Spur McIntosh	10 µM BA	HSZ: 9,3 (McIntosh), 6,1 (Triple Red Delicious), 6,3 (Paladino Spur McIntosh)	Fasolo és mts., 1989
M.26	4,4 µM BA	Több, mint 14 hajtás explantátumonként	Predieri és Fasolo, 1989
Gala	22 µM BA	HSZ: 14,2 a levélexplantátumon,; 9,8 a kalluszon	Dufour, 1990
Gala, Royal Gala, Jonagold	3 µM BA	HR%: 90,6% (Gala), 92,8% (Royal Gala), 73,3% (Jonagold)	Sriskandarajah és mts., 1990
M.9, M.26, Golden Delicious, Florina	0,2 µM TDZ	HSZ: 7,0 (M.9), 6,1 (M.26), 17,7 (Florina). 75% HR% és 2,6 HSZ (Golden Delicious)	Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990
M.27, Golden Delicious, Priscilla	0,2 µM TDZ	HSZ: 4,0 (M.27), 1,7 (Priscilla). HR%: 33% és HSZ: 3,0 (Golden Delicious)	
Golden Delicious	4,4 µM BA	HSZ: 2,5; HR%: 22,9%	Belaizi és mts., 1991
McIntosh, Golden Delicious	4,0 µM TDZ	HR%: 67% és HSZ: 3,5 (McIntosh), HR%: 28% (Golden Delicious)	Korban és mts., 1992
Royal Gala	5,0-20,0 µM TDZ	HR%: 100%	
Gala, Dayton, Macspur	15,0 µM TDZ	HR%: 50% (Gala), 55,5% (Dayton), 24% (Macspur)	
M.7	20 µM TDZ	HR%: 19,8%	
M.26	22,2 µM BA	HSZ: 6,5	Famiani és mts., 1994

Gloster	8,0 mg/l 2iP	HSZ: 6,6	Keulemans és de Witte, 1994
Jork 9	22,0 μ M BA	HSZ: 1,95	Pawlicki és Welandar, 1994
Empire, Golden Delicious	31,1 μ M BA	HSZ: 6,5 (Empire), 7,3 (Golden Delicious)	Yepes és Aldwinckle, 1994b
Liberty, McIntosh, M.26	22,0 μ M BA	HSZ: 5,9 (Liberty), 7,6 (McIntosh), 15,6 (M.26)	
Jork 9	17,6 μ M BA	HSZ: 3,4	Caboni és mts., 1996
M.26	22,0 μ M BA	HSZ: 8,6	Ferradini és mts., 1996
Nezalezhnist, Idared, Florina	5,0 mg/l BA (Florina esetén 5-10 mg/l)	HR%: 67% (Nezalezhnist), 72% (Idared), 80% (Florina)	Bartish és Korkhovoi, 1997
McIntosh, Wijcik	3,0 μ M TDZ	HSZ: 5,9 (McIntosh), 10,0 (Wijcik)	Sarwar és Skirvin, 1997
Macspur	2,0 μ M TDZ	HSZ: 6,0	
Royal Gala	1,0 μ M TDZ	Az 1. (fiatalabb) szár internódusz 2-, 8-, és 73-szor több hajtást regenerált, mint a 2., 3. és 4. internódusz; a HR% 93%, 87%, 37% és 17% volt az 1., 2., 3., és 4. internóduszon. Az etioláció pedig 7-szeresére növelte hajtásszámot az 1. internódusz használata esetén, HSZ: 68,8	Liu és mts., 1998
Jork 9	17,8 μ M BA	HSZ: 4,5	Caboni és Tonelli, 1999
McIntosh	22,0 μ M BA	HR%: 76%	
Gala	17,6 μ M BA, vagy 1,0 μ M TDZ	HR% 54% 22 μ M BA, és 58% 1,0 μ M TDZ esetében	
Jork 9, M.26, Gala, McIntosh	17,8 μ M BA	HSZ: 50,0 (Jork 9), 48,3 (M.26), 46,1 (Gala), 44,2 (McIntosh)	Caboni és mts., 2000
Granny Smith, Morspur Golden, Starkrimson	7,5 μ M TDZ	HR%: 87% (Granny Smith), 53% (Morspur Golden), 100% (Starkrimson)	Gercheva és mts., 2000
Gala	22,0 μ M BA	HSZ: 4,1; HR%: 95,3%	Montecelli és mts., 2000
Gale Gala	9,08 μ M TDZ	HR%: 36,8%; HSZ: 19,5/szár	Bommineni és mts., 2001

Jork 9	17,8 µM BA	HSZ: 28; HR%: 100%	D'Angeli és mts., 2001
Royal Gala	0,2 mg/l TDZ	HSZ: 15,1; HR%: 100%	Dobránszki és mts., 2002
Fuji 2001	1-2 mg/l TDZ	HR%: 100%	Qin és mts., 2002
Topred	5,0 mg/l TDZ	HSZ: 10,0; HR%: 98%	Yancheva és mts., 2003
M.26	18,2 µM BAR, vagy 21,44 µM TOPR	A táptalaj citokinin tartalmától függően, 18,2 µM BAR-nál HSZ: 3,22; HR%: 76,5%, 21,44 µM TOPR-nál HSZ: 3,18; HR%: 54,6%	Dobránszki és mts., 2004
Bramley	5,0 mg/l BA	HSZ: 1,0	McAdam-O'Connell és mts., 2004
MM.106	8,8 µM BA	HSZ: 10,8	Modgil és mts., 2005b
Gami Almasi	7,5 mg/l BA	HR%: 94%	Rustae és mts., 2007
Hanfu	1,0 mg/l TDZ	HSZ: 19,47	Ou és mts., 2008
P.16, P.22, P.59, M.26	0,5 mg/l TDZ az indukciós táptalajban (2 hét), és 2 mg/l BA a regenerációs táptalajban	HR%: 15.6% (P.16), 22.8% (P.22), 16.4% (P.59), 37,2% (M.26)	Orlikowska és mts., 2010
Rövidítések: BA: benzil-adenin, BAR: benzil-adenin-ribozid; TOPR: meta-topolin-ribozid, TDZ: thidiazuron, 2iP: N ⁶ -(Δ^2 -izopentenil) adenin			

5. táblázat. A járulékos hajtásregeneráció előtt alkalmazott előkezelő táptalajok citokinin tartalma

Fajta/genotípus	Előkezelő táptalaj citokinin tartalma	Előkezelés időtartama	Hajtásregenerációs válasz	Irodalom
Gala	0,05 μM TDZ	3 hét	HR%: 75%, HSZ: 7,6	Swartz és mts., 1990
	5,0 μM BA		HR%: 75%, HSZ: 6,0	
M.26	citokininmentes	30 nap	HR%: 60%	Famiani és mts., 1994
M.26	citokininmentes	30 nap	HR%: 60%; HSZ: <8,5	Ferradini és mts., 1996
Royal Gala	0,5 mg/l TOP	3 hét	A regenerációs táptalaj citokinin tartalmától függően: 8,9 (5,0 mg/l BA), 15,1 (0,2 mg/l TDZ)	Dobránszki és mts., 2002
McIntosh	0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TOP	3 hét	HSZ: 5,12	Hudák és mts., 2005
Freedom	0,5 mg/l BA + 1,5 mg/l TOP		HSZ: 2,45	
Húsvéti rozmaring	1,5 mg/l KIN, vagy 0,5 mg/l TOP		HSZ: 3,26, ill. 2,95	
HSZ: hajtásszám/explantátum; HR%: regenerálódó explantátumok százaléka BA: benzil-adenin, TOP: meta-topolin, TDZ: thidiazuron				

Megállapítható, hogy aromás oldalláncú citokininek használata mind az axilláris hajtásfejlődés során a hajtássokszorozó táptalajban, mind a járulékos hajtásfejlődés során a regenerációs, és/vagy az előkezelő táptalajban előnyös lehet. Az irodalmi adatok elsősorban a BAR és a TOP előnyeit támasztják alá (Werbrouck és mts., 1996; Jámbor-Benczúr és mts., 2001; összefoglaló értékelés: Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010). Ennek oka, hogy a BAR, mely a BA-nak N⁹ pozícióban konjugált származéka, védve van az N⁹ glükolizációtól, ami a BA káros mellék-, illetve utóhatásainak egyik fő okozója lehet (Werbrouck és mts., 1996). A hidroxilált BA származékok, mint pl. a TOP, más növényfajoknál is hatékonyan csökkentik a hajtások hiperhidratációját, a hajtáscsúcs elhalását és növelik a szaporodási rátát (Wojtania és Gabriszewska, 2001; Dobránszki és mts., 2002; Palavan-Ünsal és mts., 2004; Salvi és mts., 2002; Bairu és mts., 2007, 2009a,b; Niedz és Evens, 2010; Wojtania, 2010; Moyo és mts., 2011; Aremu és mts., 2012a), elősegítik a hajtások *in vitro* gyökeresedését és növelik az akklimatizáció hatékonyságát (Kubalaková és Strnad, 1992; Werbrouck és mts., 1996; Gomez-Leyva és mts., 2008; Wojtania, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2001b, 2011; Aremu és mts., 2012a,b).

2.5. AZ *IN VITRO* KÖRNYEZET HATÁSA A HAJTÁSOK FOTOSZINTETIKUS RENDSZERÉRE

Az *in vitro* környezetben regenerált és nevelt hajtásokban a speciális tenyésztési körülmények – mint egyes táptalajkomponensek, alacsony fényintenzitás, a CO₂ csökkent parciális nyomása a tenyészedényekben, szerves szénforrás jelenléte a táptalajban, magas páratartalom és etilén szint a tenyészedényekben –, különböző morfológiai és funkcionális változásokat idéznek elő (Jámbor-Benczúr és mts., 2001; Dobránszki és mts., 2005; Hazarika, 2006; Ziv és Chen., 2008; Chandra és mts., 2010).

Ezek a változások a fotoszintetikus rendszert is érintik; *in vitro* körülmények között az alacsony fényintenzitás és a CO₂ csökkent parciális nyomása a tenyésztésre használt edényekben csökkenti, vagy blokkolja a fotoszintetikus rendszer működését. A táptalajhoz adott szénhidrátok szerepe vitatott. Egyes esetekben arról számoltak be, hogy a szacharóz csökkentette a fotoszintézis mértékét kevesebb klorofill képződött, és csökkent a ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz (RUBISCO) mennyisége (Pamplin és Chapman, 1975; Hdider és Desjardins, 1995; Premkumar és mts., 2001), más esetekben a táptalajban lévő szacharóz növelte a klorofill tartalmat és a fotoszintetikus kapacitást (Hazarika, 2006). Ha tehát a táptalaj valamilyen szénhidrátot, többnyire szacharózt, tartalmaz, akkor az *in vitro* hajtások heterotróf, vagy fotomixotróf életmódot folytatnak (Desjardins, 1995).

A fotoszintetikus rendszer fejlettsége az előállított *in vitro* hajtások és növények egyik fontos minőségi kritériuma, hiszen befolyással van az *in vitro* szaporítás során előállított hajtások és növények gyökeresedésére és akklimatizációjára (Hazarika, 2006; Ziv és Chen, 2008).

Több vizsgálat igazolta, hogy az *in vitro* növények összklorofill tartalma összevethető az *ex vitro* nevelt növényekben mért klorofill pigment mennyiségével (Desjardin, 1995). A klorofillok mennyisége az *in vitro* nevelt növények fejlettségi állapotától is függött; *in vitro* kókusz (*Cocos nucifera* L.) növények klorofill tartalma a 6 hetes tenyésztés során folyamatosan növekedett (0,134 mg/g FW-ról), és a 6. hét végére elérte (0,921 mg/g FW) az autotróf körülmények között nevelt növényben mért klorofill mennyiséget (1,451 mg/g FW). A 6 hetes növényekben a *klorofill a* és *klorofill b* aránya (3,661) sem tért el az autotróf körülmények között nevelt növényben megfigyelt aránytól (3,144) (Triques és mts., 1997).

A táptalaj szacharóz tartalma (0, 1,5 és 3,0%) nem befolyásolta *Rehmannia glutinosa in vitro* növényeinek klorofill tartalmát, a nettó fotoszintetikus rátát azonban csökkentette (Cui és mts., 2000); a tenyészemények nagyobb mértékű légcsereje azonban növelte a klorofill tartalmat. Búza (*Triticum aestivum* L.) zászlós levél *in vitro* tenyésztése során Xie és mts. (2004) megállapították, hogy abszcizinsav tartalmú táptalajon csökkent, míg zeatin tartalmú táptalajon nőtt a zászlós levelek klorofill tartalma.

Szegfű (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* tenyésztésében a fenil-urea típusú citokininek (4-PU-30 és TDZ) növelték a klorofill tartalmat, 10-, illetve 100-szor alacsonyabb koncentrációban (0,04 μ M a TDZ-nél és 0,004 μ M a 4-PU-30-nál), mint a BA (0,4 μ M). A 4-PU-30 4,0 μ M, a TDZ 0,4 μ M koncentrációban alkalmazva a *klorofill a* és *klorofill b* arányát is növelték, azáltal, hogy a *klorofill b* mennyiségét csökkentették. 4,0 μ M 4-PU-30 növelte, 0,4 μ M TDZ azonban csökkentette fotoszintetikus membránok stabilitását (Genkov és mts., 1997).

Premkumar és mts. (2001) vizsgálatai azt mutatták, hogy az avokádó (*Persea americana* Mill.), tölgy (*Quercus ruber*), olajfa (*Olea europaea* L.) és a szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in vitro* növényeinek leveleiben az összklorofill tartalom, a *klorofill a* és *klorofill b* aránya is nagyobb volt, mint az üvegházban nevelt növények leveleiben. A RUBISCO nagy alegységének mennyisége az avokádó, a tölgy és a szamóca leveleiben kisebb volt *in vitro* körülmények között, a RUBISCO kis alegység mennyisége azonban csak a tölgy és a szamóca esetén volt kisebb *in vitro* körülmények között, mint az üvegházi növényekben.

Aremu és mts. (2012b) különböző citokinin tartalmú táptalajokon mikroszaporított banán klorofill tartalmát vizsgálták. A táptalajban BA-t és különböző topolin származékokat (meta-topolin, meta-topoli-ribozid, meta-metoxi-topolin, meta-metoxi-topolin-ribozid, 6-meta-metoxi-9-tetrahidropiranyl-topolin) használtak 10, 20, 30 μM koncentrációkban. A növényeket 16 órás fotoperiódus és $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF mellett nevelték 70 napig, a méréseket 10 naponta végezték. A pigment tartalom a tenyésztés 40. és 50. napján volt a legnagyobb. A nagy citokinin koncentrációk csökkentették a klorofill tartalmat, valamint befolyásolta a klorofill tartalmat az alkalmazott citokinin típusa is. A *klorofill a* tartalom 1000 $\mu\text{g/g}$ FW alatt volt, legalacsonyabb értékét 30 μM 6-meta-metoxi-9-tetrahidropiranyl-topolin alkalmazása esetén lehetett megfigyelni. A *klorofill b* tartalom 22-550 $\mu\text{g/g}$ FW értékek között változott.

A fotoszintézis *in vitro* mérése során Xie és mts. (2004) azt tapasztalták, hogy az abszcisinsavat vagy zeatint tartalmazó táptalajon nevelt búza (*Triticum aestivum* L.) zászlós levelek nettó fotoszintézise között az 5. napon nem volt különbség, a tenyésztés 12. napján azonban a citokinin tartalmazó táptalajon tenyésztett levelek nettó fotoszintézise nagyobb volt. Yue és mts. (1992) megállapították, hogy a fényintenzitás növelésével *in vitro* körülmények között a spárga (*Asparagus officinalis* L.) növények nettó fotoszintézise is nőtt, s meghaladta az akklimatizált növényekben mért értéket.

A fotoszintetikus rendszer működőképességének vizsgálatára alkalmas nem invazív módszer a II. fotokémiai rendszer (PSII) klorofill fluoreszcenciájának mérése. A PSII klorofill fluoreszcenciája összefüggésben van a CO_2 asszimilációban bekövetkező változásokkal (Baker, 2008). A maximális, potenciális és az aktuális, adott fényviszonyok között elért kvantumhatékonyság a PSII nyitott és zárt reakciócentrumainál a fotoszintetikus apparátus működésének gyors jellemzésére alkalmas (Roháček, 2002; Baker, 2008).

A klorofill fluoreszcencia vizsgálatokkal ki lehetett mutatni különböző stresszhatásokat több növényfaj esetén is (Jeon és mts., 2006; Šiler és mts., 2007). Az *in vitro* növényekben mért F_v/F_m értékek az akklimatizáció kezdeti szakaszában, az *in vitro* körülményekből az *ex vitro* körülményekbe való átmenet okozta stressz miatt, átmenetileg szignifikánsan csökkentek *Calathea orbiflora* (Yang és Yeh, 2008) és *Spathiphyllum* (Van Huylbroeck és mts., 1998) növényeknél.

In vitro kókusz (*Cocos nucifera* L.) növények maximális klorofill fluoreszcenciája (F_v/F_m) a tenyésztés idejének növelésével nőtt, már 2 hetesen (F_v/F_m : 0,71-0,72) elérte az autotróf növényekben mérhető F_v/F_m értéket (F_v/F_m : 0,76). A nettó fotoszintézis szintén növekedett a tenyésztési idő növelésével, de az *in vitro* növények nettó fotoszintézise nem

érte el az autotróf körülmények között nevelt növényekét. A kisebb mértékű nettó fotoszintézis oka valószínűleg az volt, hogy az *in vitro* növényekben kisebb volt a RUBISCO szintje és kapacitása (Triques és mts., 1997).

‘M.9’ alma *in vitro* hajtások klorofill fluoreszcenciájának vizsgálata (Zanandra és mts., 2006) azt mutatta, hogy a maximális kvantumhatékonyság (F_v/F_m) az *in vitro* tenyésztés idejének növelésével nőtt; F_v/F_m 0,717 volt 55 napos tenyésztést követően, és 0,806 90 napos tenyésztést követően $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ megvilágításnál. A szerzők megállapították, hogy az *in vitro* alma hajtások fotoszintetikus rendszere működőképes, a besugárzott energia hasznosítás azonban, az alacsony fényintenzitás miatt, alacsony szinten volt.

A hajtástenyészetek táptalajának egyik nélkülözhetetlen komponense a citokinin. A citokininek befolyásolják a kloroplasztiszok fejlődését, részt vesznek a kloroplasztiszok fejlődésében résztvevő gének indukálásában, a kloroplasztisz proteinek szintézisében, elősegítik a fotoszintetikus pigmentek szintézisét és a kloroplasztiszok szerkezeti differenciálódását (Schmülling és mts., 1997; Synková és mts., 1999; Kubo és Kakimoto, 2000; Cortleven és mts., 2011; Aremu és mts., 2012b). Kubo és Kakimoto (2000) árpa mutánsok vizsgálata során bizonyították, hogy működőképes kloroplasztiszok szükségesek ahhoz, hogy a levélsejtek a citokininekre normál választ tudjanak adni.

In vitro körülmények között több kutató (Genkov és mts., 1997; Xie és mts., 2004, Aremu és mts., 2012b) is bizonyította, hogy a táptalajhoz adott citokininek típusa és alkalmazott koncentrációja az *in vitro* növényekben a klorofill tartalmat befolyásolta. Nem vizsgálták azonban a citokinineknek az *in vitro* hajtások fotoszintézisére, illetve a fotoszintetikus apparátus működőképességére kifejtett hatását.

3. 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 hatások 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:

dc_935_14

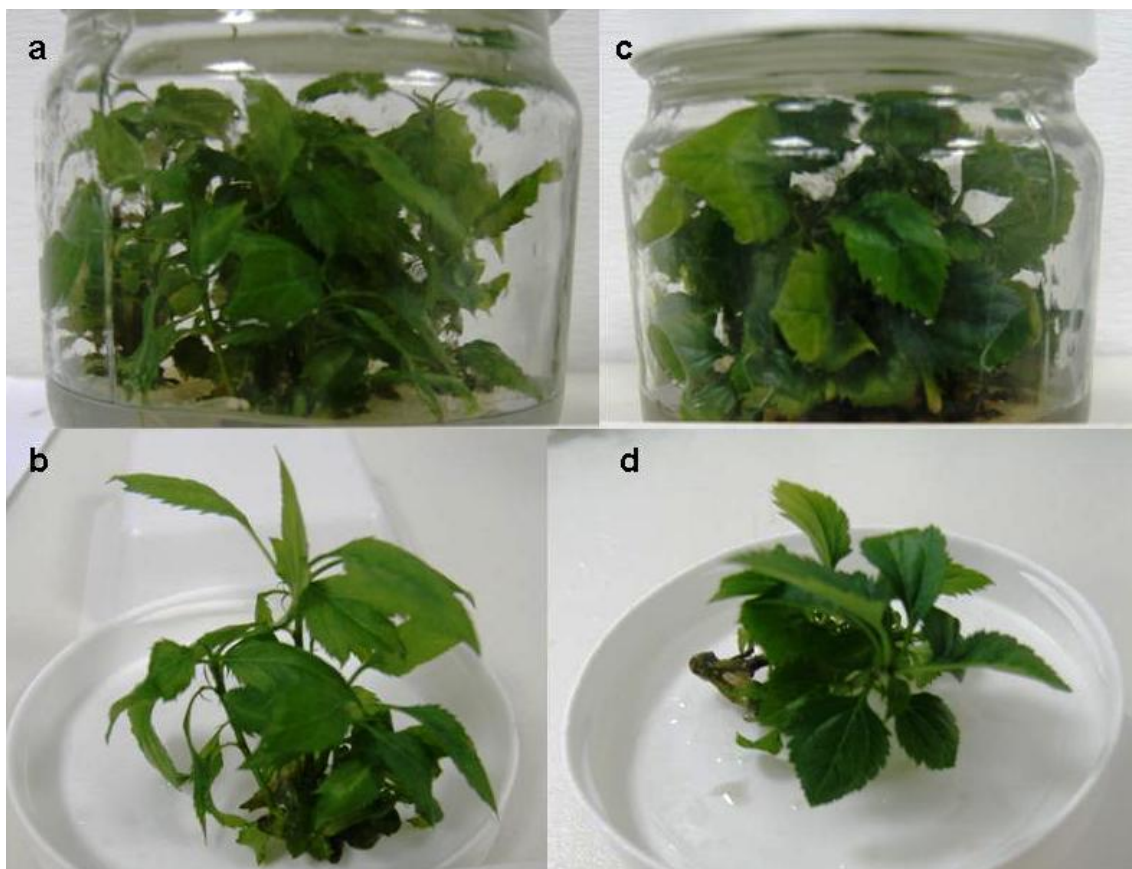
- 6) Megvizsgálni, hogy az alma hajtástenyészetekben alkalmazott különböző típusú aromás oldalláncú citokininek befolyásolják-e az *in vitro* hajtások klorofill tartalmát, illetve összetételét.
- 7) Megvizsgálni, hogy a különböző típusú aromás oldalláncú citokininek befolyásolják-e az *in vitro* hajtások 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.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. 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 (5. ábra).



5. ábra. 'Royal Gala' (a, b) és 'Freedom' (c, d) alma fajták 4 hetes *in vitro* hajtástenyészete fenntartó táptalajon.

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-agar (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.

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

4.2.1. *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 4.3. fejezetben adom meg. Tenyészedenként 400 ml-es befőttes üvegeket használtunk, 5 hajtást helyeztünk egy-egy tenyészedenybe. Az előkezelő táptalajra helyezett hajtásokat 3 hétig neveltük nevelőhelyiségben a hajtástenyészetek fenntartása és felszaporítása során is alkalmazott tenyésztési körülmények között (ld.: 4.1. fejezet). Ezt követően végeztük el a 3 hetes, előkezelt *in vitro* hajtások leveleiből az explantátumok preparálását az adventív hajtásregenerálási kísérletekhez.

4.2.2. 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 levélnyél felőli alapi részeit eltávolítottuk. A megmaradt levéllemezéből kétféle explantátumot preparáltunk:

dc_935_14

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

4.2.3. 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.

4.2.4. 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 tenyészédénybe 5 hajtást állítottunk. A táptalaj összetétele megegyezett a felszaporításra használt táptalaj összetételével, kivéve a citokinin forrást. A kísérletekben alkalmazott citokinineket és mennyiségüket a 4.3. fejezetben adom meg. A hajtásokat 3 hétig neveltük nevelőhelyiségben a 4.4. fejezetben leírtak szerint.

4.3. 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 citokonin 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-agar (plant cell culture tested, SIGMA), valamint 0,3 mg/l IBA és 0,2 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

dc_935_14

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 citokininek axilláris hajtásfejlődésre kifejtett hatásának vizsgálatakor alkalmaztuk; a táptalaj összetétele megegyezett az előkezelő táptalaj összetételével, kivéve a citokininek típusát és mennyiségét. A 6. táblázatban megadott citokinin kezeléseket alkalmaztuk a kísérletek során.

6. táblázat. Az aromás oldalláncú citokininek *in vitro* axilláris hajtásfejlődésre kifejtett hatásának vizsgálatakor alkalmazott citokininek 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 tenyészedényként 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).

4.4. 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 (5.1.1. fejezet) 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).

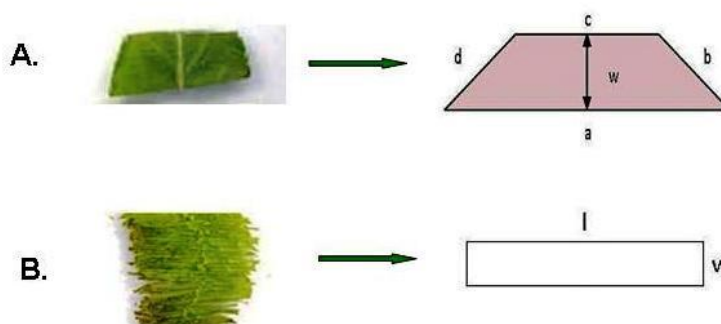
A járulékos hajtások gyökereztetése során a tenyésztés körülményei megegyeztek az előkezelés során alkalmazott tenyésztési körülményekkel az elongáció és a gyökérelongáció során: 16 órás fotoperiódus, 105 µmol m⁻² s⁻¹ PPF megvilágítás és 22 °C. A gyökérindukciós szakaszban a tenyészedenyeket lesötétítettük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

4.5. MORFOLÓGIAI PARAMÉTEREK MÉRÉSE

4.5.1. Explantátum morfológiai paramétereinek mérése

Az explantátumok preparálást követően steril körülmények között sztereomikroszkóp segítségével megmértük a preparált levéllemez explantátumok méretét a 6. ábrán bemutatott módon, valamint a levéllemez vastagságát is megmértük. Explantátum típusonként (konvencionális, vagy tTCL explantátum), illetve az explantátum eredete szerint (1., vagy 2. csúcsi levél) minimum 60 explantátum méretadatait vettük fel ismételtenként, a méréseket legalább háromszor megismételtük.



6. ábra. Az explantátumok méretének felvétele (A) konvencionális, és (B) tTCL explantátumok esetében. Konvencionális explantátum méreteit egy képzeletben a levélexplantátumra illesztett trapéz oldal (a, b, c, d), és magasság (w) méretei alapján vettük fel. tTCL explantátum méreteit egy képzeletben 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).

4.5.2. 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 kalluszejlődést, 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.

4.6. KLOROFILL FLUORESZCENCIA MÉRÉSE

Kísérleteinkben vizsgáltuk az aromás oldalláncú citokininnek hatását az *in vitro* axilláris alma hajtások leveleinek klorofill fluoreszcenciájára. Minden esetben a 2. csúcsi kifejlett 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 tesztrel 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).

4.7. KLOOROFILL 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 kifejlett 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 üvegpor 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 fotometráljuk (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 pigmentkivonatot *klorofill a*, *klorofill b* és *klorofill a + klorofill b* tartalmát:

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

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

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

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

4.8. 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 használtuk, 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.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

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

5.1.1. Konvencionális és tTCL explantátumok regenerációs képessége

A kísérletek során megvizsgáltuk, hogy az *in vitro* almahajtások leveleiből készített tTCL explantátumokon lehetséges-e járulékos hajtásképződést indukálni.

A kísérletekben a hagyományosan jól regenerálódó ('Royal Gala'), illetve a nehezen regenerálódó ('Freedom') almafajták (Magyar-Tábori és mts., 2010) eltérő regenerációs kapacitást mutattak (7. táblázat, 7. ábra).

A regenerálódás első szemmel látható jele a levélexplantátumok felületén meginduló kalluszosodás (dedifferenciálódás). A 'Royal Gala' tTCL explantátumokon a kalluszosodás már az első héten megindult. A sötétben tenyésztett tTCL explantátumok 72-93%-án volt kalluszfejlődés az 1. hét végére, míg a kontrol (konvencionális) explantátumoknak csak 50-62%-a mutatott kalluszosodást. A fényben tenyésztett tTCL explantátumok kalluszfejlődése az 1. hét végén csak 15-17%-os volt. A kalluszosodást mutató explantátumok aránya minden esetben az 1. csúcsi levélről származó explantátumok esetén volt nagyobb. A tenyésztés 2. hetének végére a kalluszosodás gyakorlatilag minden explantátumon megtörtént (95-100%), kivéve a fényben tenyésztett, 1. levélről származó tTCL explantátumokat (88%), ahol csak a regeneráció 3. hetében volt kalluszosodás az explantátumok 100%-án.

'Freedom' fajta esetén az explantátumok jóval kisebb százalékán indult meg a kalluszfejlődés; az 1. hét végén csak az explantátumok 8-33%-án. A 2. hét végére azonban a kontrol és a sötétben tenyésztett tTCL explantátumok mindegyikén (100%) megindult a kalluszosodás. A fényben nevelt tTCL explantátumoknál csak az explantátumok 10-22%-án volt kalluszfejlődés a 2. hét végén, és csak az 5. hét végére kalluszosodott minden explantátum (100%). A kalluszosodott explantátumok aránya minden esetben nagyobb volt, ha az explantátumok a 2. levélről származtak.

A 7 hétig tartó regeneráció végén értékeltük a regenerációs kapacitást, megfigyelve a hajtásregenerációt mutató explantátumok százalékát (regenerációs százalék, HR%), illetve a regenerációt mutató explantátumokon az átlagos hajtásszámot (regenerálódott hajtások száma/explantátum, HSZ) (7. táblázat, 7. ábra).

7. táblázat. Az explantátumot szolgáltató levél pozíciójának, az explantátum típusának és a hajtásregeneráció során alkalmazott megvilágításnak a hatása a 'Royal Gala' és a 'Freedom' alma fajták járulékos hajtásregenerációjára tTCL explantátumból 7 hetes tenyésztést követően. ⁺

Kezelések				'Royal Gala'		'Freedom'	
	Az explantátumot szolgáltató levél pozíciója	Explantátum típusa	Az alkalmazott fényviszonyok*	Regenerációs százalék (HR%)	Hajtásszám / explantátum (HSZ)	Regenerációs százalék (HR%)	Hajtásszám / explantátum (HSZ)
1	1. csúcsi levél	Kontrol (konvencionális)	D+L	100 a	5,6 b	39 a	2,1 a
2		tTCL	D+L	97 a	3,2 c	34,5 a	1,5 a
3			L	92 a	3,2 c	0 d	0 b
4	2. csúcsi levél	Kontrol (konvencionális)	D+L	100 a	8,0 a	25 b	2,1 a
5		tTCL	D+L	78 b	5,1 b	11 c	1,4 a
6			L	71 b	2,7 c	0 d	0 b

*: D+L: az explantátumokat a regeneráció során az első 3 héten sötétben tenyésztettük, L: az explantátumokat a regeneráció során végig fényben tenyésztettük.

⁺: Az átlagértékeket követő kis betűk a Tukey-teszt alapján meghatározott homogén csoportokat ($P < 0,05$) jelölik. Az adatokat fajtánként külön értékeltük.



7. 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).

A 'Royal Gala' fajtánál a regenerációs százalék a kontrol kezeléseknél 100% volt, a tTCL explantátumokon az explantátum eredete szignifikánsan befolyásolta az elért HR%-ot (7. táblázat). 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 (kontrol), 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 regeneráció során végig fényben nevelt tTCL explantátumokon hajtásfejlődést egyáltalán nem lehetett megfigyelni (HR%=0).

A hajtásregenerációt mutató explantátumokon az átlagos hajtásszám (HSZ) szintén a 'Royal Gala' fajta esetén volt nagyobb (7. táblázat, 7. 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) (7. 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 hajtásfejlődést (7. k, l ábra).

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.

A regeneráció elején alkalmazott fénykezelés (7. táblázat, L kezelés) késleltette a kalluszosodást, s ez a hatás jelentősebb volt a 'Freedom' fajta esetén, amely hagyományosan is nehezen regenerálódó fajta (Magyar-Tábori és mts., 2010). A hajtásregenerálódási képesség is erősen függött a genotípustól. A hagyományosan is könnyen regenerálódó 'Royal Gala' fajta estében a tTCL explantátumok hajtásregenerációs százalékát (HR%) nem befolyásolta, hogy milyen fényviszonyok között neveltük az explantátumokat, azaz a regeneráció kezdeti szakaszában a megvilágítás nem befolyásolta HR% értékét. A 'Freedom' fajtánál azonban a fény (7. táblázat L kezelés) teljesen gátolta a hajtásképződést (HR%=0%) a tTCL explantátumokon. A regeneráció kezdetén alkalmazott fény gátló, vagy késleltető hatását az alma konvencionális (kísérleteinkben kontrolként alkalmazott) levélexplantátumain több szerző is kimutatta (Fasolo és mts., 1989; Predieri és Fasolo, 1989; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Famiani és mts., 1994; Magyar-Tábori és mts., 2010). Kísérleteinkben a legnagyobb organogenikus rátát akkor lehetett elérni, ha a regenerációs periódus kezdetén 3 hétig sötétben tenyésztették a levélexplantátumokat. Yepes és Aldwinckle (1994b) kimutatta, hogy ha a kezdeti sötét szakaszt követően a fény fotoszintetikus fotonfluxusa (PPF: 100-125 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nagy volt, az szignifikánsan csökkentette a hajtásregenerációs százalék értékét (HR%). Amikor azonban a regeneráció már megkezdődött, a fényintenzitás növelése serkentette a hajtások növekedését és fejlődését.

Az explantátumot szolgáltató *in vitro* levél eredeti pozíciója az *in vitro* hajtásokon egyben a levél korát is jelenti, azaz az 1. csúcsi levél fiatalabb a 2. csúcsi levélnél. A levél eredeti pozíciója szignifikánsan befolyásolta mind a hajtásregenerációs százalékot, mind a regenerálódó hajtások számát, a genotípustól függő mértékben. Korábban több szerző (Fasolo és mts., 1989; Dufour, 1990; Famiani és mts., 1994) is bizonyította, hogy a levél kora befolyásolja a regeneráció hatékonyságát almánál. Megfigyeléseik szerint a fiatalabb levelek könnyebben regeneráltak hajtásokat. Modgil és mts. (2005b) megállapították, hogy az első két csúcsi, teljesen kifejlett levél regenerációs képessége volt a legnagyobb, ezek regenerálták a legtöbb hajtást explantátumonként. Kísérleteinkben a korábbi megfigyelésekkel összhangban megállapítottuk, hogy az 1. csúcsi levélből származó tTCL explantátumok hajtásregenerációs százaléka szignifikánsan nagyobb volt, mint a 2. csúcsi levélről származó explantátumoké, tehát a fiatalabb levelek nagyobb regenerációs képességgel rendelkeztek (7. táblázat). Az 1. csúcsi levélből készített tTCL explantátumok hajtásregenerációs százaléka nem tért el szignifikánsan a kontrol explantátumokétól, tehát a tTCL explantátumok ebből a szempontból alternatívái lehetnek a hagyományos explantátumoknak. A regenerálódott hajtások átlagos száma (HSZ) a tTCL explantátumokon nem tért el 'Freedom' fajtánál a konvencionális

explantátumon elérhető hajtásszámtól. A 'Royal Gala' fajtánál azonban a regenerálódott hajtások száma (7. táblázat) szignifikánsan kevesebb volt a tTCL explantátumokon, jelezve, hogy további vizsgálatok szükségesek az explantátumonkénti nagyobb átlagos hajtásszám eléréséhez. Ebben a kísérletben a konvencionális explantátumok számára korábban optimalizált táptalajt (Magyar-Tábori és mts., 2010) használtuk mindkét explantátum típus regenerációjánál. A hajtásregeneráció sikerét és hatékonyságát azonban a számos egyéb *in vitro* tényező hatása befolyásolja; ezek közül kiemelkedő szerepe van a táptalaj citokinin tartalmának (Ferradini és mts., 1996; Dobránszki és mts., 2005; Magyar-Tábori és mts., 2010). Yepes és Aldwinckle (1994b) kimutatta, hogy a genotípus, az explantátum méret, az *in vitro* tenyésztési körülmények és a táptalaj citokinin tartalma egymással szignifikáns kölcsönhatásban befolyásolja az alma járulékos hajtásregenerációját a levélszövetből. Ezért feltételeztük, hogy a táptalaj a tTCL explantátumok igényéhez igazított citokinin tartalmú táptalaj alkalmazásával a tTCL explantátumok regenerációs kapacitását növelni lehet. Erre irányuló kísérletek eredményeit az 5.1.2.2. fejezetben mutatom be részletesen.

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

Miután a megelőző kísérletekben (5.1.1. fejezet; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2011) bebizonyítottuk, hogy tTCL levélexplantátumokon is lehetséges járulékos hajtásfejlődést indukálni mindkét vizsgált alma fajtánál, a továbbiakban 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.

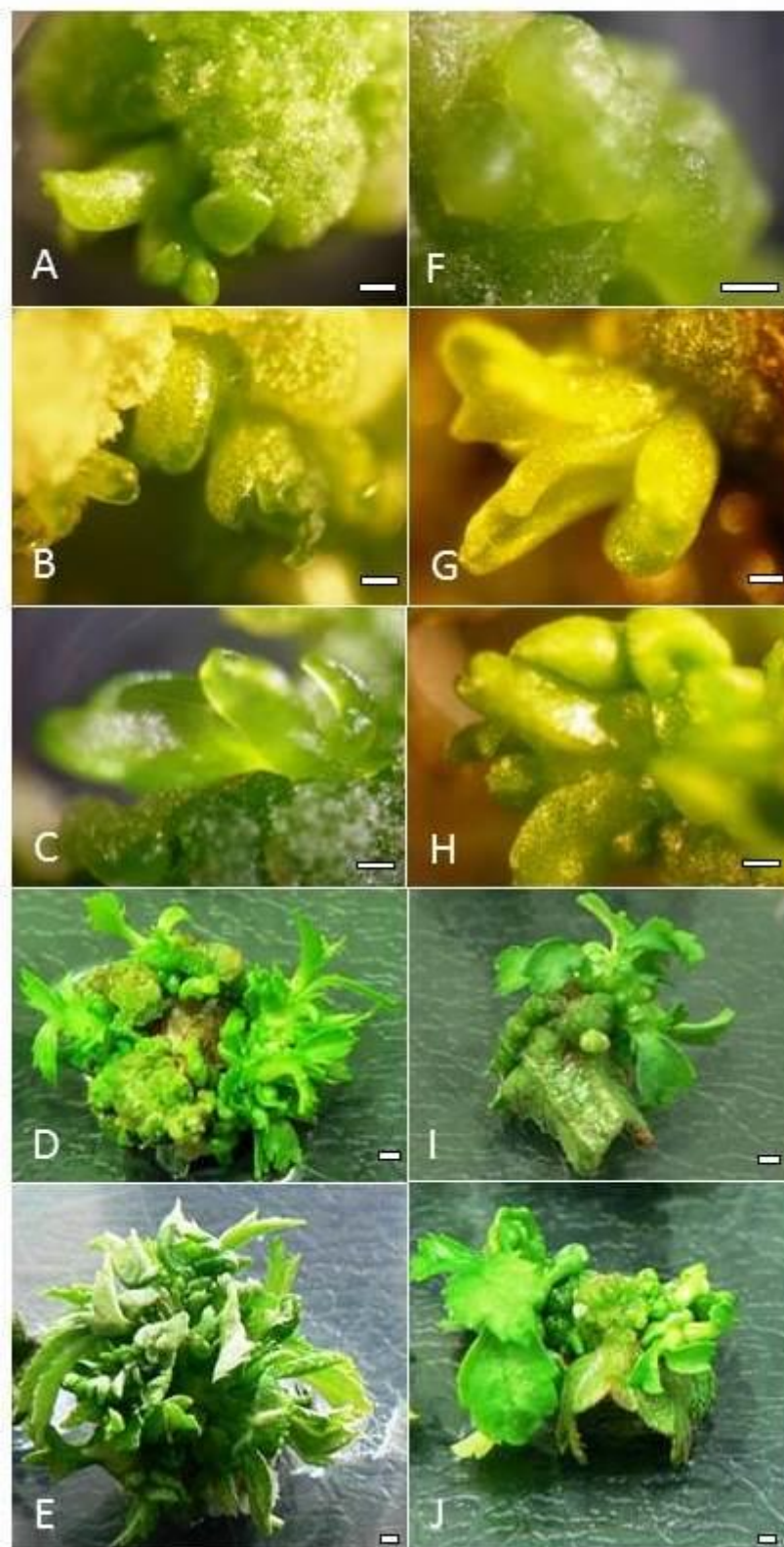
5.1.2.1. A regenerációs periódus hatása a hajtásregenerációra konvencionális levélexplantátumok esetén

Ebben a kísérletben mindkét fajta esetén egy már korábban optimalizált protokolt alkalmaztunk (Dobránszki és mts., 2005; Magyar-Tábori és mts., 2010), s azt vizsgáltuk, hogy milyen hatása van a két fajta regenerációs kapacitására, hogy mennyi ideig neveltük az

explantátumokat a regenerációs táptalajon. A járulékos hajtásfejlődés időbeli lefutását a két alfajta esetén a 8. és 9. ábrákon mutatom be. A 9. ábra a 4 - 9 hét során mért HR% és HSZ adatok alapján felrajzolt növekedési görbéket mutatja be.

A hajtásregenerációs százalék (HR%) tekintetében nyilvánvaló a fajták közötti különbség. 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 (8. táblázat; 9. 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 (8. táblázat; 9. 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.

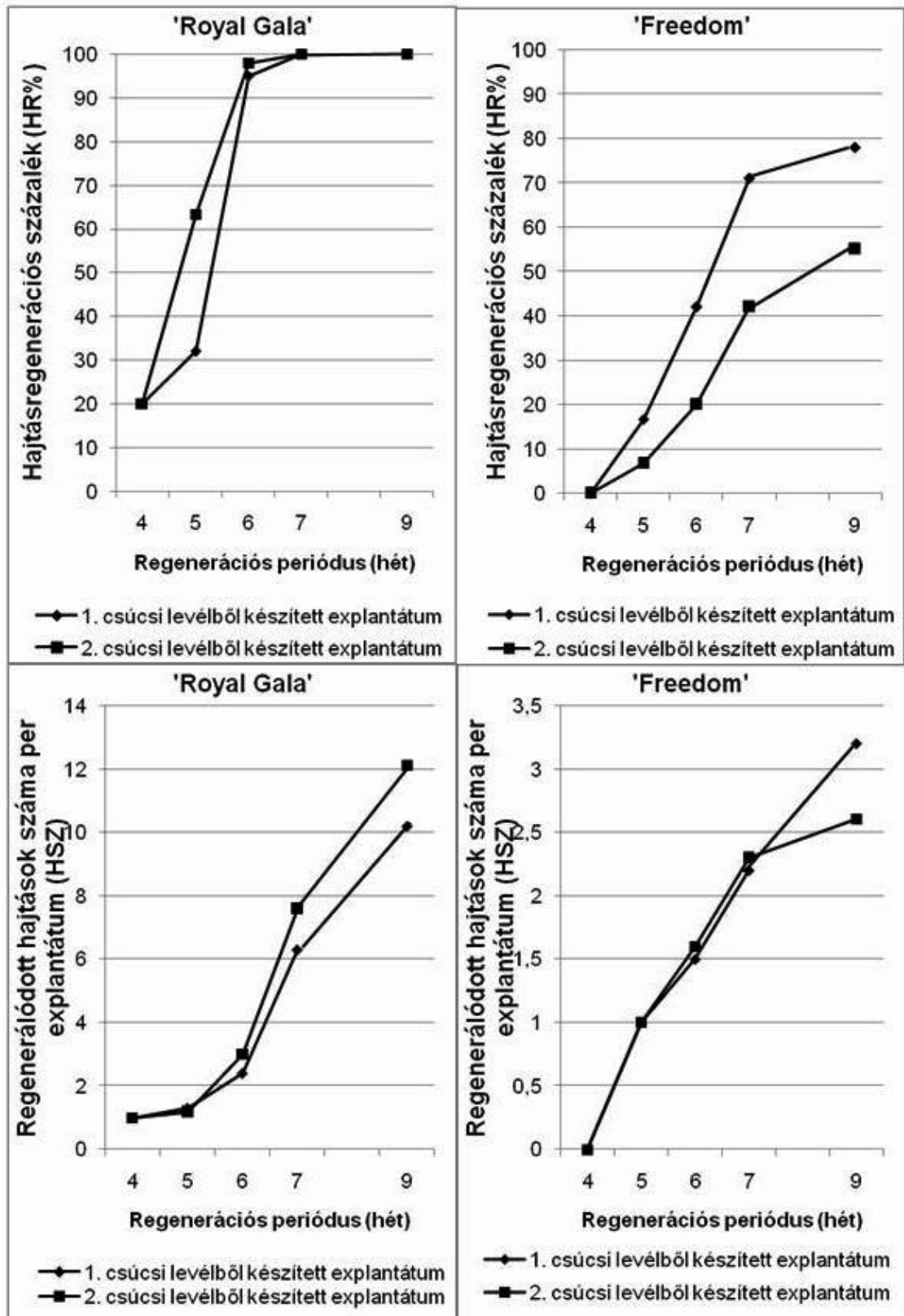
A levéllemezből történő hajtásregenerációt az alma nemes fajták és alanyok széles körében vizsgálták, és megállapították, hogy számos tényező hatása és kölcsönhatása játszik szerepet a hajtásregenerációban, pl. a genotípus, a különböző *in vitro* körülmények, a táptalaj komponensei, vagy az explantátum fiziológiai állapota (Magyar-Tábori és mts., 2010). Ugyanakkor, ahogy azt a bemutatott kísérletek eredményei is mutatták, a regenerációs periódus is kiemelkedő szerepű a regenerálódó járulékos hajtások számának értékelésekor. Ennek ellenére a közölt módszerekben az alkalmazott regenerációs időtartam széles skálán mozog, 5 héttől 4 hónapig terjed (Predieri és Fasolo, 1989; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Famiani és mts., 1994; Pawlicki és Welandar, 1994; Yepes és Aldwinckle, 1994b; Sarwar és Skirwin, 1997; Caboni és Tonelli, 1999; D'Angelli és mts., 2001). Néhány közleménytől (Fasolo és mts., 1989; D'Angelli és mts., 2001) eltekintve az optimálisan szükséges regenerációs időtartamot nem vizsgálták, pedig annak jelentős szerepe van egy-egy módszer hatékonyságának megítélésékor.



8. ábra. Járulékos hajtásfejlődés konvencionális levélexplantátumokon ‘Royal Gala’ (A-E) és ‘Freedom’ (F-J) fajtáknál 4 (A, F), 5 (B, G), 6 (C, H), 7 (D, I) és 9 (E, J) hetes tenyésztést követően. Jelölővonal hossza megfelel 1 mm-nek.

8. táblázat. A regeneráció idejének (4, 5, 6, 7 és 9 hét) hatása a hajtásregenerációra (hajtásregenerációs százalék és regenerálódott hajtások száma/explantátum)

	Regeneráció időtartama (hetek)				
	4	5	6	7	9
	Hajtásregenerációs százalék (HR%)				
Royal Gala 1. csúcsi levél	20 b A	32 b A *	95 aA	100 aA	100 aA
Royal Gala 2. csúcsi levél	20 c A	63,3 b A	98 aA	100 aA	100 aA
Freedom 1. csúcsi levél	0 c A	16,7 c A	42 b B	71 a B*	78 aA *
Freedom 2. csúcsi levél	0 c A	6,8 c B	20 bc B	42 ab B	55 a B
	Regenerálódott hajtások száma/explantátum (HSZ)				
Royal Gala 1. csúcsi levél	1 c A	1,3 c A	2,4 c A	6,3 b A	10,2 aA
Royal Gala 2. csúcsi levél	1 c A	1,2 c A	3,0 c A	7,6 b A	12,1 aA
Freedom 1. csúcsi levél	0 c A	1,0 bcA	1,5 bcA	2,2 b B	3,2 a B
Freedom 2. csúcsi levél	0 b A	1,0 ab A	1,6 ab A	2,3 a B	2,6 a B
* jelzi, ha szignifikáns különbség van HR%-ban vagy HSZ-ben az 1. és a 2. levélről származó explantátumok között. Az átlagértékeket követő kis betűk soronként, a regenerálódási idők között, jelzik a szignifikáns különbségeket ($P \leq 0,01$) a Games-Howell teszt alapján. Az átlagértékeket követő nagy betűk jelzik a két fajta közötti szignifikáns különbségeket ($P \leq 0,01$) a Games-Howell-teszt alapján, ha az explantátumok ugyanolyan pozíciójú levélről származnak.					



9. ábra. A kísérleti adatok (8. táblázat) alapján felrajzolt növekedési görbék.

Fasolo és mts. (1989) 3 hónapon át havonta vizsgálták két almafajta ('McIntosh' és 'Triple Red Delicious') járulékos hajtásfejlődését különböző növekedési regulátorokat tartalmazó táptalajokon. Megállapították, hogy mind a genotípus, mind a táptalaj növekedési regulátor tartalma befolyásolta a növekedési görbe lefutását, a hajtásregenerációs százalékot és az elérhető explantátumonkénti hajtásszámot. Kísérleteinkben a hajtásregenerációs százalék és az elérhető explantátumonkénti hajtásszám időbeli változását jelentősen befolyásolta a genotípus; ez a megállapítás összhangban van Fasolo és mts. (1989) vizsgálati eredményeivel.

D'Angelli és mts. (2001) 'Jork 9' fajta járulékos hajtásfejlődését havonta megfigyelve a regeneráció 2. és 6. hónapja között, megállapították, hogy csak a regeneráció első 3 hónapjában fejlődtek új járulékos hajtások az explantátumokon. Predieri és Malavasi (1989) az 'M.26' alany regenerációs kapacitásának vizsgálatakor megállapította, hogy a regenerációt befolyásoló különböző faktorok hatásának értékelésére az az időpont a legalkalmasabb, amikor hajtásregenerációs százalék megközelíti a 100%-ot. Azonban véleményem szerint ez a megközelítés nem megfelelő, ha figyelembe vesszük az explantátumokon regenerálódó hajtások számát is. Hiszen kísérleteinkben a 100% HR% megközelítése, vagy elérése után (6 hét után) a 'Royal Gala' hajtásszáma (HSZ) még szignifikánsan növekedett (2,4 db/explantátum értékről 10,2 db/explantátumra, illetve 3,0 db/explantátum értékről 12,1 db/explantátumra; 9. ábra, 8. táblázat). A 'Freedom' fajta esetében pedig a HR% értékek sosem érték el a 100% értéket, a HSZ tekintetében pedig - a levélpozíciótól függően - vagy enyhe emelkedést figyeltünk meg (2,2 db/explantátum értékről 3,2 db/explantátumra, 1. csúcsi levél), vagy nem volt további emelkedés a HSZ-ban (2. csúcsi levél) a regeneráció 7. hete után. Vizsgálataink azt is igazolták, hogy az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciója mindkét almafajta regenerációs kapacitását szignifikánsan befolyásolta, jelezve, hogy az explantátum fiziológiai állapotának és korának jelentős szerepe van a regeneráció hatékonyságában, ahogy azt korábban több szerző is leírta (Fasolo és mts., 1989; Dufour, 1990; Famiani és mts., 1994).

A kísérleti és irodalmi eredmények alapján megállapítható, hogy a regeneráció időtartam jelentősen befolyásolja az elérhető regenerációs százalékot és a fejlődött járulékos hajtások számát is. A járulékos hajtásfejlődés sebességét, illetve mértékét számos tényező befolyásolhatja, kísérleteinkben a genotípus és a levélpozíció hatását igazoltuk. Ezért egy-egy módszer megítélése során fontos szerepet játszik, hogy mikor végezzük el az adatok gyűjtését és értékelését; azaz mi az ideális mintavételi időpont. Különböző mintavételi időpont, azaz különböző regenerációs időtartam alkalmazása ugyanazon módszernél, teljesen eltérő

konklúzióhoz vezethet; ugyanígy azonos mintavételi időpont pl, különböző fajták hajtásregenerációjának értékelésekor (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2013b).

Ha kereskedelmi mértékű szaporítás a célunk egy módszer kidolgozása során, akkor a regenerációs periódus optimális hosszának megválasztásakor azt is figyelembe kell venni, hogy mi az az időtartam, ami még gazdaságos előállítást tesz lehetővé.

Az optimális mintavételi időpont, vagyis a regeneráció időtartamának meghatározáshoz tehát ismernünk kell a járulékos hajtásfejlődési folyamat során ható biotikus (genotípus, explantátum fiziológia állapota), abiotikus (*in vitro* körülmények, táptalajkomponensek) tényezőket, valamint az ökonómiai elvárásokat is.

5.1.2.2. 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) és az explantátum korával (1. és 2. csúcsi levélről származó explantátumok; levélpozíció). A statisztikai analízis (robosztus Welch-féle varianciaanalízis) igazolta a hatások szignifikanciáját ($P < 0,01$) mind a kalluszosodási százalék (C%, 9. táblázat), mind a regenerációs százalék (HR%, 10. táblázat) és az explantátumonként regenerálódott hajtások száma (HSZ, 11. táblázat) esetében. Az egyes kezelések összehasonlítását minden esetben Games-Howell-tesztel végeztük el (9-11. táblázatok).

A regenerálódó tTCL explantátumok már az 1. héten megvastagodtak és elkezdtek kalluszosodni, míg a nem regenerálódó tTCL explantátumok megbarnultak és elhaltak. A regenerálódó explantátumok százaléka a levélpozíciótól és fajtától függően 10,0 mg l⁻¹ TDZ koncentrációnál, vagy afelett (25 mg l⁻¹) csökkent (C%, 9. táblázat). A 'Royal Gala' fajta tTCL explantátumai a legtöbb TDZ-t (25 mg l⁻¹) tartalmazó táptalajon elhaltak, míg a 'Freedom' tTCL explantátumai ezen a táptalajon 12-33% kalluszosodást mutattak.

A hajtásregeneráció mindkét alma fajtánál megindul az első 4 héten belül. A regenerációs periódus végén a regenerációs százalékot (HR%) befolyásolta a genotípus, a táptalaj TDZ tartalma és egyes esetekben az explantátumot szolgáltató levél pozíciója is.

7 hetes regenerációs periódus után 'Royal Gala' fajtánál a legkisebb TDZ koncentráció esetén (0,25 mg l⁻¹) az 1. csúcsi levélről származó tTCL explantátumok HR%-a, míg nagy TDZ koncentrációk esetén (5,0 és 10,0 mg l⁻¹) a 2. csúcsi levélről származó tTCL

explantátumok HR%-a volt szignifikánsan nagyobb (HR%, 10. táblázat). Ezt a különbséget a levélpozícióban a 9 hetes tenyésztést követően már csak 10,0 mg l⁻¹ TDZ-t tartalmazó táptalajon lehetett kimutatni.

'Freedom' fajtánál szignifikánsan kisebb volt a regenerációs százalék (HR%) a 2. csúcsi levélről származó explantátumokon 7 hét regenerációs periódus után a 2,5 mg l⁻¹ TDZ tartalmú táptalajon, 9 hét után pedig a 2,5 és 5,0 mg l⁻¹ TDZ tartalmú táptalajon.

A regenerációs periódus hossza szignifikánsan nem befolyásolta a HR% értékét, kivéve 'Royal Gala' fajta esetén, ha a 2. csúcsi levélből származó tTCL explantátumokat a legkevesebb (0,25 mg l⁻¹) TDZ-t tartalmazó táptalajon tenyésztettük. Ebben az esetben a regenerációs periódus meghosszabbítása közel ötszörösre (14 %-ról 67%-ra) növelte a hajtásregenerációt mutató explantátumok százalékát (HR%, 10. táblázat).

'Royal Gala' 1. csúcsi levélről származó tTCL explantátumainak HR% értéke a 2,5 és 5,0 mg l⁻¹TDZ-t tartalmazó táptalajokon volt a legnagyobb (60-73% és 58-70%), mely értékek szignifikánsan kisebbek, mint a kontrol, konvencionális explantátumok regenerációs százaléka (100%). Ha azonban a tTCL explantátumokat a 2. csúcsi levélből preparáltuk, akkor az 5,0 mg l⁻¹TDZ-t tartalmazó táptalajokon a regenerációs százalék (88% mindkét regenerációs periódusban) statisztikailag nem tért el a konvencionális explantátumokon megfigyelt regenerációs százaléktól (100%).

Ezzel ellentétben azonban a 'Freedom' fajta esetében az 1. csúcsi levélről származó tTCL explantátumok hajtásregenerációs képessége volt jobb. HR% 2,5mg l⁻¹TDZ-t tartalmazó táptalajon volt a legnagyobb (52-54% a két regenerációs periódusban), és nem tért el szignifikánsan a konvencionális explantátumok regenerációs százalékától (71-78%). A 2. csúcsi levélről származó tTCL explantátumok regenerációs százaléka mind a konvencionális, mind a tTCL explantátumok esetén tendenciálisan kisebb volt, mint az 1. levélről származó explantátumok esetében. A tTCL explantátumok regenerációs százaléka minden vizsgált TDZ koncentrációnál 25 % alatt maradt (HR%, 10. táblázat).

Az eredmények (HR%, 10. táblázat) világosan mutatják a genotípus, vagy fajtafüggőséget, illetve a vizsgált tényezők, mint az explantátum mérete (konvencionális, vagy tTCL), kora (1. vagy 2. csúcsi levélből származó), táptalaj citokinin tartalma és a regenerációs periódus hossza, egymással való kölcsönhatását is a hajtásregenerációs százalékra.

9. táblázat. A genotípus, az explantátum típus, a táptalaj TDZ koncentrációja és a regeneráció idejének hatása a tTCL levélexplantátumok kalluszosodási (C%) százalékára.⁺

Az explantátumot szolgáltató levél pozíciója	Explantátum típusa	TDZ koncentráció a regenerációs táptalajban mg l ⁻¹ (μM)	Kalluszosodási százalék 7 hetes tenyésztés után (C %)	
			Royal Gala	Freedom
1. csúcsi levél	kontrol (konvencionális)	0,5 (2,27)	100 a	-
		5,0 (22,7)	-	100 a
	tTCL	0,25 (1,135)	93 a	73 ab
		0,5 (2,27)	80 a	68 b
		1,0 (4,54)	85 a	88 ab
		2,5 (11,35)	88 a	85 ab
		5,0 (22,7)	93 a	97 ab
		10,0 (45,4)	48 b	83 ab
		25,0 (113,5)	0 c	33 c
2. csúcsi levél	kontrol (konven- cionális)	0,5 (2,27)	100 a	-
		5,0 (22,7)	-	100 a
	tTCL	0,25 (1,135)	95 a	80 a
		0,5 (2,27)	88 a	88 a
		1,0 (4,54)	78 a	76 ab
		2,5 (11,35)	82 a	75 ab
		5,0 (22,7)	95 a	73 ab
		10,0 (45,4)	95 a	50 b
		25,0 (113,5)	0 a	12 c
+: Az átlagértékeket követő kis betűk a Games-Howell-teszt alapján meghatározott homogén csoportokat (<i>P</i> < 0,01) jelölik, a genotípuson és a levélpozíción belül összehasonlítva az adatokat.				

10. táblázat. A genotípus, az explantátum típus, a táptalaj TDZ koncentrációja és a regeneráció idejének hatása a tTCL levélexplantátumok regenerációs (HR%) százaléka.⁺

Az explantátumot szolgáltató levél pozíciója	Explantátum típusa	TDZ koncentráció a regenerációs táptalajban mg l ⁻¹ (μM)	Regenerációs százalék (HR%)			
			7 hetes tenyésztés után		9 hetes tenyésztés után	
			Royal Gala	Freedom	Royal Gala	Freedom
1. csúcsi levél	kontrol (konvencionális)	0,5 (2,27)	100 a	-	100 a ^{ns}	-
		5,0 (22,7)	-	71 a	-	78 a ^{ns}
	tTCL	0,25 (1,135)	42 bc	0 c	63 b ^{ns}	3 c ^{ns}
		0,5 (2,27)	17 bc	15 b	22 c ^{ns}	17 b ^{ns}
		1,0 (4,54)	42 bc	3 bc	64 b ^{ns}	12 bc ^{ns}
		2,5 (11,35)	60 b	52 a	73 a ^{ns}	54 a ^{ns}
		5,0 (22,7)	58 b	35 ab	70 b ^{ns}	40 ab ^{ns}
		10,0 (45,4)	12 c	17 b	18 c ^{ns}	21 b ^{ns}
		25,0 (113,5)	0 d	5 bc	0 d ^{ns}	8 bc ^{ns}
2. csúcsi levél	kontrol (konvencionális)	0,5 (2,27)	100 a	-	100 a ^{ns}	-
		5,0 (22,7)	-	42 a *	-	55 a ^{ns}
	tTCL	0,25 (1,135)	14 c *	10 b	67 b ^s	12 bc ^{ns}
		0,5 (2,27)	25 bc	19 ab	29 c ^{ns}	25 b ^{ns}
		1,0 (4,54)	37 bc	8 b	43 bc ^{ns}	8 bc ^{ns}
		2,5 (11,35)	32 bc	11 b *	50 bc ^{ns}	14 bc ^{ns} *
		5,0 (22,7)	88 a *	12 b	88 a ^{ns}	12 bc ^{ns} *
		10,0 (45,4)	52 b *	3 bc	62 b ^{ns} *	3 bc ^{ns}
		25,0 (113,5)	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: jelzi, ha szignifikáns különbség van a regenerációs idők (7, vagy 9 hét) között;

^{ns} jelzi, ha nincs szignifikáns különbség.

*jelzi, ha szignifikáns különbség van HR%-ban az 1. és a 2. levélről származó explantátumok között.

dc_935_14

A regenerációs százalék mellett a regenerációs kapacitás értékelésének másik fontos tényezője a regenerálódó explantátumokon fejlődő hajtások átlagos száma (hajtásszám, HSZ). A hajtásszámot minden, a kísérletekben vizsgált tényező befolyásolta.

A regenerációs periódus meghosszabbítása két héttel 0,5 – 1,0 mg l⁻¹TDZ-t tartalmazó táptalajon szignifikánsan növelte a HSZ-t az 1. levéről származó tTCL explantátumokon 2,0-3,5 db-ról 5,6-6,3 db-ra, ami szignifikánsan nem tért el az 1. levélből származó konvencionális explantátumon elérhető HSZ-től (6,3 db) 7 hetes tenyésztést követően. Hasonlóan, a hajtásszám a konvencionális explantátumok esetében is növekedett a regenerációs periódus meghosszabbításával; az 1. levélből származó explantátumok esetén 6,3 db-ról 10,3 db-ra, a 2. levélből származó explantátumok esetén 7,6 db-ról 12,1 db-ra. A 2. levélből származó tTCL explantátumok esetében azonban HSZ sohasem érte el a konvencionális explantátumon megfigyelhető HSZ értékek egyikét sem, bár 2,5-10,0 mg l⁻¹TDZ tartomány mellett a regenerációs periódus növelésével a HSZ értékei szignifikánsan nőttek. Az eredmények alapján 'Royal Gala' fajta tTCL explantátumai számára az optimális TDZ koncentráció 5,0 mg l⁻¹ 7 hét tenyésztést követően, a regenerációs periódus meghosszabbításával a TDZ optimum 0,5-5,0 mg l⁻¹ TDZ tartományban adható meg függetlenül a levélpozíciótól (HSZ, 11. táblázat).

A 'Freedom' fajtánál a HSZ tekintetében a tTCL explantátumok regenerációs képessége nem tért el szignifikánsan a konvencionális explantátumétól, ha a tTCL explantátumok számára optimális TDZ koncentrációt biztosítottuk; 2,5 mg l⁻¹TDZ tartalmú táptalajon elért 2,1-2,3 db HSZ statisztikailag nem tér el a konvencionális explantátumon megfigyelt 2,2-2,3 db HSZ értéktől 7 hetes regenerációt követően. A regenerációs periódus kiterjesztése 9 hétre csak az 1. levélből származó konvencionális (2,2 db-ról 3,2 db-ra), illetve 0,25mg l⁻¹TDZ koncentrációjú táptalajon a tTCL (0 db-ról 1,5 db-ra) explantátumokon növelte a HSZ értékét. A 'Freedom' fajta tTCL explantátumai számára az optimális TDZ koncentráció 2,5 mg l⁻¹ TDZ függetlenül az eredeti levélpozíciótól és a regeneráció időtartamától (HSZ, 11. táblázat).

A 10. ábra mutatja mindkét fajta esetén 7 hetes tenyésztést követően a járulékos hajtásregenerálódást mindkét explantátum típus (konvencionális és tTCL) esetében az explantátum típusára optimalizált TDZ koncentrációjú táptalajokon.

11. táblázat. A genotípus, az explantátum típus, a táptalaj TDZ koncentrációja és a regeneráció idejének hatása a tTCL levélexplantátumokon fejlődő hajtások számára. ⁺

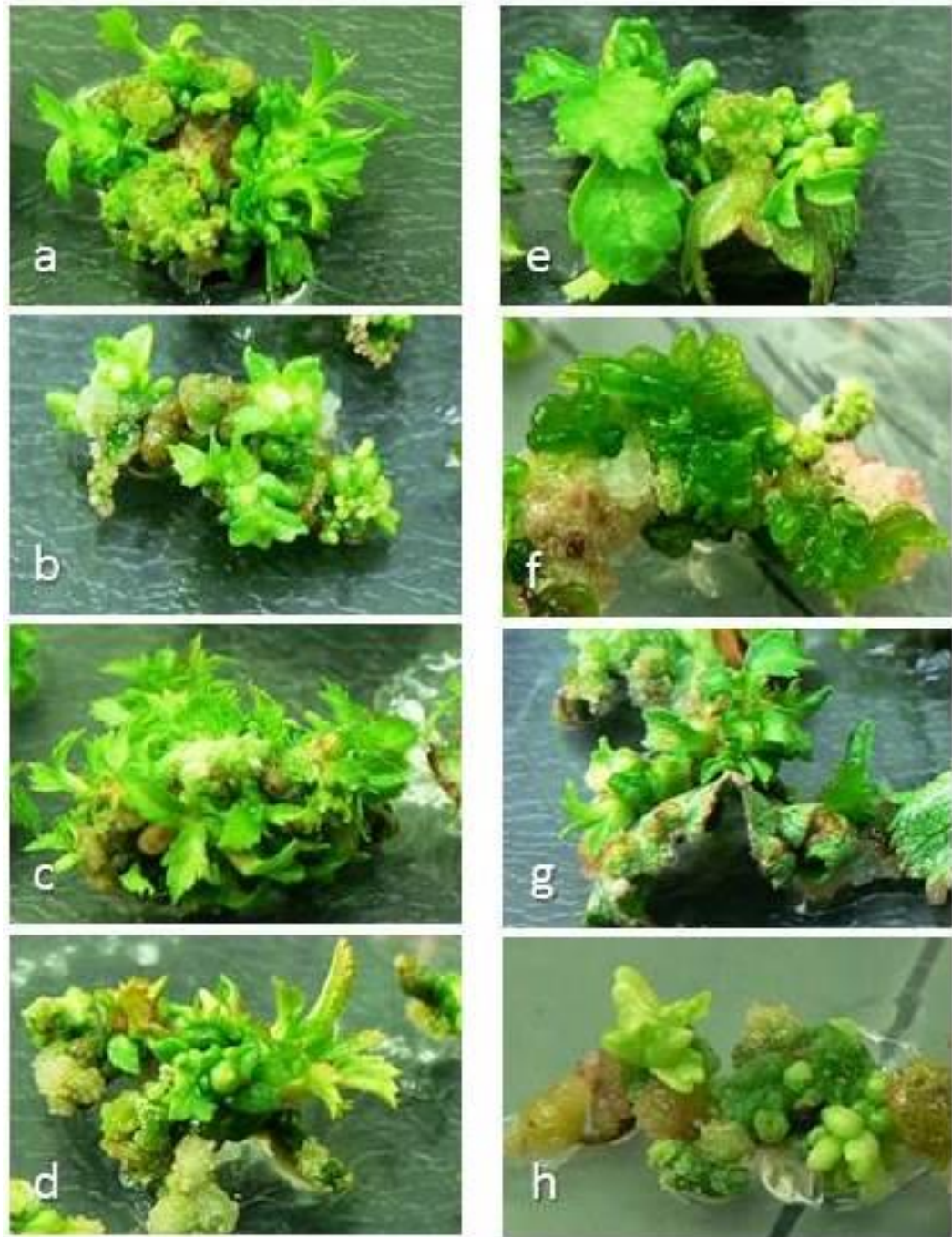
Az explantátumot szolgáltató levél pozíciója	Explantátum típusa	TDZ koncentráció a regenerációs táptalajban mg l ⁻¹ (μM)	Regenerálódott hajtások száma / regenerálódó explantátum (HSZ)			
			7 hetes tenyésztés után		9 hetes tenyésztés után	
			Royal Gala	Freedom	Royal Gala	Freedom
1. csúcsi levél	kontrol (konvencionális)	0,5 (2,27)	6,3 a	-	10,2 a ^s	-
		5,0 (22,7)	-	2,2 a	-	3,2 a ^s
	tTCL	0,25 (1,135)	2,5 b	0 c	3,9 bc ^{ns}	1,5 b ^s
		0,5 (2,27)	2,0 b	1,1 b	5,5 b ^s	1,1 b ^{ns}
		1,0 (4,54)	3,5 ab	1,5 ab	6,3 b ^s	1,4 b ^{ns}
		2,5 (11,35)	4,2 ab	2,1 a	5,6 b ^{ns}	2,4 a ^{ns}
		5,0 (22,7)	4,4 a	1,5 ab	5,1 bc ^{ns}	2,3 a ^{ns}
		10,0 (45,4)	2,6 ab	1,5 ab	3,1 c ^{ns}	2,3 a ^{ns}
		25,0 (113,5)	0 c	1,5 ab	0 d ^{ns}	1,7 ab ^{ns}
2. csúcsi levél	kontrol (konvencionális)	0,5 (2,27)	7,6 a	-	12,1 a ^s	-
		5,0 (22,7)	-	2,3 a	-	2,6 a ^{ns}
	tTCL	0,25 (1,135)	1,6 c	1,8 ab *	3,4 c ^{ns}	1,9 ab ^{ns}
		0,5 (2,27)	3,2 b	1,5 ab	4,1 bc ^{ns}	2,2 ab ^{ns} *
		1,0 (4,54)	3,2 b	1,0 b	4,9 bc ^{ns}	1,0 b ^{ns}
		2,5 (11,35)	2,8 b	2,3 a	5,2 bc ^s	2,8 a ^{ns}
		5,0 (22,7)	4,4 b	1,4 ab	6,5 b ^s	1,5 b ^{ns} *
		10,0 (45,4)	2,8 b	1,0 b	4,5 bc ^s	1,5 b ^{ns} *
		25,0 (113,5)	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: jelzi, ha szignifikáns különbség van a regenerációs idők (7, vagy 9 hét) között;

^{ns} jelzi, ha nincs szignifikáns különbség.

* jelzi, ha szignifikáns különbség van HSZ-ban az 1. és a 2. levélről származó explantátumok között.



10. ábra. ‘Royal Gala’ (a-d) és ‘Freedom’ (e-h) fajták járulékos hajtásregenerációja 7 hetes tenyésztést követően. Hajtásregeneráció az 1. (a,e) és a 2. (c,g) csúcsi levélről származó kontrol (konvencionális) explantátumokon. Hajtásregeneráció az 1. (b,f) és a 2. (d,h) csúcsi levélről származó tTCL levélexplantátumokon a regenerációs táptalaj optimális TDZ koncentrációja esetén (‘Royal Gala’ esetén 5.0 mg l^{-1} , ‘Freedom’ esetén 2.5 mg l^{-1})

Az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a járulékos hajtásregenerációra optimális TDZ koncentráció mind a genotípustól, mint az explantátum típusától függött. Figyelembe véve mind a HR%, mind a HSZ értékeket (10-11. táblázatok), 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.

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) (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2013).

Azonos szervből származó különböző méretű explantátumok esetén a regenerációs hatékonyság összehasonlításánál pontosabb információt nyerünk, ha a kiindulási szervre vonatkoztatjuk a regenerációs kapacitást. Ez esetünkben a levelenként regenerálódott járulékos hajtások számát, azaz a hajtáshozamot jelenti (12. táblázat).

12. táblázat. Levelenkénti hajtáshozam 7 hetes tenyésztést követően a táptalaj optimális TDZ koncentrációjú táptalajokon konvencionális és tTCL explantátumok alkalmazása esetén

Fajta	Levél pozíció	Konvencionális explantátum				tTCL explantátum			
		Explantátum száma / levél	HR%	HSZ	Hajtáshozam (HH)	Explantátum száma / levél	HR%	HSZ	Hajtáshozam (HH)
Royal Gala	1. levél	2	100	6,3	12,6	50	58	4,4	127,6
	2. levél	2	100	7,6	15,2	50	88	4,4	193,6
Freedom	1. levél	2	71	2,2	3,1	50	52	2,1	54,6
	2. levél	2	42	2,3	1,9	50	11	2,3	12,6

A 12. táblázat adatai alapján látható, hogy tTCL explantátumok használatával 6,5-17,5-szer jobb hajtáshozam érhető el, mint konvencionális explantátum esetében. A különböző méretű explantátumok regenerációs kapacitásának összehasonlítására ezért bevezettük a növényi Növekedési Korrekciós Faktor (GCF) és a Geometriai Faktor (GF) fogalmát (Teixeira da Silva és Dobránszki 2011, 2014), melyet az 5.1.3. fejezetben ismertetek részletesen.

5.1.2.3. A regenerálódott járulékos hajtások genetikai stabilitása

Az *in vitro* szaporítás során az egyik kiemelkedő fontosságú szempont, hogy a kiindulási anyaggal (anyanövény) genetikailag teljesen azonos utódnövény állományt állítsunk elő. Az *in vitro* szaporítás során fellépő örökletes genetikai változások (szomaklonális variabilitás) problémát okozhatnak a kereskedelmi szaporítás során, hiszen az utódok anyanövénnyel való genetikai azonosságát és egyöntetűségét (uniformitás) negatívan befolyásolják (Larkin and Scowcroft, 1981; Hammerschlag, 1996; Jain, 2001). A szomaklonális variabilitás forrása kétféle lehet: (1.) már a kiindulási növényanyagban meglévő genetikai variabilitás manifesztálódik az *in vitro* szaporítás során (pre-existing variation), vagy (2.) az *in vitro* tenyésztés indukál genetikai változást. A genetikai változás bekövetkezésének valószínűségét növeli, ha a szervfejlődés járulékos regeneráción keresztül történik, mivel itt a szervfejlődés nem már meglévő merisztémákból indul ki, melyeknek a genetikai stabilitása a legnagyobb, hanem a fejlődési folyamat során indukáljuk a merisztémák fejlődését már differenciálódott sejtekből, szövetekből (Rout és mts., 1998). A genetikai változás valószínűségét tovább növeli, ha szervfejlődés indirekt járulékos regenerációval (azaz kalluszfázison keresztül) megy végbe (Son és mts., 1993; Karp, 1995; Abeyaratne és mts., 2004; Bordallo és mts., 2004; George és Debergh, 2008). Noha a

szövettenyésztés során megfigyelt szomaklonális variabilitás pontos oka(i) nem ismert(ek), az *in vitro* tenyésztés során a genetikai változások indukálásában kimutatták – többek között - a fajnak, a fajtának, a növényi növekedésszabályozó anyagok (auxinok és citokininek) szub-, vagy supraoptimális mennyiségének, az explantátum eredetének és az *in vitro* tenyésztés körülményeinek szerepét (Veilleux és Johnson, 1998; Martin és mts., 2006).

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). A molekuláris vizsgálatok eredményeit a 13. táblázatban foglaltam össze. Az eredmények alapján a különböző levélpozícióból származó, s így különböző korú tTCL explantátumokon eltérő (növekvő) 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.

Alma *in vitro* szaporított növényeinek genetikai stabilitásával kapcsolatos irodalmi adatok meglehetősen ellentmondóak. Míg Li és mts. (2002), valamint Modgil és mts. (2005a) molekuláris vizsgálatai (DNS-metilációs profil, RAPD), almánál kimutatták, hogy az *in vitro* szaporítás során genetikai változások alakulhatnak ki, addig Pathak és Dhawan (2010) ISSR markerekkel végzett vizsgálatai a mikroszaporított ‘MM111’ alany genetikai stabilitását igazolták.

13. táblázat. Genetikai stabilitás vizsgálata mikroszatellit (SSR) analízissel alma *in vitro* tenyészetekben

Hajtások eredete			Primerek							
Fajta	Az explantátumot szolgáltató levél pozíciója és az explantátum típusa	TDZ koncentráció (mg l ⁻¹)	CH02C09	CH04e05	CH4g10	COL	CH05h12	CH05d03	CH03g04	CH05b06
Royal Gala	1. levél konvencionális		230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
	1. levél tTCL	0,25	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		0,50	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		1,0	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		2,5	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		5,0	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		10,0	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
	2. levél konvencionális		230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
	2. levél	0,25	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		0,50	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		1,0	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		2,5	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		5,0	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
		10,0	230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
	mikroszaporított kontrol hajtás		230,240	177	173	234	164	170, 180	133, 147	168, 192
Freedom	1. levél konvencionális		242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
		0,5	242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
		2,5	242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
		10,0	242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
	2. levél konvencionális		242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
		0,5	242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
		2,5	242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210
	mikroszaporított kontrol hajtás		242, 252	177, 205	173, 187	234	164	158, 180	137, 141	160, 168, 198, 210

5.1.2.4. A regenerálódott járulékos hajtások elongációja és gyökeresítése

A járulékos hajtások gyökeresedésére gyakran káros utóhatást gyakorolnak a regenerációs táptalajban alkalmazott citokininek, mint a BA, vagy a TDZ, ezért a hajtások gyökeresedési képességét egy-egy módszernél vizsgálni kell (van Nieuwkerk és mts., 1986; Dufour 1990; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; Sedira és mts., 2007; Dobránszki és mts., 2006).

A kísérletekben regenerálódott járulékos hajtások gyökeresedési képességét tesztelve, eltérést tapasztaltunk a két vizsgált almafajta regeneránsainak gyökeresedési képességében.

A 'Royal Gala' járulékos hajtásai 75-80%-os gyökeresedést mutattak, amely megegyezik az axilláris úton fejlődött hajtások gyökeresedési kapacitásával (80%, Magyar-Tábori és mts., 2009). A járulékos hajtások gyökeresedési képességét nem befolyásolta sem a regenerációs táptalaj TDZ koncentrációja, sem a levélexplantátum kora, sem a típusa, amelyről a hajtások származtak. Ez az eredmény összhangban van korábbi megfigyeléseinkkel (Magyar-Tábori és mts., 2011).

A levélexplantátum típusa és a regenerációs táptalajban alkalmazott TDZ koncentrációja azonban utóhatást gyakorolt a 'Freedom' fajta járulékos hajtásainak gyökeresedési képességére. Egyáltalán nem gyökeresedtek azok a hajtások, melyek konvencionális explantátumon regenerálódtak, illetve azok a hajtások melyek 0,25-1,0 mg/l TDZ tartalmú táptalajon tenyésztett tTCL explantátumokon regenerálódtak. 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%).

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 'Freedom' fajta esetén azonban a regeneránsok egy része nem gyökeresedett. A 'Freedom' fajtánál táptalaj optimális TDZ koncentrációja alma levél tTCL explantátumok 9 hetes regenerációja esetén 2,5 mg/l TDZ, ezért megállapíthatjuk, hogy a járulékos hajtásregeneráció szempontjából optimális TDZ koncentrációnál fejlődő hajtások gyökeresedése az axilláris hajtások gyökeresedési százalékával megegyező, ezért az ennél a fajtánál is megfelelő volt.

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

5.1.3.1. A GCF és GF elméleti alapjai

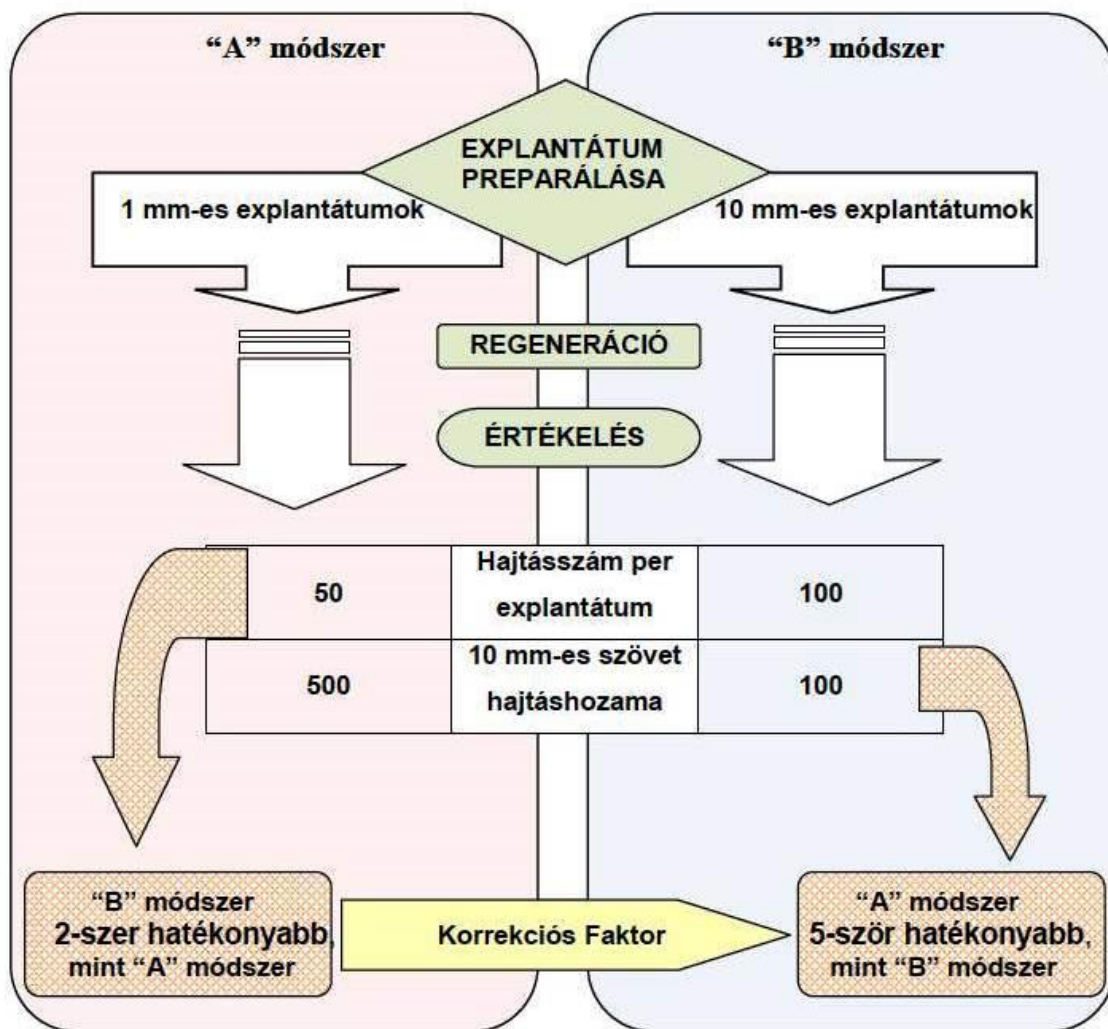
Ahogy azt az 5.1.2.2. fejezetben már röviden bemutattam (12. táblázat), a különböző méretű explantátumok regenerációs képességének összehasonlításakor, és egy-egy módszer hatékonyságának megítélésekor felmerül a kérdés, hogy mit mivel hasonlítsunk össze. Más-más következtetésre jutunk egy-egy kísérlet értékelésekor és más módszerekkel való összevetésekor, ha egy-egy explantátumra korlátozzuk az összehasonlítást (hajtásszám/regenerálódó explantátum), mintha arra a kiindulási szervre, vagy szövetdarabra vonatkozóan végezzük el az értékelést (11. ábra), amelyből az explantátumokat preparáltuk (hajtáshozam).

Általánosítva, amikor szövettenyésztési kísérleteket tervezünk, illetve végzünk, arra a kérdésre kell választ találnunk, hogy hogyan végezzük az explantátum preparálást, azaz milyen alakú és méretű explantátumokat vágjunk, hogy a legtöbb regeneránst nyerhessük. Vagyis, hogyan növelhetjük a regeneránsok számát ugyanazon kísérleti körülmények és feltételek között azáltal, hogy megváltoztatjuk az explantátum méretét és/vagy alakját?

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.



11. ábra. Elméleti megfontolás különböző módszerek hatékonyságának összehasonlítására korrekciós faktor (GCF) használata nélkül (bal oldali oszlop), illetve korrekciós faktor segítségével (jobb oldali oszlop).

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 12. ábrán és 14. 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).

A GF független minden egyéb *in vitro* kísérleti körülménytől, csak az explantátum mérete és alakja alapján meghatározható; és a számításánál figyelembe kell venni, hogy mely szövettájakból történik az új (cél) szerv regenerációja. GF tehát az explantátum-alapú összehasonlításnak (ld.: I. eset) egyik komponense, s arányos GCF-ral, mely a kiindulási szerv/szövet-alapú összehasonlításra alapul (ld.: II. eset). 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 készíthetőek; 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.

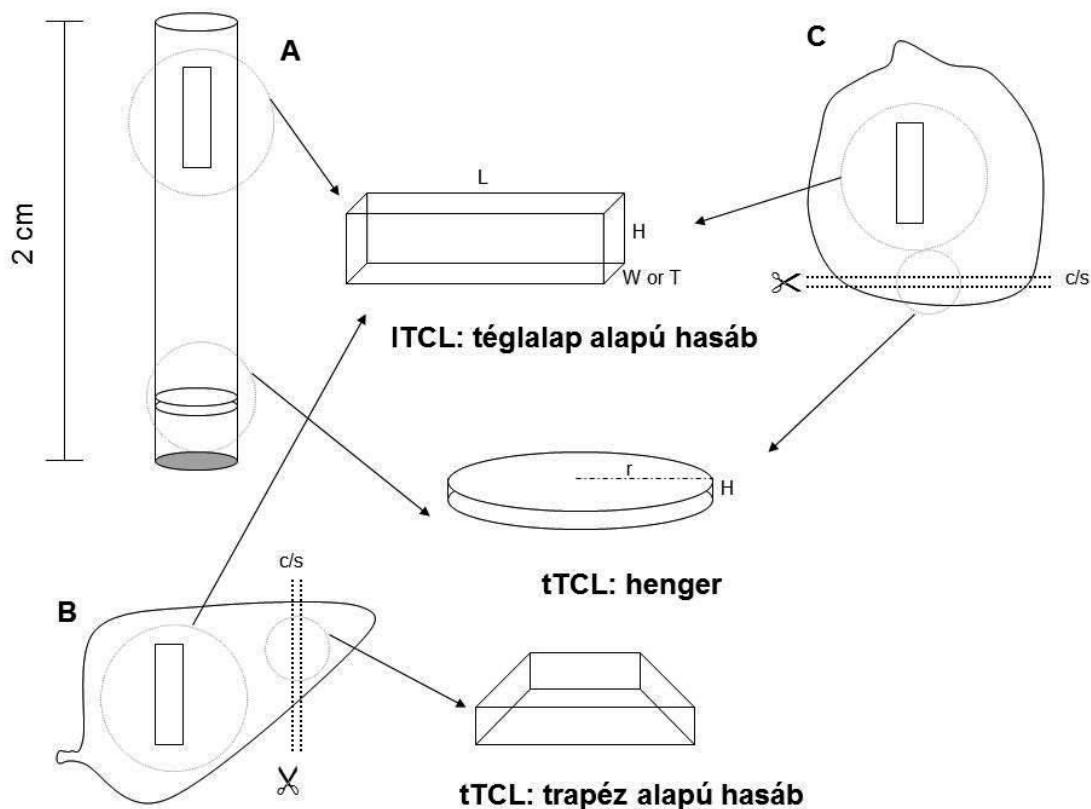
A regenerációt számos egyéb tényező és körülmény (faj, fajta, táptalaj összetétele, egyéb *in vitro* körülmények a regeneráció során) is befolyásolja, melyek hatását 'k' faktorként összegezve, a GCF és GF között az összefüggést az alábbiakban adhatjuk meg:

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

Hajtásregeneráció esetén $R\% = HR\%$, azaz a hajtásregenerációt mutató explantátumok százaléka, s így GCF:

$$GCF = \frac{n \cdot HR\%_{tTCL}}{HR\%_{conv.}} \cdot k \cdot GF$$

A 'k' érték könnyen számítható, ha csak egy tényező tér el a kísérletekben (pl. a fajta). Ha azonban több tényező is eltérő, akkor 'k' értékét kísérleti úton kell meghatározni. Ha az összes kísérleti körülmény megegyezik, akkor 'k' értéke állandó.



12. ábra. TCL explantátumok preparálása során létrejövő különböző alakú és méretű explantátumok. Transzverzális thin cell layer (tTCL) és longitudinális thin cell layer (ITCL) típusú explantátumok preparálása különböző kiindulási szervekből. A kiindulási szerv, szövet bármely nyitva-, vagy zárvatermőnél lehet **(A)** internódusz szövet, levélnyél, gyökér, apikális merisztématikus terület stb., **(B)** levél, szíromlevél, csészelevél, **(C)** PLB, gumó, hagyma, bármely közel gömbölyű szerv, pl. ovárium. H: magasság, L: hossz, W vagy T: szélesség, vagy vastagság, r: sugár; c/s: keresztmetszeti vágás, ✂: vágási irány az explantátum preparálás során

14. 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 hasábbal 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 becsülésére. (w: explantátum szélessége, vagy vastagsága). PLB = protokormszerű test (protocorm-like body); SAM = hajtáscsúcs merisztéma (shoot apical meristem)				

5.1.3.2. A GCF és GF gyakorlati alkalmazása alma modell növényen

A GCF és GF gyakorlati alkalmazását a jelen dolgozatban bemutatott kísérleti adatok felhasználásával mutatom be a vizsgált két almafajtánál ('Royal Gala' és 'Freedom'). Az alma *in vitro* organogenezisét széleskörűen tanulmányozták (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mts., 2010), kiváló fásszárú modell növény a szövettenyésztési kísérletekben.

A GCF és GF kalkulációjához néhány irodalmi előzményt figyelembe kellett venni, melyek az alábbiak:

1.) Az explantátum alakját és méretét a regeneráció hatékonyságára alma esetében csak néhányan vizsgálták. James és mts. (1988) vizsgálták a 'Greenleeves' alma fajta hajtásregenerációját *in vitro* levelekből és megállapították, hogy a regenerációs kapacitás függött az explantátum alakjától. Négyféle explantátumot hasonlítottak össze: 7 mm-es levélkorongokat, hosszirányban 3 csíkra vágott levéldarabokat, keresztirányban 3 csíkra vágott levéldarabokat és hosszirányban 5 csíkra vágott levéldarabokat. A regenerációs kapacitás a hosszirányban vágott levélcsíkok esetén nagyobb volt, mint levélkorong explantátumok esetében. A szerzők azt feltételezték, hogy ennek az volt az oka, hogy a levélcsíkok esetében nagyobb a levélexplantátum vágási felülete, mint levélkorong explantátumoknál, de konkrét méréseket nem végeztek sem az explantátumok, sem a vágási felületek méretét illetően.

2.) Korábbi szövettani vizsgálatok (Welander, 1988; Pawlicki és Welander, 1994; Caboni és mts., 1996; Yancheva és mts., 2003) igazolták, hogy az *in vitro* alma levéllemezből kiinduló hajtásregenerációban nemcsak az epidermális és szubepidermális sejtek vesznek részt, mint néhány más kertészeti növényfaj esetében (krizantém, *Cymbidium* orchidea; Teixeira da Silva 2005; Teixeira da Silva és Tanaka, 2006), hanem a mezofillum sejtjei is.

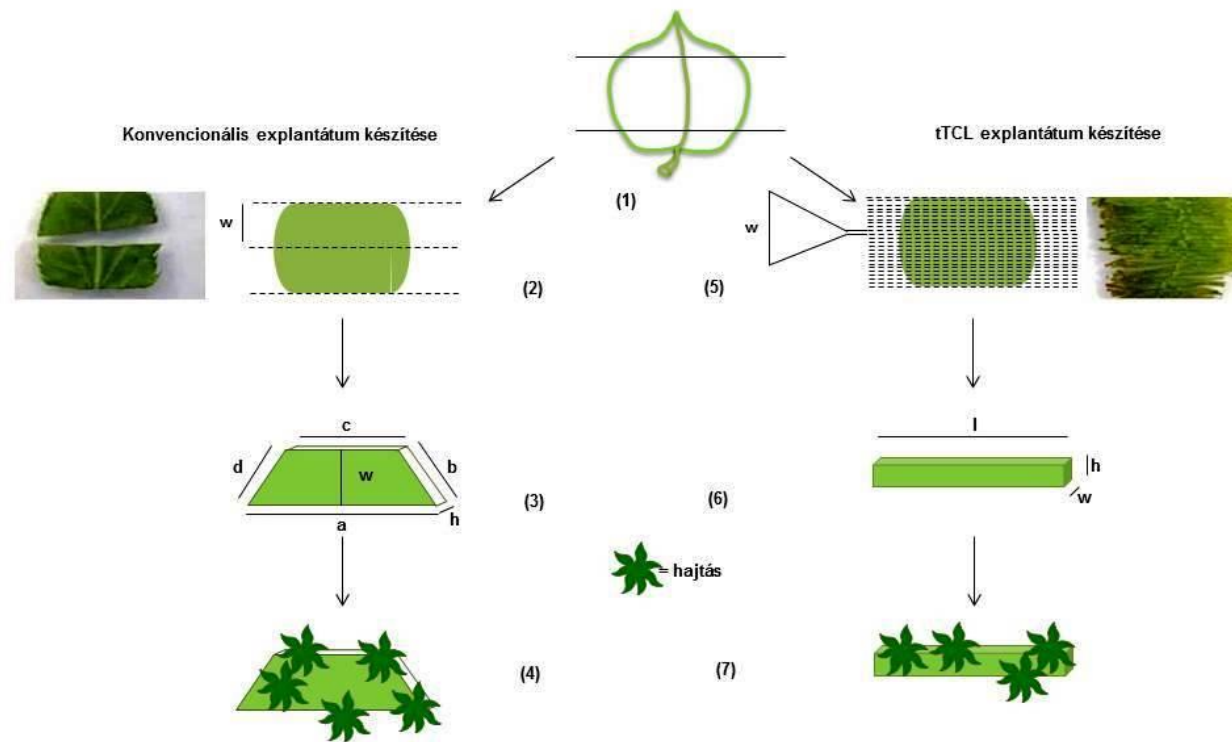
3.) Egy jól regenerálódó ('Gala') és egy nehezen regenerálódó ('Golden Delicious') almafajta együttenyésztése során Dufour (1990) azt vizsgálta, hogy befolyásolja-e az együttenyésztés a másik almafajta regenerációs kapacitást. A kísérletekben egy jól regenerálódó ('Gala') fajta képes volt a nehezen regenerálódó 'Golden Delicious' fajta regenerációs kapacitását javítani. Ezért a szerző feltételezte, hogy egy még nem azonosított, endogén vízoldható, diffúzibilis faktor szabadult fel a jól regenerálódó 'Gala' fajta explantátumaiból, s ennek volt szerepe abban, hogy a 'Golden Delicious' regenerációs kapacitása javult.

A 13. ábrán mutatom be a kísérleteinkben a konvencionális és a tTCL explantátumok készítése során az explantátum felületének és térfogatának becsléséhez alkalmazott a mértani testek kialakítását. A konvencionális explantátumok preparálása során kialakuló levélexplantátum alakja trapéz alapú hasákkal közelíthető, ahol a hasáb alapját képező trapéz 'a' és 'c' oldalai mentén alakítjuk ki a vágási felületeket. A tTCL explantátum preparálása során elméletileg szintén trapéz alapú hasákkal közelíthetők a preparált explantátumok, azonban ezeknek az explantátumoknak az extrém kicsi mérete miatt a felület és térfogat számításához szükséges paraméterek nem mérhetőek. Így a gyakorlatban a levéllemezből készített tTCL explantátumok felületének és térfogatának számításához téglatest alapú hasákkal közelítjük az explantátum alakját, melynek paraméterei könnyen mérhetőek. tTCL explantátum esetében a hasáb alapját képező téglalap 'l' oldalai mentén alakítjuk ki a vágási felületeket.

A 15. táblázatban két konkrét példán ('Royal Gala' fajtánál a 2., 'Freedom' fajtánál az 1. csúcsi levél adatai alapján) mutatom be az explantátumok felszínének, térfogatának és a GF értékének kiszámítását. A táblázatban bemutatott adatokból megállapítható, hogy egyik fajta esetében sem volt lényeges különbség a kétféle explantátum típus között a vágási felület nagyságában (3,99, illetve 3,53 mm² a 'Royal Gala' fajtánál, és 2,91, illetve 2,30 mm² a 'Freedom' fajtánál), ellentétben a James és mts. (1988) által végzett kísérleteknél. Ezért feltételezhetjük, hogy nem az eltérő nagyságú vágási felület az oka annak, hogy a két explantátum típus regenerációs képessége eltérő.

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_{tTCL}), valamint az explantátumok térfogatát (V_{conv} és V_{tTCL}) 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:

$$GF_{conv.-tTCL} = \frac{\frac{A_{conv}}{V_{conv}}}{\frac{A_{tTCL}}{V_{tTCL}}}$$



13. ábra. A konvencionális és a tTCL explantátumok készítése, az explantátum felületének és térfogatának becsléséhez alkalmazott a mértani testek kialakítása. A konvencionális explantátum becslésére a trapéz-alapú hasábot alkalmazzuk (a, b, c, d, w, h méretek felvétele). A tTCL explantátum becslésére a téglatestet alkalmazzuk (h és w mérése). (1): a donor (az explantátumot szolgáltató) levél; (2): keresztbe vágott levélből készített konvencionális explantátum (w: kb. 5 mm); (3): a levélből készített tTCL explantátum (w: kb. 0,1 – 0,3 mm) (részletek az anyag és módszer fejezetben); (3) és (6): a becslésnél alkalmazott geometriai testek; (4) és (7): az explantátumokon fejlődő járulékos hajtások

15. táblázat. Példaszámítás: Geometriai faktor (GF) számítása a kísérleti eredmények felhasználásával. A 'Royal Gala' fajtánál a 2., 'Freedom' fajtánál az 1. csúcsi levél adatait vettük figyelembe a példaszámításnál.

Fajta	Explantátum forrása	Konvencionális explantátum teljes felszíne (mm ²) // vágási felülete (mm ²)	tTCL explantátum teljes felszíne (mm ²) // vágási felülete (mm ²)	tTCL explantátumok száma / konvencionális explantátum	Konvencionális explantátum térfogata (mm ³)	tTCL explantátum térfogata (mm ³)	GF (tTCL explantátumot a konvencionális hoz viszonyítva)
'Royal Gala'	<i>in vitro</i> levél	102.37 // 3,53	7.81 // 3,99	25	9.59	0.38	0.5192
'Freedom'	<i>in vitro</i> levél	86.0 // 2,91	5.03 // 2,30	25	7.06	0.22	0.5328
A hajtásszám mért, a felszín és a térfogat a mért explantátum paramétereiből számított értékek, a GF értékét az explantátum felszíne és térfogata alapján számítottuk trapéz alapú hasáb (konvencionális explantátum), illetve téglalap alapú hasáb (tTCL explantátum) alapján. (ld.: 13. ábra, 14. táblázat)							

Figyelembe véve, hogy a konvencionális explantátum alakját trapéz alapú hasábbal, a tTCL explantátum alakját téglalap alapú hasábbal közelítettük (12. ábra, 14. táblázat), így a mért explantátum paramétereiből (13. ábra) GF az alábbi módon számítható:

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

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 a 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.

Azon növényfajoknál, ahol a regeneráció csak az epidermális, illetve szubepidermális szövettájakból indul ki, nem az explantátumok teljes, hanem csak azok epidermális felületét vesszük figyelembe a GF kiszámításakor (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2014). Továbbá, az explantátumok alakja is eltérő lehet attól függően, hogy mely szerv szolgáltatta az explantátumot, illetve milyen az explantátum típusa (12. ábra, 14. táblázat). A mellékletek fejezetben a vonatkozó közleményünkre alapozva (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2014) néhány ilyen esetre vonatkozóan megadom a GF kiszámításának módját (2. sz. melléklet).

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

$$HSZ_{\text{tTCL}} = GF \cdot k \cdot HSZ_{\text{conv.}}$$

A 'k' az egyenletben egy korrekciós faktor, amely az explantátum méretét és alakját kivéve mindazokat a kísérleti körülményeket összegzi matematikailag, melyek a regenerációs folyamat hatékonyságát befolyásolják. Az 5.1.2.2. fejezetben bemutatott kísérletekben ezen faktorok közül négynek a regenerációs kapacitásra kifejtett hatását tanulmányoztunk. A négy vizsgált tényező: a genotípus ('Royal Gala', 'Freedom' fajták), a regenerációs periódus hossza (7, illetve 9 hét), az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciója (vagyis az explantátum

kora) (1., illetve 2. csúcsi levél), és különböző TDZ koncentrációk 1,135-113,5 μM intervallumban.

A 'k' érték alakulására vonatkozóan az alábbi összefüggések állapíthatók meg a kísérleti adatok alapján (16. táblázat).

16. táblázat. A 'k' faktor változása 'Royal Gala' fajtánál 9 hetes regenerációs periódust követően azonos kísérleti körülmények között (azonos mennyiségű TDZ a táptalajban, illetve azonos levélpozíció), illetve eltérő kísérleti körülmények között (eltérő mennyiségű TDZ a táptalajban, illetve eltérő levélpozíció) az 5.1.2.2. fejezetben bemutatott kísérleti eredmények alapján

A táptalaj TDZ tartalma	Explantátum típus	Levél pozíció	HSZ	GF	k	HR%	GCF	
0,5 mg/l (2,27 μM)	konvencionális	1. csúcsi levél	10,2	0,4712		100		
		2. csúcsi levél	12,1	0,5192		100		
	tTCL	1. csúcsi levél	5,5		1,1	22	2,9	
		2. csúcsi levél	4,1		0,7	29	2,6	
		5,0 mg/l (22,7 μM)	1. csúcsi levél		5,1	1,1	70	8,8
			2. csúcsi levél		6,5	1,0	88	11,8
HSZ: átlagos hajtásszám / regenerálódó explantátum; GF: Geometriai Faktor; k: korrekciós faktor; HR%: hajtásregenerációt mutató explantátumok százaléka; GCF: Növekedési Korrekciós Faktor.								

Ha ugyanazon fajta, ugyanolyan pozíciójú leveléből készítettük mind a konvencionális, mind a tTCL explantátumokat, és ugyanannyi TDZ-t tartalmazó táptalajra helyeztük (pl. 'Royal Gala' 2. csúcsi leveléből készített explantátumait 0,5 mg/l (2,27 μM) TDZ-t tartalmazó táptalajra helyeztük), akkor - 9 hét regenerációt követően - a tTCL explantátumokon regenerálódó hajtások átlagos száma csak 4,1 volt, szemben a konvencionális explantátumon fejlődő 12,1 hajtással (11. és 16. táblázatok). Ekkor a számított 'k' érték 0,7. A kísérletekben azt kaptuk, hogy az optimális TDZ tartalom tTCL explantátum használatakor 5,0 mg/l (22,7 μM) TDZ, s ekkor az átlagos hajtásszám a tTCL explantátumon 6,5. Ebben az esetben végezve el az összehasonlítást, az kapjuk, hogy a 'k' értéke 1,0 (16. és 17. táblázatok). Ugyancsak a 'Royal Gala' fajtánál, de az 1. csúcsi levélből származó

dc_935_14

explantátumokat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a táptalaj TDZ tartalma nem befolyásolta szignifikánsan a tTCL explantátumokon fejlődő hajtások átlagos számát 0,5 -5,0 mg/l (2,27-22,7 μ M) TDZ intervallumban (11. táblázat). Ezért a 'k' értéke is azonos volt ($k = 1,1$) mindkét összehasonlításban (16. táblázat).

A 17. táblázatban 'k' érték változását követhetjük nyomon a mintavételi idő függvényében, azaz a regenerációs periódus időtartamától függően, amikor mindkét explantátum típusnál az explantátum típusához optimalizált TDZ tartalmú táptalajon végeztük a regenerációt mindkét alfajta esetében. A táblázat mutatja, hogyan változik 'k' értéke a fajtától, a regenerációs periódus hosszától, és a levélpozíciótól függően.

A 16-17. táblázat adatait megvizsgálva láthatjuk, hogy 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). Minél nagyobb a befolyásoló tényezők száma két módszer összehasonlításakor, annál nagyobb azoknak a komponenseknek a száma, amelyek befolyásolják a 'k' faktor értékét, annak egy-egy alegységét képezve. Gyakorlati szempontból ez azt jelenti, hogy ha pl. teljesen azonos kísérleti körülményeket használunk, csak pl. a kísérletben szereplő fajták különbözőek, akkor meg tudjuk határozni a fajták szerepét a 'k' értékben, az alábbi összefüggést felhasználva:

$$\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = k \cdot GF.$$

Mivel GF független a fajtától, és $\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}}$ kísérletileg meghatározható mindkét fajta

esetében, 'k' értéke mindegyik fajta esetén eltérő és az adott fajtára jellemző lesz adott kísérleti körülmények között, feltéve, hogy a fajták regenerációs kapacitása különböző.

17. 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						

dc_935_14

A GCF kiszámítható a mért kísérleti eredmények alapján (10. és 11. táblázatok adatai), figyelembe véve, hogy 1 konvencionális explantátumból 25 tTCL explantátum készíthető, az alábbi módon:

$$GCF = [25 \times (HR\%_{tTCL} \times HSZ_{tTCL}) / 100] / [(HR\%_{conv.} \times HSZ_{conv.}) / 100]$$

Ez, maradva az előbbi példáinknál, a 'Royal Gala' fajta 2. csúcsi leveléről származó explantátumok esetében (16. táblázat) egy kiindulási szervre, azaz 1 levélre vonatkoztatva azt jelenti, hogy 9 hetes regenerációs periódust követően 24,2 hajtás (HSZ: 12,1; HR%: 100%) regenerálható, ha konvencionális explantátumot használunk, míg 286 hajtás (HSZ: 6,5; HR%: 88%), ha tTCL explantátumot. Így a számított GCF=11,8. A 'Freedom' fajta 1. és 2. csúcsi leveléből származó explantátumok esetében, hasonló számítást követően (16. és 17. táblázatok), GCF=13 az 1. levél esetében, és GCF=6,9 a 2. levél esetében. Tehát megállapítható, hogy a 'Royal Gala' 2. levélből származó explantátumokhoz hasonlítva a 'Freedom' fajta regenerációs kapacitása jobban növelhető tTCL explantátumok használatával, ha az explantátumok az 1. csúcsi levélből származnak (GCF=13, illetve 11,8), de kevésbé, ha a 2. csúcsi levélből készítjük (GCF=6,9, illetve 11,8) azokat.

A GCF értéke azonban, ahogy korábban definiáltuk, kiszámítható a $GCF = \frac{n \cdot HR\%_{tTCL}}{HR\%_{conv.}}$ k GF egyenlet segítségével is.

Figyelembe véve a fenti egyenletet, valamint, hogy $\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = k \cdot GF$, a

$\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = GCF \cdot \frac{HR\%_{conv}}{n \cdot HR\%_{tTCL}}$ egyenletet kapjuk, ami alma levélexplantátumok esetén:

$$\frac{HSZ_{tTCL}}{HSZ_{conv}} = GCF \cdot \frac{HR\%_{conv}}{25 \cdot HR\%_{tTCL}}.$$

Behelyettesítve az alma levélexplantátumokra vonatkozó GF-et, általánosan:

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

Ha visszatérünk a 16. táblázatban közölt adatokhoz, könnyen belátható hogyan alkalmazható a GF és GCF a gyakorlatban a regenerációs kapacitás javítására. Azonos kísérleti körülmények között (azonos TDZ tartalmú táptalajon, azonos korú explantátumokon) tTCL explantátumok regenerációs kapacitása az 1. csúcsi levélből származó explantátumok esetében 2,9-szerese, míg a 2. csúcsi levélből származó explantátumok esetében 2,6-szorosa volt a konvencionális explantátumok regenerációs kapacitásának 9 hetes regenerációs időszak után. Amikor a táptalaj TDZ tartalmát a tTCL explantátum igényeihez optimalizáltuk, a regeneráció hatékonyságát tovább tudtuk növelni, ahogy ezt a GCF értékének a növekedése jelezte. Az 1. csúcsi levélből preparált explantátumok esetében a GCF értéke 2,9-ről 8,8-ra; a 2. csúcsi levélből preparált explantátumok esetében pedig 2,6-ről 11,8-ra nőtt. Tehát a két esetben a regeneráció hatékonyságát 3-szorosra, illetve 4,5-szörösre növeltük a TDZ tartalom optimalizálásával, azonos alakú és méretű explantátum használata mellett (tTCL explantátum). A megfelelő explantátum megválasztása (tTCL a konvencionális helyett), és a táptalaj citokinin tartalmának optimalizálása együttesen azt eredményezte, hogy a konvencionális explantátumhoz viszonyítva 8,8-szorosra, illetve 11,8-szorosra tudtuk növelni a regenerációs kapacitást.

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.

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 szövettájaiból 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.

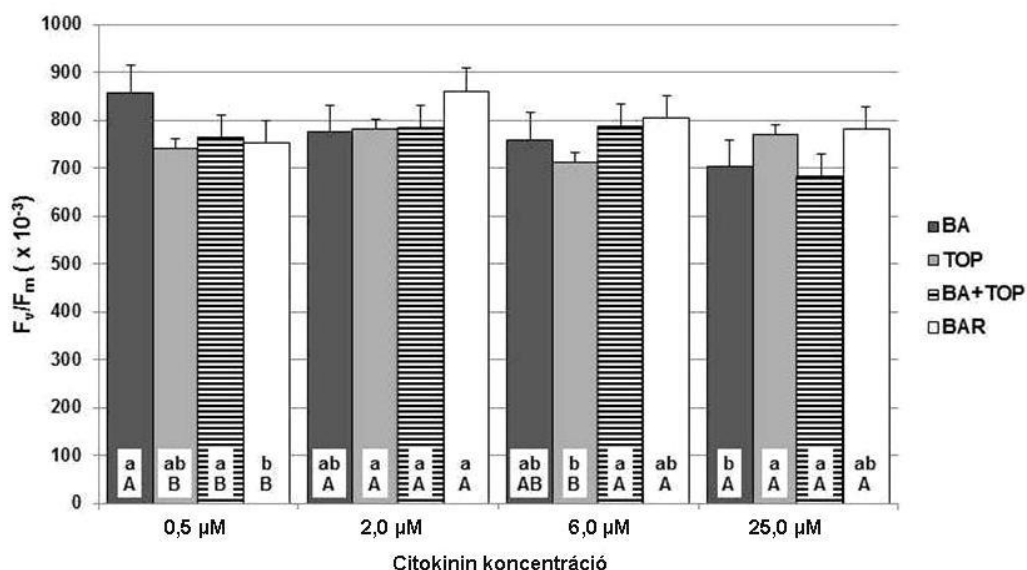
5.2. AROMÁS OLDALLÁNCÚ CITOKININEK HATÁSA AXILLÁRIS *IN VITRO* HAJTÁSOK FOTOSZINTETIKUS APPARÁTUSÁNAK MŰKÖDÉSÉRE ALMA NÖVÉNYBEN

5.2.1. Aromás oldalláncú citokininek hatása az *in vitro* alma levelek klorofill fluoreszcenciájára

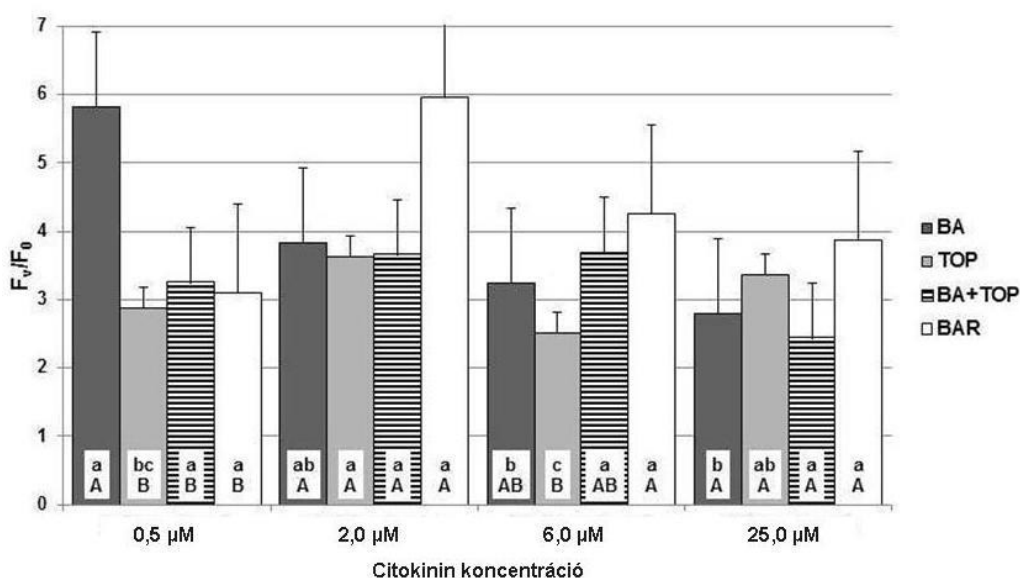
A táptalaj citokinin tartalma befolyásolta mind a sötét-, mind a fényadaptált levelek klorofill fluoreszcenciáját a táptalajhoz adott citokinin típusától és az alkalmazott koncentrációtól függően (14-17. ábrák).

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. A csökkenés az F_v/F_m esetében csak a legnagyobb alkalmazott BA koncentrációnál (25 μM) volt szignifikáns, míg a fotokémiai hatékonyságot jelző F_v/F_0 értéke már 6,0 μM BA alkalmazásakor is szignifikánsan alacsonyabb volt, jelezve, hogy az emelkedő BA koncentráció a PSII fotokémiai hatékonyságát már 6,0 μM BA alkalmazása esetében csökkenti, míg a rendszer maximális kvantumhatékonysága ekkor még változatlan (14-15. ábrák).

BAR tartalmú táptalajon fejlődött hajtásoknál a legnagyobb F_v/F_m értéket 2,0 μM BAR alkalmazása esetében mértük. Hasonló tendencia figyelhető meg az F_v/F_0 értékét illetően is, bár statisztikailag nem igazolható a BAR koncentrációk hatása fotokémiai hatékonyság (F_v/F_0 érték) esetén, kivéve a legkisebb (0,5 μM) koncentrációnál, ahol a fotokémiai hatékonyság csökkenését (F_v/F_0) statisztikailag igazoltuk. A BAR hatását a BA hatásához viszonyítva az eredmények azt mutatták, hogy 2,0-25,0 μM koncentrációtartományban a BAR hatása a BA hatásával megegyező volt mind a F_v/F_m , mind a F_v/F_0 tekintetében (14-15. ábrák). Az aromás oldalláncú citokininek ribozidjai (itt: BAR) általában kisebb aktivitást mutatnak, mint a nukleobázisok (itt: BA). A BAR-nak ez a hatása valószínűleg azzal magyarázható, hogy a BAR, a BA N⁹-ribozidja, az egyik fő transzport formája a citokininnek a növényen belül, könnyen és reverzibilisen konvertálódik nagyobb aktivitású BA-vá (Sakakibara, 2006; Dobránszki, 2014).



14. ábra. A II. fotokémiai rendszer (PSII) maximális, potenciális kvantumhatékonysága (F_v/F_m) a 'Royal Gala' különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak sötét-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.



15. ábra. A II. fotokémiai rendszer (PSII) fotokémiai folyamatainak maximális hatékonysága (F_v/F_0) a 'Royal Gala' különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak sötét-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.

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 alkalmazása esetén. A BA és TOP kombinált alkalmazása a táptalajban hasonlóan befolyásolta a fejlődő hajtások klorofill fluoreszcenciáját, mint a TOP egyedüli alkalmazása; szignifikáns eltérést az F_v/F_m értékekben nem tapasztaltunk. (14-15. ábrák).

Alacsony citokinin koncentráció esetében (0,5 μM) F_v/F_m és F_v/F_0 a BA használata esetén volt szignifikánsan a legnagyobb. 2,0 és 6,0 μM koncentrációknál, melyek az axilláris alma hajtáskultúráknál szokásosan alkalmazott koncentráció tartományába esnek (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010), azonban a BAR használata esetén volt nagyobb az F_v/F_m és F_v/F_0 értéke; 6,0 μM -nál tudtuk ezt statisztikailag igazolni. A legnagyobb alkalmazott citokinin koncentrációnál (25,0 μM) a citokinin típusok hatása között nem tudtunk különbséget kimutatni.

A levelek sötét-adaptációjával a klorofill fluoreszcencia mérése előtt elérjük, hogy a PSII elektron-akceptorai oxidált állapotba kerülnek, azaz a reakció centrumok nyitott állapotúak. Ezt követően a magasabb F_v/F_m , és F_v/F_0 értékek mérése azt jelzi, hogy a nagyobb a PSII kapacitása a fény abszorbeálására és a fotokémiai reakciókban való hasznosítására. A 14-15. ábrákon bemutatott adatokból látható, hogy az F_v/F_m értékei 0,683-0,861 között változtak a különböző citokinin kezelésektől függően. Ezek a klorofill fluoreszcencia értékek nagyságrendileg megegyeznek korábban más szerzők által 55-90 napos alma *in vitro* tenyésztésben mért értékekkel (0,710-0,806) (Zanandra és mts., 2006), valamint 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.

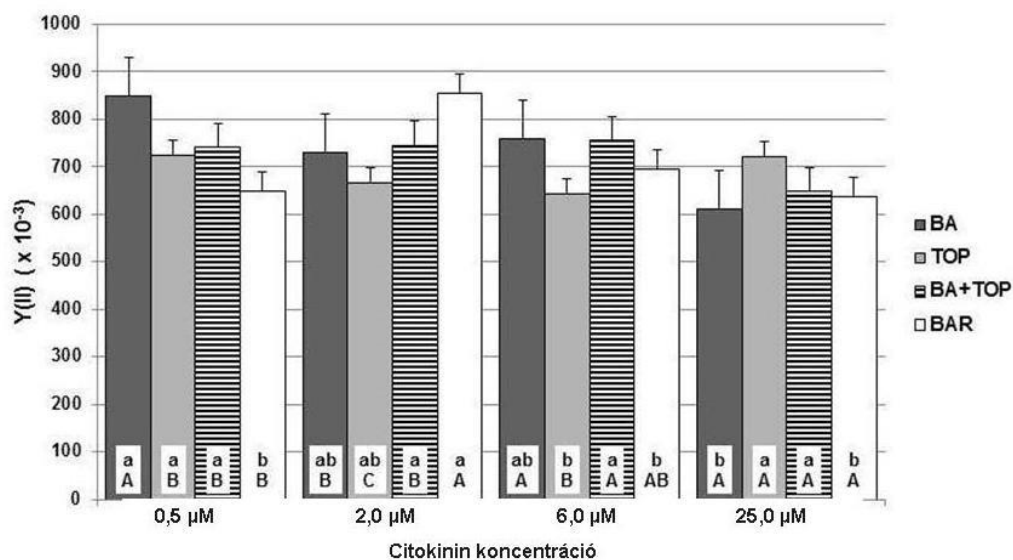
Hasonló eredményeket kaptunk (Magyar-Tábori és mts., 2014) 1,3-4,4 μM BA, BAR és TOP tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* *Amelanchier canadensis* 'Rainbow Pillar' hajtások klorofill fluoreszcenciájának vizsgálatakor. A kísérletekben az F_v/F_m értéke a táptalaj citokinin tartalmától függően 0,639 és 0,774 között változott, *Amelanchier canadensis*

'Rainbow Pillar' esetében általában a magasabb citokinin koncentrációnál érte el a legnagyobb értéket.

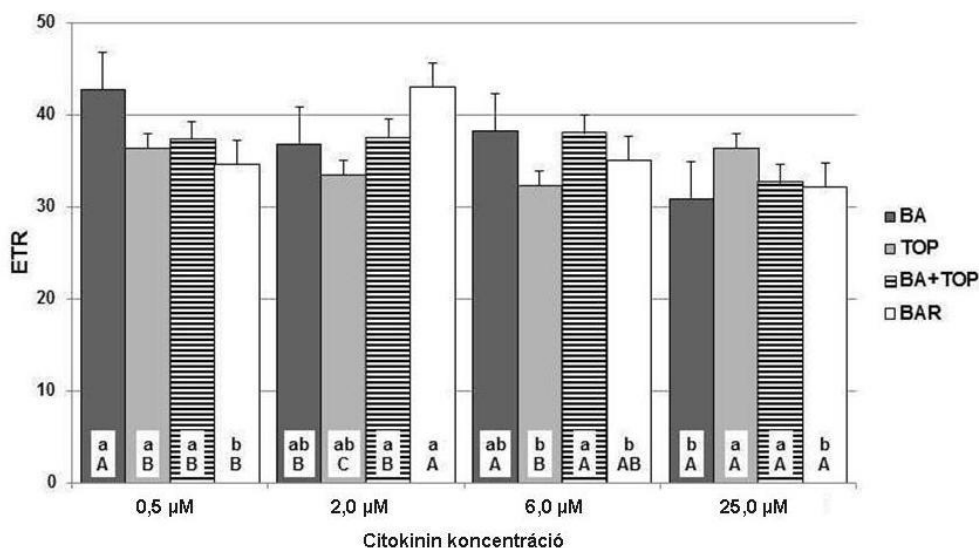
A PSII aktuális kvantumhatékonyságát az aktuális fényviszonyokon nevelt leveleken mértük „Yield protocol”-al. Ekkor a PSII elektron-akceptorai redukált állapotba kerülnek, azaz a reakció centrumok zárt állapotúak. A PSII elért hatékonyságát a relatív elektrontranszport rátával (ETR) határoztuk meg. Y(II), azaz az aktuális kvantumhatékonyság, sohasem érte el a maximális kvantumhatékonyságot (F_v/F_m) (14 és 16. ábrák).

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 $2,0 \mu\text{M}$ citokinin koncentrációnál érték el (16. és 17. ábrák). Ha a táptalaj citokinin forrása TOP volt, akkor az axilláris alma hajtáskultúráknál szokásosan alkalmazott koncentrációk ($2,0$ és $6,0 \mu\text{M}$) esetében szignifikánsan volt a legalacsonyabb Y(II) és ETR. BA és TOP kombinált alkalmazása esetén Y(II) és ETR értékei koncentrációtól függetlenek voltak. A legnagyobb Y(II) és ETR értékeket $0,5 \mu\text{M}$ BA és $2,0 \mu\text{M}$ BAR, a legalacsonyabb értékeket pedig $2,0 \mu\text{M}$ és $6,0 \mu\text{M}$ TOP alkalmazását követően mértük. $25,0 \mu\text{M}$ citokinin koncentrációnál nem volt különbség a citokinin kezelések Y(II) és ETR-re kifejtett hatásában.

A citokininek a hajtástenyésztés kulshormonjai, biztosítják a hajtások növekedését és fejlődését (George és Debergh, 2008; Van Staden és mts., 2008; Magyar-Tábori és mts., 2010; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010). Fontos szerepet játszanak a kloroplasztiszok fejlődésében és strukturális differenciálódásában; kimutatták, hogy részt vesznek egyes a kloroplasztiszok fejlődését irányító gének indukálásában (Synková és mts., 1999; Kubo és Kakimoto, 2000; Kulaeva és mts., 2002; Cortleven és mts., 2011), megfelelő fejlettségű kloroplasztiszok szükségesek a növényi szervek, szövetek citokinin válaszához (Kulaeva és mts., 2002). Ennek ellenére a bemutatott kísérletek az elsők, melyekben arra kerestünk választ, hogy az *in vitro* szaporítás során a táptalajhoz adott különböző típusú citokininek befolyásolják-e a fejlődő *in vitro* hajtások fotoszintetikus rendszerének működőképességét. Az eredményeink azt bizonyítják, hogy a táptalajhoz adott aromás oldalláncú citokinineknek mind a típusa, mind a koncentrációja hatással van az *in vitro* alma hajtások PSII rendszerének maximális kvantumhatékonyságára (F_v/F_m) és a fotokémiai folyamatainak maximális hatékonysága (F_v/F_0), valamint az aktuális kvantumhatékonyságára (Y(II)) is, s így befolyásolják a fotoszintetikus rendszerük működőképességét.



16. ábra. A II. fotokémiai rendszer (PSII) aktuális kvantumhatékonysága ($Y(II)$) 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.



17. ábra. A II. fotokémiai rendszer (PSII) elektrontranszport rátája (ETR) 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.

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

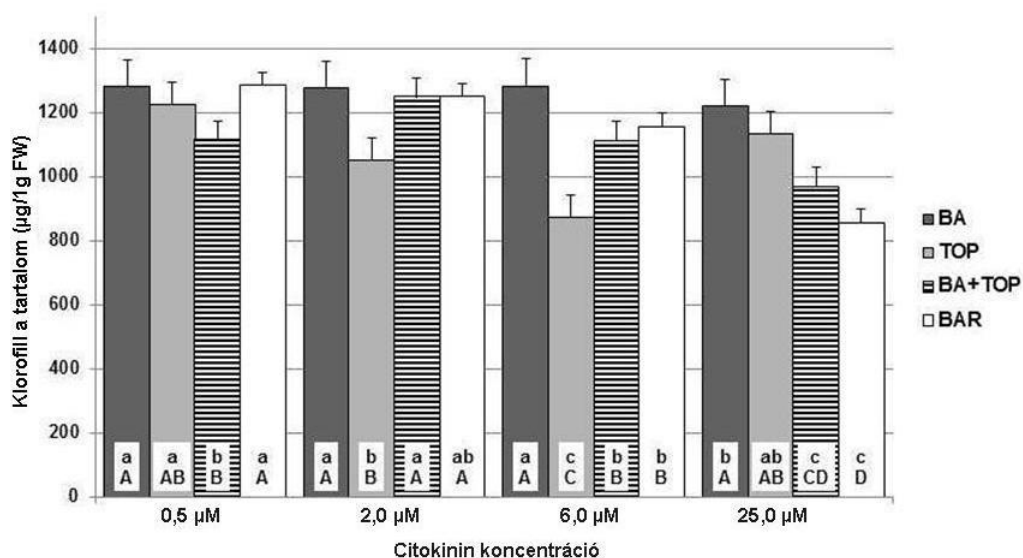
A klorofill tartalmat az *in vitro* almahajtások felső két, kifejlett levelében mértük, mivel korábbi vizsgálataink bizonyították, hogy 3 hetes tenyésztést követően az axilláris alma hajtástenyészetekben a két csúcsi levél biztosan a 3 hetes tenyésztés során fejlődik (Dobránszki és mts., 2002). A 3 hetes tenyésztést követően a levelek klorofill tartalmában szignifikáns különbségeket mutattunk ki (18-21. ábrák).

A különböző típusú citokininek az összklorofill tartalomra kifejtett hatása (20. ábra) függött az alkalmazott citokinin koncentrációtól. Az összklorofill tartalom minden vizsgált koncentrációnál akkor volt a legnagyobb, ha a hajtások BA-t tartalmazó táptalajon fejlődtek. Hasonlóan, a *klorofill a* (1220-1282 $\mu\text{g}/1\text{g}$ levél nedves súly (FW)) (18. ábra) és *klorofill b* (623-898 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW) (19. ábra) tartalom is a BA alkalmazását követően volt a legnagyobb, míg a *klorofill a* / *klorofill b* aránya (21. ábra) a legkisebb (1,42-1,958). A táptalaj BA, illetve BAR 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 értük el (2,706 és 2,804). BA és 25,0 μM TOP kombinált alkalmazása esetén a levelekben szintén nagy *klorofill a* / *klorofill b* arányt (2,782) mutattunk ki (21. ábra).

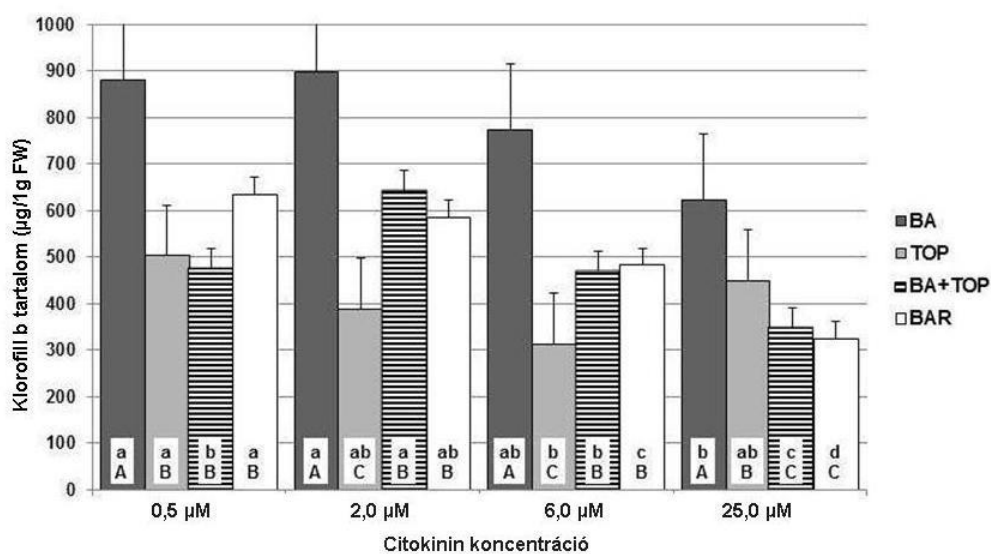
Az adatokból (18-19. ábrák) látható, hogy a *klorofill b* tartalomban a citokinin kezelések hatására bekövetkező változás mértéke (65%) mintegy kétszerese volt a *klorofill a* tartalomban (34%) bekövetkezett változás mértékéhez képest.

A táptalaj BAR koncentrációjának növelése szignifikánsan csökkentette a levelek *klorofill a* és *klorofill b* tartalmát, 1285 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW-ról 855 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW-ra, illetve 635 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW-ról 325 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW-ra. Ezzel ellentétben a táptalaj BA koncentrációjának növelése csak a legnagyobb koncentráció (25,0 μM) esetén okozott szignifikáns csökkenést a pigment tartalomban (18-19. ábrák). Ezek az eredmények összhangban vannak Aremu és mts. (2012b) banán szövettenyészetben mért eredményeivel.

Ha a táptalaj citokinin forrása TOP volt, a TOP koncentrációjának növekedésével 6,0 μM -ig a levelek *klorofill a* tartalma csökkent, s ennél a citokininnél volt a legalacsonyabb a levelek *klorofill b* tartalma 2,0 és 6,0 μM TOP esetében (388 és 311 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW). A BA és a TOP kombinált alkalmazásakor 2,0 μM TOP BA-val való kombinációja eredményezte a legnagyobb *klorofill a* (1248 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW) és *klorofill b* (644 $\mu\text{g}/1\text{g}$ FW) tartalmat. Ugyanilyen nagy *klorofill a* és *klorofill b* tartalmat tudtunk elérni, ha a 25,0 μM BAR-t, vagy BA+ 25,0 μM TOP-t adtunk a táptalajhoz (18-19. ábrák).

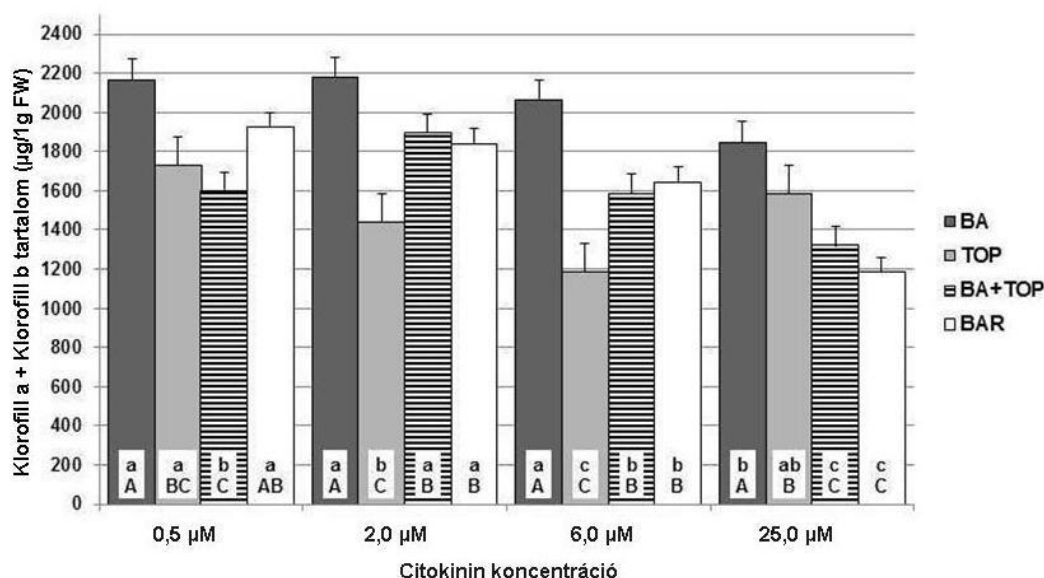


18. ábra. A ‘Royal Gala’ különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak első két, teljesen kifejlett csúcsi levelében mért *klorofill a* tartalom (µg / 1g FW). Az oszlopokon belüli betűk a Duncan-teszt alapján meghatározott statisztikailag homogén csoportokat ($P \leq 0,05$) 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.

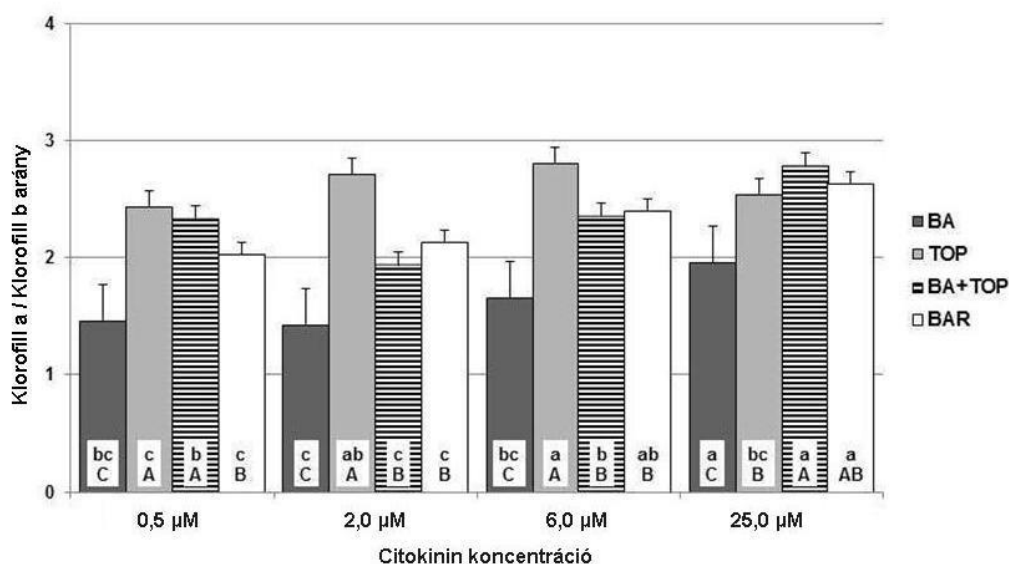


19. ábra. A ‘Royal Gala’ különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak első két, teljesen kifejlett csúcsi levelében mért *klorofill b* tartalom (µg / 1g FW). Az oszlopokon belüli betűk a Duncan-teszt alapján meghatározott statisztikailag homogén csoportokat ($P \leq 0,05$) 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.

dc_935_14



20. ábra. A ‘Royal Gala’ különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak első két, teljesen kifejlett csúcsi levelében mért összklorofil (*klorofil a* + *klorofil 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.



21. ábra. A *klorofil a* / *klorofil b* aránya ‘Royal Gala’ különböző citokinin tartalmú táptalajon fejlődött *in vitro* hajtásainak első két, teljesen kifejlett csúcsi levelében. 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.

dc_935_14

A kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy a táptalaj citokinin tartalma – a citokinin típusa és alkalmazott koncentrációja – befolyásolta az *in vitro* alma hajtások leveleinek klorofill tartalmát, különösen a *klorofill b* pigment mennyiségét. Eltérő citokinin tartalmú táptalajon fejlődő *in vitro* alma hajtások leveleiben eltérő a *klorofill a* és a *klorofill b* aránya is.

Sáez és mts. (2012) úgy találták, hogy noha a növény klorofill tartalma nem közvetlenül jelzi a növény fotoszintetikus kapacitását, de jó indikátora lehet a fotoszintetikus rendszer általános állapotának. A kísérleti eredményeink szerint néhány esetben a klorofill tartalom és a klorofill fluoreszcencia között kimutatható volt párhuzam. Ha a táptalaj citokinin forrása BA volt, a BA koncentráció növelésével, nemcsak az összklorofill tartalom, hanem a klorofill fluoreszcencia is csökkent. BAR esetében ez a tendencia csak 2,0 μM koncentráció felett figyelhető meg, de a 2,0 μM BAR kezelés után tapasztalható nagy F_v/F_m és $Y(\text{II})$ értékek nem indokolhatók a klorofill mennyiségi változásával. Ha a táptalaj TOP-t tartalmazott, a 2,0 és 6,0 μM TOP esetében mértük a legkisebb *klorofill a* és a *klorofill b* értékeket, viszont a klorofill fluoreszcencia (F_v/F_m és $Y(\text{II})$) csak a 6,0 μM TOP koncentráció alkalmazása esetében csökkent szignifikánsan. A fotokémiai folyamatok maximális hatékonyságát jelző legnagyobb F_v/F_0 értéket pedig 2,0 μM TOP-ot tartalmazó hajtások levelein mértük. Ha táptalaj kétféle citokininint tartalmazott (BA+TOP kezelések) akkor a klorofill tartalom és a klorofill fluoreszcencia között semmilyen összefüggést nem lehetett megállapítani.

A klorofill tartalom és a klorofill fluoreszcencia paraméterek közötti összefüggés statisztikai analízisének eredményeit a 18. táblázatban foglaltam össze.

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

	<i>klorofill b</i>	<i>klorofill a+b</i>	<i>klorofill a/b</i>	F_v/F_m	F_v/F_0	$Y(\text{II})$
<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 bizonyították, hogy sem a *klorofill a* és a *klorofill b* pigmentek mennyisége, sem az aránya nem befolyásolta a II fotokémiai rendszer (PSII)

dc_935_14

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 ($r = -0,515$; $P < 0,05$). Összefoglalva jelen eredmények alapján megállapítható, hogy, Sácz és mts. (2012) eredményeivel ellentétben, a 3 hetes *in vitro* alma hajtások klorofill tartalma alapján a fotoszintetikus rendszer általános állapotára, és maximális teljesítőképességére 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.

dc_935_14

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:

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

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 (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.

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 szövettájaiból 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 klorofillok mennyisége ($r=0,561$; $P < 0,05$) és aránya ($r=-0,515$; $P < 0,05$) befolyásolta a II. fotokémiai rendszer aktuális fényviszonyok közötti kvantumhatékonyságát.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Abdul-Kader AM, Máthé Á, Lászlóffy K. *In vitro* propagation of apple: Comparative response of three cultivars to cytokinin and auxin. *Acta Hort.*, 1992; 300: 155-162.
2. Abeyaratne WM, De Silva UN, Kumari HMPS. Callus induction, plant regeneration and occurrence of somaclonal variation in somatic tissues of some indica rice varieties. *Ann. Sri Lanka Dept. Agricult.*, 2004; 6: 1-11.
3. Ali Bacha N, Al-Rihani Kh, Abdul-Kader AM. Development of a method for *in vitro* propagation of the apple local cultivar "Sukari". *Bassel al-Assad J. Engin. Sci., Agricul., Food, Chem. Biotech.*, 2009; 26: 213-234.
4. Al-Rihani Kh, AbdulKader AM, Dayoub A, Kalhout AR. *In vitro* micropropagation of apple rootstock M27. *Research J. Aleppo Univ., Agric. Sci. Ser.*, 2005; 53: 47-66.
5. Al-Tiawni E, Ali Bacha N., Al-Rihani K, Abdul-Kader A. *In vitro* micropropagation of apple cv. Golden Delicious using tissue culture technique. *Bassel al-Assad J. Engin. Sci., Agricul., Food, Chem. Biotech.*, 2009; 26: 47-64.
6. Aremu AE, Bairu MW, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J. Topolins: A panaceae to plant tissue culture challenges. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 2012a; 108: 1-16.
7. Aremu AO, Bairu MW, Szűčová L, Finnie JF, Van Staden J. The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas. *J. Plant Physiol.* 2012b; 169: 1530-1541.
8. Babbar SB, Jain R, Walia N. Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 2005; 41: 258-261.
9. Bahmani R, Karami O, Gholami M. The effect of carbon source and concentration on *in vitro* shoot proliferation of MM.106 apple rootstock. *Fruit, Vegetable, Cereal Sci. Biotech.*, 2009; 3: 35-37.
10. Bairu MW, Jain N, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South Afr. J. Botany* 2009a; 75:122–127.
11. Bairu MW, Kulkarni MG, Street RA, Mulaudzi RB, Van Staden J. Studies on seed germination, seedling growth, and *in vitro* shoot induction of *Aloe ferox* Mill., a commercially important species. *HortScience* 2009b; 44: 751–756.
12. Bairu MW, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 2007; 90: 15–23.
13. Baker NR. Chlorophyll Fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol* 2008; 59: 89-113.
14. Baraldi R, Fasolo Fabbri Malavasi F, Predieri S, Castagneto M. Effect of potassium humate on apple cv. 'Golden Delicious' cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1991; 24: 187-191.

15. Barciszewski J, Rattan SIS, Siboska G, Clark BFC. Kinetin – 45 years on. *Plant Sci.* 1999; 148: 37-45.
16. Bartish IV, Korkhovoi VI. The composition of nutrient medium and the efficiency of shoot induction *in vitro* from apple leaf explants. *Russian J. Plant Physiol.* 1997; 44: 381-385.
17. Belaizi M, Paul H, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS. Direct organogenesis from intermodal segments of *in vitro* grown shoots of apple cv. Golden delicious. *Plant Cell Rep.* 1991; 9: 471-474.
18. Bolar JP, Norelli JL, Aldwinckle HS. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. *HortScience*, 1998; 33: 1251-1252.
19. Bolhàr-Nordenkamp HR, Long SP, Baker NR, Öquist G, Schreiber U, Lechner EG. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. *Funct. Ecol.* 1989; 3: 497–514.
20. Bommineni VR, Mathews H, Samuel SB, Kramer M, Wagner DR. A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. *HortScience* 2001; 36: 1102-1106.
21. Bordallo PN, Silva DH, Maria J, Cruz CD, Fontes EP. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. *Horticult. Brasil.* 2004; 22: 300-304.
22. Borges de Paiva Neto V, Campos Otoni W. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Sci. Hortic.* 2003; 97: 193-202.
23. Bulley SMW, James DJ. Regeneration and genetic transformation of apple (*Malus* spp.). In: Curtis IS (Ed.), *Transgenic Crops of the World: Essential Protocols*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2004. Chapter 15
24. Caboni E, Lauri P, D'Angeli S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Rep.* 2000b; 19: 755-760.
25. Caboni E, Lauri P, Damiano C, D'Angeli S. Somaclonal variation induced by adventitious shoot regeneration in pear and apple. *Acta Hort.* 2000a; 530: 195-201.
26. Caboni E, Tonelli M, Falasca G, Damiano C. Factors affecting adventitious shoot regeneration *in vitro* in the apple rootstock 'Jork 9'. *Adv. Hortic Sci.* 1996; 10: 146-150.
27. Caboni E, Tonelli MG. Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple. *Plant Cell Rep.* 1999; 18: 985-988.
28. Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol. Lett.* 2010; 32, 1199–1205.
29. Chu C-C, Wang C-C, Sun C-S, Hsu C, Yin K-C, Chu C-Y, Bi F-Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science China Mathematics* 1975; 18(5): 659-668.
30. Ciccoti AM, Bisognin C, Battocletti I, Salvadori A, Herdemertens M, Jarausch W. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agron. Res.* 2008; 6: 445-458.

31. Ciccoti AM, Bisognin C, Battocletti I, Salvadori A, Herdemertens M, Wallbrain M, Jarausch W. Micropropagation of *Malus sieboldii* hybrids resistant to apple proliferation disease. *Acta Hortic.* 2009; 839, 35-42
32. Cortleven A, Noben J-P, Valcke R. Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content. *Proteome Sci.* 2011; 9: 33.
33. Cui Y-Y, Hahn E-J, Kozai T, Paek K-Y. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 2000; 62: 219-226.
34. D'Angeli S, Lauri P, Dewitte W, Van Onckelen H, Caboni E. Factors affecting *in vitro* shoot formation from vegetative shoot apices of apple and relationship between organogenic response and cytokinin localisation. *Plant Biosyst.* 2001; 135: 95-100.
35. De Klerk G-J, Ter Brugge J, Marinova S. Toxicity of ethanol during proliferation and adventitious root formation in apple microcuttings *in vitro*. *Biol. Plant.* 1997; 39: 105-112.
36. De Klerk GJ. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 1990; 39: 129-144
37. Desjardins Y. Photosynthesis *in vitro* – on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Hortic.* 1995; 393: 45-61.
38. Dobránszki J. Cytokinins – importance, structure, effects *in vitro*. In: Dobránszki, J. (Ed.): Aromatic cytokinins applied exogenously in plant tissue culture. University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences, Research Institute of Nyíregyháza, Hungary, 2014; p.5-22.
39. 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 cytokinins and auxin. *Int. J. Hortic. Sci.* 2000b; 6: 36-39.
40. 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. *Int. J. Hortic. Sci.* 2000c; 6: 76-78.
41. Dobránszki J, Hudák I, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Galli Zs, Kiss E. Effects of different cytokinins on the shoot regeneration from apple leaves of 'Royal Gala' and 'M.26'. *Int. J. Hortic. Sci.* 2004; 10: 69-75,
42. Dobránszki J, Hudák I, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Galli Zs, Kiss E. How can different cytokinins influence the process of shoot regeneration from apple leaves in 'Royal Gala' and 'M26'. *Acta Hort.* 2006; 725:191-196.
43. Dobránszki J, Jámber-Benczúr E, Reményi ML, Magyar-Tábori K, Hudák I, Kiss E, Galli Z. 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'. *Int. J. Hortic. Sci.* 2005; 11(1): 41-46.
44. Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Jámber-Benczúr E, Kiss E, Lazányi J, Bubán T. Effect of conditioning apple shoots with *meta*-topolin on the morphogenic activity of *in vitro* leaves. *Acta Agron. Hung.* 2002; 50: 117-126.

45. Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Lazányi J, Bubán T, Szalai J. Influence of aromatic cytokinins on shoot multiplication and their post-effects on rooting of apple cv. Húsvéti rozmaring. Int. J. Hortic. Sci., 2000a; 6: 84-87.
46. Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Tombácz E. Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. Plant Biotech. Rep. 2011; 5(4): 345-352.
47. Dobránszki J, Teixeira da Silva JA. Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple. Sci. Hortic. 2011; 127: 460-463.
48. Dobránszki J, Teixeira da Silva JA. *In vitro* shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors. J. Hortic. Sci. Biotechn. 2013; 88(1): 60-66.
49. Dobránszki J, Teixeira da Silva JA. Micropropagation of apple - a review. Biotechnol. Adv. 2010; 28:462-488.
50. Driver JA, Kuniyuki AH. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Hortic. Sci. 1984; 19: 507-509.
51. Dufour M. Improving yield of adventitious shoots in apple. Acta Hortic. 1990; 280: 51-60.
52. Ďurkovič J, Mišalová A. Micropropagation of temperate noble hardwoods: An overview. Functional Plant Sci. Biotech. 2008; 2: 1-19.
53. Elliott RF. Axenic culture of shoot apices of apple. New Zealand J. Bot., 1972; 10: 254-258.
54. Famiani F, Ferradini N, Staffolani P, Standardi A. Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. J. Hortic. Sci. 1994; 69: 679-685.
55. Fasolo FMF, Predieri S. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. Acta Hortic. 1990; 280: 61-68.
56. Fasolo FMF, Zimmerman RH, Fordham I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. Plant Cell Tissue Org. Cult. 1989; 16: 75-87.
57. Felföldy L. A biológiai vízminőség. Budapest: Vízgazdálkodási Intézet; 1987; 141-148.
58. Ferradini N, Famiani F, Proietti P, Stanica F. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M.26 apple rootstock. J. Hortic. Sci. 1996; 71: 859-865.
59. Ferreira FJ, Kieber JJ. Cytokinin signalling. Current Opin.Plant Biol. 2005; 8: 518-525.
60. Gamage N, Nakanishi T. *In vitro* shoot regeneration from leaf tissue of apple (cultivar "Orine"): high shoot proliferation using carry over effect of TDZ. Acta Hortic. 2000; 520: 291-300.
61. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 1968; 50: 151-158.
62. Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I. Effect of cytokinins on Photosynthetic Pigments and Chlorophyllase Activity in *in vitro* Cultures of axillary Buds of *Dianthus caryophyllus* L. J. Plant Growth Regul. 1997; 16: 169-72.

63. George EF, Debergh PC. Micropropagation: Uses and Methods. In: Plant propagation by tissue culture. Eds. George EF, Hall MA, De Klerk G-J. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008. p. 29-64.
64. George EF. Indirect organogenesis from callus. In: Plant Propagation by Tissue Culture Part 2. In Practice. 2nd Edition. Exegetics Ltd., Edington, Wilts. England, 1996; p. 601-612.
65. George EF. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2008. p. 1-28.
66. Gercheva P, Andinova T, Ivanova K. Plant Regeneration from Leaf Tissues of Apple Cultivars Granny Smith, Morspur Golden and Starkrimson. Bulg. J. Agric. Sci. 2000; 6: 637-643.
67. Gibson SI. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. J. Exp. Bot. 2004; 55: 253-264.
68. Gomez-Leyva JF, Martinez Acosta LA, Lopez Muraira IG, Silos Espino H, Ramirez-Cervantes F, Andrade-Gonzalez I. Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. Int. J. Bot. 2008; 4: 326–330.
69. Grant NJ, Hammatt N. Increased shoot and root production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. Tree Physiol. 1999; 19: 899-903.
70. Hammerschlag FA. Somaclonal Variation. In: Hammerschlag FA and Litz RE, editors. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CAB International, Wallingford, 1996; p. 277-301.
71. Han XJ, Yang HQ, Duan KX, Zhang XR, Zhao HZ, You SZ, Jiang QQ. Sodium nitroprusside promotes multiplication and regeneration of *Malus hupehensis in vitro* plantlets. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2009; 96: 29-34.
72. Hanke V, Rohde A, Grafe C. Untersuchungen zur Regeneration an somatischen Gewebe *in vitro*. I. Zur Adventivsprossbildung an Blattexplantaten bei Apfel (*Malus domestica* Borkh). Studies on regeneration from somatic tissue *in vitro*. I. Adventitious shoot formation on leaf explants in apple (*Malus domestica* Borkh). Gartenbauwiss 1991; 56: 214-220.
73. Hazarika BN. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. Sci. Hortic. 2006; 108: 105-120.
74. Hdider, C, Desjardins Y. Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase efficiency by the presence of sucrose during the tissue culture of strawberry plantlets. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 1995; 31. 165–170.
75. Howell SH, Lall S, Che P. Cytokinins and shoot development. Trends Plant Sci. 2003; 8(9): 453-459.
76. Hudák I, Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Galli Zs, Kiss E. Effects of aromatic cytokinins on the organogenesis in apple. Book of Abstracts COST 843 Final Conference COST 843 and COST 851 Joint Meeting, June 28-July 3, 2005, Stará Lesná, Slovakia, 2005; p.82-84.

77. Huetteman CA, Preece JE. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1993; 33: 105-119.
78. Hwang I, Sakakibara H. Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiol. Plant.* 2006; 126: 528-538.
79. Jain SM. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 2001; 118: 153-166.
80. Jámbo-Benczúr E, Kissimon J, Fábián M, Mészáros A, Sinkó Z, Gazdag Gy, Nagy T. *In vitro* rooting and anatomical study of leaves and roots of *in vitro* and *ex vitro* plants of *Prunus x davidopersica* „Piroska”. *Int. J. Hortic. Sci.* 2001; 7: 1-5.
81. Jámborné Benczúr E. A mikroszaporítás szakaszai és módjai, In: Jámborné Benczúr E, Dobránszki J (szerk.). *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 2005; p. 60-75.
82. James DJ, Dandekar AM. Regeneration and transformation of apple (*Malus pumila* Mill.). *Plant Tissue Cult. Man.* 1991; B8: 1-18.
83. James DJ, Passey AJ, Rugini E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 1988; 132: 148-154.
84. Jeon MW, Ali MB, Hahn E-J, Paek KY. Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during *ex vitro* acclimatization of micropropagated CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. *Environ. Exper. Bot.* 2006; 55: 183-194.
85. Jones OP, Hopgood ME, O'Farrel D. Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstocks. *J. Hortic. Sci.* 1977; 52: 235-238.
86. Jones OP. Effect of benzyladenine on isolated apple shoots. *Nature* 1967; 215: 1514-1515.
87. Kakimoto T. Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* 2003, 116: 233-239.
88. Kamboj JS, Blake PS, Quinlan JD, Baker DA. Identification and quantitation by GC-MS of zeatin and zeatin riboside in xylem sap from rootstock and scion of grafted apple trees. *Plant Growth Regul.* 1999; 28: 199-205.
89. Kamínek M, Březinová A, Gaudinová A, Motyka V, Vaňková R, Zaáímalová E. Purine cytokinins: a proposal of abbreviations. *Plant Growth Regul.* 2000; 32: 253-256.
90. Karhu ST. Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1997; 122: 476-480.
91. Karhu ST. The quality of applied carbohydrates affects the axillary branching of apple microshoots. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 1995; 30: 21-27.
92. Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 1995; 85: 295-302.
93. Kausal N, Modgil M, Thakur M, Sharma DR. *In vitro* clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. *Indian J. Exp. Biol.* 2005; 43: 561-565.
94. Keulemans J, de Witte K. Plant regeneration from cotyledons and embryonic axes in apple: Sites of reaction and effect of pre-culture in the light. In: Schimdt H., Kellerhals, M (eds.): *Progress in Temperate Fruit Breeding*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1994; p. 371-375.

95. Kiss I, Fehér T, Jámbor-Benczúr E. Comparative anatomy of stems of *Hydrangea macrophylla* cv. Messalina *in vitro* and *in vivo*. Hortic. Sci. 1997; 29: 74-78.
96. Kiss I, Jámbor-Benczúr E, Fehér T, Csillag F. Anatomical characteristics of leaf surface and stomata of *Hydrangea* plants grown *in vitro*, *in vivo* and transplanted. Hortic. Sci. 1994; 26: 98-100.
97. Korban SS, O'Connor PA, Elobeidy A. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. J. Hortic. Sci. 1992; 67: 341-349.
98. Kovalchuk I, Lyudvikova Y, Volgina M, Reed BM. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2009; 96: 127-136.
99. Kozgar MI, Khan S. Induced mutagenesis in crop plants. Bioremed., Biodiv. Bioavail. 2012; 6 (special issue 1): 118.
100. Kubaláková M, Strnad M. The effects of aromatic cytokinins (populins) on micropropagation and regeneration of sugar beet *in vitro*. Biol. Plant. 1992; 34: 578-579.
101. Kubo M, Kakimoto T. The *CYTOKININ-HYPERSENSITIVE* genes of *Arabidopsis* negatively regulate the cytokinin-signaling pathway for cell division and chloroplast development. The Plant Journal 2000; 23:385-94.
102. Kulaeva ON, Burkhanova EA, Karavaiko NN, Selivankina SY, Porfirova SA, Maslova GG, Zemlyachenko YV, Börner T. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. J. Plant Physiol. 2002; 159: 1309-1316.
103. Lane WD, Looney NE. A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. Theor. Appl. Genet. 1982; 61, 219-223.
104. Lane WD, McDougald JM. Shoot tissue culture of apple: Comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. Can. J. Plant Sci. 1982; 62, 689-694.
105. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaklonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 1981; 60: 197-214.
106. Lászlóffy K, Abdul-Kader AM, Máthé Á. *In vitro* propagation of *Malus domestica* L. cv. 'Julyred' apple. Acta Hort. 1992; 300, 149-154.
107. Leonard NJ, Henderson TR. Purine ring rearrangements leading to the development of cytokinin activity. Mechanism of the rearrangement of 3-benzyladenine to N⁶-benzyladenine. J. Am. Chem. Soc. 1975; 97: 4990-4999.
108. Li RY, Murthy HN, Kim SK, Paek KY. CO₂-enrichment and photosynthetic photon flux affect the growth of *in vitro*-cultured apple plantlets. J. Plant Biol. 2001; 44: 87-91.
109. Li X, Xu M, Korban S. DNA methylation profiles differ between field- and *in vitro*-grown leaves of apple. J. Plant Physiol. 2002; 159: 1229-1234.
110. Lima-Nishimura N, Quoirin M, Naddaf YG, Wilhelm HM, Ribas LL, Sierakowski MR. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. Plant Cell Rep. 2002; 21: 402-407.

111. Linsmayer EM, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1965; 18: 100-127.
112. Litwińczuk W. Efficiency of a double-phase medium in micropropagation of semi-dwarf apple rootstocks M.26, MM.106 and P 14. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 2000; VIII: 97-106.
113. Liu J-H, Nada K, Kurosawa T, Ban Y, Moriguchi T. Potential regulation of apple *in vitro* shoot growth via modulation of cellular polyamine contents. *Sci. Hortic.* 2009; 119: 423-429.
114. Liu Q, Salih S, Hammerschlag F. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Rep.* 1998; 18: 32-36.
115. Lloyd G, McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmialatifolia* by use of shoot tip-culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 1981; 30: 421-427.
116. Loescher WH, Everard JD. Sugar alcohol metabolism in sinks and sources. In: Zamski E, Schaffer AA, editors. *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships*. Marcel Dekker, New York, 1996; p. 185-207.
117. Lucyszyn N, Quoirin M, Anjos A, Sierakowski MR. Blends of agar/galactomannan for Marubakaido apple rootstock shoot proliferation. *Polímeros Ciên. Tecnol.* 2005; 15: 146-150.
118. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Hudák I. Effect of cytokinin content of the regeneration media on *in vitro* rooting ability of adventitious apple shoots. *Sci. Hortic.* 2011; 129(4): 910-913.
119. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Hudák I. Factors affecting the rooting ability of *in vitro* apple shoots. *Hung. Agric. Res.* 2009; 18: 10-14.
120. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Jámor-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'. *Int. J. Hortic. Sci.* 2001b; 7: 26-29.
121. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Jámor-Benczúr E, Lazányi J. Role of cytokinins in shoot proliferation of apple *in vitro*. *Analele Universității din Oradea VII. Partea I Fascicula Agricultură Și Horticultură*, 2001a; 17-24.
122. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Jámor-Benczúr E. High *in vitro* shoot proliferation in the apple cultivar Jonagold induced by benzyladenine analogues. *Acta Agron. Hung.* 2002; 50: 191-195.
123. Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Teixeira da Silva JA, Bulley SM, Hudák I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 2010, 101(3): 251-267.
124. Magyar-Tábori, K., Fira, A. & Mandler-Drienyovszki N. Cytokinins and the activity of photosynthetic apparatus in plant tissue culture. In: Dobránszki, J. (Ed.): *Aromatic cytokinins applied exogenously in plant tissue culture*. University of Debrecen, Centre for Agricultural Sciences, Research Institute of Nyíregyháza, Hungary, 2014; p.50-69.

125. Malabadi RB, Teixeira da Silva JA. Thin cell layers: application to forestry biotechnology. In: Rao MNV, Soneji J (eds) Focus on Tree Micropropagation. Tree and Forestry Science and Biotechnology 2011; 5(Special Issue 1): 14-18.
126. Marin JA, Jones OP, Hadlow WCC. Micropropagation of columnar apple trees. J. Hortic. Sci. 1993; 68: 289-297.
127. Martin KP, Pachathundikandi SK, Zhang CL, Slater A, Madassery J. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Pant 2006; 42: 188-192.
128. Masuda T, Bessho H, Komori S, Tsuchiya S. Studies on cell culture and plant regeneration in apple. II. Adventitious shoot formation from the roots of intact micropropagated plantlets. Bulletin of the Fruit Research Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Series C (Morioka). 1988; 15: 13-19.
129. Matsubara S. Structure-activity relationships of cytokinins. Phytochemistry 1980; 19: 2239-2253.
130. McAdam-O Connell D, Mac An tSaoir S, Copeland R. Development of leaf disk regeneration system for 'Bramley's' seedling apple (*Malus x domestica* Borkh.). Acta Hortic. 2004; 663: 483-486.
131. McMeans O, Skirvin RM, Otterbacher A, Mitiku G. Assessment of tissue culture-derived 'Gala' and 'Royal Gala' apples (*Malus x domestica* Borkh.) for somaclonal variation. Euphytica 1998; 103: 251-257.
132. Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Van Saltza MH, Strong FM. Structure and synthesis of kinetin. J. Am. Chem. Soc. 1955a; 78: 2662-2663.
133. Miller CO, Skoog F, Van Saltza MH, Strong FM. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc. 1955b; 77: 1329-1334.
134. Modgil M, Handa R, Sharma DR, Thakur M. High efficiency shoot regeneration from leaf explants of in vitro grown shoots of apple. Acta Hortic. 2005b; 696: 123-128.
135. Modgil M, Mahajan K, Chakrabarti SK, Sharma DR, Sobti RC. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. Sci. Hortic. 2005a; 104: 151-160.
136. Modgil M, Sharma DR, Bhardwaj SV. Micropropagation of apple cv. Tydeman Early Worcester. Sci. Hortic. 1999; 81: 179-188.
137. Mok DW, Mok MC. Cytokinin metabolism and action. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001; 52: 89-118.
138. Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ. Differential cytokinin structure-activity relationships in *Phaseolus*. Plant Physiol. 1978; 61: 72-75.
139. Montecelli S, Gentile A, Damiano C. *In vitro* shoot regeneration of apple cultivar Gala. Acta Hortic. 2000; 530: 219-223.
140. Mouhtaridou GN, Sotiropoulos TE, Dimassi KN, Therios IN. Effects of boron on growth, and chlorophyll and mineral contents of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *in vitro*. Biol. Plant. 2004; 48, 617-619.

141. Moyo M, Finnie JF, Van Staden J. Recalcitrant effects associated with the development of basal callus-like tissue on caulogenesis and rhizogenesis in *Sclerocarya birrea*. Plant Growth Regul. 2011; 63: 187–195.
142. Muleo R, Morini S. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM 106 apple genotype in *in vitro* culture. Sci. Hortic. 2006; 108: 364-370.
143. Muleo R, Morini S. Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstock growing *in vitro*. J. Plant Physiol. 2008; 165: 1838-1846.
144. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 1962; 15: 473-497.
145. Nabeela AB, Darkazanli K, Abdul-Kader AM. Direct organogenesis and plantlet multiplication from leaf explants of *in vitro*-grown shoots of apple (*Malus domestica* Borkh.) cv. ‘Golden Delicious’ and MM111 rootstock. Fruit, Vegetable Cereal Sci. Biotech. 2009; 3: 28-34.
146. Niedz RP, Evens TJ (2010) The effects of benzyladenine and metatopolin on *in vitro* shoot regeneration of a *Citrus citrandarin* rootstock. Res. J. Agricult. Biol. Sci. 2010; 6: 45–53.
147. Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R. Transport of polyols in higher plants. Plant Physiol. Biochem. 2001; 39: 717-728.
148. Noiton D, Vine JH, Mullins MG. Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in micro-cuttings of ‘Jonathan’ apple. Plant Growth Regul. 1992; 11: 377-383.
149. Ongjanov V. Regeneracija biljaka jabuke kulturom lista *in vitro*. Regeneration of apple plants by *in vitro* leaf culture. Jugosl. Vocar. 1988; 22: 423-426.
150. Orlikowska T, Zawadzka M, Kucharska D, Lahuta LB. The influence of the cooling of donor cultures on the *in vitro* adventitious regeneration and carbohydrate metabolism of four dwarfing apple rootstocks. Acta Phys. Plant. 2010; 32: 333-340.
151. Ou CQ, Li LG, He P, Zhang ZH. *In vitro* adventitious shoot regeneration and induction of tetraploid from leaves of Hanfu apple. J. Fruit Sci. 2008; 25: 293-297.
152. Palavan-Ünsal N, Çağ S, Çetin E. The role of meta-topolin in senescence of wheat leaf segments. J. Cellul. Mol. Biol. 2004; 3: 23–31.
153. Pamplin, E.J., Chapman, J.M. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue cultures. J. Exp. Bot. 1975; 26: 212-220.
154. Patat-Ochatt EM, Ochatt SJ, Power JB. Plant regeneration from protoplasts of apple rootstocks and scion varieties (*Malus domestica* Borkh.) J. Plant Physiol. 1988; 133: 461-465.
155. Pathak, H. Dhawan, V. Molecular analysis of micropropagated apple rootstock mm111 using issr markers for ascertaining clonal fidelity. Acta Hort. (ISHS) 2010; 865: 73-80.
156. Pawlicki N, Welander M. Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. J. Hortic. Sci. 1994; 69: 687-696.

157. Pierik RLM. Commercial aspects of micropropagation. In: Prakash J, Pierik RLM, editors. Horticulture – New Technologies and Applications. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 1991; p. 141-153.
158. Podwyszynska M, Wojtania A, Gabryszewska E. Application of m-topolin for plant micropropagation. Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa 2000; 7: 173-180.
159. Pontaroli AC, Camadro EL. Plant regeneration after long term callus culture in clones of *Asparagus officinalis* L. Biocell. 2005; 29: 313-317.
160. Predieri S, Fasolo FFM. High frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M 26 (*Malus pumila* Mill.). Plant Cell Tissue Org. Cult. 1989; 17: 133-142.
161. Predieri S, Infante R, Fasolo F, Righetti B. CO₂ enrichment effect on *in vitro* grown apple and kiwifruit. Acta Hort. 1991; 300: 107-110.
162. Premkumar A., Mercado JA, Quesada MA. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. J. Plant Physiol. 2001; 158: 835-840.
163. Pua E-C, Chong C. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta* No.5. Can. J. Bot. 1984; 62: 1545-1549.
164. Pua E-C, Chong C. Regulation of *in vitro* shoot and root regeneration in 'Macspur' apple by sorbitol (D-glucitol) and related carbon sources. J. Am. Soc. Hort. Sci. 1985; 110: 705-709.
165. Qin L, Li M, Wang Y-X, Han L-X, Huang Z-G, Zhao G-R. Effects of different cytokinins on leaves *in vitro* regeneration of Fuji 2001 apple variety. J. Fruit Sci. 2002; 19: 215-218.
166. Quorin M., Lepoivre, P. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hort. 1977; 78: 437-442.
167. Reinert J, Backs D. Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. Nature 1968; 220: 1340-1341.
168. Rijavec T, Dermastia M. Cytokinins and their function in developing seeds. Acta Chim. Slov. 2010; 57: 617-629.
169. Roháček K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. Photosynthetica 2002; 40:13-29.
170. Rout GR, Das P, Goel S, Raine SN. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Bot. Bull. Acad. Sinica 1998; 39: 23-37.
171. Rustae M, Nazeri S, Ghadimzadeh M, Malboobi MA. Optimizing *in vitro* regeneration from Iranian native dwarf rootstocks of apple (*Malus domestica* Borkh.). Int. J. Agri. Biol. 2007; 9: 775-778.
172. Sáenz L, Jones LH, Oropeza C, Vlácil D, Strnad M. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). Plant Growth Regul. 2003; 39: 205–215.

173. Sáez PL, Bravo LA, Sáez KL, Sánchez-Olate M, Latsague MI, Ríos DG. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between *in vitro* and nursery plants. Biol. Plant. 2012; 56: 15–24.
174. Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamiya Y, Yamaya T, Yamaguchi S. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. Proc. Nation. Acad. Sci. USA. 2005; 102: 9972-9977.
175. Sakakibara H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. Ann. Rev. Plant Biol. 2006; 57: 431-449.
176. Salvi ND, George L, Eapen S. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2002; 68:143–151.
177. Sarwar M, Skirvin RM. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus X domestica* Borkh.) *in vitro*. Sci. Hortic. 1997; 68: 95-100.
178. Schaefer S, Medeiro SA, Ramírez JA, Galagovsky LR, Pereira-Netto AB. Brassinosteroid-driven enhancement of the *in vitro* multiplication rate for the marubakaido apple rootstock [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.]. Plant Cell Rep. 2002; 20: 1093-1097.
179. Schmidt G, Waldemaier S. Histological studies on *in vitro* and *ex vitro* leaves during the adaptation phase of *Rhododendron* „Pink Pearl“. Acta Agron. Hung. 1992; 42: 11-21.
180. Schmülling T, Schäfer S, Romanov G. Cytokinin as regulators of gene expression. Physiol. Plant. 1997; 100: 505-519.
181. Schmülling T. Cytokinin. In: Encyclopedia of Biological Chemistry (Eds. Lennarz, W and Lane MD). Academic Press/Elsevier Science. 2004; p.1-7.
182. Sedira M, Welander M, Geier T. Influence of IBA and aphidicolin on DNA synthesis and adventitious root regeneration from *Malus* 'Jork 9' stem discs. Plant Cell Rep. 2007; 26: 539-545.
183. Sharma M, Modgil M, Sharma DR. Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. Indian J. Exp. Biol. 2000; 38: 1236-1240.
184. Sharma S, Shahzad A, Teixeira da Silva JA. Synseed technology - A complete synthesis. Biotechnol. Adv. 2013; 31: 186-207.
185. Šiler B, Mišić D, Filipović B, Popović Z, Cvetić T, Mijović A. Effects of salinity on *in vitro* growth and photosynthesis of common centaury (*Centaureum erythrae* Rafn.) Arch. Bio. Sci. Belgrade 2007; 59(2): 129-134.
186. Snir I, Erez A. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. HortScience 1980; 15: 597-598.
187. Son SH, Moon HK, Hall RB. Somaclonal variation in plants regenerated from callus culture of hybrid aspen (*Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx.). Plant Sci. 1993; 90: 89-94.
188. Sotiropoulos TE, Molassiotis AN, Mouhteridou GI, Papadakis I, Dimassi KN, Therios IN, Diamantidis G. Sucrose and sorbitol effects on shoot growth and proliferation *in vitro*,

- nutritional status and peroxidase and catalase isoenzymes of M 9 and MM 106 (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *Europ. J. Hortic. Sci.* 2006; 71: 114-119.
189. Sriskandarajah S, Goodwin P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1998; 53: 1-11.
 190. Sriskandarajah S, Skirvin RM, Abu-Qaoud H, Korban SS. Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 1990; 65: 113-121.
 191. Staba EJ. Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. In: Seikel MK, Runeckles VC, editors. *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 2. Appleton-Century Crofts, New York, 1969; p. 75-102.
 192. Standardi A, Houshmand D. Effects of culture age and time of explant excision on *in vitro* shoot regeneration in an apple cultivar and apple rootstocks. *Agric. Mediterr.* 1992; 122: 85-89.
 193. Strnad M, Hanuš J, Vaňek T, Kamínek M, Ballantine JA, Fussell B, Hanke DE. *Meta-topolin*, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. Robusta) *Phytochemistry* 1997; 45(2): 213-218.
 194. Strnad M. Enzyme immunoassays of N⁶-benzyladenine and N⁶-(*meta*-hydroxybenzyl)adenine cytokinins. *J. Plant Growth Regul.* 1996; 15: 179-188.
 195. Sugiyama M. Organogenesis *in vitro*. *Current Opin. Plant Biol.* 1999; 2: 61-64.
 196. Swartz HJ, Bors R, Mohamed F, Naess SK. The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1990; 21: 179-184.
 197. Synková H, Van Loven K, Pospíšilová J, Valcke R. Photosynthesis of transgenic *pssu-ipt* tobacco. *J. Plant Physiol.* 1999; 155: 173-182.
 198. Tantos Á, Mészáros A, Farkas T, Szalai J, Horváth G. Triacntanol-supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Rep.* 2001; 20: 16-21.
 199. Teixeira da Silva JA. Effective and comprehensive chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflora*) regeneration and transformation protocols. *Biotechnology* 2005; 4: 94-107.
 200. Teixeira da Silva JA. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 2013; 113: 149-161.
 201. Teixeira da Silva JA, Chin DP, Van PT, Mii M. Transgenic orchids. *Sci. Hortic.* 2011; 130: 673-680.
 202. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. The Plant Growth Correction Factor. I the hypothetical and Philosophical Basis. *Int. J. Plant Develop. Biol.* 2011; 5:73-74.
 203. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. *J Plant Growth Regul.* 2013a; 32: 922-943.
 204. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J. How Timing of Sampling Can Affect the Outcome of the Quantitative Assessment of Plant Organogenesis *Sci. Hortic.* 2013b; 159:59-66.
 205. 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. J. Plant Growth Regul. 2014; 33: 881-895.
206. Teixeira da Silva JA, Tanaka M. Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). J. Plant Growth Regul. 2006; 25: 203-210.
 207. Teixeira da Silva JA, Tanaka M. Thin Cell Layers: The Technique. In: Davey M, Anthony P (eds.), Plant Cell Culture: Methods Express. Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 2010; Chapter 2: 25-37.
 208. Teixeira da Silva JA, Tanaka M. Optimization of particle bombardment conditions for hybrid *Cymbidium*: Part II. Transgenic Plant J. 2011; 5:78-82.
 209. Theiler-Hedtrich C, Theiler-Hedtrich R. Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. Acta Hort. 1990; 280: 195-199.
 210. Thorpe T, Stasolla C, Yeung EC, De Klerk G-J, Roberts A, George EF. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2008; p. 115-73
 211. Tran Thanh Van M. Thin cell layer concept. In: Nhut DT, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T. (Eds.) Thin cell layer culture system: Regeneration and transformation applications. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 2003; p. 1-16.
 212. Tran Thanh Van M. *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. Nature 1973; 246: 44-45.
 213. Triques K, Rival A, Beulé T, Puard M, Roy J, Nato A, Lavergne D, Havaux M, Verdeil J-L, Sangare A, Hamon S. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. Plant Sci. 1997; 127: 39-51.
 214. Van Huylenbroeck JM, Piqueras A, Debergh PC. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. Plant Sci. 1998; 134: 21-30.
 215. Van Nieuwkerk JP, Zimmerman RH, Fordham I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. HortScience 1986; 21: 516-518.
 216. Van Staden J, Zazimalova E, George EF. Plant growth regulators II: Cytokinins, their Analogues and Inhibitors. In: Plant propagation by tissue culture. Eds. George EF, Hall MA, De Klerk G-J. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008; p. 205-226.
 217. Vargha, A., 2007. A ROPstat statisztikai menürendszer.
http://www.ropstat.com/download/rop_hun_stat.doc
 218. Vasil IK, Vasil V. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 1972; 8: 117-125.
 219. Veilleux RE, Johnson AAT. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation, interaction, and utilization. Plant Breed. Rev. 1998; 16: 229-268.
 220. Verdeil J-L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? Trends Plant Sci. 2007; 12: 245-252.

221. Walkey DG. Production of apple plantlets from axillary-bud meristem. Can. J. Plant Sci. 1972; 52: 1085-1087.
222. Wang PJ, Charles A. Micropropagation through meristem culture. In: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. Springer, Berlin, 1991; p. 32-53.
223. Wang Q, Tang H, Quan Y, Zhou G. Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. J. Hortic. Sci. 1994; 69: 833-839.
224. Ward SP, Leyser O. Shoot branching. Current Opin. Plant Biol. 2004; 7: 73-78.
225. Webster CA, Jones OP. Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. J. Hortic. Sci. 1991; 66: 1-6.
226. Webster CA, Jones OP. Micropropagation of apple rootstock M9: Effect of sustained subculture on apparent rejuvenization *in vitro*. J. Hortic. Sci., 1989; 64: 421-428.
227. Welander M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. J. Plant Physiol. 1988; 132: 738-744.
228. Welander M, Maheswaran G. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. J. Plant Physiol. 1992; 140: 223-222.
229. Welander M. *In vitro* shoot and root formation in the apple cultivar Åkerö. Ann. Bot. 1985; 55: 249-261.
230. Welander M. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. J. Hortic. Sci. 1989; 64: 361-366.
231. Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen HA, Debergh PC. *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? Physiol. Plant. 1996; 98: 291-297.
232. Werner EM, Boe AA. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. HortSci. 1980; 15: 509-510.
233. Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T. Regulation of plant growth by cytokinin 2001. PNAS 98(18): 10487-10492. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.171304098
234. Wojtania A, Gabryszewska E. Effect of cytokinins and amino acids on multiplication of *Pelargonium* cultivars. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 2001; 70(3): 203-207.
235. Wojtania A. Effect of meta-topolin on *in vitro* propagation of *Pelargonium X hortorum* and *Pelargonium X hederæfolium* cultivars. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 2010; 79:101–106.
236. Xie, Z., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q. & Cao, W. Effects of exogenous ABA and cytokinin on leaf photosynthesis and grain protein accumulation in wheat ears cultured *in vitro*. Plant Growth Regul. 2004; 44: 25-32.
237. Yang S-H, Yeh D-M. *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviours and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. Plant Cell Tissue Org. Cult. 2008; 93: 201-207.
238. Yancheva SD, Golubowicz S, Fisher E, Lev-Yadun S, Flaishman MA. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. Plant Sci. 2003; 165: 299-309.

239. Yepes LM, Aldwinckle HS. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regul.* 1994a; 15: 55-67.
240. Yepes LM, Aldwinckle HS. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1994b; 37: 257-269.
241. Yue D, Desjardins Y, Lamarre M, Gosselin A. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. *Sci. Hortic.* 1992; 49: 9-16.
242. Zaid S, Soulaïman M, Abdul-Kader A. *In vitro* propagation of three apple rootstocks. *Damascus Uni. J. Basic Sci.* 2000; 16(2): 63-78.
243. Zanandra I, Bacarin MA, Schmitz DD, Braga EJB, Peters JA. Chlorophyll fluorescence in *in vitro* cultivated apple. *R Bras Agrociência Pelotas* 2006; 12:305-8.
244. Zhou R, Cheng L, Dandekar AM. Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *J. Exp. Bot.* 2006; 57: 3647-3657.
245. Zimmerman RH, Fordham IM. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1985; 110: 34-38.
246. Ziv M, Chen J. The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd edn. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2008; p. 465-477.
247. Zobayed SMA, Armstrong J, Armstrong W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Sci.* 2001; 161: 537-548.

8. 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 közöltük.

Szeretném megköszönni a több évre visszanyúló együttműködést, a folyamatos szakmai és emberi támogatást Dr. Heszký 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 Már földiné Gyurján Zsuzsannának a steril laboratóriumi munkák, Dr. Hudák Ildikónak és Magyar né 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 Gyümölcsstermő 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 Gyümölcsstermő Kutató és Szaktanácsadó Kht. kutatóinak, Dr. Bubán Tamásnak és Dr.

dc_935_14

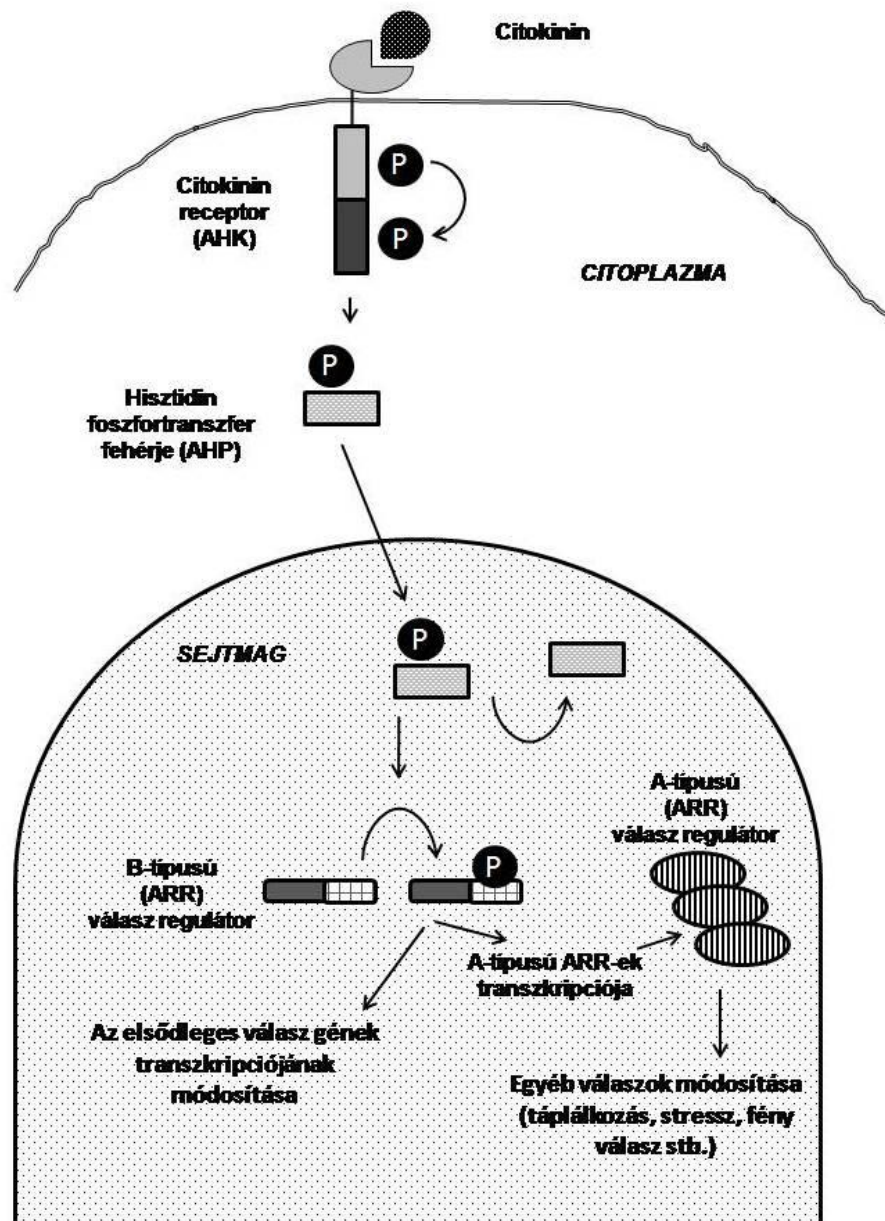
Szabó Tibornak, akikkel almakutatás témakörben az évek során együtt dolgozhattam. Köszönöm Dr. Ferenczy Antalnak (BCE Biometria és Agrárinformatika) a hasznos konzultációkat és segítséget a biometria értékelés témakörében.

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.

dc_935_14

MELLÉKLETEK



A növények citokinin jelátvittele többlépéses foszforátvitellel (P),
 Schmülling (2004), Ferreira és Kieber (2005), Hwang és Sakikabara (2006) és Rijavec és
 Dermastia (2010) munkái nyomán.
 (Dobránszki, 2014)

A Geometriai faktor (GF) kiszámítása különböző alakú explantátumok esetén, ha a regeneráció csak az epidermális/szubepidermális szövettájából indul ki (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2014 alapján)

1. Henger alakú tTCL explantátum és gömb/félgömb alakú konvencionális explantátum

összehasonlítása

$$GF_{tTCL} = \frac{\frac{A_{tTCL,epid}}{V_{tTCL}}}{\frac{A_{conv,epid}}{V_{conv}}} = \frac{\frac{2\pi r_{tTCL} h}{r_{tTCL}^2 \pi h}}{\frac{2\pi r_{conv}^2}{2\pi r_{conv}^3}} = \dots = \frac{2}{3} \frac{r_{conv}}{r_{tTCL}}$$

A GF értéke csak az explantátumok sugarainak hányadosától függ. A GF ezzel a képlettel mindig kiszámítható, ha

- (1) az egyik (konvencionális) explantátum gömb/félgömb alakú,
 - (2) a másik (tTCL) explantátum henger, vagy korong alakú,
- és fenntartva az eredeti feltételt, hogy a regeneráció csak az epidermális/szubepidermális szövettájából indul ki.

2. Téglalap alapú hasáb alakú ITCL explantátum és gömb/félgömb alakú konvencionális explantátum

összehasonlítása

$$GF_{ITCL} = \frac{\frac{A_{ITCL,epid}}{V_{ITCL}}}{\frac{A_{conv,epid}}{V_{conv}}} = \frac{\frac{lw}{2\pi r_{ITCL}^2}}{\frac{2\pi r_{conv}^2}{2\pi r_{conv}^3}} = \dots = \frac{r_{conv}}{3h_{ITCL}}$$

A GF értéke az ITCL explantátum vastagságától és a konvencionális explantátum sugarától függ. A GF ezzel a képlettel mindig kiszámítható, ha az ITCL explantátumot félgömb alakú konvencionális explantátumból preparáltuk, fenntartva az eredeti feltételt, hogy a regeneráció csak az epidermális/szubepidermális szövettájából indul ki.

3. Henger alakú tTCL explanátum és félhenger alakú konvencionális explantátum összehasonlítása

Mivel mind a tTCL, mind a konvencionális explantátum esetén:

$$\frac{A_{\text{tTCL,epid}}}{V_{\text{tTCL}}} = \frac{2\pi r h_{\text{tTCL}}}{r^2 \pi h_{\text{tTCL}}} = \frac{2}{r} \quad \text{és} \quad \frac{A_{\text{conv,epid}}}{V_{\text{conv}}} = \frac{\pi r h_{\text{conv}}}{\frac{r^2 \pi h_{\text{conv}}}{2}} = \frac{2}{r}, \text{ ezért a GF számításakor csak az}$$

epidermális felületeket vesszük figyelembe:

$$GF_{\text{tTCL}} = \frac{A_{\text{tTCL,epid}}}{A_{\text{conv,epid}}} = \frac{2\pi r h_{\text{tTCL}}}{\pi r h_{\text{conv}}} = \dots = \frac{2 h_{\text{tTCL}}}{h_{\text{conv}}}$$

A GF értéke az explantátumok hosszától (h_{conv} , h_{tTCL}) függ. A GF ezzel a képlettel mindig kiszámítható, ha

(1) az egyik (konvencionális) explantátum félhenger alakú,

(2) a másik (tTCL) explantátum korong alakú, és sugara megegyezik a konvencionális félhenger alakú explantátum sugarával,

valamint fenntartva az eredeti feltételt, hogy a regeneráció csak az epidermális/szubepidermális szövettájakból indul ki.

4. Téglalap alapú hasáb alakú ITCL explanátum és félhenger alakú konvencionális explantátum összehasonlítása

$$GF_{\text{ITCL}} = \frac{\frac{A_{\text{ITCL,epid}}}{V_{\text{ITCL}}}}{\frac{A_{\text{conv,epid}}}{V_{\text{conv}}}} = \frac{\frac{l w}{l w h_{\text{ITCL}}}}{\frac{\pi r h_{\text{conv}}}{\frac{r^2 \pi h_{\text{conv}}}{2}}} = \dots = \frac{r}{2 h_{\text{ITCL}}}$$

A GF értéke az ITCLz explantátum vastagságától és a konvencionális explantátum sugarától függ. A GF ezzel a képlettel mindig kiszámítható, ha az ITCL explantátumot félhenger alakú konvencionális explantátumból preparáltuk, fenntartva az eredeti feltételt, hogy a regeneráció csak az epidermális/szubepidermális szövettájakból indul ki.