

***In vitro* steril magvetés és mikroszaporítás az *ex situ* konzerváció szolgálatában**

KOVÁCS ZSÓFIA¹, TILLYNÉ MÁNDY ANDREA²

¹Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénytan Tanszék és Soroksári Botanikus Kert

²Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszék

E-mail: zsofia.kovacs42@gmail.com

Összefoglalás

A biodiverzitás védelme nemzetközi és hazai szinten is fontos törekvés a természetvédelem számára. Az élővilág sokféleségének hosszútávú fennmaradását számos tényező veszélyezteti, mint például a klímaváltozás, a környezetszennyezés, inváziós fajok terjedése, nem fenntartható területhasználat, valamint a humán eredetű károsítás (pl: motocross, erdőirtás). Az *in situ* (eredeti élőhelyen megvalósuló megőrzés) elsődleges és előnyt élvez az *ex situ* (eredeti élőhelyen kívüli megőrzés) módszerekkel szemben. Bizonyos esetekben azonban az eredeti élőhelyen nem valósulhat meg a faj hosszútávú védelme. Például tartósan fennálló természetkárosítás esetén, ami közvetve élőhely degradációval vagy közvetlen módon a populáció pusztulásával jár. Ilyen esetekben az *ex situ* módszerek alkalmazása a faj túlélésének egyetlen záloga. A botanikus kertek és arborétumok aktívan részt vesznek a gyűjtemények, az élő növényanyag kialakításában és fenntartásában. Az élő növényanyag megőrzése mellett azonban az *in vitro* módszerek terjedése is fontos. Számos pozitív példával jellemezhető a steril magvetés és a mikroszaporítás konzervációbiológiai jelentősége. A biotechnológiai módszer a biológiai növényanyag repatriációs célokra való felszaporítását is lehetővé teszi, továbbá az alap- és alkalmazott kutatásokra is felhasználható. Fontos azonban a genetikai diverzitás megőrzésére való törekvés kielégítése, emiatt a klonális szaporítás védett fajok esetében kevésbé preferált módszer. Bizonyos esetekben azonban indokolt az alkalmazása a gyors egyedszámnövelés érdekében. Ezzel szemben a steril magvetés lehetőséget nyújt a kontrollált körülmények közötti neveléshez, ezáltal pedig a faji sokszínűség megőrzéséhez.

Kulcsszavak: *ex situ*, *in vitro*, konzervációbiológia, mikroszaporítás

Bevezetés

A humán tevékenységek következtében fellépő élőhely degradáció és pusztulás számos élőlény kihalásához vezetett. Napjainkban több, mint 26 500 faj kihalással fenyegetett státuszt kapott az IUCN adatbázisa alapján (Internet1). A növényvilág közel 20%-a érintett kipusztulással, amely tendencia csak aktív konzervációbiológiai lépésekkel mérsékelhető. A gyűjteményes kertekre jelentős szerep hárul, 105 634 faj megőrzése a cél a kertekben, ez a szövetes növények 93%-át jelenti. Ez a szám igen jelentős, de Mounce és munkatársai (2017) kutatásuk során rávilágítottak újabb fejlesztési pontokra a megőrzés terén. Ide sorolható a trópusi égövről származó fajok gyűjteményeskerti számának növelése, nagyobb fókusz a kihalással fenyegetett fajokra és azok több kertben zajló megőrzésére, továbbá az endemikus fajok *ex situ* kollektióban megőrzött számának emelése (Mounce et al. 2017).

***Ex situ* konzerváció jogszabályi környezet**

A biodiverzitás védelme érdekében megszületett a Biológiai Sokféleség Egyezmény 1992-ben. Az egyezmény 9. cikkelye tartalmazza a szerződő felekkel szemben támasztott követelményeket az *ex situ* konzerváció tekintetében (UNCED 1992). A hazai jogszabályi környezetbe az 1995. évi LXXXI. törvény kihirdetésével lépett be. A részes felek a növényi sokféleség megőrzésének fókuszában, 2002-ben elfogadták a Növénymegőrzési Természetvédelmi Világstratégiát (GSPC). Ez a stratégia tovább növelte az *ex situ* megőrzés fontosságát és erősítette jelentőségét az *in situ* megőrzés mellett. A 2002-2010-es tervezési időszakra a védett és veszélyeztetett fajok 40%-nak megőrzését irányozta elő. A második tervezési időszak (2010-2020) ezt a célt tovább növelte, az *ex situ* állományban megőrzésre javasolt fajok számát 75%-ra emelte (Convention on Biological Diversity 2012). Hazánkban a Magyar Arborétumok és Botanikus Kertek Országos Szövetségének (MABOSZ) tagkertjeiben fellelhető a védett harasztok 38%-a, az egyetlen védett nyitvatermő, a csikófark (*Ephedra distachya* L.) és a védett zárvatermők 52%-a (Isépy et al. 2014). A gyűjteményes kertekbe *ex situ* állomány telepítésre a nemzeti park igazgatóságok is javaslatot tettek (Internet2). Ez a javaslati lista fókuszba helyezi azokat a védett és veszélyeztetett növényfajokat, melyek *ex situ* védelmének kidolgozása a hosszútávú fennmaradásuk érdekében fokozottan indokolt.

***In situ* és *ex situ* megőrzés**

A két konzervációs módszer között a legfőbb különbség, hogy míg az *ex situ* megőrzés magában foglalja a gyűjtőterületről származó céltaxonok mintavételét, áthelyezését és tárolását, addig az *in situ* megőrzés a cél taxonok kijelölésére és folyamatos monitoringjára fókuszál (Maxted et al. 1997). Az *in situ* módszert jellemzően nemzeti parkok, bioszféra rezervátumok, vadrezervátumok területén alkalmazzák. A védett területeken aktív őrzés, természetközeli gazdálkodási módszerek (pl: legeltetés, kaszálás) segítik a veszélyeztetett fajok fennmaradását és egyedszámuk stabilizálását, növelését. Átmenetet képez az *intersitu* vagy *quasi in situ* módszer, melynek lényege a megőrzött növények természet közeli körülmények közötti fenntartása (Volis és Blecher 2010). A génanyag eredeti élőhelyen és azon kívül történő megőrzésére több módszer is rendelkezésre áll, amit az 1. táblázat szemléltet. Az *ex situ* módszerek közül a gyűjteményes kertek az élő növényanyag fenntartásában nagy szerepet töltenek be. Ezek az állományok mérsékelik a természetben fel-

lépő turisztikai, kutatási és részben az oktatási eredetű nyomást, a kerti növénybemutatással és ismeretterjesztéssel. A gyűjteményeket sok esetben rendszertani csoportok szerint alakítják ki és így taxonómiai szempontból is bemutathatóak (Maunder et al. 2004; Engels et al. 2008; Isépy et al. 2014). A magbankok az ortodox magokkal rendelkező fajok hosszútávú tárolását teszik lehetővé. Ebben az esetben a hőmérséklet és a páratartalom is szabályozható, ami megnöveli a tárolási idő hosszát (Maunder et al. 2004; Heywood 2009; Isépy et al. 2014). Hazánkban a Pannon Magbank projekt kapcsán a kitűzött cél a Pannon biogeográfiai régió flórájának megőrzése volt, legalább 800 faj gyűjtésével és megőrzésével 2010 és 2014 között. 2014 végére a védett fajok 42,7% -át és a veszélyeztetett fajok 61,7%-át gyűjtötték be, ami elérte és meg is haladta a kitűzött célt (Halász et al. 2015). Hátránya egyedül az, hogy így a növények nem tudják követni a természetes élőhelyük környezetének változásait.

1. táblázat. A konzervációs módszerek csoportosítása és felosztása Maunder et al. 2004 és Isépy et al. 2014 nyomán

In situ	Ex situ
természetes környezeti feltételek pl: nemzeti park, bioszféra rezervátum	szabadföldi génbank
kezelt természetes populációk	közösségi kertek
kertészetileg gondozott természetes populációk	botanikus kerti bemutató gyűjtemény
	szövetkultúra
	magbank
	krioprezerváció
	termesztés: konzervációs vagy kereskedelmi célú

Table 1. Grouping and division of the conservation methods followed by Maunder et al. 2004 and Isépy et al. 2014

***In vitro* módszerek**

Védett fajok esetében sokszor tapasztalhatók a kis egyedszámú, beszűkült populációk, ahol fontos szempont lehet az egyedszám növelése és a populációk stabilizálása. A szövettenyésztési módszerek alkalmazhatóak a védett és veszélyeztetett fajok gyors és kontrollált körülmények közötti felszaporítására, valamint tárolására (Engelmann 1997). Alternatív lehetőséget kínálnak a konvencionális módszerekkel nehezen szaporítható növényfajok megőrzésére. Fontos megemlíteni, hogy a minél szélesebb genetikai variabilitás megőrzése a cél, így a vegetatív szaporítással szemben a steril magvetés a preferált módszer (1. ábra). Azonban vannak olyan esetek, amikor mag egyáltalán nem áll rendelkezésre vagy csak kis mennyiségben, esetleg a magok jelentős százaléka steril, ekkor csak a vegetatív szaporítási módszerek alkalmazhatóak a faj védelme érdekében. Az *in vitro* módszerek esetében felmerülhet a szomaklonális variabilitás fellépése, aminek elkerülése érdekében az ezt indukáló módszereket - mint pl. kallusz indukcióra alapozott kultúra indítása

- érdemes mellőzni. Az alkalmazott tenyésztési módszerek a tárolási idő alapján két csoportra oszthatók. A rövid idejű tárolásra alkalmas technikák: steril magvetés/ spóravetés, gyökérről vagy oldalrügyről indított kultúra, organogenezis (levél, hagyma buroklevél, szár, egyéb növényi szerv felhasználásával), szomatikus embriogenezis (Fay és Muir 1990; Fay 1992). A hosszú távú tárolásra alkalmas módszer a krioprezerváció, amelyet egy *in vitro* aktív génbanknak tekinthetünk (Withers és Williams 1986). A módszer lényege a folyékony nitrogénben való tartós tárolás, ami teljesen megállítja a növekedést és a növényt adott fejlődési stádiumban konzerválja. Lehetőség van alacsony hőmérsékleten tartással mérsékelni a növekedés ütemét, ami szintén egy hosszútávú tárolási módszer (Pence 1990; Fay 1992).

1. ábra. Steril magvetés illatos csngettyűvirággal (*Adenophora liliifolia* (L.) Besser)



Figure 1. Steril sowing of the lily leafed lady bell (*Adenophora liliifolia* (L.) Besser)

Lehetőségek az *in vitro* módszerekkel

Számos pozitívum emelhető ki az *in vitro* szaporítás során. Az egyik legfontosabb a repatriációs és kitelepítési programok számára a felszaporítás és a növényanyag biztosítása. Ezek a növényegedek szolgálhatják az eredeti populációk egyedszámának növelését és ezáltal a megerősítést. Másrészt a történeti elterjedési területen belül is kitelepíthetők, ahonnan már ismert előfordulásuk nincs, ezzel egy újrakolonizálás valósulhat meg (Pence 2010).

A megőrzési projektekben is fontos szerepet kapnak ezek a szaporítási módszerek. Lehetőség nyílik a magról szaporítás során a genetikai értékelésre, ami a repatriáció során egy megfelelő genetikai készlettel rendelkező állomány kialakítására ad módot. Másrészt a szaporítási protokoll kidolgozása is megvalósítható, ami a megőrzési tervek kialakításában is fontos, valamint a vadon élő populációkra gyakorolt nyomás enyhítésére is szolgál (Kane et al. 1993; Pence 2010).

A klonális szaporítás, mivel a genetikai diverzitás csökkenésével járhat, csak szükséges esetben alkalmazott módszer. Ugyanakkor pozitívként említhető meg, hogy nagy egyedszámú szapo-

ratul képezhető kis mennyiségű növényi szövet felhasználásával. Ezekre a vegetatívan felszaporított állományokra modell állományként is tekinthetünk, amin a faj igényeit, növekedési jellemzőit tanulmányozhatjuk genetikai diverzitás csökkenése nélkül. Ilyen lehet például a fény hatása, vagy a különböző tápelemek a védett faj növekedési vagy morfológiai jellemzőire gyakorolt hatása (Euliss et al. 2007; Pence 2010).

A védett és veszélyeztetett fajokat sok esetben túlgyjűjtés miatt kellett védelembe vonni. A teresztris orchideák feltűnő szépségük, számos gyógynövény a bennük található hatóanyagok miatt a gyűjtők áldozatává vált. Az *in vitro* módszerek alkalmazásával nagyobb mennyiségű növényanyag előállítására van lehetőség, ami kereskedelmi fogalomba is bocsátható a megfelelő engedélyek beszerzése után. A vad populációk védelme mellett a gyógynövények klonális szaporítása révén uniform és standard termékek készíthetők. Érdemes megemlíteni továbbá, hogy a klonális szaporítás miatt, a magokat nem gyűjtik be, így ezek az eredeti populációk újulatképzésében vesznek részt, ami miatt a genetikai diverzitás fenntartása is megvalósul (Chaturvedi et al. 2007; Pence 2010).

A mikroszaporított egyedek alkalmasak lehetnek új élőhelyek, mikroélőhelyek tesztelésére is. Az új élőhelyek relokalizációja során abban az esetben sem történik genetikai diverzitás csökkenés, ha az alkalmatlannak minősül a kísérlet során, mivel klónokból alakítjuk ki a repatriációra szánt populációt. Az élőhely tesztelésével a klímaváltozás hatásainak értékelésére is lehetőség adódik, amit szintén pozitívumként érdemes megemlíteni a módszer alkalmazása során (Pence 2010).

Az *in vitro* módszerek alkalmazásával növényi szövetek biztosíthatók különböző genetikai vonalak megőrzésével krioprezervációs célra. Ez a módszer olyan fajok esetében is alkalmazható, amelyeknél a magbanki megőrzés a magok rekalcitráns mivolta miatt nem megvalósítható (Pence 2010).

A laboratóriumi körülmények között felszaporított egyedek esetében a patogén mentesség is fontos pozitívumként említhető meg (Thormann et al. 2006).

Nehézségek az *in vitro* módszerek alkalmazásakor

A számos pozitívum mellett az *ex situ* konzerváció *in vitro* módszereinek hátrányos tulajdonságai is lehetnek. A védett fajok esetében jelentős probléma az egyedi protokoll fejlesztése. A kereskedelmi termesztésre szánt fajok sok esetben rendelkeznek standard protokollal, ez azonban a védett fajoknál nemzetségen belül sem egységesíthető. A protokoll fejlesztése hosszabb időt is igénybe vehet. További nehézség, hogy nem csak faji szinten tapasztalható érzékenység a különböző protokollokra, de egyes fajok esetében genotípusonként is eltérések lehetnek. A fajok továbbá eltérő reakciókat mutathatnak a nevelés különböző fázisai során. Ez problémát okozhat sok esetben az akklimatizálásnál, mikor már a felszaporított növényanyag rendelkezésre áll, de az akklimatizálás során nagyobb mortalitás tapasztalható (Pence 2010).

A nevelés során felléphetnek további problémák. A tenyészetek befertőződése komoly gondot okozhat a megőrzés során. Ezen felül a gyökér- vagy hajtásképzésben is akadályozottá válhat a növény. Megjelenhet fenolosodás, viritrifikáció, sárgulás, levélvesztés, illetve nekrozis a tenyészetekben (Pence 2010).

Az *ex situ* megőrzés során az egyik fontos cél a genetikai diverzitás minél magasabb szintjének fenntartása. Ez a követelmény laboratóriumi körülmények között nehezen kivitelezhető, a genetikai vonalak minél nagyobb számának fenntartása csak kisebb egyedszámokkal valósulhat meg a korlátozott források és térbeli korlátok miatt. Ennek következtében azonban nagyobb veszély

áll fenn a genetikai vonalak elvesztésére bármely probléma felmerülése esetén (Thormann et al. 2006; Pence 2010).

A genetikai hűség (genetic fidelity) szintén követelmény a konzerváció során. Az *in vitro* módszerek alkalmazásakor azonban felléphet a szomaklonális variabilitás problematikája (Luan 2001). A növényi sejtek *in vitro* nevelése csak a sejtek mitotikus osztódásán alapuló, aszexuális folyamat. Emiatt a nem kontrollált és véletlenszerű spontán változások előfordulása a növényi szövetek tenyésztésekor jelentős probléma. Általában a variabilitás spontán, és az *in vitro* tenyésztés során a sejtek vagy szövetek átmeneti változásai vagy állandó genetikai változásai következhetnek be. Ideiglenes változások epigenetikus vagy fiziológiai hatásokra vezethetők vissza, az állandó változások gyakran mutációs események következményei (Kaeppler et al. 2000; Pence 2010; Leva et al. 2012). A szomaklonális variabilitást nagyban befolyásolja a tenyésztésben töltött idő és a növekedésszabályozó szerek alkalmazása (Zehr et al. 1987; Bairu et al. 2006).

A laboratóriumi eszközigeny, illetőleg a magasabb technológiai szükséglet miatt magasabb költségekkel kell számolni ezen technológia alkalmazása során. A költségeket növeli a védett fajokra kidolgozandó új protokoll fejlesztése, vagy a már meglévő standard protokoll továbbfejlesztése is. A kereskedelmi célú termesztéssel szemben ez a módszer abban is különbözik, hogy kisebb a rendelkezésre álló növényanyag mennyisége, emiatt nagyobb a relatív költsége egy egyed előállításának is (Thormann et al. 2006; Pence 2010).

Nemzetközi és hazai példák a konzervációbiológia szolgálatában

A védett fajok közül a mohák és harasztok kisebb szerephez jutnak a konzervációbiológia területén. Az *Entosthodon hungaricus* (Boros) Loeske egy európai endemikus mohafaj. Száraz, szikes élőhelyek faja, amely speciális ökológiai igényei miatt és efemer jellege révén sérülékeny és ritka. A kiindulási növényanyag részben herbáriumokból, részben friss növényi mintákból, magyarországi populációkból származott. A felszíni sterilizálásra érzékeny mind a sporofiton, mind a gametofiton, utóbbi esetében a túlélési százalékok alacsonyabban alakultak. A legalkalmasabb módszer a 3% NaOCl kezelés sporofitonnal volt. A növekedésszabályozóktól és cukortól mentes BCD tápközeg, a szaporítás és a szubkultúrálás szempontjából a legjobbnak minősült. A másodlagos protonéma átmérőjének fejlődése MS táptalajon gyorsabb volt, mint BCD-n, de a rügyek száma BCD-n volt jelentősebb. A kutatás során az is kiderült, hogy gametophora alkalmazása explantátumként protonéma helyett, gyorsabban (45-60 nap) vezet fejlett növényhez (Sabovljevic et al. 2012).

A páfrányok megőrzése igen nehéz feladat, mert kevés életképes spórát képeznek. A spóra tárolása így önmagában nem elegendő ezekben az esetekben. Az *in vitro* szaporítás és a krioprezerváció emiatt nagy jelentőségű a megőrzés során. A szigetek élővilága természetvédelmi szempontból nagyon fontos, jó példa erre a *Pteris ascensionis* Sw. faj, mely az Ascension-sziget endemikus faja. Vadon ma már csak 500 egyed él, emiatt kihalással fenyegetett státuszt kapott. A spórák nátrium-diklór-izocianurát sterilizálás, majd desztilláltvízes átmosás után 1/2 MS táptalajra kerültek, ami 1% szacharóz, 2 g/l phytagel vagy 7 g/l agar és 1 g/l aktív szén hozzáadásával készült (Murashige és Skoog 1962). 6 hét után közel 80%-a a spóráknak kicsírázott. Az iniciálás után a gametofitonok 1/2 MS táptalajon, 2% -os szacharóz tartalomnál 21 ± 2 °C-on, 16 óra fény, 8 óra sötét ciklusban fejlődtek. 6–8 hetente kellett a tenyészeteket ugyanazon típusú friss táptalajon szubkultúrálni a megfelelő fejlettségi stádium eléréséig (Barnicoat et al. 2011).

Az orchideák szépségük és különleges megjelenésük miatt sok esetben váltak a gyűjtők áldozatává. Az Orchidaceae fiatal és diverz család, közel 35 000 faj alkotja (Nash et al. 2005). Míg a trópusi égövön az epifita életmód jellemző, a mérsékelt égövön a teresztris fajok terjedtek el. A *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm. Pápua Új-Guinea endemikus epifita orchideája. Gyógyászati célra felhasználhatók vegetatív részei, kivonatából emlőrák elleni készítményt állítanak elő. Eredeti élőhelyén sérülékenynek minősül a túlzott mértékű erdőhasználat miatt, így konzervációja rendkívüli mértékben indokolt. A szaporítás során 14 hetes magokat aszimbiotikus módon, Vacin & Went (VW) szilárd táptalajra vetettek (Vacin és Went 1949; Utami et al. 2017). A csírázási % és a gyökér képződés szempontjából optimálisnak a 2 g/L pepton tartalmú táptalaj minősült. Ebben az esetben 100%-os csírázás volt tapasztalható, és a protokormok 84%-os gyökeresedése volt detektálható. VW táptalaj 15%-os kókuszvíztartalommal optimális volt a gyökérfejlesztésre. Jól fejlett gyökérzetet és leveleket regeneráltak az egyedek. Ennek köszönhetően az akklimatizálás is 95%-os, igen magas túléléssel zárult (Utami et al. 2017).

A Cactaceae család számos képviselője hasonlóan az orchidea fajokhoz veszélyeztetett, a természetes élőhelyek csökkenése és a túlgyűjtés miatt. Emiatt számos faj érzékeny vagy veszélyeztetett minősítést kapott (Mace et al. 1992). A szaporítási mód kifejlesztése a hosszútávú megőrzés miatt igen sürgető. A kaktuszokat gyakran magról vagy dugványról szaporítják, de ezeknek a módszereknek sok hátránya van. A magoknál gyakran jelentkezik inkompatibilitás, alacsony csírázási arány, és a palántadőlés is komoly problémát jelent (Ault és Blackmon 1987). Három veszélyeztetett kaktuszfaj *Escobaria minima* (Baird) D. R. Hunt, *Mammillaria pectinifera* F.A.C. Weber és *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg fajok *in vitro* szaporítását dolgozták ki. Az *Escobaria minima* és *Mammillaria pectinifera* benzil-adenint tartalmazó táptalajon és a *Pelecyphora aselliformis* kinetint tartalmazó táptalajon, magas szaporodási rátát és jó minőségű gyökérképződést mutatott, és kismértékben vagy egyáltalán nem volt kallusz indukció. A *Mammillaria pectinifera* és *Pelecyphora aselliformis* kalluszából tidiazuront tartalmazó táptalajon szintén sikeresen regenerálódott. A mikroszaporított egyedeket sikeresen kiültették az eredeti élőhelyükre, ahol a virágzó stádiumig is eljutottak (Giusti et al. 2002).

Hazánkban az *in vitro* génmegőrzés és a kapcsolódó kutatások a védett és veszélyeztetett fajok esetében igen jelentősek. A teresztris orchideákkal kapcsolatos szaporítási módszerek kidolgozására példa a hazai flórában fokozottan védett hagymaburok (*Liparis loeselii* (L.) Rich.) aszimbiotikus *in vitro* csíráztatása. Illyés (2005) a magok felszínét 10 percig kalcium-hipokloritban sterilizálta, majd négy féle táptalajtípust tesztelt: 'MS' (Murashige és Skoog 1962), 'MS 1/2', 'Debergh' (Van Weas és Debergh 1986) és 'Fast' (Fast 1974). Utóbbi kettő szerves nitrogént is tartalmazott. Vizsgálta a fény és a hidegkezelés (4-6 °C) hatását is. A legmagasabb csírázási százalékok a 'Fast' és 'Debergh' táptalajokon realizálódtak. A hidegkezelés lassította a csírázást, és a sötétkezelés magasabb csírázási százalékot eredményezett (Illyés 2005). Az ELTE Füvészkert orchideagyűjteményében szintén jelentős génmegőrzési tevékenység folyik. Magcsírázási vizsgálatokat végeznek számos trópusi és mérsékelt övi fajjal. R. Eszéki Eszter (2013) doktori disszertációjában szintén foglalkozott a hagymaburok *in vitro* nevelésével és akklimatizációjával. Az *in vitro* állományból származó szárgumókat tőzeg alapú földkeverék, apró fenyőkéreg, durva szemcsés homok és perlit 2:1 arányú keverékébe ültette, majd *Sphagnum* mohával fedte be. Nagyszámú kihajtás volt jellemző és a fejlettebb gumók esetében már az első évben tapasztalható volt a generatív fázis megjelenése is (Eszéki 2013).

A tavaszi tözike (*Leucojum aestivum* L.) hazánk védett növényfaja. Az *in vitro* kultúrába vonás során a hagymákról az öreg levelek és gyökerek eltávolításra kerültek, majd 1-5 hétig hidegkezelést kaptak. A sterilizálás 2 órás csapvíz alatti mosás, majd ezt követően 70%-os etanolban 10 percig és 0,1% HgCl₂-ben 15 percig történő áztatással valósult meg. A hagymákat, a hagyma gerezdeket és a leveleket 1 mg / l benzil-adenin (BA) és 0,1 mg / l naftalin-ecetsav (NAA) tartalmú Murashige és Skoog (1962) táptalajra helyezték. Az első kiindulási kísérletben az explantátumok 81,3%, a másodikban pedig 92,3%-a lett steril. Hagymák és gyökerek fejlődtek azokon az explantátumokon, amelyek esetében az inokulum hagyma tönk volt hagyma gerezdekkel és levelekkel. A legjobb eredményt 5 hetes hűtés után sikerült elérni, és a hagymalevelekből is sikerült kisméretű hagymagumókat regenerálni (Kohut et al. 2007).

A hagymás fajok közül érdemes még megemlíteni a hóvirág taxonok kultúrába vonását. Tilly és munkatársai (2006) a *Galanthus elwesii* és *Galanthus nivalis* 'Flore Pleno' taxonok kapcsán végeztek kultúrába vonási kísérletet. A kiindulási alapanyag nyugalmi stádiumban lévő hagymagumó volt, amit 70%-os etanolban 30 másodpercig, majd 0,3%-os 2 csepp Tween 80-at tartalmazó higany-klorid oldatban 5 percig sterilizáltak. Steril desztilláltvízben átmosták a hagymákat, majd egyenlő felekre vágták őket. Az alsó fél további négy részre került felosztásra hosszirányban. A táptalaj a vörshagyma mikroszaporításra alkalmas recept alapján készült el. Az eredmények alapján elmondható, hogy a legmagasabb számú hagymát a 0,2 mg/l benzil-adenin és 2,0 mg/l naftil-ecetsav tartalmú táptalaj produkálta. A hagymák kisméretűek voltak, 76% -a kisebb, mint 5 mm átmérőjű. Sok esetben még a gerezdek is kisméretű hagymákat termeltek. Átlagosan 2,89 inokulum volt. Hasonló eredményeket kaptak azon a táptalajon, amely 2,0 mg/l benzil-adenint és 2,0 mg/l naftil-ecetsavat tartalmazott. Ebben az esetben a nagyobb méretű hagymák száma 30% -ra emelkedett és mérsékelt kalluszképződés is megfigyelhető volt. A benzil-adeninről kinetitre történő váltás a hagymák számát csökkentette, ugyanakkor a méretük nőtt, a nagyobb hagymák aránya 50%-ra emelkedett. Az átlagos inokulum szám 2,21 volt (Tilly et al. 2006).

Néhány kárpát-medencei védett sáfrányfaj mikroszaporításánál az explantátumok hagymagumók, ill. magvak voltak, amelyeket felületi sterilizálás után NAA és BA tartalmú, módosított MS táptalajra helyeztek. A legtöbb faj / genotípus esetében sikeres volt a mikroszaporítás, azonban néhány esetben csak kallusztenyészet útján tudtak növényeket regenerálni. Ez utóbbi esetben azonban, a DNS polimorfizmus vizsgálatok semmilyen különbséget nem mutattak ki az *in vitro* regenerált növények és az eredeti explantátumok között. A kultúrák nagy része embriogén volt. A fajok, amelyek esetében sikerült tömegesen növényeket regenerálni: *Crocus heuffelianus* (kárpáti sáfrány), *C. scopusiensis* (szepességi sáfrány), *C. vittatus* (halvány sáfrány) és *C. banaticus* (bánsági sáfrány). A regenerált növények hagymagumókat képeztek, ezek potenciálisan alkalmasak az *ex vitro* nevelésre (Demeter et al. 2010; Freytag et al. 2017).

Csontos és Bognár (1984) az *Adonis vernalis* L. (tavaszi hérics) vegetatív mikroszaporításának módszerét dolgozták ki. A növények sterilizált szárdarabjai módosított Nitsch táptalajra helyezték (4 mg/l NAA, 0,4 mg/l BAP, 500 mg/l kazein hidrolizátum, pH 6,5), amelyen primer zöld kallusz képződött. Welander tápközegen is eredményes, primer fehér kalluszok képződtek. A primer kalluszok módosított Nitsch táptalajon 5 mg/l GA₃ hozzáadásával és szekunder kallusz képzéssel hosszútávon fenntarthatók. A további növekedéshez 30 mg/l szacharóz adagolása is szükséges, a kísérletek azt bizonyítják, hogy csak glükóz szénforráson a tenyészetek nem fenntarthatók.

Összességében elmondható, hogy hazai és nemzetközi szinten számos védett és veszélyeztetett növényfaj *in vitro* szaporítási módszerét kidolgozták, azonban a hazai flóra több tagjánál is indokolt lehet további módszerek kidolgozása és az *ex situ* védelembé vonás megvalósítása.

Irodalomjegyzék

1995. évi LXXXI. törvény a Biológiai Sokféleség Egyezmény kihirdetéséről
- Ault, J.R. and Blackmon, W.J. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience, 22: 126-27.
- Bairu, M.W., Fennell, C.W. and van Staden, J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA cv. 'Zelig'*). Sci. Hort. 108: 347-351.
- Barnicoat, H., Cripps, R., Kendon, J. and Sarasan, V. 2011. Conservation *in vitro* of rare and threatened ferns – case studies of biodiversity hotspot and island species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 47: 37-45.
- Chaturvedi, H.C., Main, M. and Kidwai, N.R. 2007. Cloning of medicinal plants through tissue culture – a review. *Indian J. Exp. Biol.* 45: 937-948.
- Convention on Biological Diversity 2012. Global Strategy for Plant Conservation: 2011-2020. Botanic Gardens Conservation International, Richmond, UK ISBN: 978-1-905164-41-7
- Csontos P. és Bognár J. 1984. Kísérletek az *Adonis vernalis* L. vegetatív mikroszaporítására. *Botanikai Közlemények*, 71(3-4): 193-198.
- Demeter, Z., Surányi, G., Molnár, V.A., Sramkó, G., Beyer, D., Kónya, Z., Vasas, G., M-Hamvas, M. and Máthé, C. 2010. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. *Plant Cell Tiss. Org.* 100: 349-353.
- Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. In: Ford-Lloyd, B.V., Newbury, J.H. and Callow, J.A. (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CAB International, Wallingford, UK, 119-162.
- Engels, J.M.M., Maggioni, L., Maxted, N. and Dulloo, M.E. 2008. 'Complementing *in situ* conservation with *ex situ* measures', in Iriondo, J. Maxted N. and Dulloo M.E. (eds) *Conserving Plant Genetic Diversity*, 169-180.
- Eszéki R.E. 2013. Orchideafajok génmegőrzési és szaporítási lehetőségei. Possibilities of orchid gene preservation and propagation. Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem. Kertészettudományi Doktori Iskola.
- Euliss, A.C., Fisk, M.C., Coleman McCleneghan, S. and Neufeld, H.S. 2007. Allocation and morphological responses to resource manipulations are unlikely to mitigate shade intolerance in *Houstonia montana*, a rare southern Appalachian herb. *Canad. J. Bot.* 85: 976-985.
- Fast, G. 1974. Über eine Methode der kombinierten generativen-vegetativen Vermehrung von *Cypripedium calceolus*. *Die Orchidee*, 25: 125-129.
- Fay, M.F. and Muir, H.J. 1990. The role of micropropagation in the conservation of European plants. In: J.E. Hernández Bermejo, J.E., Clemente, M. and Heywood, V. (eds.), *Conservation Techniques in Botanic Gardens*, Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany, 27-32.
- Fay, M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant*, 28(1): 1-4.
- Freytag, C., Pabar, S.A., Demeter, Z., Simon, Á., Resetár, A., Molnár, V.A., Sramkó, G. and Máthé, C. 2017. Production and characterization of tissue cultures of four *Crocus* species from the Carpathian Basin. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 59: 31-39.
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F. and Tucci, F. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, 95: 319-332.

18. Halász, K., Kósa, G., Lunk, G., Szakács, É., Thalmeiner, T., Török, K. and Zsigmond, V. 2015. Seed banking in the Carpathian Basin: the Pannon Seed Bank Project. *Journal of Botanic Gardens Conservation International*, 12(1): 25-27.
19. Heywood, V.H. 2009. 'Botanic gardens and genetic conservation', *Sibbaldia* guest essay, *Sibbaldia*, The Journal of Botanic Garden Horticulture, 7: 5-17.
20. Illyés, Z., Szabolcs, R. and Bratek, Z. 2005. Aspects of *in situ*, *in vitro* germination and mycorrhizal partners of *Liparis loeselii*. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2): 137-139.
21. Isépy I., Mihalik E., Orlóci L., Papp L., Radvánszky A. és Zsigmond V. 2014. *Ex-situ* növénymegőrzés. Gyűjteményes kertek a növényvilág megőrzéséért. Magyar Arborétumok és Botanikus Kertek Szövetségének kiadványa, Budapest, 3-14.
22. Kaeppeler, S.M., Kaeppeler, H.F. and Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Pl. Molec. Biol.* 43: 179-188.
23. Kane, M.E., Bird, K.T. and Lee, T.M. 1993. *In vitro* propagation of *Ipomoea pes-caprae* (Railroad vine). *J. Coastal Res.* 9: 356-362.
24. Kohut, E., Ördögh, M., Jámbor-Benczúr, E. and Máthé, Á. 2007. Results with the establishment of *in vitro* culture of *Leucojum aestivum*. *International Journal of Horticultural Science*, 13(2): 67-71.
25. Leva, A., Petruccelli, R. and Rinaldi, L.M. 2012. Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive. In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 123-150.
26. Luan, H.Y. 2001. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources. In: Saad, M.S., Ramanatha Rao, V. (eds.), *Establishment and Management of Field Genebank, a Training Manual*. IPGRI-APO, Serdang, 54-58.
27. Mace, G., Collar, N., Cooke, J., Ginsberg, J., Leader-Williams, N., Maunder, N. and Milner-Gulland, E.J. 1992. The development of new criteria for listing species on the IUCN red list. *Species*, 19: 16-22.
28. Maunder, M., Guerrant, E.O., Havens, K. and Dixon, K.W. 2004. Realizing the full potential of *ex situ* contributions to global plant conservation. In: Guerrant, E.O., Havens, K., Maunder, M. (eds). *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press. Washington (DC). 389-418.
29. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. and Hawkes, J.G. 1997. Complementary conservation strategies. In: Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. and Hawkes, J.G. (eds) *Plant Genetic Resources Conservation*. Chapman and Hall, London, 15-39.
30. Mounce, R., Smith, P. and Brockington, S. 2017. *Ex situ* conservation of plant diversity in the world's botanic gardens. *Nature Plants*; DOI: 10.1038/s41477-017-0019-3
31. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
32. Nash, N., La Croix, I. and Banks, D. 2005. *Flora's Orchids*. Timber Press, Portland, 368.
33. Pence, V.C. 1990. *In vitro* collection, regeneration, and cryopreservation of *Brunfelsia densifolia*. Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, Netherlands: IAPTC; Abs. 377.
34. Pence, V.C. 2010. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin*, 65: 539-547.
35. Sabovljevic, M., Papp, B., Sabovljevic, A., Vujicic, M., Szurdoki, E. and Segarra-Moragues, J. 2012. *In vitro* micropropagation of rare and endangered moss *Entosthodon hungaricus* (Funariaceae). *Bioscience Journal*, 28: 632-640.
36. Thormann, I., Dulloo, M. and Engels, J. 2006. Techniques for *ex situ* plant conservation. In: *Plant Conservation Genetics*. Haworth Press. 7-36.
37. Tilly, M.A., Jámbor, B.E. and Szabó, J. 2006. Results with the micropropagation of *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis* 'Flore Pleno'. Proc. Vth IS on *In Vitro* Culture and Hort. Breeding. *Acta Hort.* 439-442.

38. UNCED 1992. Convention on Biological Diversity. United Nations Conference on Environment and Development, Rio de Janeiro.
39. Utami, E.S.W., Hariyanto, S. and Manuhara, Y.S.W. 2017. *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(5): 406-410.
40. Vacin, E., and Went, F.W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. BOT. GAZ. 110: 605-613.
41. Van Weas, J. and Debergh, P.C. 1986. *In vitro* germination of some Western European orchids. Physiol Plant, 67: 253-261.
42. Volis, S. and Blecher, M. 2010. Quasi in situ: a bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. Biodiversity and Conservation, 19(9): 2441-2454.
43. Withers, L.A. and Williams, J.T. 1986. *In vitro* conservation. Rome: International Board for Plant Genetic Resources.
44. Zehr, B.E., Williams, M.E., Duncan, D.R. and Widholm, J.M. 1987. Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. Canad. J. Bot. 65: 491-499.
45. Internet1: <https://www.iucnredlist.org/>
46. Internet2: http://www.termeszettvedelem.hu/_user/browser/Image/Ex_situ/ex_situ_lista_szoveges_2014_05_22.pdf

***In vitro* sterile sowing and micropropagation for *ex situ* conservation**

KOVÁCS, ZS.,¹ TILLYNÉ, M.A.²

¹Szent István University, Faculty of Horticultural Science, Department of Botany and Soroksár Botanical Garden

²Szent István University, Faculty of Horticultural Science, Department of Floriculture and Dendrology

E-mail: zsofia.kovacs42@gmail.com

Summary

Protecting biodiversity is an important endeavor for nature conservation at international and regional level. Many factors endanger the long-term survival of wildlife, such as climate change, environmental pollution, the spread of invasive species, unsustainable land use, and human-induced damage (e.g. motocross, deforestation). *In situ* (conservation in the original habitat) is a priority and an advantage over *ex situ* (non-habitat conservation) methods. In some cases, however, long-term protection of the species cannot be achieved in the original habitat. For example, in the case of permanent damage to nature, which indirectly results in habitat degradation or in direct destruction of the population. In such cases, the use of *ex situ* methods is the only possibility for the survival of the species. Botanical gardens and arboreta are actively involved in the design and maintenance of collections, of live plant materials. In addition to preserving living plant material, however, the spread of *in vitro* methods is also significant. Several positive examples of

the sterile sowing and micropropagation can be described. The biotechnology method also allows the propagation of biological plant material for repatriation purposes and can be used for basic and applied research. It is important to aim to preserve genetic diversity, so clonal propagation is a less preferred method for protected species. However, in some cases, it is justified to use it to increase the number of individuals. Conversely, sterile sowing provides the opportunity to grow plant material under controlled conditions, and thus to preserve diversity in the species level.

Keywords: *ex situ*, *in vitro*, conservation biology, micropropagation

Szerzők:

Kovács Zsófia (kapcsolattartó szerző) – PhD hallgató, Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénytani Tanszék és Soroksári Botanikus Kert, 1118 Budapest, Villányi út 29-43.
Tillyné Mándy Andrea – CSc, egyetemi docens, Szent István Egyetem, Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszék, 1118 Budapest, Villányi út 29-43.