

Magyarország legidősebb fehér akác egyedének *in vitro* felszaporítása

Demku Tamás¹, Dr. Gyulai Gábor², Láposi Réka³,
Veres Anikó⁴

Magyarország legidősebb (302 éves) fehérakác (*Robinia pseudoacacia* L.) példányának *in vitro* és *ex vitro* fenntartását tűztük ki célul. A fa fizikai állapota miatt rügykultúrából kiinduló *in vitro* járulékos hajtástenyésztést alkalmaztunk. A regenerált növényeket az akklimatizáció után a SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet Kísérleti Terére ültettük ki. A genetikai stabilitás megállapítására DNS-t izoláltunk a felszaporított egyedekből és 12 *Robinia pseudoacacia* specifikus SSR (Simple Sequence Repeat) primerrel hasonlítottuk össze az idős bábolnai egyed DNS-ével. Az eredmények alapján a vizsgált lókuszokon nem találtunk eltéréseket, de a teljes azonosság megállapításához még további molekuláris genetikai vizsgálatok szükségesek.

Bevezetés

A fehér akác (*Robinia pseudoacacia* L.) sokoldalúan és az egyik legnagyobb mennyiségben hasznosított fás szárú faj a *Fabaceae* családból világszerte. Hazánk erdős területeinek közel egynegyedét az akác alkotja.

Észak-Amerikában, az Appalache-hegységben őshonos, de a származási területe keleti és nyugati régióra osztható (Stephens, 1973). A fehér akácot az őshazájában gyors növéssű, rövid életű fajokként, megközelítőleg 90 évig élőként tartják számon (Farrar, 1995).

Az európai kontinensen 1601-ben jelent meg Jean Robin (1550-1629) francia királyi kertésznek köszönhetően, aki a párizsi Királyi Gyógynövény Kertet gazdagította egy, még a mai napig élő példánnyal (Arbres Remarquables de Paris). Magyarországon a jelenleg élő legidősebb fehér akácfa 1710-ből származik, és a Bábolnai Nemzeti Ménesbirtok udvarán található.

Hazánkban a fehér akác elterjedése a sokoldalú felhasználhatósága miatt gyors volt: 1885-ben 37 000, 1911-ben 109 000 és 1938-ban 86 000 ha. 1960-ban Európán belül Magyarországon volt a legnagyobb az elterjedési területe, mely 2009-re elérte a 415 000 ha-t (Rédei, 2003; Rédei *et al.*, 2006, 2011).

A 302 éves bábolnai fa, a *polyphyll akácok* csoportjába tartozik (1. ábra). Figyelemmel a bábolnai öreg fa életkorára és fizikai állapotára (erősen korhadt, vasszerkezettel van összefogva és feltámasztva a koronája) célul tűztük ki a fa *in vitro* és *ex vitro* megőrzését a jövő nemzedék számára.

Anyag és módszer

In vitro tenyésztés

Rédei és munkatársai (Rédei *et al.*, 2002, 2005) gyökér explantumból sikeres *in vitro* mikroszaporítási módszert dolgoztak ki a *R. pseudoacacia* L. fajra. A

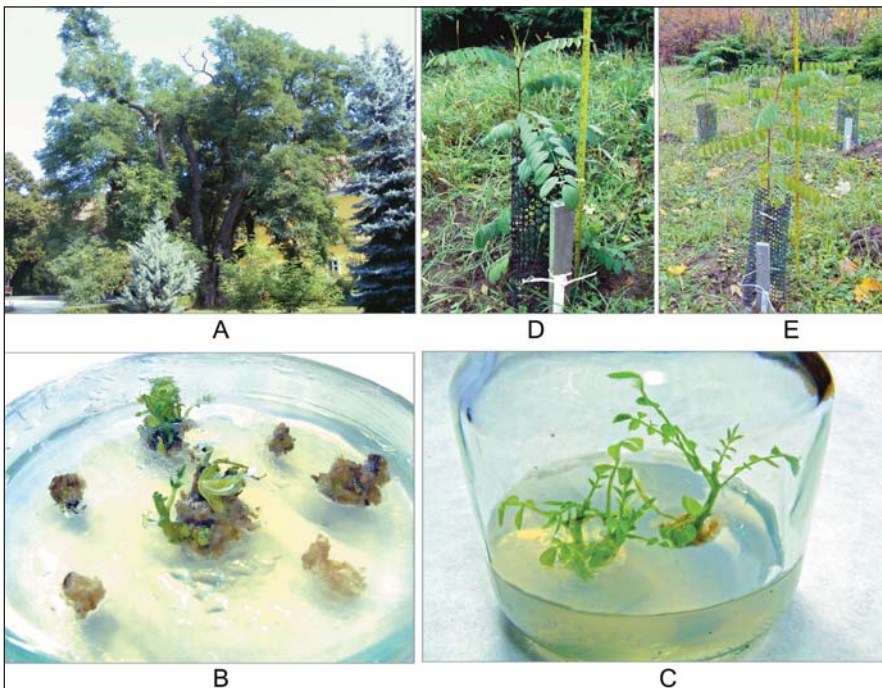
302 éves bábolnai fehér akác fizikai állapota miatt ezt a módszert nem tudtuk alkalmazni, így rügymintákat gyűjtöttünk az egyedről és ezekből indítottunk *in vitro* tenyészetet. A rügyek sterilizése során 70%-os alkoholban 1 perc áztatást, 3:1 arányú háztartási HYPO (Na-hypoklorit) oldatban 30 perc ráztatást; majd 3-szoros steril desztillált vízzel alapos mosást alkalmaztunk.

A sterilizést követően a rügyeket növekedési hormonokat [0,2 mg/l NES (naftilecetsav) és 1 mg/l BA (benziladenin)], 20 g/l szacharózt és 6 g/l agart tartalmazó MS (Murashige & Skoog, 1962) táptalajokra helyeztük.

A megfelelő hajtásregenerációhoz különböző összetételű táptalajokat teszteltünk (1. táblázat).

A tenyészetek kontrollált körülmények között, 22±2°C-on, 16h fény/8h sötét fényperiódus, 40 W-os Tungstram fénycsövek fényénél nevelkedtek.

A gyökerezés kiváltásához a hajtásokat hormonmentes WPM táptalajra helyeztük (Lloyd, 1980). A sikeres gyökerezést követően a növényeket „B”



1. ábra: A – Az 1710-es bábolnai *Robinia pseudoacacia* L.; B – *In vitro* tenyésztés létesítése; C – *In vitro* növények regenerálása; D, E – Az akklimatizált egyedek fenntartása a Kísérleti Téren.

¹ Doktorandusz, SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

² MTA doktora, egyetemi tanár, SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

³ főiskolai docens, Károly Róbert Főiskola, Környezettudományi Intézet, Gyöngyös

⁴ egyetemi adjunktus, SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

típusú általános virágföldbe ültették, ahol üvegburás takarást alkalmazva sikeresen akklimatizáltuk az egyedeket.

A növényeket a SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet Kísérleti Terére (továbbiakban Kísérleti Tér) ültették ki.

Genetikai vizsgálatok

A felnevelt regeneráns növények és a kontrollként szolgáló bábolnai anyanövény leveleiből DNS-t izoláltunk *Qiagen – Plant DNeasyR mini kit* (Bio-marker Kft., Gödöllő) felhasználásával, ezt követően NANODROP spektrofotométerrel mértük meg a koncentrációját. A PCR fragmentum felszaporításához 12-15 ng/μl-es koncentrációra felhígított DNS-t használtunk.

A molekuláris vizsgálatokhoz Chunlan *et al.* (2004) és Mishima *et al.* (2009) alapján 12 *Robinia pseudoacacia* fajra specifikus SSR (*Simple Sequence Repeat*) primert alkalmaztunk. A PCR termékeket *Bio-Rad Icycler™ Thermal Cycler* készülék és a következő protokoll felhasználásával szaporítottuk fel. 10 μl végtérfogatú termék tartalmazott: 1 μl DNS templátot, 1,2 mMol dNTP-t, 1 μl 10X-es puffert (West Team Biotech), 0,5 Unit Taq polimerázt (West Team Biotech), 2 μl (10 μM) forward primert, 2 μl (10 μM) reverz primert, 1 μl (10 μM) M13 CY5 jelölt primert (Vallunen, 2006) és 3,7 μl steril vizet (Millipore S.A.S., France). A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen alkalmaztuk: 2 perc 95°C, majd 10 cikluson keresztül 10 mp 95°C, 30 mp 65°C ciklusonként 1°C csökkenéssel, 1 perc 72°C, 34 cikluson keresztül: 10 mp 95°C, 30 mp 56°C, 1 perc 72°C, végül 5 perc 72°C.

Az SSR primerpárokkal történő PCR felszaporítást követően, a DNS fragmentumokat nagy felbontású, vertikális poliakrilamid gélen, ALF express II (Automated Laser-Fluorometer) DNS analízátor felhasználásával elemeztük. A pontos allélméretet meghatározásához az ALFwin Fragment Analyzer 1.03 szoftvert alkalmaztunk.

Eredmények és értékelésük

In vitro felszaporítás

A kezdetben alkalmazott táptalaj (T1, 1. táblázat) nem biztosított elegendő hajtáshozamot, ezért a kallusz-tenyészteket új, csökkentett hormonkoncentrációjú táptalajra (T2, 1. táblázat) helyeztük át. A módosítás nem hozta meg a várt eredményt, ezért megemeltük a pH értéket 5,6-ról, 5,8-ra és csökkentettük a felhasznált NES (0,1g/l-re) és agar

1. táblázat: A felhasznált táptalajok összetétele

	Táptalaj	BA (mg/l)	NES (mg/l)	GA3 (mg/l)	Agar (g/l)	Szacharóz (g/l)	pH
T1	½ MS	1	0,2	-	6	20	5,5-5,6
T2	½ MS	0,5	0,2	-	6	20	5,5-5,6
T3	½ MS	0,5	0,1	-	4	20	5,7-5,9
T4	1 MS	0,5	0,1	0,3	4	20	5,7-5,9
T5	WPM	-	-	-	6	20	5,5-5,6

2. táblázat: A 302 éves bábolnai fehérek akác, az *in vitro* felszaporított egyedek SSR adatai és a molekuláris genetikai vizsgálatokhoz felhasznált primerek (1 Mishima *et al.*; 2 Lian *et al.*)

Primer név	RP 102 ¹	RP 106 ¹	RP 109 ¹		RP 150 ¹	
Bábolna 1710	191 bp	127 bp	135 bp	147 bp	185 bp	195 bp
<i>In vitro</i> 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>In vitro</i> 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>In vitro</i> 3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>In vitro</i> 4	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Primer név	RP 206 ¹		RP 211 ¹	RP 01B ¹	Rops 15 ²
Bábolna 1710	213 bp	227 bp	194 bp	170 bp	128 bp
<i>In vitro</i> 1	✓	✓	✓	✓	✓
<i>In vitro</i> 2	✓	✓	✓	✓	✓
<i>In vitro</i> 3	✓	✓	✓	✓	✓
<i>In vitro</i> 4	✓	✓	✓	✓	✓

mennyiségét 4 g/l-re, így lágyabb táptalajt (T3, 1. táblázat) biztosítottunk a növények számára (Kirilla *et al.*, 2010). Ez a módszer gyors növekedést és hajtásindukciót eredményezett, melynek következtében 2-3 hetente vált szükségessé a passzálás Jámborné *et al.* (2005) és Kirilla *et al.*, (2010) eredményeihez hasonlóan.

A hajtáshozam növelése érdekében a T3-as táptalajt 0,3 mg/l GA3-mal (gibberellinsav) egészítettük ki (T4, 1. táblázat) (Kamlesh *et al.*, 2009). A GA3 hatására ugrásszerű hajtásnövekedés indult meg. A levélhozam szintén erőteljesebbé vált (1. ábra).

Növényregenerálás

A hajtásregeneráló táptalajon az átlag 5 cm-es magasság elérése után a gyökeresedés WPM táptalajon (T5, 1. táblázat) spontán módon megindult. Ekkor a gyökereket körbevevő táptalajjal együtt a fiatal, *in vitro* növényeket átültettük „B” típusú általános virágföldbe és üvegburával fedtük le, megvédve a páratartalom különbségéből adódó kiszáradástól.

Miután a növények akklimatizálódtak az új közeghez, 1-2 hét alatt, az üvegbura fokozatos eltávolításával kelően megerősödtek, majd 2-3 hét után kiültetésre kerültek a Kísérleti Térre.

Az első három példány 2012. június 16-án került kiültetésre és 2012. szeptember 11-én meghaladták az átlag 50 cm-es magasságot. 2012. év nyarán további példányokat ültettünk ki és mindegyik egyed életképes maradt (1. ábra).

Genetikai stabilitás

A növényregenerálás kallusz fázison keresztül valósult meg, így mindenképpen szükségessé váltak a genetikai vizsgálatok. A vegetatív úton szaporított növények DNS-ujlenyomatának elkészítéséhez elterjedten alkalmazott módszer az SSR analízis. Az SSR markerek nagyfokú polimorfizmusának köszönhetően a különböző fajták elkülönítésére már 6 SSR primer alkalmazása is elegendő (Galli *et al.*, 2005; Halász *et al.*, 2005). A fajtaazonosság bizonyítására 12 *Robinia pseudoacacia* specifikus SSR-lókuszon hasonlítottuk össze az *in vitro* regenerált növények DNS-ét a kontroll Bábolna-1710 egyed DNS-ével. A kezdeti eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált lókuszekben nem mutatható ki eltérés a bábolnai és a Kísérleti Téren lévő egyedek között (2. táblázat).

A fajták elkülönítéshez 6 SSR marker is elegendő, de az azonosság bizonyításához ennél jóval több, 30-32 primerre

lenne szükség, ezért tervezzük további primerek bevonását is a vizsgálatokba.

Értékelés, megvitatás

A bábolnai 1710-es *Robinia pseudoacacia* L. egyed helyi jelentőségű védett természetvédelmi emlékként van nyilvántartva. Ezt az egyedet a gödöllői Szent István Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézetében *in vitro* és *ex vitro* sikerült felszaporítani. Az eddigi eredményeink alapján nem mutatható ki genetikai variabilitás a regeneránsok között, de a teljes azonosság bizonyításához még további DNS alapú vizsgálatok szükségesek.

Irodalom

Chunlan L, Oishi R, Miyashita N, Hogetsu T (2004): High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 836-841.
 Farrar J L (1995): *Trees of the northern United States and Canada*. Ames, IA: Blackwell Publishing. 502.
 Galli Z, Halász G, Kiss E, Heszky L, Dobránszki J (2005): Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *HortScience* 40(7): 1974-1977.
 Gyulai G, Láposi R, Rennerberg H, Veres A, Herschbach C, Fábian Gy, Waters L Jr (2011): *Conservation genetics (1710–2010) - Cloning of*

living fossils: Micropropagation of the oldest Hungarian black locust tree (*Robinia pseudoacacia*) planted in 1710 (Bábolna, Hungary). In: *Plant Archaeogenetics*. 117-127.

Halász G, Veres A, Kozma P, Kiss E, Balogh A, Galli Zs, Szőke A, Hoffmann S, Heszky L. (2005): Microsatellite fingerprinting of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the Carpathian Basin. *Vitis* 44: 173-180.

Jámborné Benczúr E, Dobránszki J (2005): *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 324.

Kamlesh K, Anju B, Raj D (2009): Efficient regeneration of plantlets from callus and mesophyll derived protoplasts of *Robinia pseudoacacia* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2009) 96:95-103, DOI 10.1007/s11240-008-9465-y.

Kirilla Z, Balla I, Palkovics L, Laimer M (2010): Fehér akác (*Robinia pseudoacacia* L.) klónok *in vitro* szaporítása, víruseszterelése és hőkezelése. XVI. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2010. március 11. Összefoglalók, 85.

Láposi R. (2011): A fehér akác (*Robinia pseudoacacia* L.) és rokon fajainak genetikai jellemzése SSR, ITS és cpDNA szekvenciák alapján. Diplomamunka. SZIE, MKK, Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő.

Lloyd G, McCown B H (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc*, 421-427.

Mairie de Paris (2011): *Arbres Remarquables de Paris*, 2011.

Mishima K, Hira T, Urano S, Watanabe A, Takata K (2009): Isolation and characterization of microsatellite markers from *Robinia pseudoacacia* L. *Molecular Ecology Resources* Vol. 9 No. 3:850-852.

Murashige T & Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97.

Rédei K, Osváth-Bujtás Z and Balla I (2002): Clonal approaches to growing black locust (*Robinia pseudoacacia*) in Hungary: a review, *Forestry*, Vol. 75, No. 5.

Rédei K (2003): Bewirtschaftung und Verbesserung von Robinie (*Robinia pseudoacacia*) in Ungarn. - *Die Holzzucht*, 12:15-17.

Rédei K, Balla I, Osváth-Bujtás Z, Veperdi I (2005): Szövettenyésztésen alapuló mikroszaporítási eljárások alkalmazása az akác szelekciós nemesítésében. Alföldi Erdőkert Egyesület Kutatói Nap, Tudományos eredmények a gyakorlatban. Szeged. 2229.

Rédei K, Osváth-Bujtás Z, Veperdi I (2006): Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) clonal seed orchards in Hungary. *Silva Balcanica*, 7(1):63-68.

Rédei K, Csiba I, Keseru Zs, Kamandiné Végh Á, Györi J (2011): The Silviculture of Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) in Hungary: a Review, ISSN: 1847-6481, SEEFOR.

Stephens, H A (1973): *Woody plants of the North Central Plains*. Lawrence, KS: The University Press of Kansas. 530.

Vallunen J A (2006): *Protocols for Working with M13-Tailed Primers* (v. 2.3.1)

TÓTH IMRE: Lomblevelű díszfák, díszcserjék kézikönyve

Tarkavirág Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Dunaharaszti, 2012, 789 oldal.

A kertészeti dendrológia doyenje, Tóth Imre a fás szárú növények terén szerzett szakmai ismeretanyagának és élettapasztalatának összegzésére vállalkozott a most napvilágot látott művével. A szerző dolgozott dendrológusként a vácrátóti botanikus kertben, a Fővárosi Kertészeti Vállalat díszfaiskolájának vezetőjeként, s címzetes egyetemi docensként két évtizede oktatja a dendrológiát a Budapesti Corvinus Egyetem Dísznövénytermesztési és Dendrológiai Tanszéke keretében. Munkálkodása közben 12 könyvet, tankönyvet írt – részben társszerzőkkel – tanulóknak, hallgatóknak, kertészeknek és kertbarátoknak. E könyv alapját a Mezőgazdasági Kiadónál az ő tollából 1969-ben megjelent *Díszfák, díszcserjék* c. mű képezi, amelyet közel fél évszázad bővülő ismeretanyaga tesz most teljessé. Az alapvető alaktani fogalmak után család- és nemzetséghatározót találunk, amit 255 nemzetség, 911 faj és 1390 fajta jellemzése követ. Ezekben a morfológiai sajátosságok megadása után az elterjedési terület, ökológiai igény, kertészeti felhasználás, gondozás, fontosabb kórokozók és

kártevők, szaporítási mód tömör bemutatását olvashatjuk 856 levél ábrájának közreadásával. A kötetet a szakkifejezések szótára, a taxonok leíróinak rövid életrajzi adatai, a tudományos nemzetség-, faj- és fajtanevek jelentésének megfejtése, továbbá térképek, irodalomjegyzék és névmutatók teszik teljessé.

Az olvasó a kötet kézbevételekor bizonyára hiányolni fogja a színes fényképeket, látványos ábrákat, az „olvasóbarát” szerkesztést, amelyekkel a mostanában megjelent „pazar külföldi művek” – gyakran gyatra – magyar fordításaiban találkozhat. Lássuk be, hogy hazai szerző – hacsak jelentős anyagi hozzájárulással nem támogatja a kiadót – nem tud ilyen művet manapság megjelentetni. Ezért is lehet az, hogy Tóth Imre nagyszerű könyvének megjelentetését magának a szerzőnek kellett felvállalnia.

Mivel az erdész-kollégák közül sokan foglalkoznak díszfákkal, díszcserjékkel, jó szívvel ajánlhatjuk nekik e remek könyvet a kertészeti dendrológiai ismereteik elmélyítésére.

Dr. Bartha Dénes



Tóth Imre
**LOMBLEVELŰ
DÍSZFÁK, DÍSZCSERJÉK
KÉZIKÖNYVE**