

## Mintavétel növényi sejt-, szövet- és szervtenyészetekből

TÓTH ENDRE KRISTÓF<sup>1</sup>, KRISTON ÉVA<sup>2</sup>, JÓZSA SÁNDOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MTA ATK Növényvédelmi Intézet

<sup>2</sup>NÉBIH, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság,  
Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratórium

<sup>3</sup>Pannon Egyetem, Georgikon Kar

E-mail: toth.endre@agrar.mta.hu

### Összefoglaló

Növényi sejt-, szövet- és szervtenyészetekből számos ok miatt lehet szükség mintavételre. Írásunkban áttekintjük a mintavételezések leggyakoribb okait, módszereit, a minták méreteit és a hozzájuk tartozó mérési eredmények szórását, értelmezéseit.

1. Mintavétel táptalajból. Mérhetjük valamely táptalajalkotó fogyását, az autoklávozás, vagy a fény hatására bekövetkező bomlásokat, vagy valamely növényi exudátum kiválasztását, stb.
2. Mintavétel *in vitro* növényből diagnosztikai célból. Különös figyelmet kell fordítani az egyes diagnosztikai módszerek (ELISA, PCR, bioteszt) érzékenységre, valamint a vizsgálandó vírus, viroid vagy fitoplazma szöveti koncentrációjára.
3. A polimeráz láncreakcióhoz kapcsolható vizsgálati módszerek (PCR, RT-PCR, IC-PCR) érzékenysége javítható az *in vitro* kultúrába vitt növények vizsgálatával a kisebb inhibitor-hatás, valamint az esetleg zavaró egyéb organizmusok hiánya miatt.
4. Mintavétel biokémiai mérés elvégzése érdekében. Esetről esetre kell megfontolni, hogy az összehasonlításokat friss súlyra, vagy a minta szárazanyagára vonatkoztatjuk-e.
5. Mintavétel kallusból, szuszpenziós kultúrából, növekedési görbe felállítása érdekében.
6. Mintavétel sterilitás ellenőrzési céllal, amely megfeleltethető a mikrobiológiai mintavételeknek.
7. Mintavétel termékforgalmazási céllal. Azokban az esetekben, amikor nagy mennyiségű *in vitro*, vagy *ex vitro* növényanyagot készítünk elő szállításra, akkor nincs lehetőség a teljes tétel megszámlálására. Ilyenkor termésbecslésre kényyszerülünk. Bemutatunk egy lehetséges matematikai statisztikai formulát a megfelelő mintaszám nagy biztonságú kiválasztására. Az ilyen, számítással kapott mintaszám nem egyezik meg a különböző országok növényvédelmi hatóságai által adott növényfaj esetében megkövetelt és a károsító tesztlékekhez felhasználandó mintaszámmal.

**Kulcsszavak:** mintavétel, növényi szövettenyésztés, vírusmentesítés, relatív szórás, alsó becslés

## Bevezetés

Mindenki, aki természettudományos kísérleteket, vagy technológiafejlesztést végez, szükségszerűen szabályos mintavételezésekre kényszerül. A mintavételezések, mérések minden esetben hibákkal terhelték, amelyek matematikai módszerekkel megfelelően feltárhatók, hatásuk kiküszöbölhető. A különféle szaktudományok művelői egyre gyakrabban hangsúlyozzák e módszerek fontosságát. Például Lippi et al. (2006) megállapítását idézzük, mely szerint a humán orvoslásban a laboratóriumi mérési eredmények akár 70%-ban is befolyásolhatják a kórismézést. Jelen dolgozatunkban megkíséreljük összefoglalni a növényi sejt-, szövet, és szervtenyésztés területéhez kapcsolódó mintavételezések jellegzetességeit.

### 1. Mintavétel a táptalajból

A steril *in vitro* kultúrák táptalajaiból bármikor vehetünk mintát a növényi részek friss táptalajra helyezésétől kezdve, egészen a következő passzálságig. A mintavételek gyakoriságát a feladat jellege és a mérési kapacitás dönti el. Egy hat hétig táptalajon maradó kultúránál általában elegendő hetente mintát venni, finomabb méréseknél lehet akár naponta is. Mérhetjük valamely táptalajalkotó fogyását, vagy egy adott vegyületnek az autoklávozás vagy a fény hatására bekövetkező bomlását, valamely növényi exudátum mennyiségét, stb. Általában a mintavétel azonos edényekből történik steril körülmények között. Valamennyi mintavételezést legalább négy ismétlésben végezzük. Folyékony táptalajból könnyebb homogén mintát venni, mint az agarral szilárdított táptalajokból. A folyékony tápközegből egyszerűen vehetünk mintát steril körülmények között steril, szűrős pipettahegy, vagy steril üvegpipetta alkalmazásával. Kis térfogatú minták vételekor nincs szükség korrekciókra (pl. 100 mikroliteres minta a névlegesen 100 ml-nyi tápközegből). Ha a minta jelentősebb térfogatú, akkor szükség van a megmért táptalajalkotókat visszapótolni steril körülmények között, különben a változásokról torz adatokat kapunk. Ennek viszont az a hátránya, hogy a rendszeres mintavétel, majd visszapótlás megnöveli a fertőződés veszélyét. Agarral, vagy más módon gélesített táptalajban az esetenként lassú diffúzió miatt a növény közelében más lehet a mérendő anyag koncentrációja, mint a növénytől távolabbi részekben. Amennyiben agarral szilárdított táptalajból szeretnénk mérni, célszerűbb a nevelőedényekből random módon választani, majd a teljesen növénymentessé tett táptalajt homogenizálni és mintázni.

A különféle mintavételezések tervezésekor tehát dönthetünk úgy is, hogy a mintákat a különféle kezelések nevelőedényeinek sokaságából véletlenszerűen választjuk ki és a célnak megfelelően feldolgozzuk azok tartalmát. A mindig ugyanazon edényekből történő mintavételezés és a véletlenszerűen kiválasztott edények mérési eredményesorában nagy különbségek lehetnek, különösen, ami a kísérleti szórást illeti.

### 2. Mintavétel *in vitro* növényből diagnosztikai célból, immundiagnosztikai módszerek alkalmazása esetén

Mindenekelőtt meg kell ismernünk az alkalmazandó diagnosztikai módszerek érzékenységét, valamint a vizsgálandó vírus várható szöveti koncentrációját. Ismeretes, hogy a leggyakrabban alkalmazott immunológiai tesztrendszer, az ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) érzékenységhatára általában 1 ng/ml vírusfehérje. Alapos szakmai előbírálattal szükséges annak eldöntésére, hogy az *in vitro* növényeinket érdemes-e ELISA-val tesztelni, s ha igen, az milyen megbízhatóságú.

Ritkán az *in vitro* növények tesztelése megközelíti a hagyományos termőhelyről származó növények vizsgálatának érzékenységét. Gyakoribb az, amikor nem. Ilyenkor dönthetünk úgy, hogy nem alkalmazzuk az *in vitro* növények tesztelését, vagy pedig csak előszűrőként értelmezzük a kapott adatokat. A döntésnél figyelembe kell venni az alábbi körülményeket is:

Merisztéma eredetű-e a kultúra? A szegfű foltosság vírus (carnation mottle carmovirus, CarMV) példája jól szemlélteti ennek fontosságát. E vírus jó immunogén és nagy szöveti koncentrációt ér el az üvegházi és szabadföldi szegfű növényekben. Merisztéma eredetű kultúrában – amennyiben nem sikerül a merisztémát úgy kioperálni, hogy az valóban vírusmentes legyen – a regenerálódó növényekből még hosszú ideig (hetekig) nem lehet kimutatni a vírust szerológiai módszerekkel, ugyanakkor indikátornövényvel (*Chenopodium amaranticolor* L.) tesztelve nagy, klorotikus foltokat kapunk. Régebben ezt a változatot (nem szerencsés kifejezéssel) „attenuated form”-nak nevezték (Hollings és Stone 1962). Valójában nincs szó új vírusváltozatról, csak a köpenyfehérje mennyisége lassan éri el a kimutathatósági szintet. E megfontolás alapján érdemes azzal is számolni, hogy a növényünk mennyi ideje van *in vitro* körülmények között? Az is lényeges, hogy milyen hőfokon tartjuk a kultúrát. Noha az *in vitro* növényeken gyakran nem látszanak tünetek, a vírusszintézis üteme jelentős lehet, amely függ az adott gazda-parazita kapcsolattól, a táptalaj összetételétől és a hőmérséklettől.

Hogyan vegyük a mintát? Egyszerű esetben, amikor például egy vírustörzset *in vitro* növényen tartunk fenn (általában) látható tünetekkel, akkor elegendő egy steril csipesszel véletlenszerűen lecsipenteni egy - *in vitro* értelemben vett - középkorú levelet. Tömegmérés után rögtön használhatjuk akár inokulációra, akár pozitív kontrollnak. Minősített esetben (pl. merisztéma eredetű növények előtesztelésekor) viszont célzottan levélemeletenként és oldalanként kell különböző korú leveleket nyernünk, úgy, hogy az egyedből reprezentatív mintát kapjunk. Amennyiben egy nevelőedényben több, eredetileg külön-külön steril kultúrába vitt növényke helyezkedik el, akkor valamennyi egyed mintázva átlagmintát képzünk és egyesítve homogenizáljuk azt.

Lényeges, hogy mely víruscsoportba tartozó vírust szeretnénk ELISA-val vizsgálni. Jól vizsgálható víruscsoportok pl. TOBAMO (pl. dohány mozaik vírus, Odontoglossum gyűrűsfoltosság vírus, Obuda pepper virus, stb.), vagy a POTEX (pl. Cymbidium mosaic virus, burgonya X vírus, hortenzia gyűrűsfoltosság vírus, stb.). A víruscsoportok tagjainak többségét nem, vagy csak előszűrőként érdemes ELISA-val vizsgálni. Esetenként spontán kórokozó eliminálódás is előfordulhat egyes hajtáskultúrákban. Megfigyeléseink szerint ilyen jelenség fordult elő pl. clostero- (pl. carnation necrotic fleck virus, CarNFV), tospovirusok (pl. Impatiens necrotic spot virus, INSV), vagy fitoplazmák (pl. European stone fruit yellows, ESFY) esetében.

### **3. Mintavétel *in vitro* növényből diagnosztikai célból molekuláris biológiai módszerek és biotesztek alkalmazása esetén**

A polimeráz láncreakcióhoz kapcsolható vizsgálati módszerek (PCR, RT-PCR, IC-PCR) érzékenysége sokszor javítható az *in vitro* kultúrába vitt növények vizsgálatával a kisebb inhibitor-hatás, valamint az esetleg zavaró egyéb organizmusok hiánya miatt. Az *in vitro* növények általában sokkal kevesebb másodlagos anyagcseretermékert tartalmaznak, mint a kiültetett társaik, így a reverz transzkripció és/vagy a polimeráz láncreakció is kevésbé gátlódik. E módszerek esetében tehát sokszor érdemesebb a szűrővizsgálatokat még az *in vitro* növényeken elvégezni és nem a kiültetett, edzett palántákon (Kriston 2005). Technikai szempontból a mintavétel hasonló, mint az immundiagnosztikai mintavételezéskor.

#### 4. Mintavétel biokémiai mérés elvégzése érdekében

Valamilyen biokémiai paraméter mérésekor esetről esetre kell megfontolni, hogy az összehasonlításokat friss súlyra, vagy a minta szárazanyagára vonatkoztatjuk-e. Amennyiben szárazanyagra szeretnénk vonatkoztatni, akkor a feladat jellege dönti el, hogy szárítást (60°C, 105°C) vagy liofilizálást végzünk-e. Legtöbbször az *in vitro* növények szárazanyagtartalma kisebb, mint a szabadföldi, vagy üvegházi megfelelőiknek, de ez nem mindig van így, pl. a Xanthi dohány (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) esetében, MS táptalajon az *in vitro* változat levelének nagyobb a szárazanyagtartalma.

A mintavételek során igyekezzünk hasonló állapotú szerveket, szöveteket nyerni. Hajtáskultúránál szikével, vagy ollóval leválasztjuk a megfelelő növényi részt, mérjük, majd mintazacsókóba vagy Eppendorf csöbe tesszük. Kalluszból csipesszel veszünk mintát, majd egy korábban tározott Eppendorf csővel együtt megmérjük a tömegét. A feltárásáig jégen, vagy hosszabb távon -70°C-os hűtőszekrényben, esetleg folyékony nitrogénben tároljuk.

#### 5. Mintavétel kalluszból, vagy szuszpenziós kultúrából növekedési görbe felállítása érdekében

Már a szövettenyésztési kísérletek korai korszakában is a szakcikkek gyakran tartalmaztak növekedési görbéket. Ezeket leggyakrabban valamely táptalajalkotó, vagy a fizikai környezet (fény, hőmérséklet) hatására bekövetkező kedvező, vagy előnytelen hatások szemléltetésére használták. A növekedési görbék a tágabb értelemben vett szigmoid-függvények közé tartoznak. E gyűjtőnév alatt a szigmoid alakú grafikkal rendelkező (általában valós értékű és folytonos) függvényeket szokás érteni. A tipikus görbét azonban csak akkor kapjuk meg, ha elég hosszú ideig tart a vizsgálat (50-80 nap) és mérni tudjuk a kimerülés következtében létrejövő, a görbét letörő adatokat is. Hunt és Loomis (1976) például a szacharóz koncentrációtól függő *Nicotiana rustica* L. kallusz növekedési görbéjét közölte. A 8.; 28.; 43.; 55. napon vettek mintát 6-6 ismétlésben. Véletlenszerűen kiválasztott edényekből 20, egyben lemért kalluszcsozó tömegéből nyertek egy adatot.

Nem kapunk szigmoid görbét akkor, ha valamilyen extrém kísérleti paramétert állítunk be, ilyenkor a kultúra stagnál, vagy pusztul. Ne várjunk szigmoid görbét a rövid, néhány napos kísérletek során, ilyenkor valójában a görbe középső, az intenzív, egyenletes növekedést szemléltető szakasza látszik.

A szuszpenziós kultúrák növekedési görbéjének meghatározása technikailag kissé összetettebb. A tenyészeteket ilyenkor steril, csavaros kupakkal ellátott, tározott centrifugacsövekbe öntjük steril körülmények között, majd kis fordulatszám (1000 rpm alatt) 5 percig centrifugáljuk. A felülúszókat steril edénybe leöntjük, majd megmérjük a sejthalmaz tömegét („friss súly”). Ezt követően a tápfolyadékkal visszamoszuk a nevelőedénybe a sejteket és tovább rázatjuk azokat. Hasonlóan kezdődik a sejtszám meghatározása is. A súlymérés után a sejtek sejtfalát enzimesen leemésztjük („protoplasztálunk”), majd a kapott protoplasztokat Bürker kamrában számoljuk, 1 g friss tömegre vonatkoztatjuk. Egy korábbi kísérletben például burgonya (*Solanum tuberosum* L. cv. Désiree) szuszpenziós kultúrában  $2,67 \times 10^6$  sejtet számoltunk grammonként (4 ismétlés átlaga,  $D(x) = 0,380 \times 10^6$ ) (Tóth, publikálatlan). Szuszpenziós kultúrák gyarodásának nyomon követésére alkalmasak lehetnek a turbidimetriás- (Sung 1976) és korlátozottan egyes elektrokémiai módszerek is.

A sejtek életképessége fontos kiegészítő adat, ennek megfigyelésére általában a fluoreszceindiacetát 5 mg/ml-es, acetonos oldatát használják, amelyet 0,01%-os végkoncentrációban adnak

a tenyészethez. Az elhalt sejtek UV fényben vöröses színnel jellemezhetők, az élők zöld színnel fluoreszkálnak.

## 6. Mintavétel sterilitás ellenőrzési céllal

Az *in vitro* tenyészetek sterilitásának ellenőrzése megfeleltethető egyes mikrobiológiai mintavételeknek. A sterilnek vélt kultúrák esetében előfordul, hogy a fertőzöttség szabad szemmel nem látható, legyen annak eredete akár valamilyen endofita, akár utólagos fertőződést okozó baktérium. A tenyészeteket érdemes időről időre megvizsgálni, különösen, ha valamilyen szokatlan elváltozást, csökkent növekedési erélyt tapasztalunk. Folyékony táptalaj alkalmazása esetén - az agaros táptalajokhoz képest - gyakrabban fordul elő sokáig rejtve maradó fertőzöttség, ezért érdemes ismételten mikrobiológiai ellenőrzéseket végezni. Folyékony táptalajnál elegendő steril oltókaccsal a táptalajba érni, majd pedig baktérium táptalajra kikenést végezni. Agarral gélesített táptalajok esetében jobbnak tartjuk, ha az új táptalajra helyezés előtt, a frissen vágott felületű növényi részt húzzuk végig a mikrobiológiai táptalaj felszínén.

## 7. Mintavétel termékforgalmazási céllal

Az alább előforduló statisztikai fogalmak és elemi ismeretek megtalálhatók pl. Hunyadi (2001) könyvében. Azokban az esetekben, amikor nagy mennyiségű *in vitro*, vagy *ex vitro* növényanyagot készítünk elő szállításra a megrendelő számára (általában 100 000 felett), akkor nincs lehetőség a teljes tétel megszámlálására. Ilyenkor speciális célú termésbecslésre kényszerülünk. Bemutatunk egy lehetséges matematikai statisztikai formulát a megfelelő mintaszám nagy biztonságu behatárolására.

**A feladat** tömören: A szállítás nevelőedényekben (a továbbiakban „edény”) történik. Véletlenszerűen kiválasztott  $n$  edényben (ez a minta) leszámolt növényegyedek átlagát jelölje  $\bar{X}$ . A megrendelő  $N$  növényegyedet rendel, a szállítmányt előre megállapodott ( $H\%$ ) hiány belül elfogadja. A szállító alapesetben  $k=N/\bar{X}$  edényt szállít, de biztonsági megfontolásokból esetleg megtoldja még  $Q\%$ -kal. Kérdés: mekkora legyen a mintaszám ( $n$ ) ahhoz, hogy a szállítmány adott ( $P$ ) biztonsággal megfeleljen a megrendelő elvárásának?

Némi matematikai statisztikai megfontolás vezet a minimálisan szükséges mintaszám ( $n$ ) gyakorlatilag megfelelő közelítő formulájához (ld. alább). Ebben az edényenkénti növényegyed sokasági átlag ( $M$ ) ismeretlen, ezért a formula mellé felírtuk  $n$  egy (durva) alsó becslését (a nevezőt kissé növeltük), ebben már nem szerepel  $M$ . Viszont mindkét formulában szerepel  $cv$  (variációs koefficiens), az edények közötti heterogenitás mérőszáma, azaz a sokasági relatív szórás:  $cv = \sigma/M$ , itt  $\sigma$  a szórás jelöli. Formulánkban  $cv$  értékét ismertnek tételezzük fel. A formulák:

$$n \approx \left[ \frac{z \times cv}{h + q - z \times cv \times \sqrt{\frac{M}{N}}} \right]^2, \text{ ennek alsó becslése, } n_a = \left[ \frac{z \times cv}{h + q} \right]^2$$

ahol,  $h = H/100$ ,  $q = Q/100$  a tolerancia ill. a többlet küldemény decimális alakban,  $z$  a standard normális változó kívánt biztonsághoz tartozó kvantilise (ld. 1. Táblázat).

Az alsó becslésekről tájékoztat az 1. táblázat. Orientációs számítások mutatják, hogy **n** fenti alsó becslése valóban durva, a paramétereiktől függően 20-40%-kal elmaradhat a szükséges mintaszámtól, ezért **n<sub>a</sub>** számú edény leszámolásánál nem állhatunk meg. Képezzük az átlagot ( $\bar{X}$ ), ezt tesszük **M** helyére a közelítő formulába, kiszámoljuk **n**-et és folytatjuk a mintavételt. Finomíthatjuk a műveletet: időnként újra átlagot számolunk, és ezzel újra becsljük a szükséges mintaszámot.

1. táblázat. Alsó becslés a szükséges mintaszámra különböző **cv**, **h**, **q** értékek és biztonsági szintek mellett

Biztonsági szint:		P = 90% z = 1,28				P = 95% z = 1,64				P = 99% z = 2,58			
		q=Q%				q=Q%				q=Q%			
<b>cv</b>	<b>h</b>	0%	1%	2%	3%	0%	1%	2%	3%	0%	1%	2%	3%
5%	1%	41	10	5	3	68	17	8	4	166	42	18	10
	2%	10	5	3	2	17	8	4	3	42	18	10	7
	3%	5	3	2	1	8	4	3	2	18	10	7	5
10%	1%	164	41	18	10	272	68	30	17	666	166	74	42
	2%	41	18	10	7	68	30	17	11	166	74	42	27
	3%	18	10	7	5	30	17	11	8	74	42	27	18

Table 1. Lower estimate of the required sample number with different heterogeneity (**cv**), tolerancy (**h**), surplus package (**q**) values and reliability levels (**P**)

Alább vázoljuk **n** közelítő formulájának megokolását.

Normális eloszlású sokaság átlagának  $\Delta$  pontosságú becslésére ismert az

$$n = (z \times \sigma / \Delta)^2 = [z \times cv / (\Delta / M)]^2 \text{ formula,}$$

esetünkben a  $\Delta$  hibahatárt a **h** hiány-tolerancia és a **q** többlet-küldemény szabályozza, hogyan? – ez a kérdés.

Legyen **k** db edény a küldeményben. **k** igen nagy, ezekben a növényegedek összes száma (**Y**) normális eloszlásúnak tekinthető, átlaga  $k \times M$ , szórása  $\sqrt{k} \times \sigma$ , ( $\sigma = M \times cv$ ). Az 1. ábra szemlélteti a szituációt H%-os hiány-tolerancia mellett. Ha P%-os biztonságra törekszünk, akkor **k**-nak legalább akkorának kell lennie, hogy az eloszlás harang-görbéje alatti területnek legalább P%-a az  $(1-h)N$  korláttól jobbra essék, jelölje ezt a **k** értéket **k'**. Az ábráról leolvasható a

$$k' \times M = (1-h)N + z \times \sqrt{k'} \times \sigma \text{ összefüggés,}$$

amely  $\sqrt{k'}$ -re vonatkozóan másodfokú egyenlet. Ennek negatív gyöke érdektelen, a pozitív gyök négyzete – az  $N/M$  arányt  $k_0$ -lal jelölve:

$$k' = [z \times cv / 2 + \sqrt{(z \times cv / 2)^2 + (1 - h)k_0}]^2 \approx (1 - h)k_0 + z \times cv \times \sqrt{k_0}$$

Ez utóbbi közelítés, amely meglehetősen jó, úgy adódik, hogy a négyzetre emelés után a  $(z \times cv/2)^2$  tagokat elhagyjuk, ezek nagyságrendekkel kisebbek a többi tagnál.

Ha az  $N/\bar{x}$  számú edény helyett  $Q\%$ -kal többet, azaz  $(1+q)N/\bar{x}$  –ot küldünk, ennek kell elérnie a  $k'$  értéket, amiből a minta-átlag felső határára az  $\bar{x}' = (1+q)N/k'$  érték adódik. Ekkor a  $\Delta$  hibahatár (a minta-átlag megengedett eltérése a sokasági átlagtól):

$$\Delta = \bar{x}' - M = \frac{(1+q)N - M[(1-h)k_0 + z \times cv \times \sqrt{k_0}]}{(1-h)k_0 + z \times cv \times \sqrt{k_0}} = M \frac{h + q - z \times cv / \sqrt{k_0}}{1 - h + z \times cv / \sqrt{k_0}}$$

A második alakban a nevező gyakorlatilag elhagyható, mert  $h$  is és  $z \times cv / \sqrt{k_0}$  is kicsi 1-hez képest, ráadásul ellenkező előjelűek. Így kapjuk a

$$\Delta \approx M(h + q - z \times cv \times \sqrt{M/N})$$

közelítést, ezt téve  $\Delta$  helyére  $n$  ismert formulájában, a szükséges mintaszámra a fentebb prezentált közelítő számhoz jutunk.

1. ábra. Illusztráció a minimálisan szükséges edényszám ( $k'$ ) meghatározásához

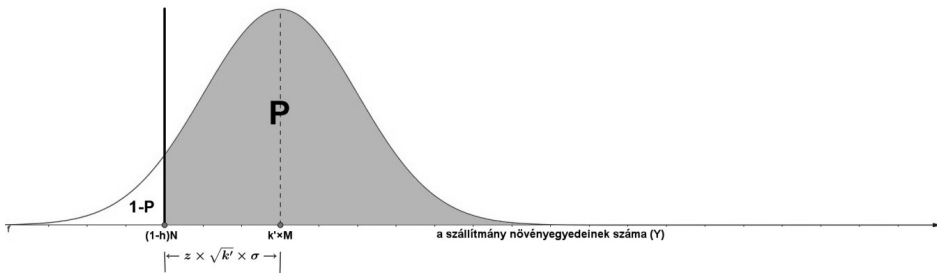


Figure 1. Illustration for calculating the minimum number of jars ( $k'$ ) require

Elég jelentős megrendelés mellett tehát a szükséges mintanagyság ( $n$ ) nem függ (!) sem a sokasági átlagtól ( $M$ ), sem a rendelt szálak számától ( $N$ ), csakis az edény-állomány homogenitásától, a relatív szórástól ( $cv$ )! A fenti levezetés nyomán megállapíthatjuk, hogy mind szakmai, mind matematikai statisztikai szempontból szükség van a termékek egyöntetűségének folyamatos javítására, másrészt még viszonylag nagy mintaszám feldolgozása nyomán is szükség van néhány százaléknyi ráadás küldésére a biztonságosság és a viták elkerülésének érdekében.

### Irodalomjegyzék

1. Hollings, M. and Stone, O.M. 1962. Report Glasshouse Crops Research Institute, 1961:100.
2. Hunt, W.F. and Loomis, R.S. 1976. Carbohydrate-limited growth kinetics of tobacco (*Nicotiana rustica* L.). *Plant Physiology*, 57: 802-805.
3. Hunyadi L. 2001. A mintavétel alapjai. Számalk. Kiadó, Budapest.
4. Kriston É. (2005): *In vitro* növények esetében alkalmazható diagnosztikai eljárások. In: Kertészeti növények mikroszaporítása. 112 – 117. Szerk.: Jámborné Benczúr E. – Dobránszki J. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
5. Lippi, G., Guidi, G.C., Mattiuzzi C. and Plebani, M. 2006. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44: 358-365.
6. Sung, Z.R. 1976. Turbidimetric Measurement of Plant Cell Culture Growth. *Plant Physiol.* 57(3): 460-462.

## Sampling of plant cell, tissue and organ cultures

TÓTH E. K.<sup>1</sup>, KRISTON É.<sup>2</sup>, JÓZSA S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences

<sup>2</sup>National Food Chain Safety Office, Directorate of Plant Protection, Soil Conservation and Agro-environment, Plant Health and Molecular Biology Laboratory

<sup>3</sup>University of Pannonia, Georgikon Faculty

E-mail: toth.endre@agrar.mta.hu

### Summary

Plant cell, tissue and organ cultures may need to be sampled for a number of reasons. In our paper we reviewed the most common causes of sampling, sampling methods, sample sizes and the standard deviation and interpretations of the corresponding measured data.

Sampling from culture medium. We can measure decreasing of nutrients or decomposition of different compounds due to light or to autoclaving, the quantity of plant exudates etc.

Sampling from in vitro plant for diagnostic purposes. Particular attention should be paid to the sensitivity of each diagnostic method (ELISA, PCR, biotest) and to the tissue concentration of the virus, viroid or phytoplasma tested.

The sensitivity of the methods related to the polymerase chain reaction (PCR, RT-PCR, IC-PCR) can be improved by testing in vitro cultures due to the lower inhibitory effect and the absence of any other interfering microorganisms.

Sampling for biochemical measurement. It should be considered case by case whether the comparisons are based on the fresh weight or the dry matter of the sample.

Sampling from callus or suspension culture in order to determinate growth curve.



Sterility control sampling, which corresponds to microbiological sampling.

Sampling for the quantitative estimation of the yield. In this case, where large quantities of in vitro or ex vitro plant materials are prepared for delivery, it is impossible to quantify the entire lot, therefore there is no other way than estimating the crop yield. We propose a possible mathematical statistical formula for the safe selection of the appropriate sample size. The sample size calculated this way does not correspond to that required by the plant protection authorities of different countries in case of pathogen's tests for the given plant species.

**Keywords:** sampling, plant tissue culture, virus elimination, coefficient of variation, lower estimate

### **Szerzők**

Tóth Endre Kristóf (kapcsolattartó szerző) – PhD, intézeti mérnök, MTA ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest Herman Ottó út 15.

Kriston Éva – MSc, laboratóriumi referens, NÉBIH, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság, Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratórium, 1118 Budapest, Budaörsi út 141-145.

Józsa Sándor – CSc, ny. egyetemi docens, Pannon Egyetem, Georgikon Kar, 8360 Keszthely, Deák F. u. 16.