

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

200070 B

(51) Int. Cl.⁵

A 01 H 5/00
C 12 N 1/38

(22) Bejelentés napja: 1987.10.29. (21) 4878/87

(30) Bejelentés elsőbbsége:
(86 15 299) 1986.10.30. FR

(40) Közzététel napja: 1989.08.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.04.30.

(72) Feltalálók:

FREYSSINET Georges,
FREYSSINET Martine,
St Cyr au Mont d'Or, (FR)

(73) Szabadalmaz:

Rhone-Poulenc Agrochimie,
Lyon, (FR)

(54) ELJÁRÁS NAPRAFORGÓ REGENERÁLÁSÁRA EMBRIOGENEZISSSEL

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás *Helianthus annuus* (napraforgó) változatainak regenerálására szomatikus embriogenezissel sejtekből vagy szövetekből, első szakaszban napraforgó szövetek tenyésztésével hormontartalmú serkentő tápközegen embriogén kallusok és szomatikus embriók képzésére és az embriók növekedésének serkentésére, majd második szakaszban tenyésztéssel, amely lehetővé teszi az embriók csírázását és lehetőleg gyökeres növényekké fejlődését, úgynevezett csíranövény növekedést serkentő közegen.

A találmány értelmében úgy járnak el, hogy az első két lépést G-benzil-amino-purin hatásos mennyiségét, valamint szacharózt tartalmazó tápközegen hajtják végre auxin-típusú hormon távollétében.

HU 200070 B

A leírás terjedelme: 7 oldal, ábra nélkül

A találmány tárgya eljárás napraforgó növény regenerálására sejtekből vagy szövetekből szomatikus embriogenezissel.

Bár számos termesztett növényfajta elkülönített sejtjeiből vagy szöveiteiből regenerálható a növény, a napraforgóval (*Helianthus annuus*) kapcsolatos ilyen erőfeszítések gyakran eredménytelenek maradtak. Az irodalomban leírni néhány, a napraforgó szomatikus embriogenezissel végzett regenerálására vonatkozó eljárást, de ezek a módszerek csak ritkán genotípusokra vagy interspecifikus hidridekre vonatkoznak. Az explantátumokat egy első közegben tenyésztik, amely serkenti a kalluszképződést. A kalluszt aztán átviszik egy második közegbe, amely serkenti a szomatikus embriók és csíranövények képződését. A csíranövényeket ezután átviszik egy harmadik közegbe, amely serkenti a gyökérképződést, és a regenerált növényt ebben a szakaszban talajba lehet ültetni.

Paterson és Everett (*Plant Sci.*, 42., 125, /1985/) kifejlesztettek egy közegét, amely tulajdonképpen a Georgieva-Todorov és munkatársai (*Proc. 9th Int. Sunflower Conference, Torremolinos, Spanyolország, 1980, 122. oldal*) által kidolgozott közeg javított formája; ez a közeg indukálja az SS 415 B termesztett napraforgófajta regenerálódását szomatikus embriogenezissel sziklevél alatti fragmensekből. Az explantátumokat 2 hétig tenyésztik sötétben, majd 2-4 hétig világosban módosított Murashige és Skoog (MS) közegben, amely 40 mg/l adenin-szulfáttal, 1 mg/l 6-benzil-amino-purinnal (BAP), 1 mg/l naftalin-ecetsavval (NAA) és 0,1 mg/l gibberellinnel (GA₃) van kiegészítve. Az első 2 hét során laza kallusz képződik, majd a fényben zöld foltok tűnnek elő, amelyek hajtásokká alakulnak. Anatómiai vizsgálat azt mutatja, hogy ezek a zöld foltok a zigóta embriókhoz hasonló szomatikus embriók.

Chandler és Jan (*Agronomy Abstr.*, 58, /1983/) leírják a napraforgó regenerálását interspecifikus keresztezésekből származó éretlen embriókból. Az éretlen (4-5 napos) embriókat Chandler és Beard által leírt növekedést elősegítő embriónevelő táptalajra (*Crop. Sci.*, 23, 1004, /1983/) helyezik. A megnőtt embriókat 2-3 hét múlva átteszik MS-közeg alapú különböző táptalajokra, amelyek auxint és doxiciklint tartalmaznak változó dózisokban. Ezek a közegeken a növények különböző módokon hozhatók létre, beleértve a közvetlen csírázást vagy a kallusz indukciót, amelyet organogenezis vagy embriogenezis követ. A legjobb eredményeket 0-1 ppm közötti indolecetsav (IAA) és kinetin koncentrációval érik el. A rendszer előnye, hogy egyetlen embrióból több klónt állítanak elő.

Cooley és Wilcox a 0172377 számú európai szabadalmi bejelentésben egy olyan, HA 89 és RHA 274 napraforgó változatokra alkal-

mazott eljárást javasol, amely a fent leírt három szakaszból áll és három különböző táptalajon hajtják végre, amelyek közül az első két szakasz táptalaja szükségszerűen tartalmaz egy auxin-típusú hormont. Ennek az eljárásnak azonban több hátránya is van; egyrészt csak olyan embriókkal hajtható végre, amelyek mérete egy szűk tartományba (0,1-2 mm) esik, ezért kevésbé rugalmas, másrészt a közeg cserélni kell az első és a második szakasz között, végül pedig a kapott csíranövények regenerálódási foka még így is igen kedvezőtlen.

Találmányunk egy olyan egyszerűbb, napraforgó változatok regenerálására szolgáló eljárásra vonatkozik, amely olyan csíranövényeket eredményez, amelyeknek nagyobb a növekedési kapacitása, ha újra a talajban termesztik őket.

Közelebbről a találmány tárgya eljárás napraforgó változatok regenerálására éretlen embriókból

- az első szakaszban a sejtekből vagy a szövetekből embriogén kalluszt képezve hormontartalmú indukciós táptalajon tenyésztve,
- a második szakaszban az embriogén kalluszokat hormontartalmú táptalajon tenyésztve, így ezek növekszenek, fejlődnek és csíráznak,
- egy adott esetben végrehajtott harmadik szakaszban tenyésztéssel lehetőséget adva a növények növekedésére és fejlődésére.

A találmány szerinti megoldást az jellemzi, hogy az első két szakaszt azonos jellegű tápközegben végezzük, amely megfelelő mennyiségű G-benzil-amino-purin citokinin-típusú hormont valamint szacharózt tartalmaz, auxin-típusú hormon távollétében.

Leírásunkban a továbbiakban a százalékos értékek tömeg/térfogat értékeket jelölnek, amennyiben mást nem adunk meg.

Azok a növényi szövetek, amelyekből a szomatikus embriók előállításához explantátumokat lehet kivenni, a napraforgó (*Helianthus annuus*) olyan változataiból származnak, amelyeket elsősorban a szelekciós programokban használnak.

Az eljárást nyolc változat felhasználásával szemléltetjük: HA 89, HA 290, HA 291, HA 300, HA 303, T 76, RT 26 és óriás szürke csikos. A HA 89 változat Dade Counts-ból (Florida, USA), a HA 290, HA 291, HA 300, HA 303, T 76 és RT 26 változatok a Seedtec International Inc. cégtől (Woodland, Kalifornia, USA) és az óriás szürke csikos a Northrup King Seeds cégtől (Fresno, Kalifornia, USA) származik.

Az explantátumok üvegházban termesztett növényekből származnak, amelyeket ellenőrzött megtermékenyítésnek vetünk alá. A kalluszok előállítására az előnyösen alkalmazható explantátum az éretlen embrió. Az éretlen embriókat magházukkal együtt elkülönítjük a napraforgó fészekvirágzatoktól amikor

4-21 naposak; általában 0,1-5 mm méretűek. A nagyméretű éretlen embriókat több egyenlő részre vágjuk a gemmula-radicula tengelyen át haladó síkok mentén, így legtöbb-szörözhetjük az egyetlen embrióból nyert klónok számát.

A találmány szerinti eljárást a következőképpen hajtjuk végre:

HA 89, HA 290, HA 291, HA 300, HA 303, T 76, RT 26 és óriás szürke csíkos napraforgó változatokat üvegházban termesztünk (26 °C, 40000 lux, napi 15 órás megvilágítási idő) és ellenőrzött megtermékenyítésnek vetjük alá. Az éretlen embriókat 4-21 nappal a beporozás után eltávolítjuk. A fészekvirágzatokból kiemelt magvakat úgy sterilizáljuk, hogy 20 percre kereskedelemben kapható Javelle-víz oldatába mártjuk, amelynek klórmetrikus erőssége 3%, és amelyhez néhány csepp Tween 80 nedvesítőszer (8-10 ml etilén-oxidot tartalmazó etilén-oxid és nonil-fenol kondenzátum) adunk, majd steril desztillált vízzel háromszor mostuk. Az embriókat ezután aszeptikus körülmények között elkülönítjük, ha szükséges, feldaraboljuk és az első, úgynevezett embrió-indukciós közegbe helyezzük.

Ez az első közeg szervesen sokat, vitaminokat, aminosavakat, szacharózt és egy hormont tartalmaz a kalluszok képződéséhez megfelelő mennyiségben. A szervesen sok makroelemek sói és nyomelemek sói. Az ebben az első közegben alkalmazott makroelemeket például a következő vegyületek közül választhatjuk: magnézium-szulfát, kalcium-klorid, monokálium-foszfát, kálium-nitrát és ammónium-nitrát. A nyomelemeket tartalmazó sók közül megemlíthetjük a bórsavat, mangán-szulfátot, cink-szulfátot, nátrium-molibdátot, réz-szulfátot, kobalt-kloridot, kálium-jodidot és a vas-nátrium-EDTA kelátot. A szerves sóknak ez a kombinációja Murashige és Skoog néven ismert (MS).

A makroelemek és a nyomelemek előnyös mennyisége

1 liter közegben a következő:

magnézium-szulfát-heptahidrát	(370 mg)
kalcium-klorid-dihidrát	(440 mg)
monoalkálium-foszfát-dihidrát	(170 mg)
kálium-nitrát	(1900 mg)
ammónium-nitrát	(1650 mg)
bórsav	(6,2 mg)
mangán-szulfát-tetrahydrát	(22,3 mg)
cink-szulfát-heptahidrát	(8,6 mg)
nátrium-molibdát-dihidrát	(0,25 mg)
réz-szulfát-pentahidrát	(0,025 mg)
kobalt-klorid-hexahidrát	(0,025 mg)

4

kálium-jodid	(0,83 mg) és
vas-nátrium-EDTA kelát	(36,7 mg).

Az első közeg tartalmaz vitaminokat is, 5 úgymint nikotinsavat, tiamint, piridoxint, mio-inozitot, és egy aminosavat, úgymint alanint, glutamint, szerint, triptofánt, ciszteint vagy előnyösen glicint. A vitaminok és aminosavak előnyös mennyisége 1 liter közegre a következő:

10	nikotinsav	(0,5 mg)
	tiamin-hidroklorid	(0,1 mg)
	piridoxin-hidroklorid	(0,5 mg)
	mio-inozitol	(100 mg) és
15	glicin	(2 mg).

Az első közeg tartalmazhat egy vitamin- és aminosav-kiegészítőt is, ez a kiegészítő nem alapvetően fontos a szomatikus embriók képződéséhez, de növeli előfordulásuk gyakoriságát. Ebben az esetben a vitaminok és aminosavak előnyös mennyisége 1 liter közegben a következő:

	nikotinsav	(0,5 mg)
	tiamin-hidroklorid	(0,1 mg)
25	piridoxin-hidroklorid	(0,5 mg)
	mio-inozitol	(4000 mg)
	L-alanin	(1000 mg)
	L-glutamin	(800 mg)
	L-szerin	(160 mg)
30	L-triptofán	(50 mg)
	L-cisztein	(10 mg) és
	glicin	(2 mg).

Az első közegben levő szacharóz 8-12%, előnyösen 9% mennyiségben van jelen.

35 Az első közegben levő hormon, amelynek milyensége a találmány egyik jellemzője, citokinin-típusú, 6-benzil-amino-purin. Általában 0,5-1 mg/l közeg a megfelelő hormommennyiség. Agart, így Phytagar vagy Gelrite nevű terméket használunk a közeg megszilárdítására. 0,6% Phytagar vagy 0,3% Gelrite végső koncentráció jó eredményt ad. A közeg pH-ja 5,0-6,3 között mozoghat és előnyösen 5,0.

40 A közegét autoklávban sterilizáljuk, a hormonok kivételével, amelyeket mikroporozus membránon végrehajtott szűrővel sterilizálunk.

45 Az éretlen embriókat, amelyeket erre az első közegre helyezünk, körülbelül 2-3 hétig neveljük sötétben, 26 °C-on. Ez alatt az időszak alatt a zigóta embriók kifejlődnek és szomatikus embriók jelennek meg a sziklevel alatt és a sziklevel belső felületén a HA 291 változat esetében. Ezeket a szomatikus embriókat azután elkülönítjük és áthelyezhetjük a második, úgynevezett csíranövény növekedést biztosító közegre. Az embriogén kalluszt vagy az elkülönített embriókat 2-3 hétig 26 °C-on, világosban (1500 lux) neveljük 60 második közegen, napi 12-16, előnyösen 16 órás megvilágítási idővel. Ez alatt az idő alatt az embriók kicsíráznak és a képződött csíranövények gyökeret ereszthetnek.

65 Az első közeghez hasonlóan a második közeg szervesen sokat, vitaminokat, egy

aminosavat, szacharózt és egy hormont tartalmaz. A szervetlen sók makroelemek és nyomelemek sói. A makroelemek, nyomelemek, vitaminok és az aminosav ugyanazok, mint az első közegben, azonos koncentrációban, kiegészítő nélkül. A szacharóz előnyösen kisebb mennyiségben van jelen, mint az első közegben, például 2-4%-ban, előnyösen 3%-ban. Az alkalmazott hormon azonos az első közegben alkalmazott hormonnal, 6-benzil-10-amino-purin. Általában 0,1-0,5 mg/l a megfelelő mennyiség. Agart, például Phytagar vagy Gelrite nevű terméket alkalmazunk a közeg megszilárdítására, 0,6% Phytagar vagy 0,3% Gerlite végső koncentráció jó eredményt ad. 15 A közeget a fent leírt módon sterilizáljuk, és pH-ja 5,0-6,3, előnyösen 5,0.

A második közegen 2-3 hét után az elkülönített szomatikus embriók kicsíráznak és átalakulnak 2-5 cm-es csíranövényekké. A 20 gyökeret eresztett csíranövényeket át lehet helyezni talajba, tőzeg, vermikulit és finom homok 3 : 2 : 1 arányú steril keverékébe, amelyet Jiffy-cserépbe tesszük; a cserepeket nedves homokkal töltött tálba helyezzük és 25 átlátszó polietilén zacskóval betakarjuk a nagy nedvességtartalom fenntartása érdekében, majd az egészet 15 °C-os klímakamrába (6000 lux) helyezzük 12-16 óra, előnyösen 15 óra napi megvilágítási idő alkalmazásával. 10 nap múlva a növényeket nagyobb cserepekbe tesszük át és üvegházban neveljük 26 °C-on (4000 lux) napi 12-16 óra, előnyösen 15 óra megvilágítási idő alkalmazásával.

Azokat a növényeket, amelyek nem 35 eresztettek gyökeret, beolthatjuk üvegházban nevelt fiatal növényekbe szokásos módszerrel (lásd Habermann, Wallace: Amer. J. Bot., 45., 479, /1958/), vagy 10-20 napra áthelyezhetjük egy gyökerezhető közegbe vagy 40 harmadik közegbe.

A harmadik közeg szervetlen sókat, vitaminokat és szacharózt tartalmaz. A szervetlen sók makroelemek és nyomelemek sói. Az ebben a harmadik közegben alkalmazott makroelemeket a következő vegyületekből választhatjuk: magnézium-szulfát, kalcium-klorid, mononátrium-foszfát, kálium-nitrát és ammónium-szulfát. A nyomelemeket tartalmazó sók lehetnek például bórsav, mangán-szulfát, 50 cink-szulfát, nátrium-molibdát, réz-szulfát, kobalt-klorid, kálium-jodid és vas-nátrium-EDTA kelát. A szervetlen sóknak ez a kombinációja B5 néven ismert. A makroelemek és nyomelemek előnyös mennyisége 1 liter közegben a következő:

magnézium-szulfát-heptahidrát	(250 mg)	
kalcium-klorid-dihidrát	(150 mg)	60
mononátrium-foszfát-monohidrát	(169 mg)	
kálium-nitrát	(3000 mg)	
bórsav	(3 mg)	
mangán-szulfát-tetra-		65

hidrát	(13,2 mg)
cink-szulfát-heptahidrát	(2 mg)
nátrium-molibdát-dihidrát	(0,25 mg)
réz-szulfát-pentahidrát	(0,025 mg)
kobalt-klorid-hexahidrát	(0,025 mg)
kálium-jodid	(0,75 mg) és
vas-nátrium-EDTA kelát	(40 mg).

A harmadik közeg vitaminokat is tartalmaz. Ezek nikotinsav, tiamin, piridoxin és mio-inozitol. A vitaminok előnyös mennyisége 1 liter közegben a következő:

nikotinsav	(1 mg)
tiamin-hidroklorid	(10 mg)
piridoxin-hidroklorid	(1 mg) és
mio-inozitol	(100 mg).

A harmadik közeg tartalmaz szacharózt, aktív szenet vagy egy auxin-típusú hormont is. A szacharóz például 1-2%, előnyösen 1%, az aktív szén 0,1% mennyiségben van jelen. Ha aktív szén helyett inkább hormont alkalmazunk, 0,1-0,2 mg/l 3-indolecetsav választódik ki. Agart, úgymint Phytagar vagy Gelrite nevű terméket használunk a közeg megszilárdítására. 0,5% Phytagar vagy 0,25% Gerlite végső koncentráció megfelelő. A közeg pH-ja 5,0 és 6,0 között változhat és előnyösen 5,0. A közeget autoklávban sterilizáljuk.

A növényeket ezen a közegen 2-3 hétig neveljük 26 °C-on világosban (1500 lux), napi 12-16 órás, előnyösen 16 órás megvilágítási idővel. A növények ezután gyökeret eresztenek és áthelyezhetők talajba.

Az ezzel az eljárással kapott növények fenotípusukban különbözhetnek a kiindulási anyagtól, az in vitro stressz következtében. A növényeket kézi munkával porozzuk be és addig tároljuk, amíg a magvakat összegyűjtjük. Néhány magvat eltüntetünk az új napraforgó növények vizsgálatára és az előnyös mutánsok lehetséges kiválasztására, amelyeket azután bevonunk egy változat szelekciós programba.

A találmány szerinti megoldást a következő nem-korlátozó példákkal szemléltetjük közelebbről:

1. példa

A törzsoldatok elkészítése

a) B5 törzsoldat

Tízszerezs töménységű B5 törzsoldatot úgy állítunk elő, hogy egy zacskó szacharóz nélküli, a B5 közeget (Flow Laboratories gyártmánya, tartalmazza a B5 szervetlen sóit, 1 mg nikotinsavat, 1 mg piridoxin-hidrokloridot, 10 mg tiamin-hidrokloridot és 100 mg inozitolt - végső koncentrációk) föloldunk

desztillált és ionmentesített vízben (1000 cm³ végső térfogat). A törzsoldatot 100 cm³-es aliquot részekre osztjuk és -20 °C-on tároljuk.

b) 6-benzil-amino-purin (BAP) törzsoldat

1 g/l BAP tartalmú törzsoldatot készítünk úgy, hogy 100 mg 6-benzil-amino-purint feloldunk néhány cm³ 0,15 n sósavoldatban, az oldatot enyhén melegítjük és desztillált és ionmentesített vízzel 100 cm³-re hígítjuk. Ezt az oldatot 0,2 µm-es Minisart NML jelű membránszűrőn (Sartorius gyártmány) szűrve sterilizáljuk, mielőtt hozzáadnánk az első és a második közeghez.

c) 3-indolecetsav (IAA) törzsoldat

0,2 g/l IAA-t tartalmazó törzsoldatot készítünk úgy, hogy 20 mg 3-indolecetsavat feloldunk néhány cm³ tiszta etanolban, és az oldatot desztillált és ionmentesített vízzel 100 cm³-re hígítjuk. Ezt az oldatot 0,2 µm-es Minisart NML jelű membránszűrőn (Sartorius gyártmány) szűrve sterilizáljuk, mielőtt hozzáadnánk a harmadik közeghez.

d) Vitamin- és aminosav-kiegészítő

Chandler és Beard szerint (Crop. Sci., 23., 1004, /1983/).

Húszszoros töménységű vitamin- és aminosav-törzsoldatot készítünk úgy, hogy 39 g mio-inozitolt, 10 g L-alanint, 8 g L-glutamint, 1,6 g L-szerint, 0,5 g L-triptofánt és 0,1 g L-ciszteint együtt feloldunk desztillált és ionmentesített vízben (végső térfogat 500 cm³). A törzsoldatot 50 cm³-es aliquot részekre osztjuk és -20 °C-on tároljuk.

2. példa

A közegek előállítása

a) Első közeg vagy embrióindukciós közeg

A közeget úgy állítjuk elő, hogy egy zacskó szacharóz nélküli Murashige és Skoog közeget (a Flow Laboratories gyártmánya, tartalmazza az MS közeg szervesetlen sóit, 0,1 mg tiamin-hidrokloridot, 0,5 mg nikotinsavat, 0,5 mg piridoxin-hidrokloridot, 2 mg glicint és 100 mg inozitolt) és 90-120 g szacharózt feloldunk desztillált és ionmentesített vízben. Adott esetben hozzáadunk 500 cm³ vitamin- és aminosav-kiegészítőt, majd pH-ját 0,1 n nátrium-hidroxiddal 5,0-ra állítjuk be, a térfogatot 1 literre egészítjük ki, és 6 g Phytagar (Gibco gyártmány) vagy 3 g Gelrite (Kelco gyártmány) hozzáadása után az elegyet 20 percig autoklávozzuk 68,9 kPa nyomáson. Amikor a közeg langyos, hozzáadjuk a

6

fent leírt módon sterilizált BAP-oldatot (2,2-4,4 µM; 0,5-1 cm³). A elegyet ezután Petri-csészékbe öntjük.

5 b) Második közeg vagy csíranövény nevelő közeg

A második közeget az első közeghez hasonló módon állítjuk elő, együtt feloldva egy zacskó MS közeget, 30 g szacharózt és 6 g Phytagart vagy 3 g Gelrite-et 1 liter vízben, és autoklávozás után hozzáadva a steril BAP-oldatot (0,44-2,2 µM; 0,1-0,5 cm³). A közeget Plantcon-csészékbe (a Flow Laboratories gyártmánya) öntjük.

c) Harmadik közeg vagy gyökereztető közeg

A harmadik közeget úgy állítjuk elő, hogy 10-20 g szacharózt adunk a B5 desztillált és ionmentesített vízzel készített törzsoldatának 100 cm³-éhez. A pH-t 0,1 n nátrium-hidroxid oldattal 5,0-ra állítjuk be, majd az elegy térfogatát 1 literre egészítjük ki és 5 g Phytagart és 1 g aktív szén adunk hozzá. Autoklávozás után a közeget Mason-kannákba öntjük. Ha 3-indolecetsavat is tartalmazó harmadik közeget akarunk használni, az aktív szén kihagyjuk a harmadik közeg készítése során. Autoklávozás után a langyos közeghez hozzáadjuk a steril IAA-oldatot (0,57-1,11 µM; 0,5-1 cm³). A közeget hasonlóképpen Mason-kannákba öntjük.

A harmadik közeg folyékony változata csak a B5 szervesetlen sóit és 1% szacharózt tartalmaz 5,0 pH-n. Az elegyet 10 ml-es részletekben szűrőpapírhidat tartalmazó üvegcsövekbe öntjük Chandler és Beard módszere (Crop. Sci., 23., 1004, /1983/) szerint, majd autoklávozzuk.

3. példa

Az éretlen embriókat magházukkal együtt elválasztjuk a napraforgó (*Helianthus annuus*, T 76 változat) fészekvirágzatoktól, amikor elérik a 0,5-1,5 mm-es nagyságot. A magvakat 20 percig sterilizáljuk Javelle-víz oldatában, amelynek klórmétrikus erőssége 3%, és desztillált vízzel mossuk. Az éretlen embriókat burkuktól elválasztjuk és Petri-csészékbe, az első közegre helyezzük. Az első közeget a fent leírt módon állítjuk elő, 90 g/l szacharózzal és 0,5 mg/l (2,2 µM) BAP-pal.

A Petri-csészéket sötétben inkubáljuk 3 hétig, hogy serkentsük a szomatikus embriók képződését.

Ebben a szakaszban a szomatikus embriókat, amelyek elkezdtek csírázni, elkülönítjük a zígita embrióktól és a második közegre, Plantcon-csészékbe helyezzük. A második közeg, amelyet a fent leírt módon elkészítet-

tünk, 0,1 mg/l BAP-t tartalmaz, ami 0,44 μ M-nak felel meg. Az embriókat világosban neveljük 3 hétig, és csíranövényekké fejlődnek.

A 2-5 cm magasságú csíranövényeket ezután átesszük a harmadik közegre, hogy megindítsuk a gyökérképződést. A harmadik közeg, amelyet a fent leírt módon készítünk, előnyösen 10 g szacharózt tartalmaz. Gélesített közeg esetén 1 g/l aktív szén hozzáadása megszünteti az előző közegből származó BAP maradék hatását (Maene és Debergh: Plant Cell Tissue Organ Culture, 5, 23-33 /1985/), és serkenti a gyökerek gyors növekedését. Körülbelül 2 hét után a csíranövényeket áttehetjük talajba.

Ha a csíranövények elkezdtek gyökeret eresztetni a második közegen, érintkezésbe hozhatjuk őket a harmadik folyékony közeggel, a Chandler és Beard által leírt technikával (Crop. Sci., 23, 1004, /1983/). Ez a megoldás lehetővé teszi a gyökérzet jelentős fejlődését és elkerüli a gyökerek sérülését, amikor a növényeket a talajba visszük át.

4. példa

Helianthus annuus HA 89 változatának éretlen embrióit eltávolítjuk, amikor eléri a 0,1-0,5 mm-es méretet és az endospermiummal együtt első közegre helyezük. Az első közeg 90 g/l szacharózt és 0,5 mg/l (megfelel 2,2 μ M-nak) BAP-t tartalmaz. 3 hétig sötétben tartás után a szomatikus embriókat elkülönítjük és friss első közegre helyezük, még mindig sötétbe. Az elkülönített embriókon másodlagos szomatikus embriók képződnek. 3 hét sötétben tartás után a másodlagos

szomatikus embriókat elkülönítjük és a második közegre helyezük. A második közeg 30 g/l szacharózt és 0,1 mg/l (0,44 μ M) BAP-t tartalmaz.

A kifejlődő csíranövényeket ezután átesszük folyékony vagy gélesített harmadik közegre, hogy gyökerezzenek. Ezután áttehetők talajba.

5. példa

Helianthus annuus HA 89 változatának éretlen embrióit 21 nappal a beporzás után eltávolítjuk; 5 mm méretűek. Elválasztjuk őket a burkuktól, és mielőtt az első közegre helyezük, hosszában négy egyenlő részre vágjuk két sík mentén, amelyek merőlegesen egymásra és párhuzamosak a gemmula-radicala tengellyel. Ebben az esetben az első közeg 90 g/l szacharózt és 1 mg/l BAP-t tartalmaz. 3 hét sötétben tartás után a szomatikus embriókat elkülönítjük, és második közegre helyezük. A második közeg 30 mg/l szacharózt és 0,5 mg/l BAP-t tartalmaz.

A kifejlődő csíranövényeket ezután áttehetjük folyékony vagy gélesített harmadik közegre, hogy gyökerezzenek, majd talajba. Azokat a csíranövényeket, amelyek nem eresztettek gyökeret, beoajthatjuk fiatal növényekbe a Habermann és Wallace által leírt módszer (Amer. J. Bot., 45, 479, /1958/) szerint.

6-27. példák

Az alábbi példák bemutatják azoknak a kombinációknak egy-egy részét, amelyek a különböző leírt eljárásokkal megvalósíthatók.

Példa száma	Változat	Méret (mm)	Szét-darabolás	I. közeg			II. közeg			gyökeresítés
				Táp-közeg	Szacharóz (%)	BAP (mg/l)	Táp-közeg	Szacharóz (%)	BAP (mg/l)	
6.	T 76	1,5	-	modMS*	9	1	modMS*	3	1	modMS* +3% szacharóz 0,5 BAP
7.	T 76	1,5	-	modMS*	9	1	modMS*	3	1	III SC
8.	T 76	1,5	-	modMS*	9	1	modMS*	3	1	III L
9.	T 76	1,5	-	MS	9	1	MS	3	1	III SC
10.	T 76	1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,1	III SC
11.	T 76	1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,1	III L
12.	T 76	1,5	-	supMS**	9	0,5	MS	3	0,1	III SA 0,1
13.	T 76	≤3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
14.	T 76	≤3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
15.	T 76	=5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
16.	T 76	=5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L

Pél- da száma	Válto- zat	Mé- rel (mm)	Szét- dara- bolás	I. közeg			II. közeg			győ- ke- rez- tetés
				Táp- közeg	Sza- charóz (%)	BAP (mg/l)	Táp- közeg	Sza- charóz (%)	BAP (mg/l)	
17.	RT 26	≤1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,1	III L
18.	RT 26	≤3	-	supMS **	9	0,5	MS	3	0,1	III SC
19.	HA 89	≤1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,5	III SC
20.	HA 89	≤3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
21.	HA 89	≤3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
22.	HA 89	≤3	-	supMS **	9	0,5	MS	3	0,1	III SC
23.	HA 89	=5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
24.	HA 89	=5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
25.	HA 89	>5	+	MS	9	1	MS	3	0,5	III SC
26.	HA 291	≤1,5	-	supMS **	9	0,5	MS	3	0,1	III SA 0,1
27.	HA 291	=5	+	supMS **	9	0,5	MS	3	0,1	III SA 0,2

* A módosított MS közeg literenként 600 mg kalcium-klorid-dihidráttal, 1260 mg kálium-nitráttal, 1100 mg ammónium-nitráttal és 250 mg mio-inozitolt tartalmaz. A többi alkotórészek változatlanok.

**kiegészített MS közeg

III SA = szilárd III közeg + IAA (0,1 vagy 0,2 mg/l)

III SC = szilárd III közeg + aktiv szén

III L = folyékony III közeg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a *Helianthus annuus* (napraforgó) változatainak regenerálására szomatikus embriogenezissel sejtekből vagy szövetekből,

egy első szakaszban napraforgó szövetek tenyésztésével hormontartalmú serkentő tápközegen embriogén kalluszok és szomatikus embriók képzésére és az embriók növekedésének serkentésére, majd

egy második szakaszban tenyésztéssel, amely lehetővé teszi az embriók csírázását és célszerűen gyökeres növényekké fejlődését csíranövény növekedést serkentő közegen, majd

adott esetben egy harmadik szakaszban a növények gyökerei növekedésének vagy képződésének serkentésével gyökereztető közegen, *azzal jellemezve*, hogy az első két lépést 0,1-8 µmol/liter 6-benzil-amino-purint, továbbá az első lépést 8-12 t%, a második lépést 2-4 t% szacharózt tartalmazó, auxin-típusú hormontól mentes tápközegen hajtjuk végre.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest - A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
R 4923 - KJK

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szövetenként éretlen embriókat alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a 6-benzil-amino-purint az első közegben 2,2-4,4 µmol, a második közegben 0,44-4,4 µmol koncentrációban alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az első közegben 9 t% és a második közegben 3 t% szacharózt alkalmazunk.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy első közegként Murashige és Skoog (MS) típusú közegét alkalmazunk.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy első közegként vitamin és aminosav-kiegészítőt tartalmazó Murashige és Skoog (MS) típusú közegét alkalmazunk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a második közeg az első, vitaminnal és aminosavakkal ki nem egészített közeggel azonos mennyiségű szervesetlen sókat, vitaminokat és aminosavat tartalmaz.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy adott esetben regenerálódásra képes több részre szétdarabolt 4-21 napos, 0,1-5 mm méretű éretlen embriókat tenyésztünk.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a második szakasz után a kapott gyökértelen növényeket gyökereztető közegen tenyésztjük a gyökérképződés serkentésére.