

MINTAVÉTEL NÖVÉNYI SEJT-, SZÖVET- ÉS SZERV TENYÉSZETEK BŐL

Tóth Endre Kristóf

MTA ATK Növényvédelmi Intézet és Óbuda Kert Kft. Budapest

Kriston Éva

NÉBIH, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság,
Növény-egészségügyi és Molekuláris Biológiai Laboratórium, Budapest

Józsa Sándor

Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Keszthely

DR. MARÓTI MIHÁLY EMLÉKÜLÉS

2017. április 21.

MINTAVÉTEL – SOKFÉLE OKBÓL

**Mintavétel táptalajból (táptalajalkotó fogyás, exudátum mérés,
maradó elektromos vezetőképesség (EC), pH, stb.)**

**Mintavétel növényből - diagnosztika: - vírus és fitoplazma koncentráció!
ELISA, PCR, bioteszt
- inhibitorhatás kevesebb**

Mintavétel növényből - biokémiai mérés (milyen egységre vonatkoztatunk?)

Mintavétel szuszpenziós kultúrából, sejtszámlálás

Gyarapodásmérés szuszpenziós kultúrában

Mintavétel sterilitás ellenőrzési céllal

Mintavétel termésbecslési céllal

Mintavétel a táptalajból I.

1. A tenyészedények sokaságából véletlenszerűen kiveszünk n darabot és feldolgozzuk a méréshez

Relatív nagy szórás

2. Mindig ugyanazokból a tenyészedényekből veszünk mintát

Kis térfogatú minta



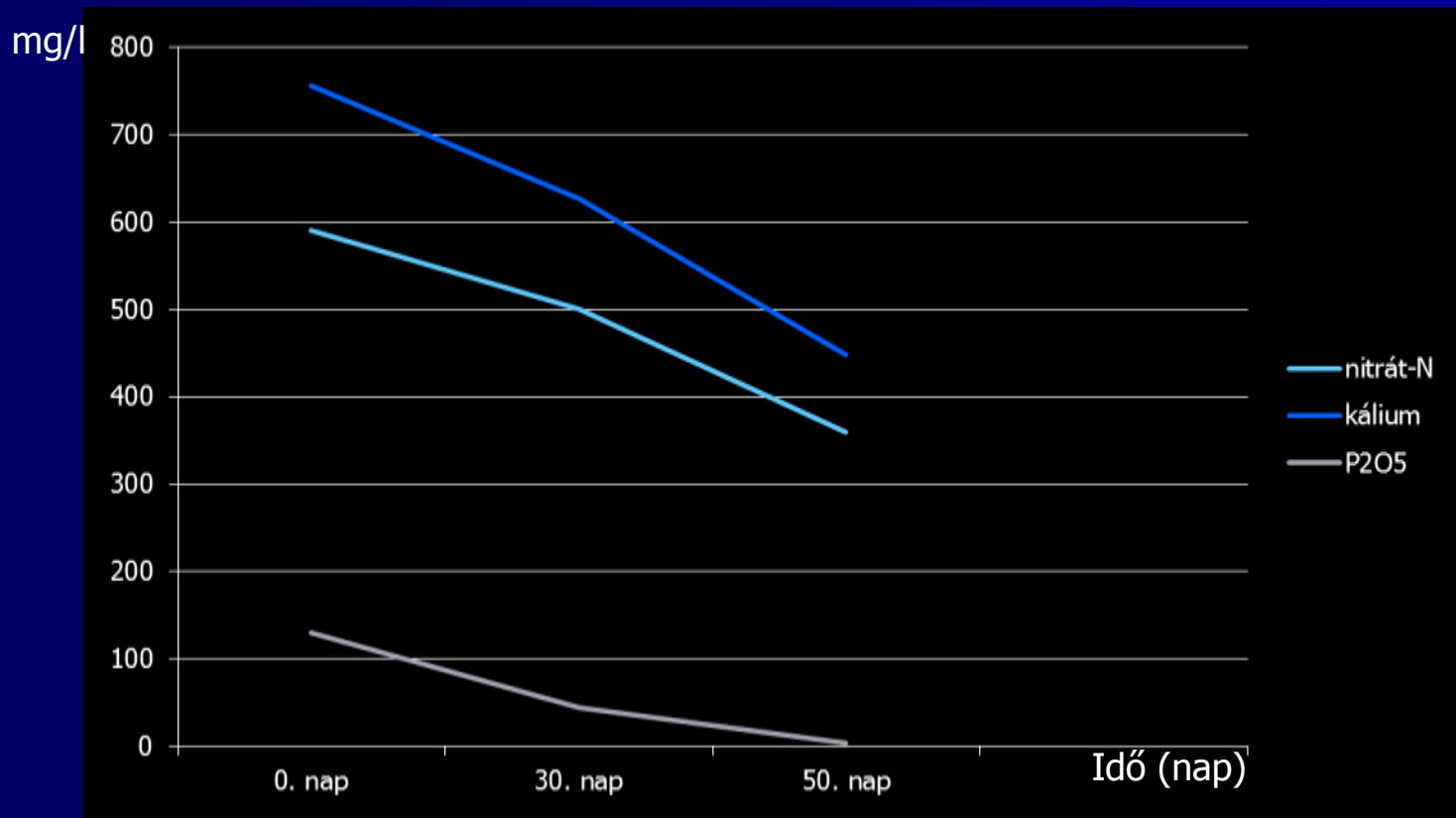
Nagy térfogatú minta

Visszapótlás lehetséges

Növekvő fertőződési kockázat

Bonyolult korrekciós számítás

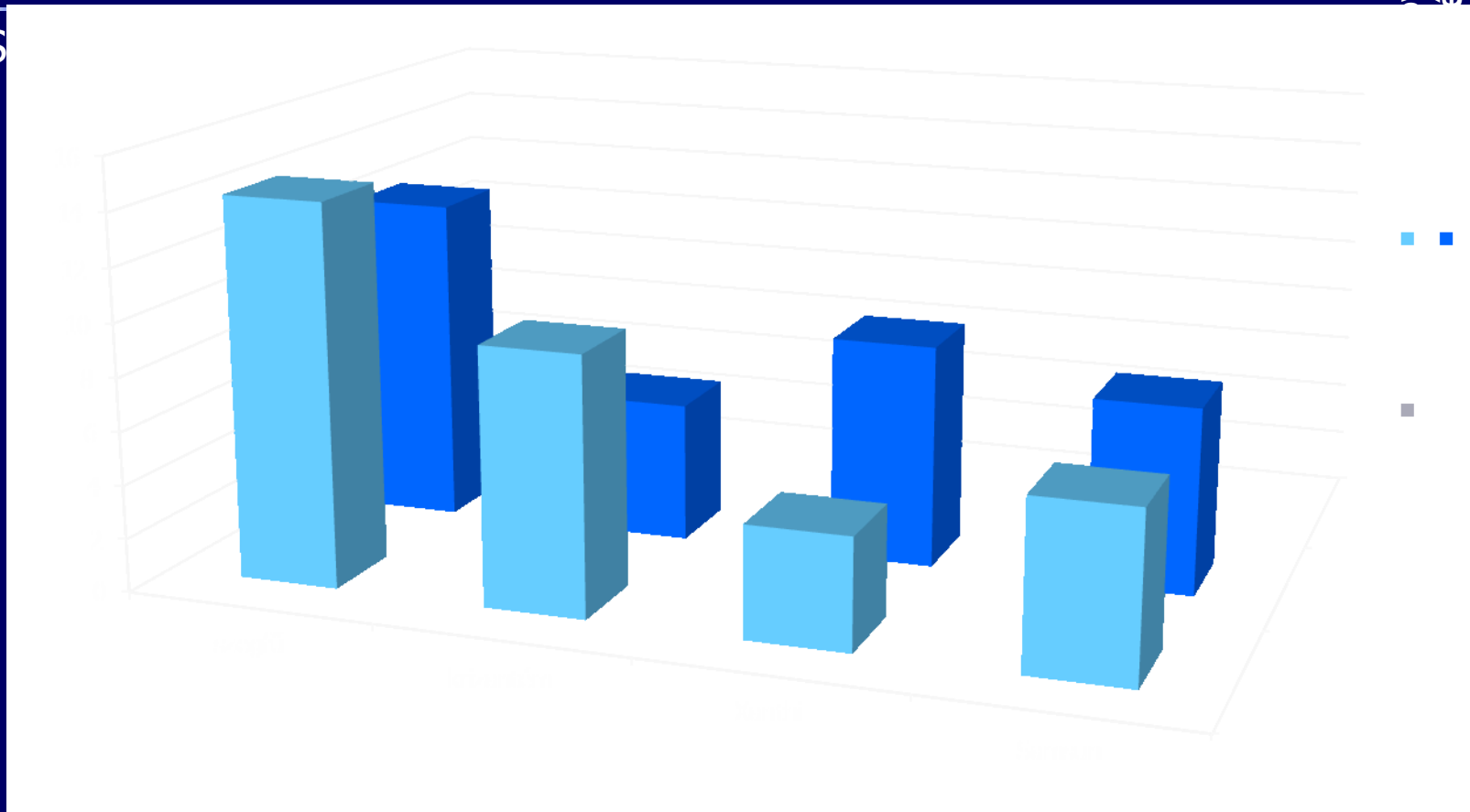
Mintavétel a táptalajból II.



Miscanthus sinensis L. folyadékkultúra

Mintavétel növényből

S



AZ *IN VITRO* NÖVÉNYEKEN ELVÉGEZHEŐ VIROLÓGIAI TESZTEK MINTAVÉTELEZÉSE

I. ELISA (és egyéb szerológiai tesztek)

Alapos szakmai előbírálát alapján érdemes (ELISA kimutatási határ: 1 ng/ml)

- **merisztéma eredetű-e a kultúra?** (A carnation mottle virus példája)
- **mennyi ideje van *in vitro* körülmények között?**
- **milyen hőfokon?**
- **hogyan vegyük a mintát?**
- **mely víruscsoportba tartozó vírust szeretnénk vizsgálni?**

Jól vizsgálhatók:

TOBAMO (pl. dohány mozaik vírus, Odontoglossum gyűrűsfoltosság vírus, Obuda pepper virus, stb.)

POTEX (pl. Cymbidium mosaic vírus, burgonya X vírus, hortenzia gyűrűsfoltosság vírus, stb.)

**A VIRUSCSOPORTOK tagjainak többségét nem,
vagy csak előszűrésként érdemes ELISA-val vizsgálni.**

Esetenkén spontán eliminálódás is előfordul *in vitro* kultúrákban:

pl. clostero-(pl. CarNFV), tospo-(pl. INSV) vírusok, vagy fitoplazmák (pl. ESFY)

AZ *IN VITRO* NÖVÉNYEKEN ELVÉGEZHEŐ VIROLÓGIAI TESZTEK MINTAVÉTELEZÉSE II. Polimeráz láncreakció (PCR, RT-PCR)

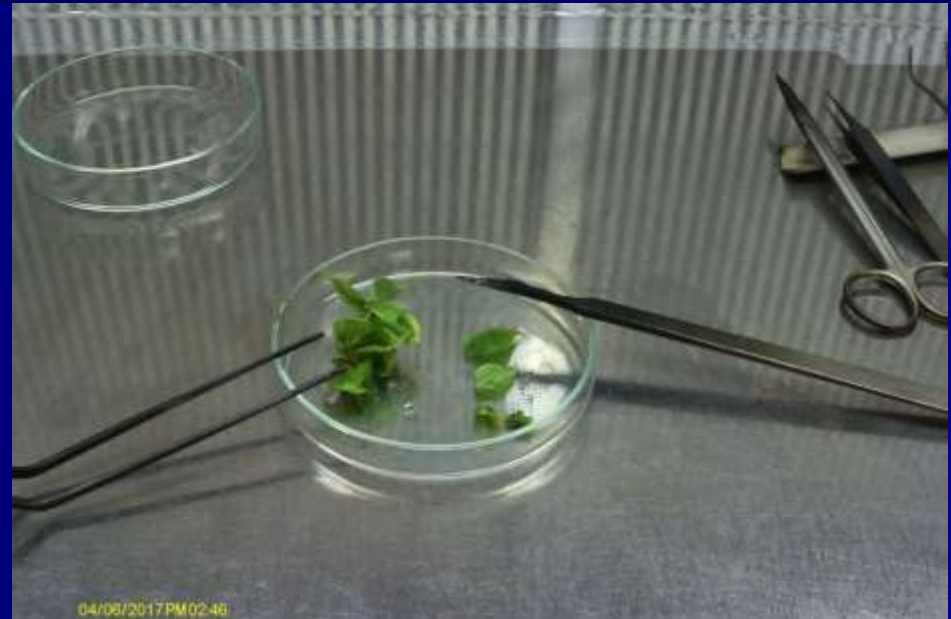
Jó hatékonyság, a kimutathatósági határ: 1 pg/ml körül
Esetenként előnyösebb az *in vitro* növények vizsgálata:
Sokkal kevesebb a reakciót gátló inhibitor tartalom !
Nincsenek jelen az esetleg zavaró mikroorganizmusok!



Szöveti homogenizátumok (1 g/10 ml)

balra: dohány, jobbra: krizantém

AZ *IN VITRO* NÖVÉNYEKEN ELVÉGEZHETŐ VIROLÓGIAI TESZTEK MINTAVÉTELEZÉSE III.



Egyszerű eset: csipesszel véletlenszerűen
- *in vitro* értelemben vett középkorú levelet
Minősített eset: célzottan levélemeletenként és
oldalanként - reprezentatív minta

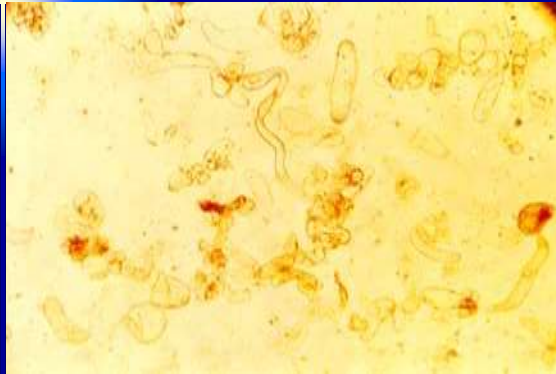
Gyarapodásmérés Kallusz és szuszpenziós kultúrában

A szokásos mért paraméterek:
friss súly, száraz súly (60 °C vagy 105 °C, esetleg liofilizálás),
turbiditás (zavarosság)

növekedési index



Mintavétel és sejtszám meghatározás szuszpenziós kultúrából

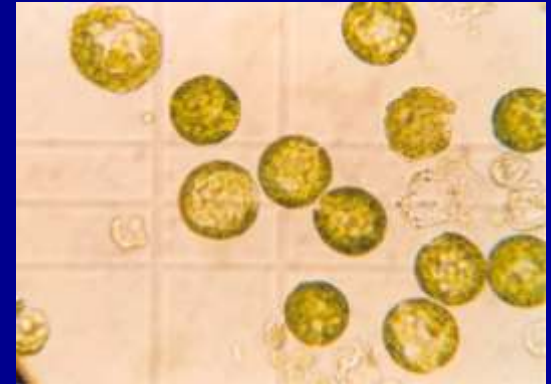


SZUSZPENZIÓS KULTÚRA

Centrifugálás és
friss súly mérés



Enzimes sejtfal
emésztés
(protoplasztálás)



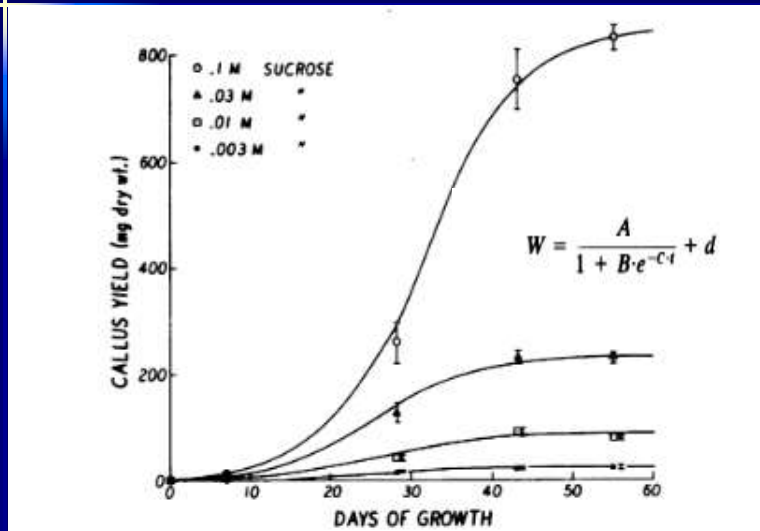
Pl. burgonya (Désiree) szuszpenziós kultúra

$2,67 \times 10^6$ sejt/g (4 ismétlés átlaga, $D(X) = 0,380 \times 10^6$)

(Tóth, publikálatlan)

Számolás Bürker (Buerker) kamrában

Klasszikus növekedési görbe (logisztikus görbe)



Szénhidrát (szacharóz) koncentrációtól függő
Kallusznövekedés (*Nicotiana rustica* L. kallusz)

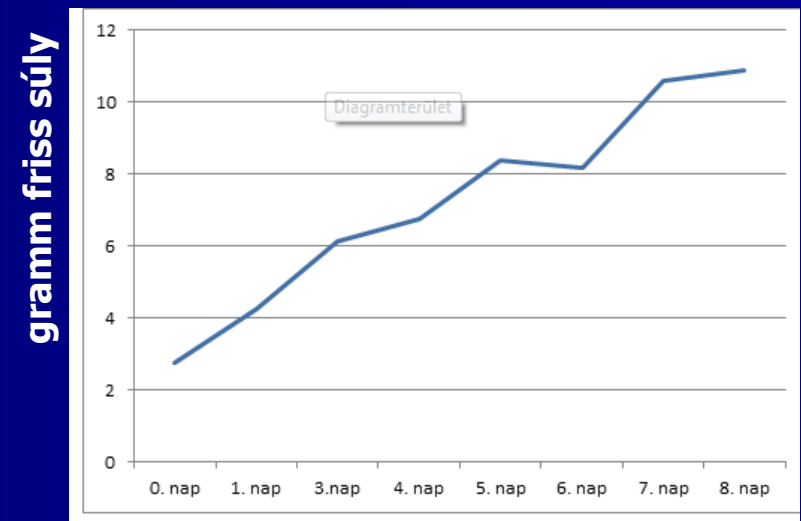
Hunt és Loomis
(1976) nyomán

MÉRÉSI MÓDSZER:

Mintavétel: 8.; 28.; 43.; 55. napon

Ismétlés: 6, véletlenszerűen kiválasztott edényből

Mérés: 20, egyben lemért kalluszcsozó



Burgonya (Désiree) szuszpenziós kultúra

(Tóth, publikálatlan)

Mintavétel sterilitás ellenőrzési céllal



Mintavétel termésbecslési céllal



Esetenként előfordul, hogy nagy mennyiségű *in vitro* növényt kell kiadnunk:

Hány üveggel kell belőle megszámolnunk?



MATEMATIKAI STATISZTIKAI FORMULA A MEGFELELŐ MINTASZÁM MEGÁLLAPÍTÁSÁRA I.

Jelölések:

Sokasági paraméterek:

M = sokasági átlag (átlagosan hány növényegyed (szál) van egy edényben)

σ = sokasági szórás, az edények növényegyed száma közötti ingadozás mértéke

cv = relatív szórás (variációs koefficiens) = σ / M , a heterogenitás mérőszáma

Egyéb jelölések:

N a megrendelt szál (növényyszál egyed).

k₀ = **N/M** a leszállítandó edényszám, ha minden edényben M szál van. ($\sigma = 0$)

$\bar{x}$ = az n elemű mintából számolt átlagos növényyszám.

k = **N/ $\bar{x}$** a minta-átlag alapján számított leszállítandó edényszám alapesetben.

MATEMATIKAI STATISZTIKAI FORMULA A MEGFELELŐ MINTASZÁM MEGÁLLAPÍTÁSÁRA II.

A FELADAT:

n elemű mintát veszünk (azaz leszámolunk n db nevelőedényt)
Megszámoljuk az ezekben talált növényegyedeket és kiszámoljuk ezek átlagát.
Ha N a rendelt növényszám, akkor $k = N/\bar{x}$ edényt küldünk alapesetben

A KÉRDÉS:

Mekkora legyen a mintaelem szám ahhoz, hogy a küldeményben az összes szálak száma elég nagy valószínűséggel legfeljebb 1%-kal térjen el a megrendelt N száltól? Az „elég nagy valószínűség” legalább 90%-ot jelent.

A VÁLASZ:

ha elég sok edényt küldünk (k elég nagy /pontosabban $k_0 = N/M$ elég nagy/, 100-as nagyságrendű), akkor a minimálisan szükséges minta nagyság:

$$n = z^2 \times (CV)^2,$$

ahol

$CV = 100cv$, a sokasági relatív szórás %-ban kifejezett értéke, (a továbbiakban ismertnek tekintjük),
z pedig (ha cv ismert) a kívánt biztonsághoz képezhető standard normális változó értéke.
(90%-os biztonságnál $z=1,65$, 95%-nál $z=1,96$, 99%-nál $z=2,58$).

MATEMATIKAI STATISZTIKAI FORMULA A MEGFELELŐ MINTASZÁM MEGÁLLAPÍTÁSÁRA III.

Fontos megjegyzés:

Elég jelentős megrendelés mellett a szükséges mintanagyság (n) nem függ (!) **sem a sokasági átlagtól (M), sem a rendelt szálak számától (N), csakis az edény-állomány homogenitásától, a relatív szórástól! (cv)!**

Szemléltetés: szükséges mintanagyság (n)

sokasági rel. szórás (cv)	biztonság	
	90%	95%
2%	11	16
5%	68	96
10%	273	384

Látható, hogy már az 5%-os relatív szórásnál is elég sok edény tartalmát kellene leszámolni.

Hogyan lehetne csökkenteni a szükséges minta-nagyságot?

Kézenfekvő lehetőségek:

1. Csökkentjük az inhomogenitást (a relatív szórást). Ez technológiai finomítást kíván.
2. Enyhítjük a megengedett 1%-os eltérést (2-3%-ra). Ez alku a megrendelővel.
3. A $k = N/\bar{x}$ edény helyett néhány %-kal többet küldünk a megrendelőnek.

MATEMATIKAI STATISZTIKAI FORMULA A MEGFELELŐ MINTASZÁM MEGÁLLAPÍTÁSÁRA IV.

A minimálisan szükséges minta-nagyság, ha elég sok edényt postázunk

$$n = z^2 \frac{cv^2}{(h + q)^2}$$

Ahol a z értékről fentebb szóltunk, cv , h és q akár %-ban, akár decimálisan adott értékek.

cv = a sokasági relatív szórás (pl. 0,05, avagy 5%)

h = a küldemény megengedett eltérése a rendelt növényesztől (pl. 0,01, avagy 1%)

q = a relatív többlet-küldemény (a $k = N/\bar{x}$ edényhez képest, pl. 0,02, avagy 2%) .

SZEMLÉLTETÉS:

Szükséges leszámolandó edény (n), 95 %-os biztonságra, 5 % szórásnál

Megengedett eltérés a rendeléstől (h)	1%	2%
Többlet küldés (q)		
0%	96	24
1%	24	11
2%	11	6
3%	6	4

KÖSZÖNJÜK A FIGYELMET!

