

A szőlő (*Vitis* ssp.) mikroszaporítás kutatásának és gyakorlati alkalmazásának hazai tapasztalatai

Haydu Zsolt

FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Kecskemét
Kecskemét, Urihegy 5/A, Pf. 25., H-6001

Összefoglalás: Hazánkban a szőlő mikroszaporításának kutatása 1976-ban kezdődött. Intézetünkben 1981-ben kezdtük el kutatni e témát és dolgoztunk ki módszert. A módszer fő elemei: (1) az „egy rügy – egy hajtás” fejlődési folyamat indukálása oldalrügy tenyészetekben, (2) a rügyek gyakori (4 hetenkénti vagy havonkénti) átoltása, (3) 0,45 mg/l (= 2 mM) benziladenint tartalmazó 1/2MS táptalajon történő tenyésztés, (4) 9 cm-es tenyészcsövek használata a kísérleti szakaszban. A szőlő mikroszaporítására szakosodott laboratóriumok 1983 és 1991 között 140 ezer növényt szaporítottak 22 fajtából. Ez a tevékenység szorosan kapcsolódott a vírusmentes fajták gyors felszaporításához. Az eredményesen szaporítható fajták mellett rekalcitráns fajtákat is találtak, ill. találtunk.

Kulcsszavak: mikroszaporítás, szőlő, *Vitis* ssp., rekalcitráns fajták, kutatás, gyakorlati alkalmazás.

Bevezetés

A növényi szövettenyésztési technikák fejlődése többek között a fajok gyors szaporításához, a mikroszaporításhoz vezetett. Ennek a módszernek különös jelentősége van azoknál a fajoknál, amelyek a hagyományos szaporítási módszerekkel alacsony multiplifikációs rátával szaporíthatók. A szőlő is ezek közé a fajok közé tartozik.

A szőlő mikroszaporításának elméleti alapjait Morel professzor (1975) írta le. A részleteket több laboratóriumban vizsgálták (Barlass and Skene 1978, Jona and Webb 1978, Silvestroni 1981, Golodriga 1982, Harris and Stevenson 1982, Novák and Juvová 1983).

Hazánkban a vírusmentes szőlőfajták szelekcióját Dr. Lehoczky János kezdte el 1972-ben. (Haydu et al. 1984). A vírusmentes fajták gyors felszaporításához mikroszaporítási módszerre volt szükség. A cikk áttekinti a szőlő mikroszaporítás kutatásának és gyakorlati alkalmazásának legfontosabb hazai tapasztalatait. Ez az áttekintés azért is időszerű, mert az új szőlőfajták mikroszaporítása iránt ismét igény jelentkezik.

Kutatás

A szőlő mikroszaporításának kutatását Dr. Főglein Ferenc kezdte el az MTA Szegedi Biológiai Központ Növényélettani Intézetében 1976-ban. Alanyfajtákra (*Vitis* Berlandieri x *V. riparia* S.O.4, T.K. 5BB) dolgozott ki mikroszaporítási módszert, de az eljárás részleteit (táptalaj, hormon koncentráció stb.) nem közölte.

A szőlő mikroszaporítását 1981-ben kezdtük el vizsgálni a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben (Kecskemét). Ezek a vizsgálatok szorosan kapcsolódtak a vírusmentes fajták és klónok előállításához. A vírusmentesítési programban a vírusindexelést követően fajtánként 38-38 tőkét tartalmazó

ültetvényt alakítottak ki. A tesztelten vírusmentes fajták gyors felszaporítását mikroszaporítással kívánták megoldani.

A szőlő mikroszaporításáról szőlő eredmények egy részénél egy-egy leoltott rügyből több hajtás is fejlődött (Barlass and Skene 1978, Silvestroni 1981, Novák and Juvová 1983). Ezzel szemben mi olyan módszer kidolgozását tűztük ki célul, amely a szőlő természetes fejlődési folyamatához hasonló, tehát az „egy rügy – egy hajtás” fejlődési folyamat elérését tartottuk kívánatosnak.

Munkánk során egy alpmódszert dolgoztunk ki (Haydu 1984). A mikroszaporítást egyrügyes zölddugványozással végeztük 4 lépéses folyamatban, hasonlóan a Silvestroni (1981) által közölt sémához:

- (i) a növényanyag előkészítése, steril tenyészetek indítása és törzstenyészetek létrehozása,
- (ii) rügyszaporítás,
- (iii) gyökereztetés, gyökérképződés indukciója,
- (iv) akklimatizálás, a növények továbbnevelése.

A növényanyag előkészítése (i) a folyamatnak igen fontos része, mert tenyészetet csak a jól előkészített anyagból lehet eredményesen létrehozni. A fás vesszőket ősszel, a lombhullás után gyűjtöttük be a tőkéről. A vesszőket Solvochin Extrával (0,5%) kezeltük 5 óra hosszat. Ezt a kezelést elterjedten alkalmazzák hazánkban a szaporítóanyag készítés során. A kezelt vesszőket +2 – +5 °C hőmérsékleten tároltuk 1,5–2 hónapig. Ezalatt az idő alatt a vesszők túljutottak a mélynyugalmi perióduson. Ezt követően a vesszőket egyrügyes részekre vágtuk és ioncserélt vízbe helyeztük egy olyan szobában, amely mentes volt a légmozgástól. Ez fontos része a folyamatnak, és a zöld hajtások szennyeződésének elkerülését szolgálja. (Laboratóriumunkat homokterület vette és veszi körül!) A hajtáshoz 12 órás megvilágítást (20–30 mEm⁻²sec⁻¹) biztosítottunk fénycsövekkel (Tungstram

F 35). A hőmérséklet 23–8 °C volt. Ezt a szobát nem klimatizáltuk, hogy a légmozgást ezzel is elkerüljük. A 10–25 cm-es zöld hajtásokat egyrügyes darabokra vágtuk a hajtás megkezdése után 1,5–2 hónappal. A rügyeket sterilizáltuk (0,1% HgCl₂ /az oldat 200–400 ml-éhez egy csepp Tween 80 detergens adtuk/ –2 –4 perc, 5-szöri öblítés steril ioncserélt vízzel) és táptalajra helyeztük.

A Murashige és Skoog (1962) által leírt táptalajt használtuk úgy, hogy az ásványi sókat fél koncentrációban, a vitaminokat teljes koncentrációban adtuk a táptalajhoz (szacharóz – 3%, agar – Difco Bacto – 0,8 %), mivel korábban az ilyen összetételű táptalajjal más objektumnál kedvező tapasztalatokat szereztünk (Haydu és Vasil 1992). A táptalajt törzsoldatokból állítottuk össze (Vasil és Hildebrant (1964).

Más laboratóriumokban kapott eredmények azt mutatták, hogy a benziladenin (BA, benzilaminopurin – BAP) alkalmas citokinin hatású regulátor a rügyből történő hajtásfejlődés indukálásához (Morel 1975). Kísérleteinket ezzel a regulátorral kezdtük el. Mivel a magasabb (0,9 és 1,8 mg/l) koncentrációk levélszerű részek fejlődését eredményezték, a BA koncentrációt 0,45 mg/l-re (= 2 mM) csökkentettük. Kilenc cm hosszú, 2 cm átmérőjű tenyészcsöveket használtunk. A csöveket 0,05 mm vastag alumínium fóliából készített kupakkal fedtük, melyeket a laboratóriumban készítettünk.

A tenyészszobában (1. ábra) 12 órás megvilágítást (20–30 mEm⁻²sec⁻¹) 25–27 °C, 70–90% relatív páratartalom és 12 órás sötét periódust (20–23 °C) biztosítottunk. Magas (30 °C feletti) hőmérsékletnél az inokulumok bazális részén kalluszképződést figyeltünk meg. Ez a kallusz gátolta a tápanyag felvételét a táptalajból és az fejlődő hajtások elhalásához vezetett.

A steril tenyészetek létrehozásakor az első és második tenyésztési ciklusban a rügyből fejlődő hajtások nem mutatnak szőlőre jellemző morfológiát (2. ábra), mert ilyenkor az endogén hormon és az exogén regulátor még együtt hatnak. Általában a harmadik tenyésztési ciklusban fejlődnek a hajtások normálisan (4. kép). Ezek a tenyészetek a törzstenyészetek és ezek használhatók a rügytenyésztés céljára (ii szakasz). Gyakori (4 hetes vagy havonkénti) átoltást végeztünk ebben a szakaszban. A kísérletekben a multiplikációs ráta 3,5–8,5 volt (Haydu 1984).

A tenyésztési körülményeink mellett a gyökér indukció (iii szakasz) hormonmentes táptalajon történt (3. ábra). Az akklimatizáció (edzés, iv szakasz) a szőlő steril tenyészeteinél sokkal nagyobb odafigyelést igényel, mint a légyszárú növényfajoknál.

Már az első kísérletekben felismertük, hogy néhány fajta (Pl. Királyleányka, Pinot noir) nem tenyészthető ezzel a módszerrel (Haydu 1984). Az a tény, hogy a Pinot noir fajta más laboratóriumokban is rekalcitránsnak bizonyult (1. táblázat), azt mutatta, hogy ennél a fajtánál a mikroszaporítás kor valós problémával állunk szemben. Kísérleteink alapján a Pinot noir fajta auxotrófiáját (vagyis, hogy a fejlődésnek ebben a szakaszában egyes vegyületek szintézisére képtelen a fajta, és e vegyületek hiánya akadályozza a fejlődést) tételeztük fel (Haydu 1984). Amint egyre több fajtát vizsgáltunk,

több fajtát találtunk rekalcitránsnak. Ezeket a fajtákat az 1. táblázatban adjuk meg. Néhány fajtánál (Börner, Georgikon 28) benziladenin érzékenységet tapasztaltunk.

1987-ben a laboratóriumunk befejezte a szőlő mikroszaporításának kutatását, mert azzal az akkor alakuló Artiplant Kft. foglalkozott a továbbiakban. Néhány fajtánál azonban továbbra is vizsgáltuk a rügy és hajtástenyészeteiket a kísérleti anyagok fenntartása céljából.

1. táblázat. Rekalcitráns szőlőfajták a hazai laboratóriumok tapasztalati alapján

Szám	Fajta/Genotípus	Irodalom/Információ eredete
1.	Pinot noir	Haydu 1984, Főglein és Mészáros 1984 személyes közlés, Kerényi 1989
2.	Pinot blanc	Haydu 1983 nem közölt
3.	Nektár	Haydu 1983 nem közölt Főglein és Mészáros 1984 szem. köz.
4.	Szürkebarát	Főglein és Mészáros 1984 szem. köz.
5.	A 214	Főglein és Mészáros 1984 szem. köz.
6.	Királyleányka	Haydu 1984
7.	Leányka	Főglein és Mészáros 1984 szem. köz. Haydu 1984 nem közölt
8.	Favorit	Kerényi 1989
9.	Göcseji zamatos	Kerényi 1989
10.	Medina	Misik 1989 személyes közlés
11.	Cabernet franc	Misik 1989 személyes közlés
12.	Cabernet sauvignon	Misik 1989 személyes közlés
13.	E.B. 13	Misik 1989 személyes közlés
14.	200	Misik 1989 személyes közlés
15.	Néro	Misik 1989 személyes közlés
16.	Turán	Misik 1989 személyes közlés
17.	Zweigelt	Farkas 1991
18.	Börner	Haydu 1989 nem közölt
19.	Georgikon 28	Haydu 1994 nem közölt

Gyakorlati alkalmazás

A kutatási tapasztalatokat – néha kis változtatásokkal – a nagytételű szaporításra berendezkedett laboratóriumban (Meriklón GT, Artiplant Kft.) alkalmazták. Ezek a laboratóriumok a szőlő mikroszaporítását is kutatták, de az eredményeket hivatali titokként kezelték és nem hozták nyilvánosságra.

A termelő laboratóriumok 500 ml-es befőttesüveget használtak tenyészedeiként (5. ábra). A Vegboxban (6. ábra), amely a Dr. Fári Miklós által kifejlesztett Clonmatic fél-automata mikroszaporító berendezésben használt műanyag tenyészedei, szintén jó növekedést és fejlődést figyeltek meg. Ezek a laboratóriumok edzett növényeket állítottak elő (7. ábra). A Meriklón GT (Budapest) 1981-ben alakult a növényfajok vírusmentes fajtáinak mikroszaporítására. Bár a GT 1983 és 1987 között 78 ezer szőlő növényt állított elő (2. táblázat), a tevékenységét elsősorban a gazdaságosabban mikroszaporítható fajok (burgonya, szegfű, gerbera, fokföldi ibolya stb.) koncentráta. A Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Intézet Kutató Állomásának (Fertőd) Szövettenyésztő Laboratóriuma 4900 növényt szaporított.

(1996–1997, 2. táblázat), de fő tevékenysége a gyümölcsfajokon végzett kutatás és az eredmények gyakorlati alkalmazása volt. Ezért vált szükségessé az Artiplant Kft. megalapítása (1987) a szőlő mikroszaporítására. Ez a laboratórium 57 ezer növényt szaporított (1988–1991, 2. táblázat), és a tevékenységét 1992-ben fejezte be. Ekkor a hazai mezőgazdaságban bekövetkezett változások miatt a mikroszaporítással és a hagyományos szaporítási módszerekkel előállított szaporítóanyag iránti kereslet jelentősen lecsökkent.

A termelő laboratóriumok 22 fajtaból 140 ezer növényt szaporítottak (2. táblázat). A szaporítóanyagot eltelepítették (8–9. ábra), az ültetvényekben magas művelési módot alkalmaztak. A mikroszaporításból eredő szaporítóanyagból életképes, jó kondíciójú és jól termő ültetvények lettek. A mikroszaporítással és a hagyományos szaporítással előállított szaporítóanyagból létesített ültetvényekben a termés mennyiségére vonatkozó összehasonlító kísérleteket nem végeztek, de a mikroszaporításból eredő ültetvényben terméscsökkenést nem figyeltek meg. A szakemberek felkeresték ezeket az ültetvényeket és semmilyen negatív elváltozást nem tapasztaltak.

Néhány szerző az in vitro tenyészetekből és a mikroszaporításból eredő szőlő növényeken morfológiai elváltozásokat és terméscsökkenést figyelt meg (Grenan 1984, Deloier et al. 1995). Hazánkban az ültetvényekben szemmel látható negatív hatást nem találtak.

Az tény, hogy a mikroszaporítás alatt a szőlő növények juvenalis fejlődési állapotba kerülnek. Az in vitro tenyészetekből kikerülve a növények a juvenalis állapotra jellemző tulajdonságokat fokozatosan veszítik el és végül időskori (adult) tulajdonságokat mutatnak. A magasművelés általánosan elterjedt hazánkban és ez a művelési mód elősegíti az időskori fejlődési állapot kialakulását.

A Jubileum 75 fajta mikroszaporításból eredő anyagán végzett vizsgálat azt mutatta, hogy a növények jobb növekedésekor nagyobb a képződött fürtök száma. A 121 vizsgált növényből 91 növény magasabb volt 160 cm-nél. Ezen a növényeken átlagban 5,1 fürt fejlődött. A gyengén növekvő 31 növényen (ezek 160 cm-nél alacsonyabbak voltak) átlagosan 1,5 fürtöt figyeltünk meg (Haydu és Dalloul 1986, nem közölt).

A mikroszaporítással sajátgyökerű szaporítóanyagot állítanak elő. Hazánkban különös előnye a szőlő mikroszaporításának, hogy a szőlőültetvényeknek közel a fele filoxérammunis homoktalajon található. A sajátgyökerű szaporítóanyag közvetlenül telepíthető a homoktalajba, nem szükséges oltvány készítése.

Hátránya a módszernek, hogy munkaigényes és ezért drágább a hagyományos szaporítóanyag előállításánál. A szakemberek úgy tartják, hogy csak a legértékesebb növényanyag szaporítására célszerű a módszert alkalmazni törzsültetvények létrehozására.

2. táblázat. A mikroszaporított fajták és a növények száma Magyarországon

Szám	Fajta	Mikroszaporított növény (db)			
		Meriklón	Artiplant	T.C.L.*	Össz.
1.	Alany Berl. x Rip. K125AA		7669		7669
2.	" T. 5C	23200	4499		27699
3.	" T.K. 5BB		4654		4654
4.	" T.K. 5BB Cr. 2		6205		6205
5.	Fercal		8839		8839
6.	Nemes Bianca		519		519
7.	Cabernet Sauvignon	10000	1197		11097
8.	Chasselas blanc	5400	800		6200
9.	Chasselas rouge		1108		1108
10.	Ezerfürtű	514			514
11.	Jubileum 75	1624			1624
12.	Kerner		5144	1698	6842
13.	Kékfrankos	28827	1972	1503	32302
14.	Kövidinka		1170		1170
15.	Olaszrizling		922		922
16.	Pintes	5476			5476
17.	Rajnai rizling		6645	626	7271
18.	Szürkebarát		2714		2714
19.	Kékoporto		1273		1273
20.	Zengő	425	1859		2284
21.	Zöld veltelini	3005		1077	4082
22.	Zweigelt		154		154
	Összesen:	78471	57343	4904	140718

* Gyümölcs- és Dísnövénytermesztési Kutató Intézet Szövettenyésztő Laboratóriuma (Fertőd)

Az ismertetett adatok (2. táblázat) azt mutatják, hogy a szőlő mikroszaporításának valóban gyakorlati jelentősége lehet. Ismerte a mikroszaporítás lehetőségeit, a szakembereknek maguknak kell eldönteniük, hogy milyen szaporítási módszert választanak a magas biológiai értékű szaporítóanyag előállításához. Jelenleg néhány rekalcitráns fajta mikroszaporítását vizsgáljuk. A kutatómunka tapasztalatai alapján azt javasoljuk a szakembereknek, hogy amennyiben mikroszaporítás iránti igényük van, forduljanak Intézetünkhöz. A fajták törzstenyészeteit 6–8 hónapos kísérleti szakasz alatt előállítjuk, és az országban több laboratórium is vállalná a nagyítélű szaporítást a törzstenyészetekből kiindulva.

Az alanyfajták Olaszországban végzett nagyítélű mikroszaporítása (195 ezer növényt szaporítottak 2001-ben, *Cancellier és Gardiman* 2001) azt mutatja, hogy a mikroszaporítási módszernek további jelentősége lehet az oltványok hatékony előállításában.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetet mond Farkas Gézániának (SzBKI, Kecskemét), hogy a fajták mikroszaporítására vonatkozó egyes adatokat rendelkezésre bocsátotta.

References

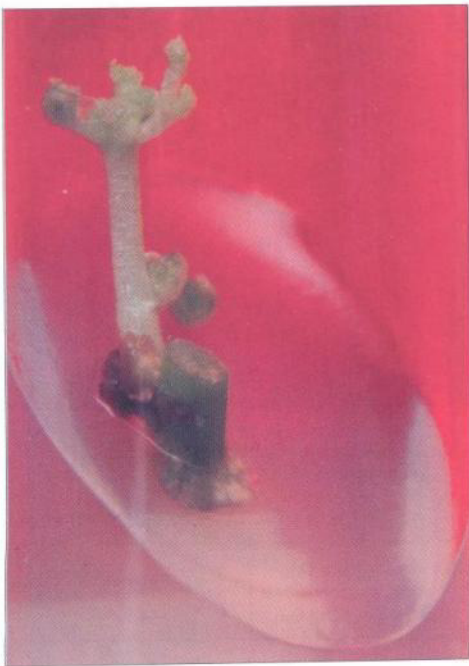
- Barlass, M. & Skene, K.G.M. (1978):** In vitro propagation of grapevines (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apex. *Vitis* 17:335–340.
- Cancellier, S. & Gardiman, M. (2001):** Micropropagazione dei portinnesti „base” della vite. *L'Informatore Agrario* (42):1–2.
- Deloire, A., Charpentier, M., Berlioz, G., Colin, A. & Gimonet, G. (1995):** Micropropagation of the grapevine: Results of 10 years of experiments in the Champagne vineyard and results of the first vinifications. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:571–578.
- Farkas E. (1991):** Gyors de drága. (Rapid but expensive, in Hungarian). *Kertészet és Szőlészet* 40 (50):22–23.
- Golodriga, P. Ya., Zlenko, V.A., Butenko, R.G. & Levenko, B.A. (1982):** Uskorennoe razmnozenie cennih genotipov vinograda. *Sadavostvo* (3):24–27.
- Grenan, S. (1984):** Polymorphisme foliaire consecutif á la culture in vitro de *Vitis vinifera*. *Vitis* 23:159–184.
- Hajdu E., Luntz O. & Lázár J. (1984):** Virusfrei Klonen von Rebsorten in Ungarn. Közlöny- és Lapkiadó Kft., Lajosmizse.
- Harris, R.E. & Stevenson, J.H. (1982):** In vitro propagation of *Vitis*. *Vitis* 21:22–32.
- Haydu Z. (1984):** In vitro cultures of grapevine (*Vitis* sp.). 531–532. In: F.J. Novák, L. Havel, J. Dolezel (eds): *Proceedings, International Symposium "Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement"*. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Haydu Z. & Vasil, I.K. (1981):** Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. *Theor. Appl. Genet.* 59:269–273.
- Jona, R. & Webb, K.J. (1978):** Callus and axillary-bud cultures of *Vitis vinifera* "Sylvaner Riesling". *Sci. Hort.* 9:55–60.
- Kerényi Z. (1989):** Szőlő és bor: Biotecnológia kutatási eredmények gyakorlati hasznosítása. (Grapevine and wine: Practical application of the results of biotechnical research, in Hungarian with English summary) *Biotecnológia és Környezetvédelem – Ma és Holnap (Biotechnology and Environmental Protection – Today and Tomorrow)* 3:15–17.
- Martin, M. (1988):** Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de la vigne. 68e Assemblée Generale O.I.V. 1–6.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Morel, G. (1975):** Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. 327–332. In: O.H. Frankel, J.G. Hawkes (eds.): *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.
- Novák, F.J. & Juvová, Z. (1983):** Clonal propagation of grapevine through in vitro axillary bud culture. *Sci. Hort.* 18:231–240.
- Silvestroni, O. (1981):** Prime esperienze sulla micropropagation della vite europea. *Vignevine* 8(10):31–37.
- Vasil, I.K. & Hildebrandt, A.C. (1966):** Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown in vitro. *Planta (Berl.)* 68:69–82.



1. ábra Tenyészszoba a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben (Kecskemét)



4. ábra A hajtás gyökeresedése



2. ábra Az elsődleges rügytenyészet abnormális morfológiát mutat



3. ábra Szőlő morfológiát mutató hajtás

5. ábra A rügyek korai fejlődése 500 ml-es befőttesüvegben





6. ábra Vegboxban fejlődő növények

7. ábra A Meriklón GT által előállított edzett növények továbbnevelése
(Hosszúhegyi Államigazdaság, 1983)



8-9. ábra Mikroszaporított növényekből létesített ültetvény
(Hosszúhegyi Államigazdaság, 1985)

