

1949

**Védett *Amaryllidaceae* fajok szövettenyésztése és antioxidáns aktivitásuk vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés  
**Juhászné Resetár Anna**

Témavezető: **Dr. Máthé Csaba egyetemi docens**

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biológia Doktori Program  
Debrecen, 2017

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2017

.....

jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Juhászné Resetár Anna doktorjelölt 2012-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2017

.....

témavezető aláírása

**Védett *Amaryllidaceae* fajok szövettenyésztése és antioxidáns aktivitásuk vizsgálata**

Értekezés a doktori (Ph. D) fokozat megszerzése érdekében a Biológia tudományágban

Írta: Juhászné Resetár Anna okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája (Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Máthé Csaba egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

A doktori szigorlat időpontja: 20.....

Az értekezés bírálói:

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 20.....

Domonkos Jolán

**Virágvarázs**

Minden egyes kis virágban  
egy elrejtett kis világ van,  
béke, harmónia, szépség,  
mosolyt fakasztó létérzés.

Színek, formák sokasága,  
illatfelhő aromákban  
csepegteti rám a varázst,  
ámulatba ejtő hatást.

Megdermedten állok csendben,  
a vadonban, vagy kiskertben  
elém táruló látványtól,  
a szívemben öröm lángol.

Elfeledtet velem mindent,  
felold bennem zárt, bilincset,  
szabadság érzése árad,  
amikor a virág rám hat.

## **A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke**

**2,4-D:** 2,4 –diklór-fenoxi-ecetsav

**2-ME:** 2-merkaptó etanol

**AA:** Aszkorbinsav

**ABTS:**2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav

**AFLP:** amplifikált fragment hossz polimorfizmus:

**BA:** benzil-amino-purin

**DPPH:**1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

**DW:** szárazanyag tartalom

**EDTA:** etilén-diamin-tetraecetsav

**FC:** Folin-Ciocalteu

**GAE:** galluszsav ekvivalens

**IAA:** indol-3-ecetsav

**IBA:** indolvajsav

**KIN:** kinetin

**MS\*:** 0,8% agarral, Gamborg vitaminnal és 2% szacharózzal kiegészített Murashige és Skoog alaptáptalaj

**NAA:**  $\alpha$ -naftil-ecetsav

**2-ME:** 2- merkaptóetanol

**PAGE:** poliakrilamid gélelektroforézis

**PBS:** NaCl tartalmú foszfát puffer

**PCR:** polimeráz lánreakció

**PVP:** poli-vinil-pirrolidon

**SDS:** nátrium-dodecil-szulfát

**Suc:** szacharóz

**TEAC:** Troloxra vonatkoztatott antioxidáns aktivitás

**TPC:** összes polifenol mérése Folin-Ciocalteu reagenssel

**Trolox:** 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-kromán-2-karbonsav

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés .....	1
1.1. Bevezetés.....	1
1.2. Célkitűzés .....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. A kutatásban vizsgált növények jellemzése .....	7
2.1.1. <i>Amaryllidaceae</i> család jellemzése .....	7
2.1.2. <i>Galanthus</i> nemzetség.....	8
2.1.3. <i>Leucojum</i> nemzetség.....	10
2.1.4. <i>Sternbergia</i> nemzetség.....	11
2.2. Természetvédelmi vonatkozások.....	12
2.3 Alap- és alkalmazott kutatásban felhasznált növényi <i>in vitro</i> tenyészetek és jelentőségük.....	14
2.3.1. <i>In vitro</i> növényi szövettenyésztés .....	14
2.3.2. Szekunder metabolitok jelenléte és az amarilliszfélék szövettenyésztése .....	17
2.4. DNS Polimorfizmus vizsgálati módszerei, AFLP .....	24
2.5. Antioxidánsok jellemzése.....	25
2.5.1. A növények antioxidáns védőrendszere .....	25
2.5.2. Antioxidánsok kimutatására alkalmas módszerek .....	28
3. Anyag és módszer .....	32
3.1. A szövettényeszetek indukciója .....	32
3.2. <i>Galanthus nivalis</i> szövettana.....	34
3.3. A <i>Galanthus nivalis</i> tenyészetek genetikai variabilitás vizsgálata.....	34
AFLP, PCR reakció menete .....	34
3.4. Enzimatisz antioxidánsok vizsgálata: gélelektroforézis és gélfestés .....	38
3.4.1. Növénykivonatok készítése .....	38
3.4.2. Natív poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) .....	39
3.4.3. A poliakrilamid gélek kiértékelése.....	40
3.5. Nem enzimatisz antioxidánsok vizsgálata.....	41
3.5.1. Polifenolmérés .....	41
3.5.2. DPPH és ABTS szabadgyök semlegesítő („gyökfogó”) aktivitás vizsgálat .....	41
4. Eredmények és megbeszélésük .....	43
4.1. <i>Galanthus nivalis</i> szövettenyésztése, szövettana és a genetikai variabilitás vizsgálat eredménye .....	43
4.2. Genetikai variabilitás vizsgálat eredménye .....	52
4.3. <i>Galanthus elwesii</i> és <i>Galanthus woronowii</i> szövettenyésztése .....	54
4.4. <i>Leucojum aestivum</i> , <i>Leucojum vernum</i> és <i>Sternbergia lutea</i> szövettenyésztése.....	58
4.5. <i>Amaryllidaceae</i> családba tartozó egyes fajok antioxidáns aktivitásának vizsgálata... 64	64
4.5.1. Nem enzimatisz antioxidánsok kimutatása.....	64
4.5.2. Enzimatisz antioxidánsok kimutatása.....	74
4.5.3. Az enzimatisz és nem enzimatisz antioxidáns aktivitások összefoglalása .....	84
5. Eredmények összefoglalása .....	89
6. English summary.....	96
7. Köszönetnyilvánítás .....	100
8. Irodalomjegyzék.....	101
9. A jelölt tudományos tevékenységének a jegyzéke .....	112

## 1. Bevezetés és célkitűzés

### 1.1. Bevezetés

Az amarilliszfélék (*Amaryllidaceae*) családja a *Magnoliophyta* törzsbe, azon belül az egyszikűek kládjába, a spárgavirágúak (*Asparagales*) rendjébe tartozó növénycsalád. Mutató virágú, évelő, lágyszárú, hagymás növények tartoznak ide, körülbelül 60 nemzetség, több mint 1200 fajjal alkotja. Számos *Amaryllidaceae* fajt kerti növényként is termesztnek, ezzel szemben sok vadon termő faj veszélyeztetett vagy védett Európában, például a Magyarországon is védettnek számító kikeleti hóvirág (*Galanthus nivalis*) (Farkas, 1999; Fay és Chase, 1996; Király és mtsai., 2007; Podani, 2014). Így e fajok megőrzése természetvédelmi, és konzervációbiológiai szempontból is fontos. Ezen nemzetségek közül ötöt ismerünk közelebbről: az *Amaryllis* (amarillisz), *Galanthus* (hóvirág), *Leucojum* (tőzike), *Sternbergia* (vetővirág), *Narcissus* (nárcisz) nemzetségeket. Áttelelő szervük hagyma, hagymagumó vagy rizóma. Megkülönbözteti őket a többi hagymás növénytől az úgynevezett amarillisz alkaloidok jelenléte (Tuba, 2007). Gyakran a növények sarjaiban vagy éppen a gyökereikben keletkezhetnek, és képződési helyeiről szállíthatnak tovább más szövetekbe. Meglehetősen erős élettani hatást fejtenek ki állati és emberi szervezetre, amely mérgezést is jelenthet, ugyanakkor megfelelő dózisban hatásos gyógyszerként is funkcionálhatnak (Fodorpataki, 2009; Schönfelder I. és Schönfelder P., 2001, Yasuyuki és mtsai.,1998). A növények megőrzésére egyik alkalmas módszer lehet az *in vitro* szövettenyésztés, mely jelenthet kallusz (hegszövet), sejtszuspenziós és protoplaszt tenyészeteket, valamint növényregenerálási és mikropropagációs eljárásokat. A szövettenyésztési eljárás azon az elven alapul, hogy megfelelő körülmények között minden már specializálódott növényi sejt képes

dedifferenciálódás során totipotenssé válni, vagyis az osztódóképességét visszanyerni, majd differenciálatlan sejttömeget (kalluszt) és bármilyen szerv- vagy szövettípust, akár egész növényt is létrehozni (Dudits és Heszky, 2003; Razdan, 2003). A kalluszosodás természetes és szintetikus citokinin és/vagy auxin típusú hormonokkal indukálható, mely többszöri átoltással folyamatosan fenntartható és szaporítható. A sejtek differenciálódásának indukciója szintén lehetséges *in vitro*, ezt nevezzük redifferenciálódásnak, mely folyamat eredménye lesz a növényregeneráció (Dudits és Heszky, 2003). A növényi szövettenyésztési eljárások alkalmazásával nagyszámú *in vitro* kultúrát hozhatunk létre, amelyek később szerepet játszanak a faj/csíraplazma megőrzésében és másodlagos anyagcsere termékek létrehozásában. Ez azt jelenti, hogy fenntarthatunk természetes élőhelyükön megtalálható, többnyire védett fajokat, amelyek biológiailag aktív vegyületeket képesek előállítani, és laboratóriumi körülmények között is hatóanyagot termelni. Néhány fontos példa erre a *Galanthus elwesii*, *Leucojum aestivum* és a sárga nárcisz (*Narcissus pseudonarcissus*) (El Tahchy és mtsai., 2011; Ivanov és mtsai., 2012). Génbankot alapíthatunk, amely farmakognóziailag szempontból fontos növényeket tartalmaz. Az *in vitro* génbankok szerepe jelentős, hiszen tenyészedényekben, kontrollált körülmények között nevelhetünk és tárolhatunk egyedeket, melyek genetikailag azonosak az eredeti élőhelyről begyűjtött növényekkel, és farmakológiai szempontból is jelentősek. A genetikai azonosság azonban nem mindig biztosított a szövettenyésztési eljárások alkalmazása során, hiszen a sok esetben használt növekedés serkentő hormonok, különös tekintettel a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavra képesek genetikai variabilitást okozni, ami konzervációbiológiai szempontból lényeges szempont (Dudits és Heszky, 2003). Az antioxidánsokról ismeretes, hogy fontos szerepet játszanak az élőlények oxidatív stresszel szembeni védelme során. A növények

antioxidáns védőrendszere rendkívül sok alkotóelemből tevődik össze, amely összehangoltan képes együttműködni a szervezetet károsító szabadgyökökkel szemben, és biztosítja a megfelelő működést. A sejtek számos antioxidáns tulajdonságú folyamattal vagy molekulával rendelkezhetnek. Ezek számszerű kimutatására egyre nagyobb az igény, ennek megoldására több analitikai eljárást fejlesztettek ki. Az antioxidánsok aktivitása a vizsgált rendszerre vonatkozó, összes antioxidáns vegyület együttes szabadgyök semlegesítő („gyökfogó”) hatását jelenti, jelen esetünkben az *in vitro* szövettenyésztéssel előállított szövetekben, szervekben (Blois, 1958; Brand és mtsai., 1995).

## 1.2. Célkitűzés

Célkitűzéseink között szerepelt, hogy a hóvirág nemzetségből a *Galanthus nivalis* (kikeleti hóvirág) *Galanthus elwesii* (pompás hóvirág), *Galanthus woronowii* (Voronov-hóvirág), a tözike nemzetségből a *Leucojum aestivum* (nyári tözike), *Leucojum vernum* (tavaszi tözike) és a vetővirág nemzetségből a *Sternbergia lutea* (őszi vetővirág) védett fajokból szövettenyészeteket indukáljunk, illetve az eredeti élőhelyről begyűjtött növényekkel genetikailag azonos növényeket regeneráljunk. A genetikai variabilitás meghatározására alkalmas eljárás a DNS polimorfizmus vizsgálatok közül az AFLP (amplifikált fragment hossz polimorfizmus). Az AFLP technikát növényeknél gyakran alkalmazzák faji identifikációhoz (Després és mtsai., 2003) és populációgenetikai vizsgálatokhoz (Baskauf és mtsai., 2009; Coppi és mtsai., 2008). Távlati céljaink között szerepel, hogy az *in vitro* regenerált növényekből a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékén gyűjteményt hozzunk létre, amely hosszútávon fenntartható. A *Galanthus woronowii* és *Sternbergia lutea* esetében még nem állítottak elő szövettenyészeteket, ezért számunkra e két faj növényregenerálási eljárásának kidolgozása különösen fontos volt.

Az amarilliszfélékre jellemző amarillisz alkaloidokat körültekintően tanulmányozták a szakirodalomban, mint például a galantamint és likorint, de e családon belül az egyéb alacsonyabb molekulatömegű bioaktív anyagokat (például polifenolokat) tartalmazó sejtmentes kivonatok vizsgálata kevésbé ismeretes (Berkov és mtsai., 2007; Harvey, 1995). Bár sok család és faj esetében köztudott a gyógyászati értékük, a növényi biotechnológiában alkalmazott szövettenyésztési eljárás során nevelt, az amarilliszfélékhez tartozó növények antioxidáns aktivitását és annak élettani hátterét kevésbé kutatták. Ezért további célkitűzéseink között szerepelt, hogy a fent említett hat faj enzimatis, valamint nem enzimatis antioxidáns aktivitását-

vizsgálatát elvégezzük az alábbi módszerekkel:

- natív poliakrilamid gélelektroforézis (PEG) a peroxidázok és katalázok aktivitásának kimutatására (Hamid és Rehman, 2009; Hamvas és mtsai., 2010),
- a szabadgyököket semlegesítő aktivitás az ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyökök gátlásának mérésével,
- a teljes polifenol tartalom meghatározása pedig Folin-Ciocalteu (FC) módszere alapján (Grubersic és mtsai., 2005; Katalinic és mtsai., 2006; Miliauskas, 2003; Singleton és Rossi, 1965).

## **Célkitűzéseink összefoglalva:**

**a)** *Galanthus nivalis* (kikeleti hóvirág) *Galanthus elwesii* (pompás hóvirág), *Galanthus woronowii* (Voronov-hóvirág) szövettenyésztési eljárásának kidolgozása és növényregenerálás, *G. woronowii* esetében elsőként a szakirodalomban, *G. nivalis* esetében pedig emriogén kallusz fejlődésén keresztül történő növényregenerálás elsőként a szakirodalomban

**b)** *Galanthus nivalis* eredeti élőhelyről begyűjtött növények és szövettenyésztéssel előállított regenerált növények genetikai variabilitás vizsgálata AFLP módszerrel

**c)** *Leucojum aestivum* (nyári tőzike), *Leucojum vernalis* (tavaszi tőzike) szövettenyésztési eljárásának kidolgozása és növényregenerálás

**d)** *Sternbergia lutea* (őszi vetővirág) szövettenyésztési eljárásának kidolgozása és növényregenerálás a szakirodalomban elsőként

**e)** Szövettenyésztés gyűjtemény (*in vitro* védett növények, más modellnövények pl. *Phragmites australis*) bővítése és fenntartása a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékén

Az eredeti élőhelyről begyűjtött szövettenyésztéssel előállított genetikailag azonos növényeink antioxidáns aktivitásának meghatározása:

**f)** nem enzimikus antioxidáns aktivitás kimutatása: a teljes polifenol tartalom meghatározása Folin-Ciocalteu (FC) módszerrel, a szabadgyököket semlegesítő aktivitás az ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyökök gátlásának mérésével

**g)** natív poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) a peroxidázok és katalázok aktivitásának kimutatására

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A kutatásban vizsgált növények jellemzése

#### 2.1.1. *Amaryllidaceae* család jellemzése

A család olyan többnyire védett fajokat foglal magába, amelyeknek főként hagymáiból hatóanyagokat lehet kinyerni, ezért került kutatásaink célpontjába. Az amarillisz szó hallatán az emberek jellemző többségének a téli időszakban tégelyekbe ültetett, majd kora tavasszal ablakokban piros színben pompázó hatalmas virágú dísnövények jutnak eszükbe. Valójában azonban ebbe a családba sokféle, különböző mutatós virágú, évelő, lágyszárú, hagymás növények tartoznak, amelyek gyakran kiskertek díszes lakói. Ezért fontosnak tartom az 1.2. Célkitűzés című fejezetben említett öt nagy nemzetség, és azon belül a hat általunk felhasznált faj részletes bemutatását, abból a célból, hogy képet alkothasson az olvasó arról, milyen morfológiával rendelkeznek az eredeti élőhelyről begyűjtött egyedek, amelyekből később szövettenyésztet létrehozását és növényregenerálást tűztünk ki célunknak.

A legtöbb 20. századi rendszerezésben már előfordultak az amarilliszfélék (*Amaryllidaceae*), bár a Cronquist-rendszer egy igen tág értelemben vett liliomféléken (*Liliaceae*) belül írta le. A két családot elválasztó tulajdonság hagyományosan az *Amaryllidaceae* alsó állású, illetve a *Liliaceae* felső állású magháza. A 2003-as APG II-rendszer az *Amaryllidaceae*-t a monocots kládon belül a spárgavirágúakhoz, a hagymafélékhez (*Alliaceae*) sorolja, de megengedi utóbbiról való leválasztását is, önálló családként (Fay és Chase, 1996; Podani, 2003). Mintegy 1200 fajuk túlnyomó részben meleg égövi, hazánkban 5 faj őshonos (Simon, 2000). A kozmopolita elterjedésű taxon 7 kládjába tölevélrózsás,

lány szárú fajok tartoznak. Áttelelő szervük hagyma, hagymagumó. Virágaik  $\{ *P3+3, (3+3), 3+(3) A3+3 G (3^-) \}$  magánosak vagy bogas típusú virágzatot alkotnak. A lepellevelek ozmofórákká, a porzólevelek sztaminódiumokká alakulhatnak. A bibe bunkós vagy mélyen háromlebenyű. Az alsó állású magházban sok centrális-anguláris placentációjú magkezdemény található. Áltermésük tok- vagy bogyószerű (Király és mtsai., 2009; Tuba, 2007).

### **2.1.2. *Galanthus* nemzetség**

A hóvirág (*Galanthus*) nemzetségbe tartozó fajok mindenki számára ismeretes bélyegeket hordoznak. Régebben a nőnapok elengedhetetlen virága volt a tavasz hírnökeként. A nemzetség tíz fajának elterjedési központja Kis-Ázsia és a Balkán, de néhányuk Európa középső és délnyugati részén is előfordul. Magyarországon honos a mindenki által ismert *Galanthus nivalis* vagy magyar nevén kikeleti hóvirág. Megjelenését tekintve 10-20 centiméter magas, hagymás, évelő növény. Hengeres felálló, csúcsán visszahajló szára csupán egy bókoló virágot hordoz. A két tőállású, kékeszöld levél szálas, 5-10 centiméter széles. A három külső lepellevél hosszabb, mint a három zöld csúcsú belső. Nyirkos erdők, ligetek és cserjések tápanyagban gazdag humuszos vályogtalajok lakója. Kimondottan szereti a lombos elegyes-, szurdok- és ligeterdőket, valamint a hegy- és dombvidéki gyertyános tölgyeseket lakóhelyéül. A virágzási ideje február-március között van, a legkorábban virágzó növények közé tartozik (Simon, 2000). Főként középhegységeink erdeinek kora tavaszi növénye, de a gyűjtések következtében számos kiskertben is megtalálható. A kikeleti hóvirág az Európai Unió területén védett fajnak számít, több természetvédelmi jogszabályban és egyezmény listában is szerepel. A hóvirág 2005 óta védett, 2007-ben Magyarországon is védetté nyilvánították. Természetvédelmi értéke 10.000 Ft. A *Galanthus elwesii* más néven török vagy pompás hóvirág Dél-Ukrajnában, Kis-Ázsiában és a Balkánon őshonos. Széles, nagyméretű

levelei szürkészöld színűek, viszonylag nagytermetű, olykor már decemberben virágozni kezd. Kertészeti példányait előszeretettel ültetik kiskertekben, ám azok jellemzően terméketlenek. A *Galanthus woronowii* vagy más néven Voronov-hóvirág a nagy orosz növénygyűjtőről, Jurij Nikolaevics Voronovról kapta a nevét. Természetes élőhelye Északkelet-Törökország és Nyugat-Kaukázusban található. Magassága akár 30-40cm is lehet (Davis, 1999; Kerényi és mtsai., 2008; Király és mtsai., 2007). A fő amarillisz- alkaloidok között elsősorban a galantamint tartják számon ezekben a növényekben. A galantamin alkaloid acetilkolinészteráz-gátló hatással rendelkezik. Használják például kóros izomgyengeség kezelésére, a curare-vegyület hatása következtében fellépő izomernyedtség megszüntetésére, gyomor, bél, hólyagrenyheség ellen, valamint műtéteknél. Manapság kedvező hatását tapasztalják az Alzheimer-kór gyógyítása terén (Henrich és Lee Teoh, 2004). A kikeleti hóvirágban megtalálható lektin származék, a GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) hatását bizonyították kártevők, például levéltetű lárvák és számos rágcsálóval szemben (PingHua és mtsai., 2004), továbbá kutatták gátló hatását a széles körben elterjedt HIV vírus ellen (Balzarini és mtsai., 2003,2007).



*Galanthus nivalis*, fotó: dr. Molnár V. Attila

2017-ben a hóvirág ismét az emberek figyelmének központjába került és az év vadvirágának választották Magyarországon. Érdekességként elmondható a hóvirágról, hogy már a görögök is tapasztalhatták áldásos

hatását. Háromezer évvel ezelőtt Homérosz eposzában, az Odüsszeiában Hermész varázsfüvet adott Odüsszeusznak, és ez hatástalanította a mérget, melyet Kirké istennő a hős borába kevert. A gyógynövény mely immunissá tette Odüsszeuszt a mérge okozta amnéziával szemben nem volt más, mint a hóvirág.

### **2.1.3. *Leucojum* nemzetség**

A *Leucojum*ok (tőzikek) nemzetségének két ismert faja a *Leucojum vernum* (tavaszi tőzike) és a *Leucojum aestivum* (nyári tőzike). A tavaszi tőzike ligeterdők, gyertyános-tölgyesek és bükkösök növénye. Elterjedési területe keletre egészen Ukrajnáig tart és Közép-Európában is őshonos. Akár 15-3 cm magasra is megnőhet. Jellemző rá, hogy egy, ritkán két bókoló virág fejlődik a hajtáson. Mind a hat lepellevél egyforma, melyeknek a csúcsa alatt sárgászöld folt jelenik meg. Toktermése sárgás. A nyári tőzike 2013-ban Magyarországon elnyerte az év vadvirága címet. Jellemzően magasabb, mint a tavaszi tőzike, akár a 60 cm-t is elérheti, valamint később virágzik. A tőkocsány rendszerint nem hosszabb a levélnél, többnyire 3-5 virágú. A magvak feketések. A *Leucojum*ok hagymáiban szintén megtalálható az amarillisz alkaloidok közül például a likorin, galantamin, narwedín (Berkov és mtsai., 2008). Láperdők, nedves rétek, és puhafás ligeterdők lakója. Elterjedési területe Dél- és Délkelet-Európa, Közép-Európában csak meghonosodva él. Magyarországon főleg a Dunántúlon található meg, és az Alföld egyes részein, de ott ritkább. Hazánkban mindkét faj védett, természetvédelmi értékük tövenként 10.000 Ft. A nyári tőzike veszélyeztetettség közeli listán szerepel a hazai Vörös listás fajok között (Király és mtsai., 2009; Schönfelder I. és Schönfelder P., 2001; Takács és Molnár, 2014).

#### 2.1.4. *Sternbergia* nemzetség

A vetővirág nemzetségébe tartozó fajok Dél-Európától Közép-Ázsiáig találhatóak meg, Törökországban a leginkább elterjedtek. Rájuk is jellemző az amarillisz alkaloidok hagymában történő megjelenése. Magyarországon a *Sternbergia colchiciflora*, magyar nevén apró vetővirág az őshonos, védett, természetvédelmi értéke 10.000 Ft. A munkánk során egy másik magyarországi nem őshonos fajt vizsgáltunk az őszi vetővirágot (*Sternbergia lutea*). Elnevezését onnan kapta, hogy októberben nyílnak a virágai, melyek csak megfelelő csapadék ellenében közvetlenül a földből bújnak ki. A virágok jellemzően élénksárga színezetűek, levelei szürkés zöldek és csavarodóak. Levelei alapján könnyen összetéveszthetőek a *Crocus* nemzetséggel. Sztepprétek, bokorerdők kedvelt lakója, kertekben dísznövényként előszeretettel ültetik (Ciampolini és mtsai., 1990; Király és mtsai., 2009).



*Leucjum aestivum*, *Leucojum vernum*, *Sternbergia colchiciflora* fotók: dr.  
Papp László, Löki Viktor

## 2.2. Természetvédelmi vonatkozások

Az 1.1. Bevezetés című fejezetben említésre került, hogy bár a családba tartozó fajok közül jó néhányat kerti növényként tartanak számon (például, tévesen a *Galanthus* nemzetség fajait), több faj védettséget élvez. A konzervációbiológiában kiemelt figyelemben részesítik a védett, esetleg gazdaságilag jelentős fajok védelmét. Fokozottan tanulmányozzák a morfológiájukat, ökológiai igényüket, begyűjtik a szaporító képleteiket, mesterséges körülmények között tanulmányozzák a magok fertilitását, és mikroszaporítási eljárásokat dolgoznak ki, hogy ritka fajok egyedszámát, és az általuk termelt főként gyógyászatban alkalmazott hatóanyagok hozamát növeljék. Bár az amarillisz családban megjelenő és általánosan jellemző másodlagos anyagcseretermék, a galantamin szintetikus előállítása megoldott, a legolcsóbb beszerzési formája mégis a hagyma begyűjtése, gondot okozva ezzel a természetvédelemnek (Takács és Molnár, 2014). Az *Amaryllidaceae* családból olyan fajokat vonunk be a kutatásainkba, amelyek védettek és gyógyászati szempontból is jelentőséggel bírnak és antioxidáns aktivitásuk még nem vizsgált (Rácz, 2012). Ebben a fejezetben összegeztem azt, hogy a mai 21. századi Magyarországon milyen intézkedések valósulnak meg annak érdekében, hogy a jövő generációi számára az általunk tanulmányozott fajok ne csak génbankokban legyenek megtekinthetőek. Az embert körülvevő flóra életünk részét képezi, ezért ismerete és megóvása már gyermekkorban fontos. A növények tanulmányozásához elengedhetetlen a begyűjtésük, de ez már nem csak fizikai értelemben valósulhat meg. Világunk fejlődésével, a digitalizáció széles elterjedésével nincs szükség a védett vagy sok esetben veszélyeztetett fajok természetes élőhelyéről történő gyűjtésére. 1982-től Magyarországon, a madarakon és a rovarvő kisemlősökön kívül más gerinces és gerinctelen állat, valamint növényfajok is törvényes oltalmat kaptak és megállapításra került az eszmei értékük is.

Védettek lehetnek kulturális, tudományos, vagy más közérdekből az arra érdemes növény és állatfajok, ezek társulásai, különleges értéket képező növénytelepítések. Törvényes eszmei értéke van minden védett fajnak. Növények esetében ez 2000 Ft-tól több 10.000Ft-ig terjedhet (Juhász, 2008). Az élőhelyek megőrzésére irányuló tevékenységek Magyarországon jó irányba haladnak. A 60-as évektől fokozott gazdasági tevékenység olyan mértékű degradációt eredményezett, amely számos faj pusztulásához vezetett. A Magyar Közlöny 2012. évi 128. számában tájékozódhatunk az új rendeletről: „*a vidékfejlesztési miniszter 100/2012. (IX. 28.) VM rendelete a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről szóló 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet és a növényvédelmi tevékenységről szóló 43/2010. (IV. 23.) FVM rendelet módosításáról*”, amelyben védett és fokozottan védett fajok, valamint természetvédelmi értékük besorolásáról szóló módosításokat is olvashatjuk, többek között felsorolva *Amaryllidaceae* fajokat is, ezzel bizonyítva számunkra is fontos jelentőségüket. Az amarilliszfélék mutatós viráguk miatt közkedveltek lettek az illegális kitermelő és értékesítő hálózatok számára. Jó példa a kikeleti hóvirág (*Galanthus nivalis*), mely az Európai Unió területén védett fajnak számít, több természetvédelmi jogszabály és egyezmény listázza. Kereskedelmi célú gyűjtése ipari méreteket öltött, mely több ország állományának létét veszélyezteti, ez lett védettségének az oka. A CITES (Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről) tiltja a kikeleti hóvirág országok közötti kereskedelmét, mert bár jelenleg kipusztulással nem fenyegetett a faj, de nemzetközi kereskedelmét szabályozni kell ahhoz, hogy a vadon élő állományok ne kerüljenek kritikus helyzetbe, és a genetikai sokszínűség fennmaradjon (Farkas, 1999; Király és mtsai., 2007). A

megfelelő *in vitro* szövettenyésztési eljárás kidolgozása lehetőséget ad arra, hogy laboratóriumi körülmények között nevelt és folyamatosan szaporítható védett növényeket megőrizzük, ezzel is segítve az adott faj fennmaradását a jövő kor számára.

## **2.3 Alap- és alkalmazott kutatásban felhasznált növényi *in vitro* tenyészetek és jelentőségük**

### **2.3.1. *In vitro* növényi szövettenyésztés**

A steril körülmények között végzett vegetatív mikroszaporítás a növényi biotechnológiának az a területe, amelyet jelenleg a legszélesebb körben alkalmaznak a gyakorlatban, illetve az üzemi technológiának a részévé vált. Az *in vitro* szaporításra felhasznált inokulumok (a növény olyan része, amely merisztéma-, kambiális- és parenchima- szövetet tartalmaz) olyan kisméretűek, hogy csak steril körülmények között tarthatók életben kívülről pótolta tápanyagok és fejlődést szabályozó vegyületek segítségével. Ezen eljárás magába foglalja a kallusz, sejtszuspenziós és protoplaszt tenyészeteket, valamint a mikropropagációs eljárásokat. A növényi sejt dedifferenciálódás során képes totipotensé válni és egy differenciálatlan sejtömeget az úgynevezett kalluszt létrehozni. A differenciálódás mértéke, a fejlődés üteme a genotípustól és a tenyésztés körülményeitől nagyban függ, ezért eltérő lehet (Maróti, 1967). A kalluszosodás eltérő arányú szintetikus és természetes auxin, vagy citokinin típusú hormonokkal megfelelő táptalajon indukálható. A fejlődő kallusz többszöri átoltással folyamatosan fenntartható és szaporítható. A sejtek differenciálódásának indukciója szintén lehetséges *in vitro*, ezt nevezzük redifferenciálódásnak, mely folyamat eredménye lesz a növényregeneráció (Dudits és Heszky, 2003; Skoog és Miller, 1957).

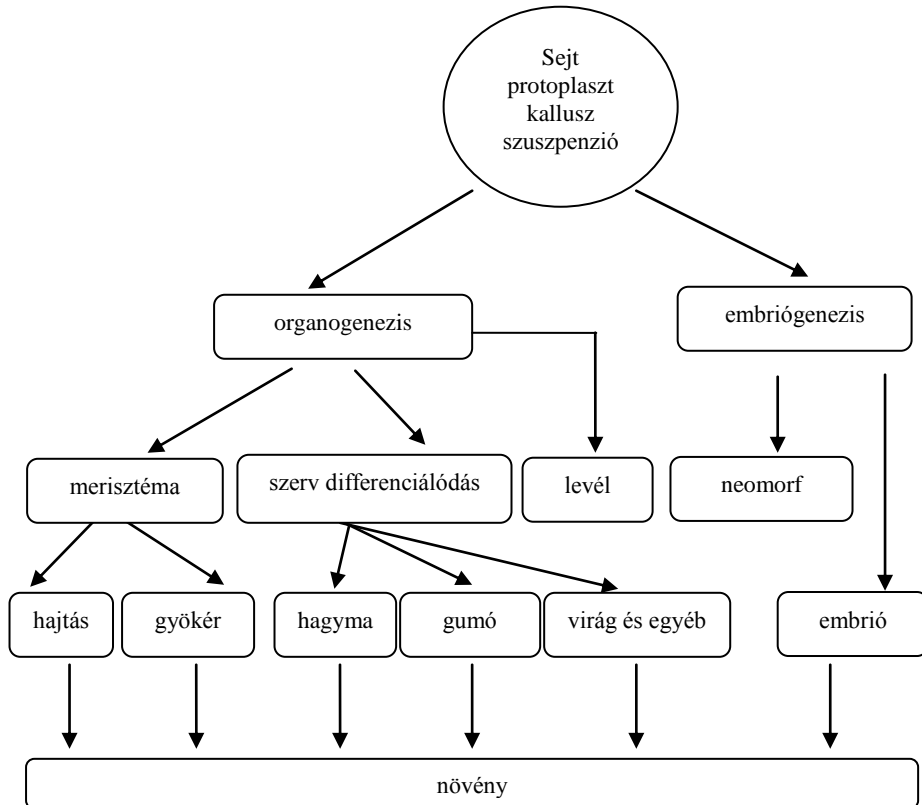
Növényi szövetkultúrákban a növényregenerálásnak kétféle útja lehet, az organogenezis és az embriogenezis. A járulékos hajtástenyészetek

organogenezissel alakulnak ki. Különböző szervekből és szövetekből is indukálható a növényregenerálás leggyakoribb útja, az organogenezis. Főbb szakaszai a következők: hajtáscsúcs differenciálódásának indukciója, hajtáscsúcsok fejlődése és sokszorozódása, és a hajtások gyökereztetése (Dudits és Heszky, 2003). Az eddigi szakirodalmi tapasztalatok azt mutatják, hogy a járulékos hajtásfejlődésre legnagyobb hatással a növényi hormonok vannak (Brettel és mtsai., 1980; Dalton, 2013; George és mtsai., 2010; Razdan, 2003; Skoog és Miller, 1957; Vasil és mtsai., 1982). A fejlődő hajtások gyökereztetéséhez, pedig általában indolvajsav (IBA) és  $\alpha$ -naftilecetsav (NAA) használható sikeresen. Az embriogenezis során szomatikus embriók képződnek. A növényregenerálás során a szomatikus embriók általában bipoláris fejlődést mutatnak (Dudits és Heszky, 2003). A biotechnológiának a növénynemesítésben alkalmazott legfontosabb módszerei közé tartozik a kalluszkultúra és a sejtenyészet. Ezen eljárások előnye, hogy költségük viszonylag alacsony. Ivaros úton nehezen szaporítható növények tömegesen állíthatók elő a mikroszaporítás segítségével.

A növényi szövettenyészetek alkalmasak:

- laboratóriumi modell kísérleti rendszerek kidolgozására
- pollen-inkompatibilitás megkerülésére
- transzgénikus növények előállítására
- genetikai variabilitás indukciójára (szomaklonális variabilitás)
- fajok, fajták konzerválására (mélyfagyasztott sejtenyészetek és embriókultúrák)
- másodlagos anyagcseretermékek (pl. gyógyszerek, gyógyhatású anyagok) termelésére

- illetve merisztématenyészetek segítségével vírusmentes növények előállítására (Demeter és mtsai., 2010; Dudits és Heszky, 2003; Szalai, 2006.)



**1. ábra.** A morfogenezis alternatív útjai a magasabbrendű növények sejt- és szövettenyészteiben (Dudits és Heszky, 2003)

### 2.3.2. Szekunder metabolitok jelenléte és az amarilliszfélék szövettenyésztése

A szekunder metabolitok általános jellemzése: a szekunder metabolitokat más néven másodlagos anyagcseretermékként említi az irodalom. Jellemző rájuk, hogy az elsődleges anyagcsere kiindulási anyagaiból vagy intermedierjeiből képződnek. Energetikai szempontból költséges a termelődésük, ezért a szekunder metabolitok mennyisége, testen belüli eloszlása és bioszintézisük időzítése összetett szabályozás alatt áll. Nem szükségesek az alapvető életfolyamatokhoz, de előnyt biztosítanak a környezettel való interakciók során. Nem általánosan elterjedt anyagok a növényvilágban, hanem specifikusak (Fodorpataki, 2009). Egyedenként igen eltérőek lehetnek, változhat a kémiai felépítésük és a mennyiségük is. Működésükre az egész élőlénynek szüksége van és nem csak az azokat szintetizáló sejteknek. A tudomány jelenlegi állása szerint a növényvilágban az ismert szekunder metabolitok száma több százezerre tehető, és alkalmazásuk előfordul a környezetkímélő növényvédelemben (biopeszticidok), egészségügyben (gyógyszerek alapanyagaként) és a kozmetikai iparban is. A másodlagos anyagcsere termékei lehetnek:

- Fenoloidok, például: sikiminsav, fenilalanin, fahéjsav, flavonoidok, xantonok, galluszsav, ubikinonok, K-vitamin, kumarinok
- Poliketidek, például: palmitinsav, sztearinsav, gliceridek, kutin
- Terpenoidok, például: kámfor, mentol, krizanténsav, abszcizinsav, koleszterol, gibberellinek, karotinok, zeaxantin, kaucsuk
- Azotoidok, például: klorofillok, auxinok, alkaloidok  
(Fodorpataki, 2009; Láng, 1998)

Nemzetségek és fajok	Szekunder metabolitok	Felhasználás	Hivatkozás
<i>Leucojum aestivum</i> <i>Leucojum vernum</i>	Alkaloidok, köztük galantamin: acetilkolinesteráz gátló hatással rendelkezik.	kóros izomgyengeség kezelésére a curare-vegyület hatása következtében fellépő izomreményesség megszüntetésére, gyomor, bél, hólyagrenyheség ellen, valamint műtéteknél alkalmazzák	Schönfelder I. és Schönfelder P., 2001 Heinrich és Lee Teoh, 2004
<i>Galanthus nivalis</i> <i>Galanthus elwesii</i> <i>Galanthus ikariae</i>	Galantamin, likorin, hemantamin, nartazin <i>Galanthus nivalis</i> agglutinin (GNA) lektin	galantamin: újabban kedvező hatását tapasztalják az Alzheimer-kór gyógyítása terén toxikus hatású számos kártékony rovarra, rágsálóra HIV-vírus elleni gátló hatás	Ping Hua és mtsai., 2004 Balzarini és mtsai., 2004 Berkov és mtsai., 2007
<i>Sternbergia fischeriana</i> , <i>Sternbergia lutea</i>	likorin, galantamin	fájdalomcsökkentő, gyulladáscsökkentő, májvédő tevékenység	Citoglua és mtsai., 2012
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> <i>Narcissus jonquilla</i> <i>Narcissus bujei</i>	hemantamin, galantamin, homolikorin	Régebben a nárciszhajtásokat hánytatószerként alkalmazta a népi gyógyászat, manapság hasmenés, légutak gyógyítására alkalmazzák	Schönfelder I. és Schönfelder P. , 2001 Tako és mtsai. , 2013 Choy és mtsai., 1999

**1. táblázat.** Másodlagos anyagcseretermékek jelenléte az amarilliszfélékben

Az amarilliszfélék és hagymafélék egy kládba tartoztak. A klád (*Alliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Agapanthaceae*) leválása és később az *Alliaceae*, a hagymafélék család különválása a felső kréta időszak kezdetén következhetett be (Tuba, 2007). Mindkét családra jellemző, hogy áttelelő szerve a hagyma. Az *Allium cepa* (vöröshagyma) *in vitro* szövettenyésztési eljárását és gyakorlati jelentőségét 1982-ben megjelent cikk írja le. Ebben a kutatásban 4-5 mm-es explantátumokat helyeztek Murashige-Skoog táptalajra (Murashige és Skoog, 1962) melyet Gamborg -féle (Gamborg és mtsai., 1968) vitaminokkal és 30g/l cukorral valamint 6g/l agar-aggarral egészítették ki. A szaporító táptalajt  $\alpha$ -naftil ecetsav (NAA) és benzil-amino-purin (BAP) különféle hormonkombinációival egészítették ki. A kísérlet sikerességét bizonyítja, hogy merisztéma, majd kalluszkultúra fejlődött melyből később járulékos szerv tenyészetet és *in vitro* génbankot hoztak létre (Fáry és mtsai., 1982) Az amarilliszfélék szövettenyésztésére általánosan elmondható, hogy szacharózzal kiegészített Murashige-Skoog táptalajon hagyományos módszerekkel vegetatív vagy generatív növényi részből eltérő auxin és citokinin típusú hormonokkal hoztak létre *in vitro* tenyészeteket. *Leucojum aestivum* és *Lillium rhodopaeum* hagyma, levél, hajtás és mag morfogenetikai válaszát vizsgálták Stanilova és munkatársai. A *L. aestivum* esetében a levél, míg a *L. rhodopaeum* esetében a hagyma bizonyult megfelelő explantátumnak. Organogenezist tudtak létrehozni 1 mg l<sup>-1</sup> BA +1 mg l<sup>-1</sup> KIN hozzáadásával MS táptalajon, illetve 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA+ 0,1 mg l<sup>-1</sup> KIN LS (Linsmaier és Skoog) hormonösszetételű táptalajon (Stanilova és mtsai., 1994). Több esetben az alkaloidok későbbi kivonása volt a cél. A *Leucojum aestivum* fiatal terméséből létrehozott kezdeti kallusz tenyészetet 4 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D és 2 mg l<sup>-1</sup> BA hormonokkal kiegészített MS táptalajon nevelték, majd 1.15 mg l<sup>-1</sup> NAA és 2.0 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű MS táptalajra helyezték. Az így kapott hajtás kezdeményekben felhalmozódott galantamint igyekeztek

kivonni és tanulmányozni. Körülbelül nyolcvan hajtástenyészetből voltak képesek kinyerni 2.5 mg l<sup>-1</sup> galantamint (Pavlov és mtsai., 2007). Ez a kísérlet bizonyította, hogy a mesterséges körülmények között nevelt tenyészetekből is lehetséges a gyógyászatban használatos alkaloidot kinyerni. 2013-ban Ptak és munkatársai azonban újabb vizsgálatokat végeztek *Leucojum aestivum* kalluszokon, annak érdekében, hogy in vitro előállított növényekből galantamint tudjanak kivonni. A 2,4-D, pikloram (4-amino-3,5,6-triklór-ecetsav) és dikamba (3,6-diklór-o-ánizssav) (25 és 50 µM koncentrációban) hatását vizsgálták embriogén kallusz képzésre és alkaloid felhalmozódásra. Az auxinok közül nagyobb embriogén morfogén válasza volt a 2,4-D-nek, de az alkaloid képződés mindhárom auxin esetében megvalósult, azonban kisebb koncentráció használata során (Ptak és mtsai., 2013). A *Leucojum vernum in vitro* tenyésztése során különböző növényi növekedést szabályozó hormonokkal vizsgálták, hogy melyik alkalmasabb stabil szövettenyészet létrehozására. Az embriók fejlődését leginkább BA és NAA jelenlétében figyelhették meg (Ptak., 2010). Kilenc nárcisz faj bevonásával kísérleteztek ki egy általánosan alkalmazható szövettenyésztési eljárást Seabrook és munkatársai (Seabrook és mtsai., 1976). Céljuk egy olyan hormonösszetételű táptalaj létrehozása volt, amely általánosan alkalmazható a *Narcissus* nemzetség fajainak mikroszaporítása során. Hajtás, gyökér és levél explantátumokat helyeztek módosított MS táptalajra, melynek induló hormonkoncentrációja 1 mg l<sup>-1</sup> NAA +10 mg l<sup>-1</sup> BA, 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> BA volt. Kalluszok megjelenését tapasztalták, majd ezeket hosszabb távon 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +2 mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú tápközegen nevelve növények megjelenését tapasztalták. Gyökeresedést 4 mg l<sup>-1</sup> NAA +4 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű táptalajon hoztak létre. *Narcissus bulbocodium* fajból 4 mg l<sup>-1</sup> BA, 0,12 mg l<sup>-1</sup> NAA és 2 mg l<sup>-1</sup> BA 1 mg l<sup>-1</sup> IBA hormonokkal kiegészített MS táptalajon is állítottak elő sikeres szövettenyészetet (Santos

és Salema, 1998). *Narcissus pseudonarcissus* (csupros nárcisz) fajból is indukáltak szövettenyészeteket, melynek hatóanyagait napjainkban hányás, hasmenés, légutak megbetegedésének enyhítésére használják (Schönfelder I. és Schönfelder P., 2001; Sage és Hammat, 1999). Piros liliom (*Nerine sarniensis*) esetén, növényi szövettenyésztés során indukáltak hagyma explantátumokból hagymakezdeményeket. A legnagyobb számban 3% szacharóz, 0,01-0,2 mg l<sup>-1</sup> NAA és 0,2 mg l<sup>-1</sup> BA- nal kiegészített MS táptalajon tudták produkálni a hagyma inokulumokat (Vishnevetsky és mtsai., 2003). *Galanthus elwesii* (pompás hóvirág) hagymájából állítottak elő szövettenyészetet BA, NAA, 2,4-D hormon-összetételű MS táptalajon (Pawowska és mtsai., 2008). A kezdeti hormonösszetételt az alaptáptalajon később a nagyobb kallusz elérése érdekében 2 mg l<sup>-1</sup> BA +2 mg l<sup>-1</sup> IBA hormonkoncentrációra cserélték és a kalluszok 25% -os növekedés serkentését tapasztalták. A megnövekedett kalluszok mellett azonban elmaradt a hajtás, virágos képlet megjelenése, ezért ennek érdekében sötétben nevelték BA és NAA hormon-összetételű táptalajon (Tilly-Mándy és mtsai., 2006). A *Galanthus ikariae* esetében gyökeret és hagymát vizsgáltak különböző mennyiségben használt NAA, suc. és aktív széntartalmú MS táptalajon. 23 °C-on 16/8 h fény mellett 16 hétig egy steril és a feltételeknek megfelelő szövettenyésztő szobában nevelték a kalluszokat. A legjobb gyökérképződést 0.5 mg l<sup>-1</sup> NAA koncentráción érték el, magát a hagyma inokulumokon történő kallusz indukciót 1/8 erősségű MS táptalajon 0,5% aktív szén, 0,5 mg l<sup>-1</sup> NAA és 60g/l suc jelenlétében voltak képesek produkálni 4 °C-n 8 hét alatt (Tprdamaz és mtsai., 2003). A *Sternbergia fischeriana* hagymájából létrehozott kezdeti kallusz tenyészetet 4 mg l<sup>-1</sup> BA és 0,25 mg l<sup>-1</sup> NAA és 2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D hormonokkal kiegészített MS táptalajon nevelték a tenyészet indításakor. Ezen nagy számban regeneráltak hagymákat (több mint 80 hagyma/explantátum) (Mirici és mtsai., 2005). A vetővirág

genus esetében folytak elsődleges vizsgálatok antioxidáns tartalom tekintetében. Ezek a vizsgálatok csak natív (természetes környezetben előforduló) növényeken történtek meg, szövettenyészetekben nem. Az első mérési eredmények a *S. fischeriana* faj vizsgálatából származnak. A *S. lutea*, *S. fischeriana* esetében alacsony antioxidáns aktivitás figyelhető meg, amelyről feltételezhető, hogy kapcsolatban áll a teljes fenol és flavonoid alacsony tartalmával. Az antioxidáns tartalmú gyógynövényeket általában kapcsolatba hozzák a fenol tartalommal (Orhan és mtsai., 2011). *Sternbergia clusiana* szövettenyésztését a növény hagymájából indították el IBA és BA hormontartalmú táptalajon. A megfelelő hormonkoncentrációk ( $10 \text{ mg l}^{-1}$  IBA+  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA) esetében sikeres hagymaprodukciót hajtottak végre (Oran és Fattash, 2005).

Faj	Szerv	Táptalaj	Hormonösszetétel	Morfogén válasz	Hivatkozás
<i>Leucojum aestivum</i> <i>Lillium rhodopaeum</i>	levél, hajtás, termés	MS, LS	1 mg l <sup>-1</sup> BA + 1 mg l <sup>-1</sup> KIN+ 0,5 mg l <sup>-1</sup> BA 0,1 mg l <sup>-1</sup> KIN	kallusz, hajtás	Stanilova és mtsai., 1994
<i>Leucojum aestivum</i>	termés	MS	4 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D+ 2 mg l <sup>-1</sup> BA	kallusz	Pavlov és mtsai., 2007
<i>Leucojum vernum</i>	levél	MS	1 mg l <sup>-1</sup> BA, 2 mg l <sup>-1</sup> NAA	kallusz	Ptak és mtsai., 2010
<i>Narcissus nemzetség</i>	hajtás, gyökér, levél	MS	1 mg l <sup>-1</sup> NAA +10 mg l <sup>-1</sup> BA, 2 mg l <sup>-1</sup> NAA +2 mg l <sup>-1</sup> BA	kallusz, egész növény	Seabrook és mtsai., 1976
<i>Narcissus bulbocodium</i>	hagyma	MS	4 mg l <sup>-1</sup> BA, 0,12mg l <sup>-1</sup> NAA	hajtás	Santos és mtsai., 1998
<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	hagyma hajtás	MS	5 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D+ 1,5 mg l <sup>-1</sup> BA	kallusz, hajtás	Sage Hammatt, 1999
<i>Nerine sarniensis</i>	hagyma	MS	0,01-0,2 mg l <sup>-1</sup> NAA, 0,2 mg l <sup>-1</sup> BA	hagyma	Vishnevetsky és mtsai., 2003
<i>Narcissus confusus</i>	hagyma	MS	4 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D+ 1 mg l <sup>-1</sup> BA 1 mg l <sup>-1</sup> KIN	kallusz, hajtás, gyökér	Sellés és mtsai., 1999
<i>Galanthus elwesii</i>	hagyma	MS	2 mg l <sup>-1</sup> BA 2 mg l <sup>-1</sup> IBA	kallusz, hajtás, gyökér- képződés	Tilly-Mándy és mtsai., 2006
<i>Galanthus ikaire</i>	hagyma gyökér	MS	0,5 mg l <sup>-1</sup> NAA 0,2-1% aktív szén	hajtás	Tprdamaz és mtsai., 2003
<i>Sternbergia clusiana</i>	hagyma	MS	10 mg l <sup>-1</sup> IBA+ 1 mg l <sup>-1</sup> BA	hagyma	Oran és Fattash, 2005
<i>Sternbergia fischeriana</i>	hagyma	MS	4 mg l <sup>-1</sup> BA és 0,25 mg l <sup>-1</sup> NAA és 2 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D	kallusz	Mirici és mtsai., 2005

**2. táblázat.** *Amaryllidaceae* fajok *in vitro* szövettenyésztésére kidolgozott eljárások

## 2.4. DNS Polimorfizmus vizsgálati módszerei, AFLP

A DNS-polimorfizmus vizsgálatához növényekben régóta használnak genetikai markereket. A DNS polimorfizmus egy adott DNS szakasz bázissorrendjének, egy génnek vagy DNS szakasznak a variációit jelenti. A genetikai markerek könnyen vizsgálható, mendeli módon öröklődő és a populációban nagy polimorfizmust mutató genomszakaszok. A molekuláris markerek alkalmazásának egyik nagy előnye a morfológiai markerekkel szemben, hogy a genom igen nagy részét használhatjuk markerként, segítségükkel meg lehet határozni gének, szekvenciák pontos helyét, helyzetét a kromoszómán. Ezek általában nem jelennek meg a fenotípusban, hanem valamilyen szekvencia- vagy méret meghatározással deríthetők fel (Deák, 2010).

**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism), azaz amplifikált fragment hossz polimorfizmus: a mi vizsgálatainkban is alkalmazott technikát Zabeau és Vos (Key Gene, Hollandia) 1993-ban szabadalmaztatta és 1995-ben publikálta (Vos és mtsai., 1995). A módszer lényege, hogy ismeretlen szekvenciájú kromoszomális restrikciós fragmentumokat amplifikálnak PCR-rel. Az AFLP módszer három fő lépése a templátkészítés, a fragmentum amplifikáció és a gélanalízis. Az AFLP technikát növényeknél gyakran alkalmazzák faji identifikációhoz (Després és mtsai., 2003) és populációgenetikai vizsgálatokhoz (Baskauf és mtsai., 2009; Coppi és mtsai., 2008). A technika előnye, hogy egyenletes eloszlásban a teljes genomot lefedve nagy mennyiségű információhoz jutunk a vizsgált szervezetet illetően, így kapcsoltsági térképek készítéséhez és összehasonlító vizsgálatokhoz használják.

A **PCR**-t (polimeráz láncreakció; Polymerase Chain Reaction), 1985-ben fedezték fel, amellyel *in vitro* módszerrel enzimatikus úton sokszorozhatunk meg (amplifikálhatunk) kromoszomális vagy klónozott DNS célszekvenciákat hőstabil DNS polimeráz enzim (Taq polimeráz), és lánckezdő oligonukleotidok (primerek) segítségével (Reineke és Karlowsky, 2000). A folyamat „thermocyclerben” zajlik, amelyben a hőmérséklet gyorsan és pontosan változtatható.

## **2.5. Antioxidánsok jellemzése**

### **2.5.1. A növények antioxidáns védőrendszere**

A káros reaktív oxigénformák (ROS) felgyülemelését a növényekben számos kedvezőtlen környezeti tényező idézheti elő, ami membránkárosodáshoz, enzim- és génműködés gátlásához, fehérjeszerkezet-meghibásodásához vezethet. Az oxidatív stressz elsősorban a fotoszintézis folyamatához kapcsolódik, hiszen a nagy mennyiségű oxigén keletkezése során kapcsolatba kerülhet redukáló képességű molekulákkal és az oxigénből veszélyes reaktív módosulatok keletkezhetnek. Azonban a növényi szervezetek hatékony antioxidáns védőrendszere lehetővé teszi azt, hogy ellenállóak legyenek a stresszhatás következtében keletkező reaktív oxigénformákkal szemben és biztosítsák megfelelő működésüket. A káros reaktív oxigénformák (szuperoxid gyök, hidrogén-peroxid, hidroxil gyök, szinglet oxigén) arányát a reaktív oxigént termelő és átalakító folyamatok kölcsönhatásai határozzák meg a növények sejtjeiben.

Az antioxidáns védőrendszer nem enzimatikus alkotói:

- Aszkorbin-sav
- Glutation
- Tokoferol

- Flavonoidok (flavonok, flavonook antocianinok)
- Karotenoidok (karotének, xantofilok)

Az antioxidáns védőrendszer enzimatis alkotói:

- Szuperoxid-diszmutáz (SOD)
- Aszkorbát-peroxidáz
- Kataláz
- Glutation-peroxidáz
- Egyéb peroxidázok és peroxiredoxinok csoportja (Batková és mtsai., 2008; Dutta és Datta, 2003; Fodorpatáki, 2009; Larcher, 2001; Láng, 1998; Smirnov, 2005; Szalai, 2006).

A növényekben leggyakrabban keletkező reaktív oxigénszármazék a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ), mely keletkezhet számos oxidáz által katalizált reakcióban. Az oxidatív stresszel szembeni tolerancia ezért jelentős mértékben függ a hidrogén-peroxidot méregtelenítő számos enzim működésétől (Das, 2014; Fodorpatáki, 2009).

Reaktív oxigénformák képződése	Reakciók	A folyamatban résztvevő elsődleges oxigénforma
Szuperoxid-diszmutáz (SOD)	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	$O_2^{\cdot -}$
Kataláz (CAT)	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	$H_2O_2$
Glutation-peroxidáz (GPX)	$2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$ $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$	$H_2O_2, ROOH$
Peroxidázok	$RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$	$H_2O_2,$

**3. táblázat.** Reaktív oxigénformák, és az enzimes védelmi rendszer legfontosabb reakciói (Boots és mtsai., 2008)

A szabadgyökök keletkezése javarészt a sejtekben lezajló természetes biokémiai folyamatok, többnyire az oxidációs folyamatok során megy végbe. Ezen folyamatoknak fontos szerepe van a szervezet normál működésének fenntartásában, például a szervezet azon mechanizmusában melyek védekező funkciót látnak el, a sejtciklus szabályozásában, vagy sejt metabolizmusában (Davies, 2000; Mittler és mtsai., 1999). Már az őskorban előszeretettel fogyasztott bogyós gyümölcsök és a bennük található vegyületek (vitaminok, flavonoidok stb.) szerepet játszottak a szabadgyökökkel szembeni védelem során. A szabadgyökök olyan reaktív oxigén-, nitrogén-, kén- vagy szénközpontú molekulák, illetve molekularészletek, amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ezért rendkívül agresszívak és rövid életidejűek, hiszen nagyon gyorsan kémiai reakcióba lépnek más vegyületekkel elektronszerzés céljából (Cadenas, 1989). A sejtelhalást, vagy a reaktív oxigén fajtákat, melyek a gazda szervezetet károsítják az antioxidánsok kompenzálni képesek. Ezek előfordulnak az élő szervezetben, táplálékban, szintetikus, vagy természetes vegyületek formájában, lehetnek enzimátikus vagy nem enzimátikus antioxidánsok. Az antioxidánsok aktivitása az összes antioxidáns vegyület együttes szabadgyökfogó hatását jelenti, amely vizsgált rendszerre vonatkozik, jelen esetünkben az *in vitro* szövettenyésztéssel előállított növényi részekre (Brand és mtsai., 1995; Blois, 1958). Kimutatásuk laboratóriumi mérések esetén eltérő lehet.

## 2.5.2. Antioxidánsok kimutatására alkalmas módszerek

**Enzimatisz antiozidánsok** kimutatására – ezek lehetnek egyes enzimek (aszkorbát-perozidáz, dehidroaszkorbát-reduktáz, glutation-S-transzferáz, glutation-reduktáz, szuperozid-dizmutáz, kataláz, perozidáz stb.) – kísérleteink során szolgáló módszerek a következők: natív poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), mely fehérjék elválasztására szolgáló eljárás. Az eljárás lehetővé teszi, hogy a fehérjék, a gélelektroforetikus szétválás során megtartsák natív térszerkezetüket. Az elektroforézist nem denaturálódó közegben, alacsony hőmérsékleten végezzük. Ezen körülmények között számos enzim megőrzi natív szerkezetét, enzimaktivitását, és a gélben specifikusan kimutathatók más fehérjék fokozott mennyisége mellett is. A „festési” eljárás során a gél egy olyan szubsztrát oldatába áztatjuk, amelyet a kimutatni kívánt enzim szelektíven alakít át, és amelynek terméke színes és oldhatatlan. Így színes csapadék jelzi az adott enzim helyét a gélben (Hegyi és mtsai., 2013).

Pirogallol és guajakol festéssel történhet a **perozidázok** kimutatása. A perozidázok különböző H-donorokat képesek eloxidálni  $H_2O_2$  vagy szerves perozidok jelenlétében, köztük fenolokat is. Meghatározása azon alapul, hogy a szubsztrátumként használt pirogallol perozidázok hatására sötétbarna purpurogallinná oxidálódik és a keletkezett festék mennyisége arányos az enzim aktivitásával (Allaga és mtsai., 1997; Láng, 1998). A pirogallol 1,2,3-trihidroxi-benzol:  $C_6H_3(OH)_3$ , fehér, kristályos, szilárd anyag. Lúgos oldata levegőn-az oxigénnel való reakció miatt-megbarnul. Erős redukálószer, natív gélek esetén jó előhívószernek bizonyul (Sarkadi, 2007). A perozidázok szerves redukáló molekulát igényelnek a  $H_2O_2$  méregtelenítéséhez, és ehhez jól használható mesterséges szubsztrátum a guajakol, az összesített működésük „guajakol-perozidáz” aktivitásként is említésre kerül (Fodorpatáki, 2009). A guajakol  $C_7H_8O_2$  szerves vegyület a pirokatechin

metiléter származéka, vörösesbarna színnel festi meg az akrilamid gél előhívás során (Amako és mtsai., 1994).

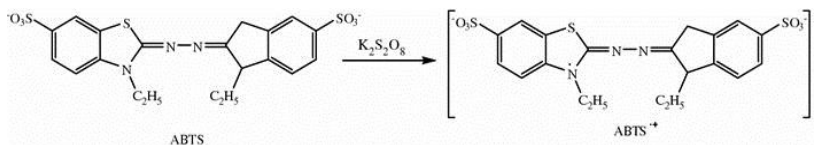
A növényi szövetekben jelentősen elterjedt Fe-porfirin tartalmú vegyület a **kataláz** enzim (CAT). Fő sajátossága, hogy gyors megújulási ciklusa van, és alacsony fogékonyságot mutat a  $H_2O_2$  iránt. Elsősorban a peroxiszómákban és a glioxiszómákban lokalizált, funkciója a mérgező hidrogén-peroxid bontása, előnye, hogy nem igényel semmilyen szerves kosubsztátumot redukáló tényezőként (Fodorpatáki, 2009). A kataláz a  $H_2O_2$  molekulához kapcsolódik a reakció során, ebből a komplexből katalitikus reakció esetén víz és oxigén keletkezik az enzim szabaddá válása mellett. A festési és mosási folyamat eredményeként a gél sötétzöld színű és a fehérjét jelző sáv jellemzően kivilágosodik (Allaga és mtsai., 1997; Láng, 1998).

**Nem enzimatis antioxiánok** kimutatására, melyek lehetnek kismolekulájú vegyületek (aszorbát, glutation, E-vitamin, fenolos vegyületek stb.) alkalmas módszerek:

- Összes polifenol tartalom mérése Folin-Ciocalteu reagenssel (**TPC**). A módszert Singleton és Rossi fejlesztette ki 1965-ben. Folin-Ciocalteu elegy alkalmazása során galluszsavra vonatkoztatott kolorimetriás *in vitro* módszer (GAE). A módszer redukálóképességen alapuló antioxián aktivitás meghatározás. A reakció a Folin-Ciocalteu elegy alkalmazására épít: az ebben lévő foszfowolframsav ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) és foszfomolibdénsav ( $H_3PM_{12}O_{40}$ ) oxidálja a fenolos komponenseket, és a keletkezett kék elszíneződés arányos a fenolos vegyületek mennyiségével (Abrankó és mtsai., 2010). Spektrofotometriásan követhető a keletkezett kék szín, 765nm-en. A minta összes polifenol-tartalmát galluszsav-egyenértékben,  $\mu\text{g/ml}$ -ben vagy  $\mu\text{g/g}$ -ban adjuk meg (Grubescic, 2005; Singleton és Rossi, 1965).

- Troloxra vonatkoztatott antioxidáns aktivitás (TEAC)

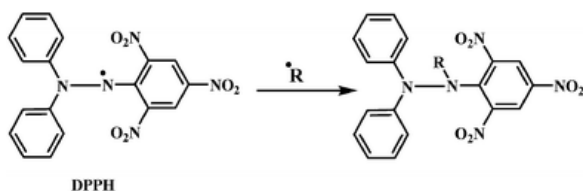
A Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-kromán-2-karbonsav) az E-vitaminnak egy vízben oldódó megfelelője. Antioxidáns, alkalmas biokémiai vagy biológiai vizsgálatokban oxidatív stressz kivédésére. A TEAC mérése az antioxidáns képesség alapján Trolox mértékegység névvel, Trolox egyenértékben (TE), például  $\mu\text{molTE}/100\text{g}$  történik. A reakció az ABTS (2,2'-anizo-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav) oxidációján alapszik (Brand, 1995; Djeridane és mtsai., 2006; Miller és mtsai., 1993; van den Berg és mtsai., 1999).



## 2. ábra. Antioxidáns és az ABTS gyök reakciója

Hidrogén-peroxid és metmioglobin jelenlétében sötét színű  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  kation gyök keletkezik. Színintenzitás csökkenést figyelhetünk meg, ha a mintánkban antioxidánsok vannak jelen, mert szabadgyökökkel történő reakció során a minta elszínetelenedik. Spektrofotometriásan nyomon követhető a reakció 734nm-en (Stratil és mtsai., 2007). A módszer gyors, egyszerű, és a gyök viszonylag stabil marad (van den Berg és mtsai., 1999). A módszer hátránya, hogy a mérés során a növényi pigmentek interferenciát okoznak (bár ez az interferencia kismértékű), és egy stabil élő szervezetben nem képződő gyököt használ.

- DPPH gyök inhibíciójának vizsgálata. Az egyik legkorábban széles körben alkalmazott gyök megkötésén alapuló antioxidáns módszer (Blois, 1985; Cao és Prior, 1998). A sötétlila színű gyök antioxidánsokkal reagálva elveszti színét. Nem természetes a sejtben normál anyagcsere során keletkező gyököt használ (Frankel és Meyer, 2000). Spektrofotometriásan 517 nm-en mérhető (Apak és mtsai., 2007). Annak megállapítására, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak ez a módszer nem alkalmas.



**3. ábra.** A DPPH gyök megkötésének alapja

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. A szövettenyészetek indukciója

Szövettenyészeteket indukáltunk *Galanthus nivalis* (kikeleti hóvirág), *Galanthus elwesii* (pompás hóvirág), *Galanthus woronowii* (Voronov-hóvirág), *Leucojum aestivum* (nyári tőzike), *Leucojum vernum* (tavaszi tőzike) és *Sternbergia lutea* (őszi vetővirág) esetében. Mind a hat fajból a szövettenyészetek indítása azonos módszer szerint zajlott, melyet szakirodalmak alapján terveztünk meg (Bhagyalakshmi és mtsai., 1999; Chen és mtsai., 2005; Darvishi és mtsai., 2006; Santos és mtsai., 1998). Gyökér, levél és hagyma explantátumokat próbáltunk ki. A szövettenyésztési eljárásokat steril fülke alatt hajtottuk végre. A növényeket és azok különböző szerveit felületi sterilizálásnak vetettük alá. Ennek során, a növényeket csapvízzel történő átöblítést követően 30 percig Domestos háztartási fertőtlenítőszer 10 v/v %-os oldatába áztattuk, majd három alkalommal tíz percig steril desztillált vízzel átmostuk. Ezt követően a hagymáról levágtuk a levelet és a gyökeret, majd a hagyma húsos alleveleket három eltérő auxin/citokinin arányú elegyet tartalmazó 0,8% (w/v) Bacto-agart (Difco, Lawrence, KS, USA). Difco-agarral, Gamborg vitaminnal (Gamborg és mtsai., 1968) és 2%(tömeg/térfogat) szacharózzal kiegészített, Murashige és Skoog alaptáptalajra (1962) -továbbiakban MS\*- helyeztük. A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és  $22 \pm 2^\circ\text{C}/18 \pm 2^\circ\text{C}$  hőmérséklet-perióduson neveltük hőlég-sterilizett petricsészékben. Fényen történő nevelés esetén, a fényerő  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  volt.

Növény	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Galanthus elwesii</i>	<i>Galanthus woronowii</i>	<i>Leucojum aestivum</i>	<i>Leucojum vernum</i>	<i>Sternbergia lutea</i>
<b>Származási hely</b>	DE Botanikus kert <sup>1</sup> Hollóháza <sup>2</sup>	SOTE/ Farmakognóziái Intézet Fűvészkert		Szatmár-Beregi síkság Márokpapi határnál	Magosliget DE Botanikus kert	Albánia
<b>Szövettenyésztés indítása</b>	2008. március, 2014. március	2012. március		2014. május	2011/ 2014. március	2013. november
<b>Növényi rész</b>	hagyma					
<b>MS* Táptalaj hormon- kombináció</b>	10NAAmg l <sup>-1</sup> + 1BA mg l <sup>-1</sup> 2NAAmg l <sup>-1</sup> + 1BAmg l <sup>-1</sup>			10NAAmg l <sup>-1</sup> + 1BA mg l <sup>-1</sup> 2NAAmg l <sup>-1</sup> + 1BAmg l <sup>-1</sup>	2NAAmg l <sup>-1</sup> 5NAAmg l <sup>-1</sup> + 1BAmg l <sup>-1</sup> 2NAAmg l <sup>-1</sup> + 2BAmg l <sup>-1</sup>	10NAAmg l <sup>-1</sup> 2NAAmg l <sup>-1</sup> 2NAAmg l <sup>-1</sup> + 1BA mg l <sup>-1</sup> 5NAAmg l <sup>-1</sup>

**4. táblázat.** Szövettenyésztés indítása eredeti növényekből. 1: A *G. nivalis* esetében a Debreceni Egyetem Botanikus kertjében nevelt növények a Tokaj-Kopasz-hegyről származnak és évtizedek óta ott nevelkednek, 2: *G. nivalis* gyűjtésére vonatkozó engedélyszám: 17512-7/2013

### **3.2. *Galanthus nivalis* szövettana**

*G. nivalis* hajtás és kallusz darabok metszésével preparátumokat készítettünk majd ezeket szövettani vizsgálatoknak vetettük alá mikroszkóp segítségével. A folyamat első lépéseként 3.7%-os formaldehidben fixáltuk 16 órán át a kallusz, ill. hajtásdarabokat, majd 4 órán át NaCl tartalmú foszfát pufferben (PBS) oldott 40%-os szacharózba áztattuk. Ezt követően 30 mikrométer vastagságú metszeteket készítettünk. A metszés, hajtás, illetve kallusz darabokból történt, melyeket fagyasztásos technikával LEICA Histoslid 2000 mikrotommal készítettük.

A vizsgálatot egy OLYMPUS PROVIS AX-70 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük.

### **3.3. A *Galanthus nivalis* tenyészetek genetikai variabilitás vizsgálata**

#### **AFLP, PCR reakció menete**

További kísérleteink során igyekeztünk bebizonyítani, hogy az általunk előállított szövettenyészet genetikailag nem különbözik az eredeti lelőhelyről származó növénytől. A szakirodalom szerint egyes szövettenyésztés során használt hormonok (például a 2,4-D) genetikai eltérésekhez vezethetnek, melyek az esetleges hatóanyag termelésre is befolyással lehetnek (Dudits és Heszky, 2003). A kutatások során a DNS-polimorfizmus vizsgálatához a PCR-technikán alapuló AFLP-módszert (Amplified Fragment Length Polymorphism) alkalmaztuk. A vizsgálatokhoz *Galanthus nivalis* eredeti növénymintákat és szövettenyészeteket használtunk, a natív növényeket különböző helyről gyűjtöttük be (4. Táblázat).

Név	Származási hely
A/OP1	Hollóháza, 1. egyed
A/OP2	Hollóháza, 2. egyed
A/OP3	Hollóháza, 3. egyed
A/Culture	Hollóháza, szövettenyészet
B/Culture	Tokaj, Kopasz-hegy 1. egyed szövettenyészete
C/Culture	Tokaj, Kopasz-hegy 2. egyed szövettenyészete

**5. táblázat.** Növény és DNS minták

### ***DNS kivonás:***

Az AFLP vizsgálatok megkezdéséhez megfelelő mennyiségű és tisztaságú DNS mintára van szükség. A különböző élőhelyekről begyűjtött *Galanthus nivalis* hajtásokból és az *in vitro* kalluszból, Benner és mtsai., 1995 által közölt kivonási módszert alkalmaztuk. A különböző *Galanthus nivalis* DNS mintáinkat *EcoRI* és *TruI* enzimekkel hasítottuk (Reineke és Karlowsky, 2000; Vos és mtsai., 1995). A restriktív enzimek és az emésztés során használt pufferek, ill. ligáláshoz használt reagensek és a Fermentas cég készítményei. A *TruI+EcoRI* restriktív enzimekkel emésztett DNS fragmentekhez a megfelelő adapter oligonukleotidokat kapcsoljuk (Reineke és Karlowsky, 2000). A *TruI* és *EcoRI* adapterekkel ligált DNS fragmentek mennyiségének növelését PCR alkalmazásával érték el. Az általunk alkalmazott módszer két lépésből állt: a kétszeresen emésztett *Galanthus nivalis* DNS minták pre-szelektív és szelektív amplifikációja. A pre-szelektív primerpár minden esetben E pre-sel-A/T pre-sel-C volt. A szelektív PCR-hez különböző AFLP primereket használtunk.

		<i>Eco</i> RI (5'-3')	<i>Tru</i> I (5'-3')
Preszelektív primerek		GACTGCGTACCAAT TCA	GATGAGTCCTGAGT AAC
Szelektív primerek	Esel2-Tsel4	GACTGCGTACCAAT TCAAG	GATGAGTCCTGAGT AACTC
	Esel3-Tsel2	GACTGCGTACCAAT TCACA	GATGAGTCCTGAGT AACAG
	Esel3-Tsel4	GACTGCGTACCAAT TCACA	GATGAGTCCTGAGT AACTC
	Esel4-Tsel6	GACTGCGTACCAAT TCACC	GATGAGTCCTGAGT AACTG
	Esel5-Tsel5	GACTGCGTACAAAT TCAGC	GATGAGTCCTGAGT AACTT

**6. táblázat.** Az AFLP technikához alkalmazott PCR reakcióban felhasznált primerkombinációk (a primerek szelektív nukleotidjaival és az általunk használt azonosítókkal)

### Gélelektroforézis és gélfestés

A restrikciós enzimekkel történő hasítás után kapott és PCR-rel amplifikált DNS fragmenteket poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el (Vos és mtsai., 1995). A DNS mintázat meghatározásakor 6% koncentrációjú poliakrilamid gélét használtunk, futtató pufferünk 0,5xTBE (Tris-borate EDTA) volt. A poliakrilamid gélek porózus szerkezete akrilamid ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$ ) polimerizációjával jön létre a keresztkötést biztosító N, N' – metilén- bisz- akrilamid ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$ ) jelenlétében. A polimerizáció eredményeként színtelen, átlátszó, rugalmas, szilárd, forralásnak és fagyasztásnak ellenálló gél keletkezik. A gél sűrűségét, viszkozitását és pórusméretét az akrilamid és bisz- akrilamid koncentrációja határozza meg. A DNS-mintákat géltre vitel előtt 2 percig 90 °C-on inkubáltuk, majd rögtön jégre/ 4 °C-ra tettük. 5 µl PCR terméket futtattunk. A DNS fragmentek azonosításához a Fermentas cég O'Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus markert használtuk, a létra 14 DNS fragmentet tartalmaz, ezek bázispárokban a következők: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031,

900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. Az általunk használt AFLP technika nem tartalmazott radioaktív jelölési lépéseket (pl. primerek), ezért a DNS fragmentek elválasztás utáni kimutatására minden esetben az ezüstfestés módszerét alkalmaztuk (An és mtsai., 2009). A géleket az UVITECH cég gél dokumentációs rendszerének segítségével "JPEG" formátumú képfájlokban rögzítettük.

### **AFLP adatok elemzése**

A különböző *G. nivalis* minták AFLP analízise a gélelektroforetikus elválasztás után a géleken egy-egy "gél oszlopként" (lane) jelenik meg. Ezekben az oszlopokban a DNS fragmentek (band) számba vehetők (Loh és mtsai., 1999). A fragmentekből, jelenlétük alapján (létező fragment=1, hiányzó fragment=0) bináris adatokat képeztünk a GelAnalyzer2010 programmal, majd egy bináris (0,1) mátrixszá egyesítettük. A digitális képen 5 pixelnél kisebb távolságra lévő sávokat azonos hosszúságúnak vettük. Az AFLP sávok meglétét/hiányát tartalmazó mátrixot ezután hierarchikus klaszteranalízisnek vetettük alá Ward-féle eljárással, a disztancia-mátrixot eukleidészi távolságokkal számolva. A számításokat R 2.15.0 környezetben implementáltuk.

### **3.4. Enzimatisz antiozidánsok vizsgálata: gélelektroforézis és gélfestés**

Az *in vitro* kultúrákat, beleértve a kalluszokat és regenerált növényeket stressz reakciók kísérik és a kalluszképzés különböző szakaszaiban – sejtprolifерáció vagy szomatikus embriogenezis- lezajló specifikus változások az izoenzim aktivitások változásai kísérik (például SOD izoenzim-aktivitás) (Blazquez és mtsai., 2009).

#### **3.4.1. Növénykivonatok készítése**

Az enzimaktivitások kimutatásához nyers növénykivonatokot készítettünk. A növényi szövettenyészetből származó mintánkhoz polivinil-pirrolidiont (PVP) adtunk. A PVP mesterségesen előállított anyag, amelyet a szervezet nem vesz fel. A fehér por vízben és alkoholban oldódik. A vegyület kémiai szerkezetéből adódóan más molekulákat szorosán magához köt; ezért elsősorban aromák és vitaminok hordozó anyagént alkalmazták. Esetünkben a fenolokat köti meg. Ezek után 150 mM NaCl-ot (Reanal, Budapest, Magyarország), 14,6 mM 2-merkaptoetanol (2-ME, Sigma-Aldrich) 10 mM Tris-HCl-t (Sigma-Aldrich) pH 8,0 (Schlereth és mtsai, 2000). tartalmazó pufferhez adtuk a növényi mintánkat 2:1 arányban. Az izolálás során jégben tartott eppendorf csövekben üvegbot és kvarchomok segítségével dörzsöltük el a mintáinkat. Ezt követően +4° C-on centrifugáltuk (Heraeus Biofuge) 10 percig 13000 rpm-en (15000 xg fordulaton). A 10 µL felülúszónk fehérje tartalmát Bradford módszerével az oldatok 595 nm-en mérhető fényelnyelése alapján SHIMADZU UV-1601 típusú spektrofotométeren határoztuk meg (Bradford, 1976). Kivonataink 3,5-4 mg növényi anyagot tartalmaztak.

### 3.4.2. Natív poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

Peroxidáz enzimek elválasztását Laemmli-féle 7,5%-os nem-denaturáló poliakrilamid-gélen vittük véghez (Laemmli, 1970). Az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) egy anionos detergens. Az SDS-kezelt fehérjék a poliakrilamid gélben méretük szerint válnak el egymástól. A natív PAGE során SDS-t nem használtunk, így számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így enzimaktivitását (Hegyi és mtsai., 2013). Az előhívás során a gél egy olyan szubsztrát oldatába áztattuk, amelyet a kimutatni kívánt enzim szelektíven alakít át, és amelynek terméke színes és oldhatatlan. A peroxidázok a  $H_2O_2$  redukálása során H-donor vegyületeket oxidálnak (Láng, 1998). Az enzim képes a pirogallolt (1,2,3-trihidroxibenzol), és a guajakolt H-donorként felhasználni. A reakció során, oxidációt követően a gél megfestődik, pirogallol használata esetén sötétbarna purpurogallinná alakul, míg a guajakol peroxidázok hatására vörösesbarna tetraguajakollá polimerizálódik (Ammar és mtsai., 2008; Demeter és mtsai., 2013; Dixit és mtsai., 2011). Katalitikus reakció esetén a kataláz a  $H_2O_2$  molekulához kapcsolódik, majd víz és oxigén keletkezik az enzim szabaddá válása mellett (Allaga és mtsai., 1997; Harris és Hopkinson, 1976). A gélek elkészítési folyamata a következőképpen leírtak szerint zajlott. Először szeparáló alsó gél, majd gyűjtő felső gél hoztunk létre, amely eltérő arányban víz, Tris-HCl puffer, 30%-os akrilamidot és TEMED-et tartalmazott. Ezt követően SDS nélküli mintapufferhez adtuk, majd a gyűjtő gél mintahelyeire vittük fel a növény kivonatainkat. Az elektroforézis puffer összetétele szintén nem tartalmazott SDS-t. Sötétben, 4° C-on, 25-30 mA/gél áramerősségű egyenárammal zajlott az elektroforézis. A pirogallol peroxidázok kimutatására a natív gél inkubáltuk 1 órát 50 mM  $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$  pufferben (pH = 7,5), majd hozzáadtunk 20 mM pirogallolt és 5 mM  $H_2O_2$ -t és 15-30 percig ugyanebben a pufferben áztattuk. Torma gyökér kivonatot

(*Armoracia rusticana*) használtunk pozitív kontrollként, amely ismert kiváló peroxidáz tevékenységéről (Hamid és Rehman, 2009). A torma aktivitását tekintettük 100%-nak és az amarilliszfélék esetében kapott értékeket ehhez viszonyítottuk. A guajakol festés során a géleket 30-60 percig inkubáltuk 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó 100 mM pH: 5,1-es, Na-acetát, pufferben. Kataláz enzimek kimutatására szolgáló gélt 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó pufferben áztattuk 15 percig. Ezután kálium-ferricianid (K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub>) és vas (III)-klorid hexahidrátot (FeCl<sub>3</sub>+6H<sub>2</sub>O) tartalmazó oldatban 15 percig inkubáltuk. Sötétzöldre festett félt kaptunk ahol a megjelenő enzimsávok átlátszóan tűnnek ki. A sávokat látható fényen detektáltuk. Apró békalencse (*Lemna minor*) levél kivonatot használtunk pozitív kontrollként (Petruska és mtsai., 2014).

A peroxidáz aktivitást spektrofotometriás módszerrel is vizsgáltuk 3 µl enzim kivonatból, ami ugyanaz volt, mint a natív aktivitás gélelektroforézis során használt kivonat, egy korábban ismertetett eljárással (M-Hamvas M. és mtsai., 2010). Mivel a 2-ME-ről ismert, hogy gátolja bizonyos peroxidázok aktivitását (Chanwun és mtsai., 2013), ezt a vizsgálati eljárást elvégeztünk 2-ME jelenlétében és hiányában is. Mintáink végső koncentrációja 2-ME-vizsgálati eljárásra szolgáló keverékben azonos volt a minták végső koncentrációjával, amit a gélekre felvittünk.

### **3.4.3. A poliakrilamid gélek kiértékelése**

A poliakrilamid géleken megjelenő enzimsávok („band”-ek) intenzitását CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével értékeltük ki. A programot a zimogramokon megjelent sávok (izoenzimek) területének meghatározására, így azok aktivitásának jellemzésére használtuk. Az adatok ábrázolásához Microsoft Office Excel 2007 és Systat Sigma Plot 10.0 programokat használtunk.

### **3.5. Nem enzimatisz antiozidánsok vizsgálata**

#### **3.5.1. Polifenolmérés**

Az összes polifenol tartalmat Singleton és Rossi 1965-ben leírt módosított módszere alapján mértük (Grubestic, 2005; Singleton és Rossi, 1965). 25 mg liofilizált (Christ Alpha 1-2 LD fagyasztva szárító; Martin Christ, Osterode, Germany) növényi szövettényészet mintát porítottunk dörzsmozsárban, majd 30%-os MeOH-ban extraháltunk (Disruptor Genie; Bohemia, NY, USA) 70° C-on 15percig. Ezt követően a mintáinkat centrifugáltuk (Heraeus Biofuge) 10 percig 13000 rpm-en 15000 rpm fordulaton. A felülúszónkat ezután 8-szorosára hígított Folin-Ciocalteu (FC) reagenst, 233 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot és 30%-os MeOH-t tartalmazó elegyhez adtuk. Galluszsavat alkalmaztunk standardként és a növényi minták összes fenol tartalmát galluszsav ekvivalensben (GAE), mg G<sup>-1</sup> DW fejeztük ki (Jurij és mtsai., 2005). 720 nm hullámhosszon, Shimadzu UV-VIS 1602 spektrofotométer (Shimadzu, Kyoto, Japán) segítségével mértük a minták abszorbanciáját.

#### **3.5.2. DPPH és ABTS szabadgyök semlegesítő („gyökfogó”) aktivitás vizsgálat**

A vizsgálatok során a polifenol méréshez készített növényi mintát használtuk fel. Aszkorbinsavat (AA) és a 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-karbonsavat (Trolox) használtunk standardként. A szabadgyök semlegesítő aktivitást elsősorban a 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-szulfonsav) gyök kation (ABTS \* kation) gátlási vizsgálatával mértük (Katalinic és mtsai., 2006; Miliauskas, 2004). 10 mg ABTS-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) 2,6 ml bidesztillált vízben oldottunk, ehhez 1,72 mg K-perszulfátot adtunk. EtOH-val hígítottunk, hogy az abszorbancia 0,7 körül legyen, az abszorbanciát 734 nm-en mértük EtOH-al szemben. A gátlás

kiszámítása százalékosan a következő képlettel történik:  $[(A_0 - A_\infty) / A_0] \times 100$ , ahol  $A_0$  az ABTS \* kationt tartalmazó reakcióelegy abszorbanciáját jelenti a 0. időpontban és  $A_\infty$  a 6. percben mért abszorbancia. 0,01 g DPPH-t oldottunk 25 ml EtOH-ban, ebből hígítottunk, hogy az abszorbancia  $0,900 \pm 0,015$  legyen. Az abszorbanciát 515 nm-en mértük EtOH-al szemben. 6 perces méréseket végeztünk. A gátlás kiszámítása százalékosan a következő képlettel történik:  $[(A_0 - A_\infty) / A_0] \times 100$ , ahol  $A_0$  a DPPH gyököt tartalmazó reakcióelegy abszorbanciáját jelenti a 0. időpontban és  $A_\infty$  a 6. percben mért abszorbancia. A szabadgyökfogó aktivitások és peroxidáz tevékenységek vizsgálatára, legalább öt független kísérletet, és két párhuzamos mérést végeztünk minden növényi minta esetében.

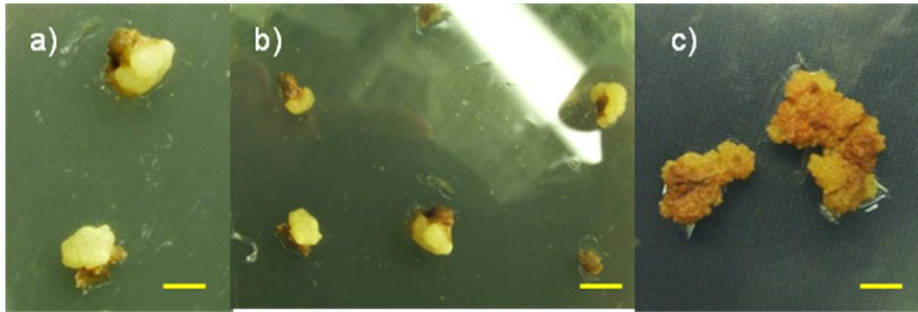
## 4. Eredmények és megbeszélésük

### 4.1. *Galanthus nivalis* szövettenyésztése, szövettana és a genetikai variabilitás vizsgálat eredménye

#### *Galanthus nivalis* szövettenyészetek létrehozása és a növényregenerálás

Stabil kallusz-vonalat tudunk előállítani *Galanthus nivalis* hagymából 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 1+ mg l<sup>-1</sup> BA, 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA és 10 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű MS\* táptalajokon. A gyökér- és levél explantátumok esetében is megkíséreltük a kalluszindukciót, de csak a hagyma esetében tudunk szövettenyészeteket előállítani. A 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+1 mg l<sup>-1</sup> BA és a 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA+1 mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajokon csak a kallusz megjelenése volt megfigyelhető és az előbbi táptalajon értünk el gyors kallusznövekedést (4. ábra a, b). Érdekes módon, ha a hagymákat 10 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű MS\* táptalajra helyeztük, a magasabb auxin/citokinin arány ellenére a kalluszokon hajtáskezdemények jelentek meg (5. ábra a, b).

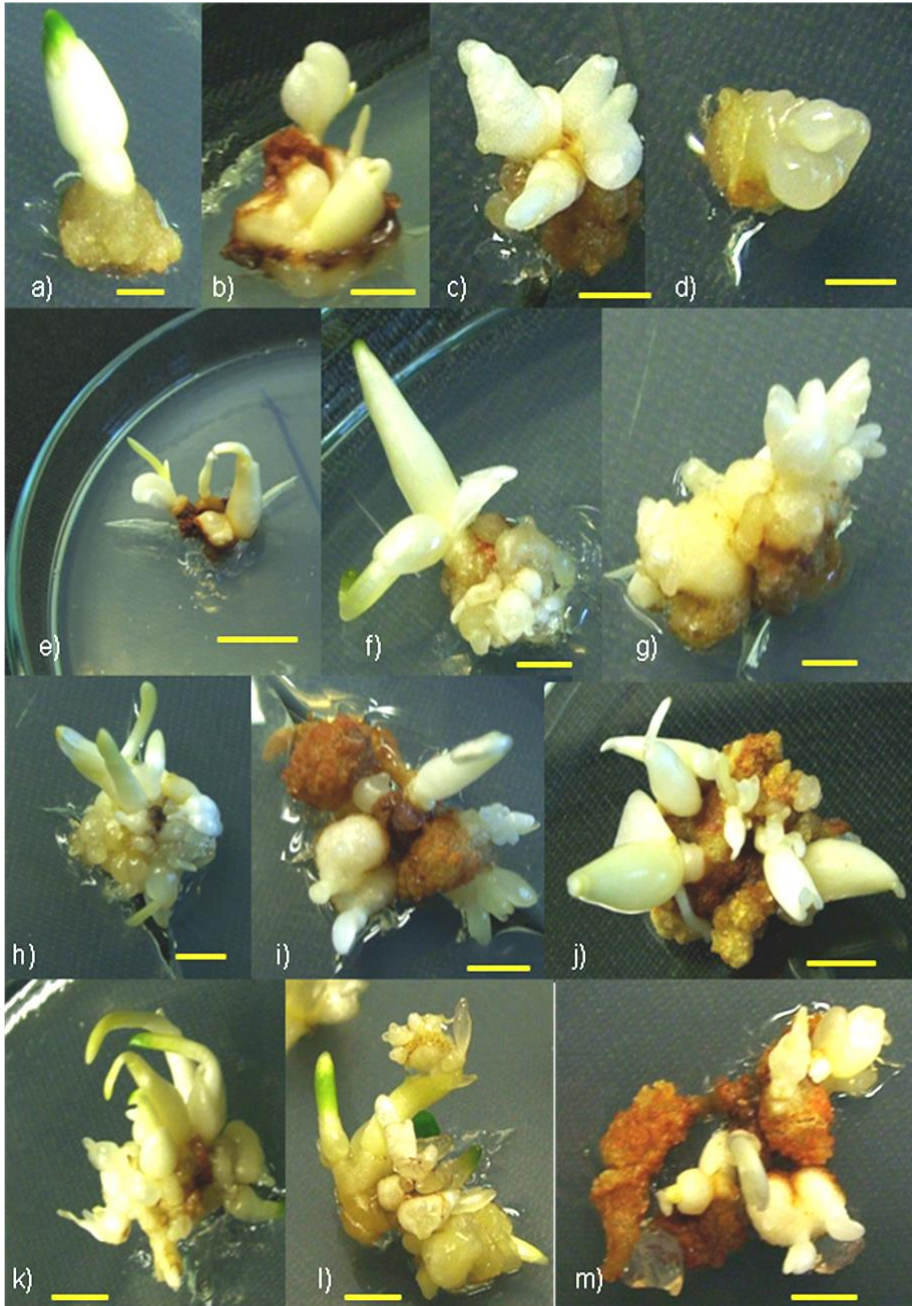
Amennyiben a kallusztényészeteket olyan táptalajra helyeztük, amely kizárólag auxint tartalmazott, a kalluszok tovább növekedtek, de szervek megjelenését nem figyelhettük meg. Ezek a kalluszok gyakran vörös színűvé váltak, és ez főleg akkor volt megfigyelhető, ha az auxinkoncentrációt növeltük (5. ábra c, m). Feltételezzük, hogy a vörösödést a tenyésztés során fellépő oxidatív körülmények indukálják (pl. polifenolok jelennek meg), ahogyan más szövettenyészeteknél is leírták (Dodds és Roberts, 1985), de a jelenséget nem tudtuk ellensúlyozni AA hozzáadásával (5. ábra b, i, j).



**4. ábra.** Kalluszenyészetek indukciója *Galanthus nivalis* bulbusokból. **a, b)** első generációs kalluszok 2 mg l<sup>-1</sup> NAA és 1 mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon, 90 napos tenyésztés után. **c)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA tartalmú táptalajon nevelt stabil, vörösödő kalluszvonal. Az alaptáptalaj MS\* volt. Jelek: 5 mm.

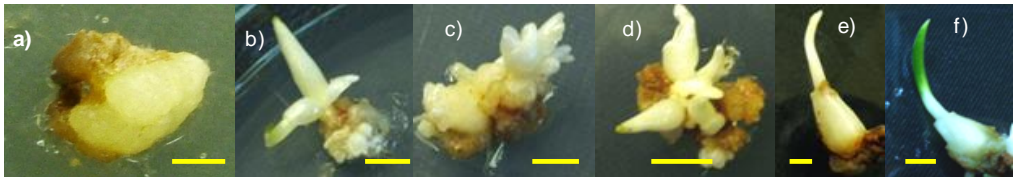
A kalluszokat továbbtenyésztve azt tapasztaltuk, hogy amennyiben az auxin mellett a táptalaj citokinint is tartalmazott, hajtáskezdemények fejlődtek. Ez a jelenség akkor is megfigyelhető volt, ha egyébként az auxin/citokinin arány magas volt (5. ábra). A magas auxin/citokinin arány általában a gyökérbérbékedésnek kedvez (Dudits és Heszky, 2003). Ez az ellentmondás valószínűleg azzal magyarázható, hogy a hóvirág differenciálatlan szövetei magas endogén citokinin tartalmúak, a táptalaj citokinin tartalma már nem befolyásolja számottevően az organogenezist. Ezt a jelenséget egyéb egyszikű fajoknál már leírták (Sangwan és Gorenflot, 1975).

Amennyiben a tenyészeteket 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA és 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű MS\* táptalajon indukáltuk, a kalluszokon intakt, zöld hajtások jelentek meg. Azonban ezeket csak akkor lehetett stabilan fenntartani, ha 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkombinációt használtunk a továbbtenyésztéshez (5 ábra .a, e, h, k, l ). Ha a passzálás során magas auxinkoncentrációjú táptalajt használtunk, a hajtáskezdemények elsárgultak (5. ábra c, j).



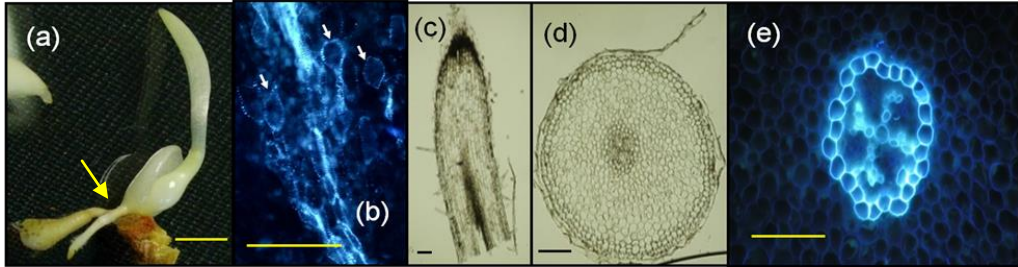
**5. ábra.** Hajtásregenerálási kísérletek eredményei: kallusz és hajtásindukció.  
**a)** *Galanthus nivalis* 10mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételen MS\* táptalajon növekvő hajtásos kallusz. Jel=3mm **b)** 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA + C-vitamin hozzáadásával vörösödés megjelenése. Jel=4mm **c)** először 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA majd 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelt hajtás. Jel=5mm **d)** 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA nevelt kalluszok.

Jel=5mm **e)** 10 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA nevelt hajtás, mely zöldül. Jel=5mm **f) és g)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelt majd C-vitamin hozzáadásával tenyésztett hajtásos kalluszok. Jel=4mm. **h)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg+ l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelt majd C-vitamin hozzáadásával tenyésztett hajtásos kalluszok. Jel=3mm **i)** ugyanazon a hormonkoncentráción egyértelmű vörös kalluszok megjelenése. Jel=3mm **j)** 10 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA + C-vitamin hozzáadásával MS\* táptalajon nevelt hajtásos kallusz. Jel = 3mm **k) és l)** először 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA majd C-vitamin hozzáadásával nevelt hajtások, jelentős zöldülés. Jel=2mm **m)** 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelt vörös kallusz és hajtás. Jel=3mm

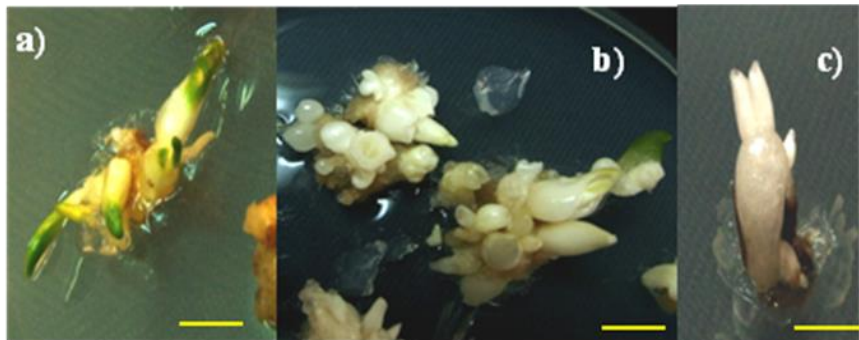


**6. ábra.** hagymaindukció. **a)** első generációs kallusz. **b)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelt hajtás. **c, d)** hajtások továbbfejlődése 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű táptalajon. **e)** a hajtásokat 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű táptalajon neveltük tovább hajtásnövelés céljából. **f)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelt zöld hajtásos hagyma. Jelek = 5mm





**8. ábra. a)** növényregenerálás és gyökérből képződés szomatikus embrióból (a nyíl a gyökeret mutatja)  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA majd  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkoncentráción nevelt hagyma explantátumon. **b)** 30 napos hajtás primordiumok fluoreszcens mikroszkópos képe. A differenciálódó tracheák (nyilak) autofluoreszcenciája lignin berakódásra utal. **c)** gyökér hosszmetesz. **d)** gyökér keresztmetesz. **e)** a gyökér kéregszövetének belső sejtrétegei és a négy xylem nyálábót tartalmazó sztele fluoreszcens mikroszkópos képe. Jól látható a másodlagos endodermisz és a xylem autofluoreszcenciája. Jel= 5 mm (a); 200  $\mu\text{m}$  (b-e).



**9. ábra. a)** hajtásos kallusz még fejletlen hagymával (A/Culture), **b)** hajtásos kallusz fejlett hagymán (B/Culture), **c)** hagyma explantátumból nevelt hajtásos hagyma, nincs kallusz produkció (C/Culture) (a), (b), (c)  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkoncentráción nevelt *G. nivalis* tenyészet. Jelek= 5 mm A/OP: Hollóházáról származó egyed, B és C/Culture: Tokaj, Kopasz-hegyről származó egyed

A *Galanthus nivalis* esetén azt tapasztaltuk, hogy miután biztonsággal tudtunk hajtásindukciót létrehozni és megnöveltük az auxin hatású hormon koncentrációját,  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú táptalajon megindult a hagymaképzés (6. ábra e). Ezeket továbbnövesztve  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú MS\* táptalajon zöld hajtásos hagymát tudtunk regenerálni (6. ábra f). Tehát elmondhatjuk, hogy kísérletünk sikeres volt és biztonsággal tudtunk hagymát létrehozni.

Számos irodalmi értekezés ad számot az *Amaryllidaceae* családba tartozó fajok szövettanyészeteiben történő embrio- vagy organogenezisről, illetve ezek szövettani alátámasztásáról. A nárcisz fajok közül a *Narcissus confusus* kallusz indukciója során megfigyelték, hogy organo-, és embriogenezis is végbement.  $4 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D hormonnal kevert MS táptalajon jött létre a kalluszindukció érett embrión. Ezt követően magas auxintartalmú táptalajon nevelték tovább kalluszaikat és azt tapasztalták, hogy víztartalmuk megnőtt, majd citokinin hatására kitüremkedések jelentek meg. Hajtás megjelenését 10 héttel a citokininnel kiegészített táptalajon tapasztalták, majd a levél-, és gyökérkezdemények indukcióját egyszerre figyelhették meg. Ez embriogenezisre utalt. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételeik során azonban kiderült, hogy  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hozzáadását követően az MS táptalajon megjelentek a hajtásprimordiumok, de a gyökércsúcs indukció  $1 \text{ mg l}^{-1}$  KN – nel (kinetin) kiegészített MS táptalajon ment végbe. Ez viszont organogenezisre utalt (Sellés és mtsai., 1999). Egy másik nárciszfaj, a *Narcissus tazetta* esetén bibeszáלבól, illetve anteridiumokból indukáltak kalluszt. Korai fejlődő szomatikus embriók jöttek létre  $3 \text{ mg l}^{-1}$  BA- nal kiegészített MS táptalajon, majd a 10 hetes kalluszokon pikkelyszerű levél- és hagymakezdemények jelentek meg. A kalluszokon  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D és  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormon összetételű táptalajon fejlődtek gyökerek. A hagymán 13 hét után jöttek létre citokinin hatására zöld levelek, majd a teljes

növényregenerálás gyökérfejlődéssel  $\frac{1}{2}$  MS táptalajon  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA hozzáadásával történt. Tehát elmondhatjuk, hogy embriogenezis ment végbe (Chen és mtsai., 2005). Szomatikus embriogenezist vizsgáltak a *Narcissus pseudonarcissus* kapcsán is. Embriogenezist indukáltak  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D és  $0,2-1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormon összetételű MS táptalajon a hagyma csúcsi részéből. Négy, majd 10 hét után jelentek meg a korai stádiumú, majd a fejlődő szomatikus embriók. Először jelentek meg a hajtáskezdemények majd a levél és gyökérkezdemény, végül a teljes növényregenerálást  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA hormon hozzáadásával vitték véghez (Sage és mtsai., 2000). A *Leucojum aestivum* (nyári tözike) szövettényésztése során  $6 \text{ mg l}^{-1}$  picloram és  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonnal kiegészített MS táptalajt használtak. A kalluszok további növekedését etilénnel indukálták. A keletkező kalluszok embriogének voltak, embriogenezis során létrejött a szomatikus embrió, majd megjelent a globuláris stádiumú szomatikus embrió  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA és  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  zeatin hormonösszetételű táptalajon. A zeatin koncentrációját növelve korai torpedó stádiumot tapasztaltak, majd NAA, zeatin és AA hozzáadásával a teljes növényt regenerálni tudtak (Ptak és mtsai., 2010). A *Galanthus nivalis* esetén elmondhatjuk, hogy  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkombinációjú táptalajon globuláris stádiumú szomatikus embriók (7. ábra c) jöttek létre, majd mikroszkóppal megvizsgálva metszeteinket, láthattuk a sziklevel megjelenését (7. ábra e) és a sziklevelet hajtáskezdéssel (7. ábra f,g). Ugyanezen, hormonkoncentráción nevelt kalluszaink metszésekor tapasztalhattuk, hogy az embriók hajtáskezdeményekkel (7. ábra h-j) fejlődtek ki majd hagymaképződés (7. ábra k) indukálódott, melyben később fiatal lomblevelek is megjelentek (7. ábra l). Gyökérképződés szomatikus embrióból  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA majd  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkoncentráción nevelt hagymán jelent meg (8. ábra a). A fluoreszcens mikroszkópos képeken jól kivehetők a differenciálódó tracheák (8. ábra b), a

gyökér hosszmetset (8. ábra c), gyökér keresztmetset (8. ábra d). Jól látható a másodlagos endodermisz és a xylem autofluoreszcenciája (8. ábra e). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy először jelent meg a hajtás és a levél majd a hajtásos hagymán jelent meg a gyökér. Bebizonyítottuk, hogy a *G. nivalis* szövettényészetek esetén embriogenezisről van szó.

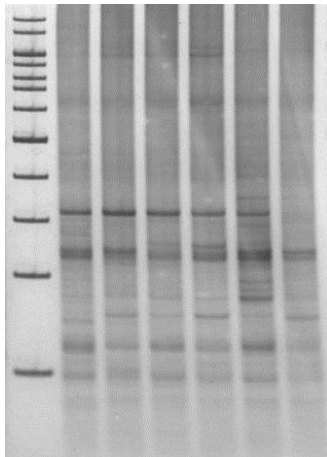
A *Galanthus nivalis in vitro* tenyészetek részletes bemutatása a dolgozatban azért készült hangsúlyosra, mert e faj szövettényésztésének kidolgozása adta a szakmai alapot a többi faj esetében használandó hormonokra és kombinációikra, valamint a legoptimálisabb tenyésztési feltételek megtapasztalására. Bár nem a mi kutatócsoportunk hozott létre először *G. nivalis* tenyészeteket, embriogén kalluszokon keresztül történő növényregenerálást leíró módszert mi közöltünk először tudományos cikkben (Resetár és mtsai., 2014).

## 4.2. Genetikai variabilitás vizsgálat eredménye

Az anyag és módszer fejezetben jelzett különböző *G. nivalis* minták genetikai variabilitását AFLP technika alkalmazásával hasonlítottuk össze. Az AFLP vizsgálatok során az 6. táblázatban összefoglalt szelektív nukleotidokat tartalmazó primereket, primerkombinációkat használtuk.

Az optimalizációs kísérletek során 16 különböző primerkombinációt teszteltünk, melyek közül 5-öt választottunk ki az AFLP analízishez reprodukálhatóságuk alapján, ezek eredménye a 10. ábrán látható.

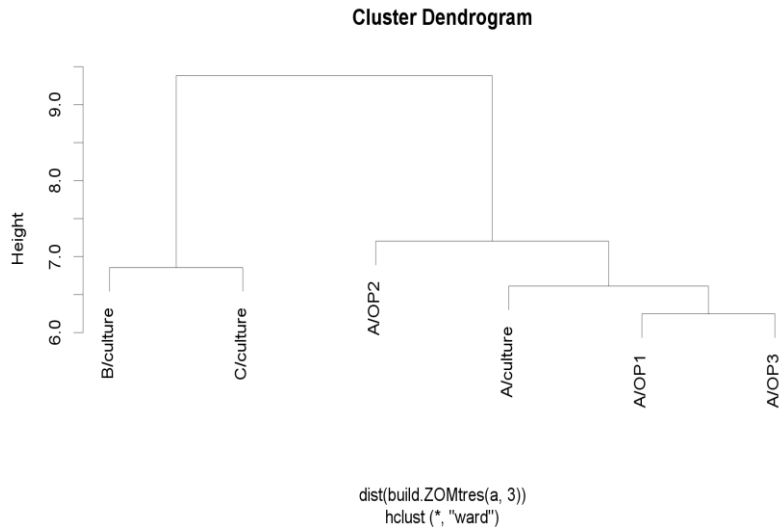
M 1. 2. 3. 4. 5. 6.



M: Molekulatömeg marker,  
1. A/OP1, 2. A/OP2, 3.  
A/OP3, 4. A/Culture, 5.  
B/Culture, 6. C/Culture (5.  
táblázat)

M. 100bp DNS létra; 1.  
1858; 2. 1673; 3. 1754; 4.  
1586; 5. 1783; 6. 2472; (a  
DNS fragmentek mérete  
bázispárokban fentről lefelé  
a következők: 1500, 1200,  
1031, 900, 800, 700)

**10. ábra.** Különböző *G. nivalis* minták AFLP analízise Esel3-Tsel4 szelektív primerekkel és gélelektroforetikus elválasztása 6%-os poliakrilamid gélen (ezüsfestés).



**11. ábra.** A különböző *G. nivalis* minták AFLP analízisén alapuló klaszteranalízis A/OP1: Hollóháza, 1. egyed; A/OP 2 Hollóháza 2.egyed; A/OP 3 Hollóháza 3.egyed; A/Culture: Hollóháza szövettenyészet; B/Culture: Tokaj, Kopasz-hegy 1.egyed szövettenyészete; C/Culture: Tokaj, Kopasz-hegy 2.egyed szövettenyészete;

Az AFLP analízis eredményeként megállapíthatjuk, hogy

- a Hollóházáról és a Tokaji Kopasz-hegyről származó *G. nivalis* populációk genetikailag elkülönülnek, két klaszterbe sorolhatók.
- A hollóházi mintákból indított kallusztenyészetek azonban genetikailag nem különböznek el az eredeti élőhelyről begyűjtött *G. nivalis* mintáktól.

Az A/Culture szövettenyészeti mintáink morfológiájukban is különböznek a Tokaj Kopasz-hegyről származó növényeinkből létrehozott szövettenyészetünktől (B/Culture, C/Culture). Megfigyelhető volt, hogy ugyanazon hormonösszetételű (2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA) táptalajon történő nevelés ellenére a Hollóházi egyedből származó szövettenyészeti mintáinkon zöld hajtásos kallusz jelent meg még fejletlen hagymával, a B/Culture esetében hajtásos kallusz, a C/Culture esetében, pedig kalluszképződés megkerülésével létrejött hajtásos hagyma fejlődött (9. ábra).

### 4.3. *Galanthus elwesii* és *Galanthus woronowii* szövettenyésztése

A pompás hóvirág (*Galanthus elwesii*) és a Voronov-hóvirág (*Galanthus woronowii*) növényeket 2012 tavaszán gyűjtöttük be a SOTE Farmakognózia Intézetének gyógynövénykertjében nevelt példányaiból. Szövettenyésztésük megtervezésében a már kidolgozott *G. nivalis* növényregenerálása képezte a szakirodalomban megjelenő gyakorlati alapokat (Resetár és mtsai., 2014). 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű MS\* táptalaj volt az induló kombináció, ahol a növények hagymáiból indítottunk szövettenyészeteket. A *G. woronowii* esetében mindkét induló táptalaj megfelelőnek bizonyult, mert kalluszok megjelenését tapasztaltuk, bár szomatikus embriók kialakulása nem volt megfigyelhető (12. ábra a, b). 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IAA hormonkombináción történő nevelés intenzív kallusz vagy gyökérképződést váltott ki. 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IBA együttes használata pedig gyökér és hajtásképződést eredményezett (12. ábra c). 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetétel esetén intenzív hagymaképződést figyelhettünk meg (12. ábra d). A *G. elwesii* mikroszaporítási kísérleteink indításakor a hagyma explantátumokat először 10 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű MS\* táptalajra helyeztük, majd a későbbiekben 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IBA, 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +2 mg l<sup>-1</sup> IAA, 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és hormonmentes MS\* táptalajon neveltük. A *G. elwesii* szövettenyésztése során 5 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű táptalajon, kalluszokon megjelenő szomatikus embriók voltak megfigyelhetőek (12. ábra e). Hasonlóan, a *G. nivalis* szövettenyészetekhez, ahol kisebb auxin koncentráció használata során jelentek meg a globuláris stádiumú szomatikus embriók (7. ábra c). 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalaj összetétel esetében kalluszok megjelenését tapasztaltuk, míg 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IBA együttes

használata gyökér és hajtásképződést eredményezett (12. ábra g), hasonlóan, mint a *G. woronowii* esetében. 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IAA tartalmú táptalajon azonban intenzív hagyma és zöld hajtások jelentek meg, melyekből később hormonmentes táptalajon nevelve egész növény fejlődött ki (12. ábra h).

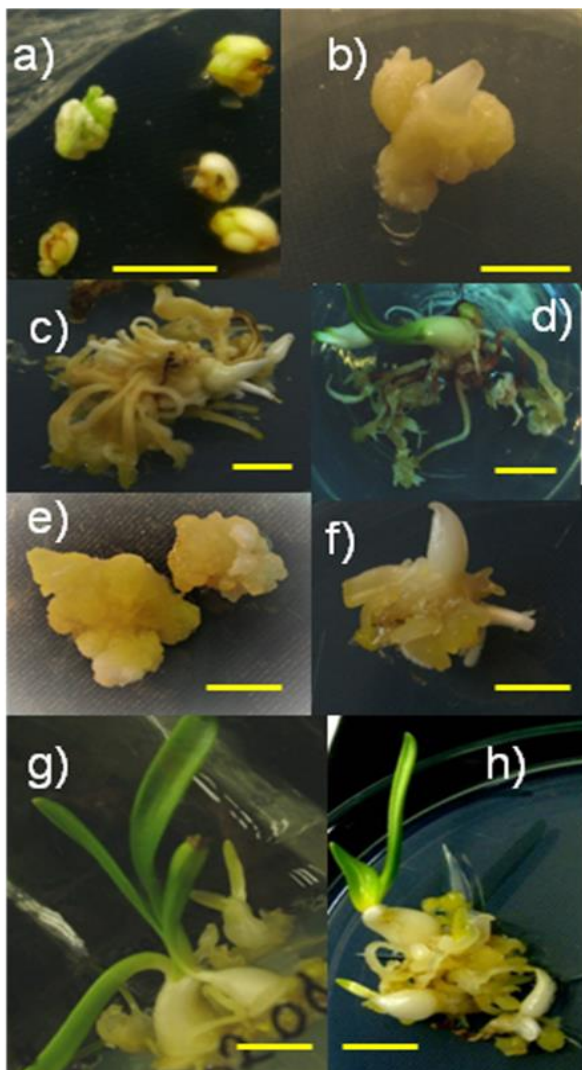
Összefoglalva tehát elmondható, hogy a *Galanthus woronowii* és *G. elwesii* esetében, a már kidolgozott *G. nivalis* szövettenyésztése alapján indítottuk kísérletünket magas auxin (NAA) alacsony citokinin (BA), és alacsony auxin alacsony citokinin tartalmú táptalajon (10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA) (Resetár és mtsai., 2014).

A *G. woronowii* esetében azt tapasztaltuk, hogy magas auxin hatású hormon koncentráció esetén gyökér és hajtások képződtek, később ezeket 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkoncentráción nevelve hagyma képződött (12. ábra d). A szakirodalomban, tudomásunk szerint a mi kutatócsoportunk írt le először *G. woronowii* esetében sikeres *in vitro* szövettenyésztési eljárást (Resetár és mtsai., 2017).

A *Galanthus elwesii*-t sokkal inkább hatóanyagtartalom tekintetében vizsgálták, és kevesen próbálkoztak mikroszaporítási kísérletekben felhasználni. Az amarillisz alkaloidok közül a pompás hóvirágban is leírták a galantamin, likorin jelenlétét (Berkov és mtsai., 2007; Jin, 2009; Orhan és mtsai., 2003; Takos és mtsai., 2013), azonban mikroszaporítására a korábbi irodalmakban kevés példát láthatunk (Tilly-Mándy és mtsai., 2006). A galantaminról tudjuk, hogy szelektív acetilkolin-észteráz inhibitor. Az Alzheimer- kór kezelésében tüneti kezelésként használják (Heinrich és Lee Teoh, 2004). A *G. elwesii* szövettenyésztése során szintén alkalmazott induló táptalaj-kombináció volt a 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű MS\* alaptáptalaj. 5 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonkombinációjú táptalajon intenzíven növekedő kalluszainkon

szomatikus embriók megjelenését, figyeltük meg (12. ábra e). Zöld hajtás és gyökér megjelenése azonban  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $2 \text{ mg l}^{-1}$  IBA, csak auxin hormon tartalmú táptalajon következett be (12. ábra g). Ezeket hosszútávon hormonmentes MS\*táptalajon nevelve, egész növényt regeneráltunk.

Tehát elmondhatjuk, hogy kísérletünk sikeres volt és biztonsággal tudunk egész növényt, létrehozni. Szövettenyészeink jó növekedési képessége alkalmas arra, hogy további vizsgálatokra használjuk fel őket és antioxidáns aktivitásukat vizsgáljuk.



**12. ábra.** *Galanthus elwesii* és *Galanthus woronowii* szövettenyésztése **a) b)** 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormonösszetételű MS\* táptalajon nevelt *G. woronowii* kalluszok hajtásképződéssel; **c)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IBA hormonkombináción nevelt gyökér és hajtásképződés; **d)** intenzív hagymaképződés (2 mg l<sup>-1</sup> NAA 1+ mg l<sup>-1</sup> BA); **e)** *G. elwesii* 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon megjelenő szomatikus embriók; **f)** kalluszok 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon hajtáskezdeménnyel; **g)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +2 mg l<sup>-1</sup> IBA együttes használata zöld leveles hajtást, gyökér kialakulását eredményezte; **h)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IAA együttes használatával hagyma megjelenése, később átoltva hormonmentes MS\* táptalajon létrejött a *G. elwesii* növényregenerálás Jelek=5mm

#### 4.4. *Leucojum aestivum*, *Leucojum vernum* és *Sternbergia lutea* szövettenyésztése

A *L. vernum*, magyar nevén tavaszi tözike esetében az *in vitro* tenyészet létrehozását 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA típusú táptalajon indítottuk el szintén a növény hagymájából. 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajokon a hajtások, azokon hagymák megjelenését figyeltük meg. A fiatal hajtásokat áthelyeztük 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 2 mg l<sup>-1</sup> IBA növekedést serkentő hormon összetételű táptalajra, amelyen a hagymák tovább növekedtek és gyökerek differenciálódtak (13. ábra a, c). Ptak és munkatársai a tavaszi tözike növény növekedés szabályozási kísérletében a legjobb eredményt úgy érte el, ha a kalluszokat abszcizinsavval és polietilén-glikollal befolyásolta, így torpedó-állapotú embriókat hozott létre (Ptak és mtsai., 2010). Az általunk létrehozott *L. vernum* szövettenyészeteken nem embriogén kalluszok fejlődtek és szomatikus embriogenezis nem volt kimutatható.

A nyári tözike (*L. aestivum*) hagymájából 2 mg l<sup>-1</sup> NAA, 5 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA és 10 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű MS\* táptalajokon indítottunk el növényregenerálási kísérletet. A kallusz mellett a gyökérzet kialakulását is meg lehetett figyelni 2 mg l<sup>-1</sup> NAA tartalmú táptalajon (13. ábra d, e, f). A *L. vernummal* ellentétben a *L. aestivum* hagyma explantátumokból embriogén kalluszok fejlődtek 2 mg l<sup>-1</sup> NAA és 10 mg l<sup>-1</sup> NAA hormonösszetételű táptalajon (13. ábra h). Ezekon az embriogén kalluszokon zöld hajtások fejlődtek (13. ábra g). Több szövettenyésztési kísérletet indítottak *L. aestivummal*, ahol az auxin/ citokinin arány változtatásával befolyásolták a tenyészetek morfogenezisét. MS\* táptalajon indították el a szövettenyésztést, majd 10 µM pikloram és 0,5 µM BA segítségével kalluszokat fejlesztettek. 10 µM NAA és 0,5 µM BA arány mellett hagymákat és gyökereket is produkáltak a kalluszok (Diop, 2007). Az

ő esetükben is a legjobb eredményeket magas NAA koncentráció jelenlétében figyelték meg, az *in vitro* tenyésztésben a növény növekedését leginkább a NAA befolyásolta.

A *Sternbergia lutea* vagy magyar nevén őszi vetővirág hagymából indítottunk szövettényészeteket 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA, 5 mg l<sup>-1</sup> NAA, 10 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA és 2 mg l<sup>-1</sup> NAA hormon összetételű MS\* táptalajon. 2 és 5 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajokon gyors növekedésű kalluszok képződtek, melyeken szomatikus embriókat láthattunk (14. ábra k, l). Ezeket tovább passzálva 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon levélkezdemények megjelenését figyelhettük meg (14. ábra i, j). Később hormonmentes MS\* táptalajon történő nevelés során a szövettényésztés során kialakult hagymákon gyökerek jelentek meg. Tehát elmondhatjuk, hogy növényt sikerült regenerálnunk. Mivel más szakirodalmi hivatkozásokat nem találtunk *S. lutea* szövettényésztés tekintetében, kijelenthetjük, hogy e faj esetében elsők között sikerült növényregenerálásra képes embriogén kallusztényészetet előállítanunk (Resetár és mtsai., 2017).

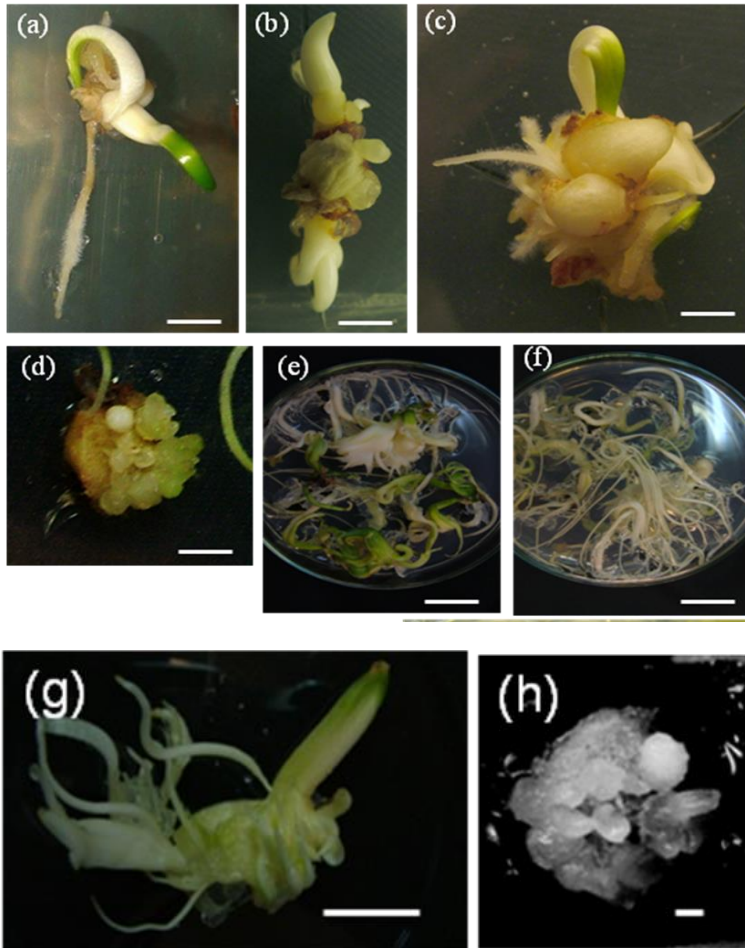
A kísérleteink során *in vitro* hagymát tudtunk létrehozni (13. ábra a, b, c, e; 14. ábra i, j) és gyökérképzést indukálni a már meglévő kalluszainkon növényhajtásainkból. A kalluszokat továbbtenyésztve azt tapasztaltuk, hogy amennyiben az auxin (NAA) mellett a táptalaj citokinint (BA) is tartalmazott, hajtáskezdemények fejlődtek. Ez a jelenség akkor is megfigyelhető volt, ha egyébként az auxin/citokinin arány magas volt (13. ábra). A magas auxin/citokinin arány általában a gyökérképződésnek kedvez (Dudits és Heszky, 2003). A *L. aestivum* esetében az auxin önmagában is elegendő volt a hajtásképzéshez (13. e ábra). Ennek valószínű oka, hogy a tenyésztett szövet magas endogén citokinin tartalommal rendelkezett. Az őszi vetővirág (*Sternbergia lutea*) növényregenerálási kísérleténél megfigyelhető volt a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű MS\* táptalajon a kalluszok

további növekedése. A kalluszokon intakt, zöld hajtások jelentek meg (14. ábra i), amit stabilan fent lehetett tartani ezzel a hormonkombinációval, illetve azok növekedése és multiplikációja is stabilizálódott. A *S. lutea* esetében ez a táptalaj típus volt a legkedvezőbb a hagymák létrejöttéhez, illetve azok későbbi növekedéséhez és fejlődéséhez. Tapasztalataink alapján, ha az auxin hormon arányát megemeljük és a táptalaj hormonösszetétele  $5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA, akkor még több hagyma képződik a kalluszokból, illetve azokon hajtás is megjelenik (14. ábra j). A tavaszi tözike (*L. vernum*) esetén azt tapasztaltuk, hogy miután biztonsággal tudtunk hajtásindukciót létrehozni, más hormonkombinációkat alkalmazva,  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg l}^{-1}$  IBA tartalmú táptalajon megindult a hagymaképzés (13. a, b, c ábra). Ezen a hormonösszetételű táptalajon tudtuk a legtöbb hagymát reprodukálni. Ezen a táptalajon figyelhettük meg a gyökér kialakulását is a szövettenyésztünkben (13. ábra a). A nyári tözike növényregenerálási kísérletet több típusú hormontartalmú táptalajon indítottuk el, amiken végül stabil kalluszvonalakat tudtunk előállítani. Azt tapasztaltuk, hogy ha megtartjuk a táptalajban az auxint ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA) és citokinint nem alkalmazunk mellé, akkor tömeges gyökérképződés alakul ki a kalluszok mellett (13. ábra e, f).

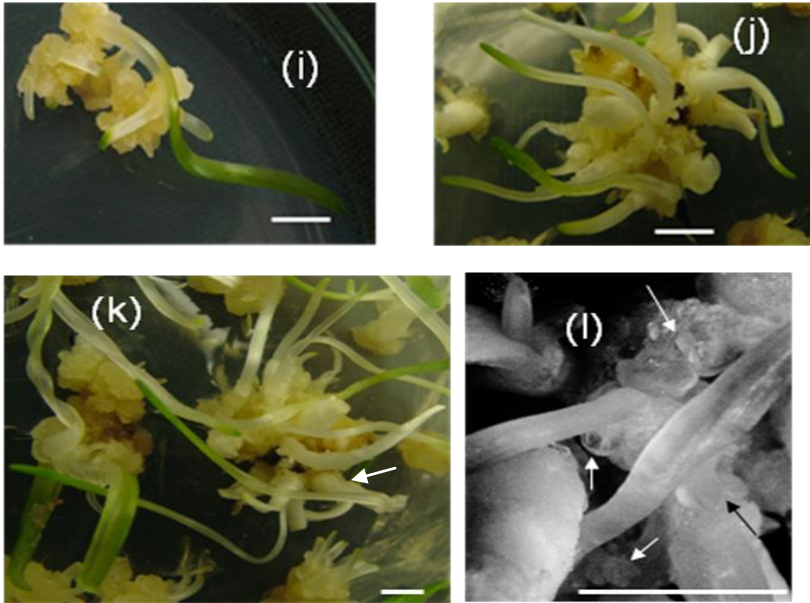
A *Leucojum aestivum* (nyári tözike) szövettenyésztése során  $6 \text{ mg l}^{-1}$  picloram és  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonnal kiegészített MS táptalajt használtak. A kalluszok további növekedését etilénnel indukálták. A keletkező kalluszok embriogének voltak, embriogenezis során létrejött a szomatikus embrió, majd megjelent a globuláris stádiumú szomatikus embrió  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA és  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  zeatin hormonösszetételű táptalajon. A zeatin koncentrációját növelve korai torpedó stádiumot tapasztaltak, majd NAA, zeatin és AA hozzáadásával a teljes növényt regenerálni tudtak (Ptak és mtsai., 2010). A nyári tözike növényregenerálási kísérletet több típusú hormontartalmú táptalajon indítottuk el, amiken végül stabil kalluszvonalakat tudtunk előállítani. Azt

tapasztaltuk, hogy ha megtartjuk a táptalajban az auxint ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA) és citokinint nem alkalmazunk mellé, akkor tömeges gyökérbépződés alakul ki a kalluszok mellett (13. ábra e, f).

Összességében elmondhatjuk, embriogén kallusztényészeteket hoztunk létre *L. aestivum* és *S. lutea* védett növényekből. Sikeresen regeneráltunk *in vitro* növényeket tavaszi tőzikéből, nyári tőzikéből. *Sternbergia lutea* esetében pedig elsőként hoztunk létre egész növényeket (Resztár és mtsai., 2017). Jó növekedési produkcióra képes zöld hajtásos növényeink alkalmasak arra, hogy további kísérletekben vizsgáljuk antioxidáns aktivitásukat.



**13. ábra.** Néhány jellegzetes *Leucojum* tenyészet. **a)** *L. vernum* regenerált növény 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 BA mg l<sup>-1</sup>tartalmú táptalajon; **b)** *L. vernum*, hajtasmultiplikáció 1 mg l<sup>-1</sup> NAA mellett; **c)** *L. vernum*, növényregenerálás 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg l<sup>-1</sup> IBA tartalmú táptalajon; **d)** *L. aestivum*, embriogén kallusz fejlődése 2 mg l<sup>-1</sup> NAA mellett; **e)** *L. aestivum*, növényregenerálás embriogén kalluszokból (2 mg l<sup>-1</sup> NAA) és **f)** a regenerált növények gyökérzete; **g)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 BA mg l<sup>-1</sup>tartalmú táptalajon embriogén kalluszokon fejlődő zöld hajtások; **h)** embriogén kallusz közeli képe Jelek= 5mm (a-d, g) és 2 mm (e, f, h).



**14. ábra.** *Sternbergia lutea* embriogén kalluszon regeneráló hajtások **i), j)** 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajokon; **k)** embriogén kalluszokon megjelenő zöld hajtások, a nyíl a hagymát jelöli; **l)** szomatikus embriók (nyilak). Jelek= 5mm (i,j,k) és 2 mm (l)

## 4.5. *Amaryllidaceae* családba tartozó egyes fajok antioxidáns aktivitásának vizsgálata

### 4.5.1. Nem enzimatisz antioxidánsok kimutatása

A nem enzimatisz antioxidánsok kimutatására általunk használt eljárások: az összes polifenol tartalom mérése Folin-Ciocalteu reagenssel (TPC) és a Troloxra vonatkoztatott antioxidáns aktivitás (TEAC), melyet ABTS\* és DPPH gyök inhibícióján keresztül vizsgáltunk. Ezek a módszerek az Irodalmi áttekintés 2.5.2. és az Anyag és Módszer 3.5.1,3.5.2. fejezetben részletezésre kerültek. Mintáink a *Galanthus nivalis*, *Galanthus elwesii*, *Galanthus woronowii*, *Leucojum aestivum*, *Leucojum vernum* és *Sternbergia lutea* eredeti élőhelyükön növekedő egyedek, amelyekből a szövettenyésztéshez használt explantátumok származtak, és szövettenyésztés során előállított kalluszokból, illetve egész növényekből álltak. A *G. nivalis* és *G. elwesii* minták enzimatisz és nem enzimatisz antioxidáns aktivitás vizsgálatának bemutatására további kísérletekre van szükség, ezért itt nem kerülnek leírásra. A továbbiakban a *G. woronowii*, *L. aestivum*, *L. vernum* és *S. lutea* fajok esetében vizsgáldtunk a nem enzimatisz és az enzimatisz antioxidánsok tekintetében is.

A legjobb antioxidáns aktivitás kialakításáért felelős vegyületek közzé tartoznak a polifenolos komponensek (Rice és mtsai., 1997; Robards és mtsai., 1999). Ezen komponensek mérésére alkalmas az elektronátmenettel járó antioxidáns aktivitás módszer, a Folin-Ciocalteu reagenssel spektrofotometriásan meghatározott összpolfenol mérés (Huang, 2005; Tabart és mtsai., 2009). Az összes fenol tartalom akkor tekinthető magasnak, ha a galluszsavra vonatkoztatott egyenérték (GAE) 12-20 mg g<sup>-1</sup> DW vagy magasabb (Daniels és mtsai., 2011; Miliauskas és mtsai., 2004). Eszerint az összes fenol tartalom magas volt *G. woronowii* *in vitro* hajtásokban, *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt növényekben, a *L.*

*aestivum* embriogén kallusz eredetű hajtásokban és kultúrákban, melyet 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon neveltünk, és a *S. lutea* embriogén kallusz és azokon regenerálódó hajtásokban 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon (7. táblázat, 15. ábra). Alacsony fenol tartalmat mutattunk ki *L. vernum in vitro* növényekben, melyet 2 mg l<sup>-1</sup> NAA hormontartalmú táptalajon neveltünk. A *G. woronowii* és *L. aestivum* és a *L. vernum* szövettényészetben mért adatok magasabbak a natív hagymákban mért adatokkal. *L. vernum* és *S. lutea* natív levelekre azonban jellemző a magasabb polifenol tartalom, mint a szövettényészetekben, vagy a natív hagymákban mért adatok esetében (7. táblázat, 15. ábra).

Összességében, elmondható, hogy a galluszsavra vonatkoztatott egyenérték (GAE mg g<sup>-1</sup> DW) alapján meghatározott értéktartományban alacsony polifenol tartalommal rendelkezik *L. vernum* mikroszaporított növény 2 mg l<sup>-1</sup> NAA hormonkombinációjú táptalajon nevelve, *L. vernum* eredeti élőhelyről származó hagyma, *L. aestivum* eredeti élőhelyről származó hagyma. Ezzel szemben magas polifenol tartalmú mintáink voltak az alábbiak: *G. woronowii*, szövettényésztéssel előállított hajtás 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelve, *G. woronowii* eredeti élőhelyről származó levél és hagyma, *L. vernum* mikroszaporított növény 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelve, *L. aestivum* embriogén kallusz eredetű növény 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelve, *L. aestivum* eredeti élőhelyről származó levél és hagyma, *S. lutea* embriogén kallusz 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelve, *S. lutea* szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelve, *S. lutea* eredeti élőhelyről származó hagyma minták. A legmagasabb összes polifenol tartalma a *L. vernum* levél és a *S. lutea* levél eredeti élőhelyről származó növényi mintáinknak volt.

Tehát kijelenthetjük, hogy a mikroszaporítással előállított növényeinknek sikerült megőrizniük polifenol tartalmukat a szövettényésztés során.

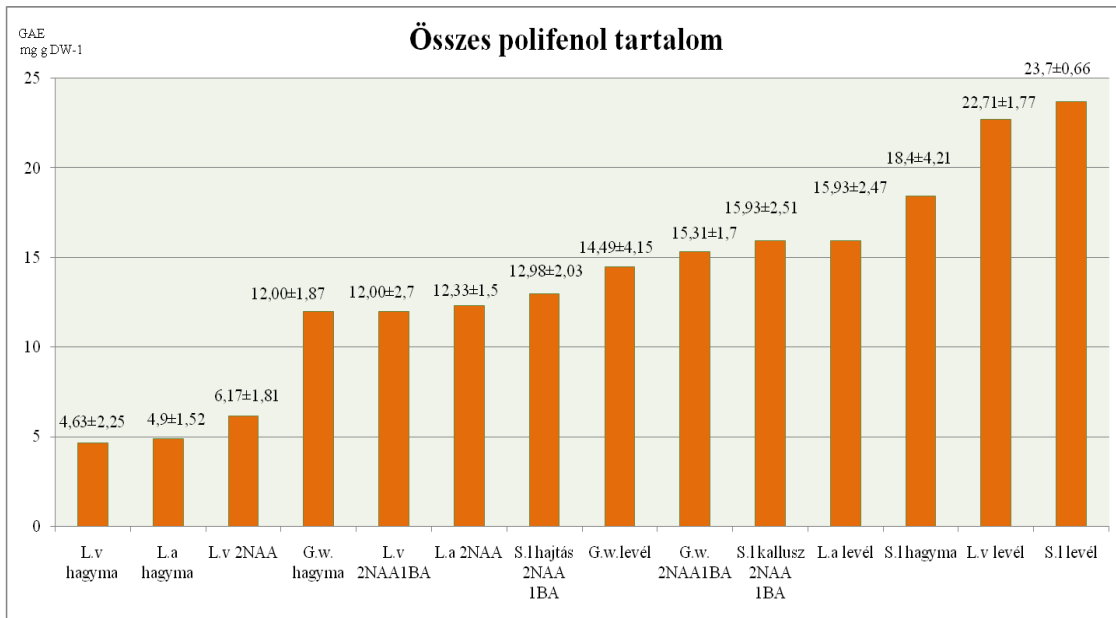
ABTS\* gyök in hibíciójának vizsgálati módszere egy jó indikátora a gyökfogó aktivitásának egy adott minta esetén különböző egyéb módszerekhez képest: DPPH \*, FRAP, ORAC, stb (Djeridane és mtsai., 2006; Katalinic és mtsai., 2006; Miliauskas és mtsai., 2004). Az ABTS \* gyökfogó aktivitást, 1 mg DW növényi anyagra vonatkoztatva kell tekinteni, az antioxidáns aktivitás magas, ha a gátlási értékek  $\geq 60\%$ . E szerint, *G. woronowii* és *S. lutea* tenyészetek jellemzően magas gátlási értékeket ( $> 70\%$ ) mutattak. Aszkorbinsavra vonatkoztatva, ha 0,5 mg DW szövettenyésztési mintákat extraháltuk 30% MeOH-ban magasabb volt az antioxidáns aktivitás, mint 2 mg (11,57  $\mu\text{mol}$ ) aszkorbinsav (7. táblázat, 16. ábra). ABTS \* kation gátlás TEAC értékre vonatkoztatva két kultúra esetében mutat magas antioxidáns aktivitást -a *G. woronowii* és a *S. lutea* szövettenyészetek esetében 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA+ 1 mg  $\text{l}^{-1}$  BA hormont tartalmazó táptalajon. Elmondhatjuk, hogy a magas fenol tartalmat az eredeti növények leveleiben magas antioxidáns aktivitás kísérte. A *L. vernum* kultúra 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA +1 mg  $\text{l}^{-1}$  BA hormonokat tartalmazó táptalajon közel 60% ABTS \* reaktív oxigénelnyelő aktivitást és viszonylag magas TEAC és aszkorbinsav ekvivalens értéket mutatott. 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA hormontartalmú táptalajon nevelt *L. aestivum* és *vernum* esetében a TEAC értékek alacsony ABTS \* gátlási / reaktív oxigénelnyelő értékeket mutattak. Az eredeti élőhelyükön növekedő egyedek, amelyekből a szövettenyésztéshez használt explantátumok származtak alacsony „gyökfogó” tevékenységet mutattak, kivéve a *S. lutea* esetében (7. táblázat, 16. ábra).

Összességében tehát elmondható, hogy szövettenyészteteink közül magas ABTS\* gyökfogó aktivitással rendelkeznek a 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA+ 1 mg  $\text{l}^{-1}$  BA táptalajon nevelt *G. woronowii* szövettenyészet és a szintén 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA+ 1 mg  $\text{l}^{-1}$  BA táptalajon nevelt *S. lutea* tenyészet, ez a két minta a legmagasabb polifenol tartalommal is rendelkezett. Ebből arra lehet következtetni, hogy a

táptalaj hormonkombinációja lényeges az antioxidáns aktivitás szempontjából, és a mi esetünkben a  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonösszetétel nem csak a szövettenyésztés sikerességének volt a kulcsa, hanem jó kombináció volt a nevelés során az antioxidáns aktivitás képességének megtartásában is. Ismert, hogy az *in vitro* mikroszaporítás során létrejött környezeti feltételek (táptalaj összetétel, 14/10 óra fény/sötét és  $22 \pm 2^\circ\text{C}/18 \pm 2^\circ\text{C}$  fény- és hőmérséklet-perióduson petricsészében történő nevelés) megváltoztatják a szekunder metabolit termelést és az antioxidáns aktivitást (Matkowski, 2008). Azonban az ebben a vizsgálatban részt vett kultúrák képesek voltak megőrizni viszonylag magas polifenol tartalmukat és ABTS\* gyökfogó képességüket. Elmondhatjuk, hogy a mikroszaporítás során ért stressz hatások, melyek a növényekben felszaporodó szabadgyököket indukálják, mint a fény és hőingadozások, amelyek a folyamatos átoltások során létrejöttek nem károsították az antioxidáns védőrendszerüket.

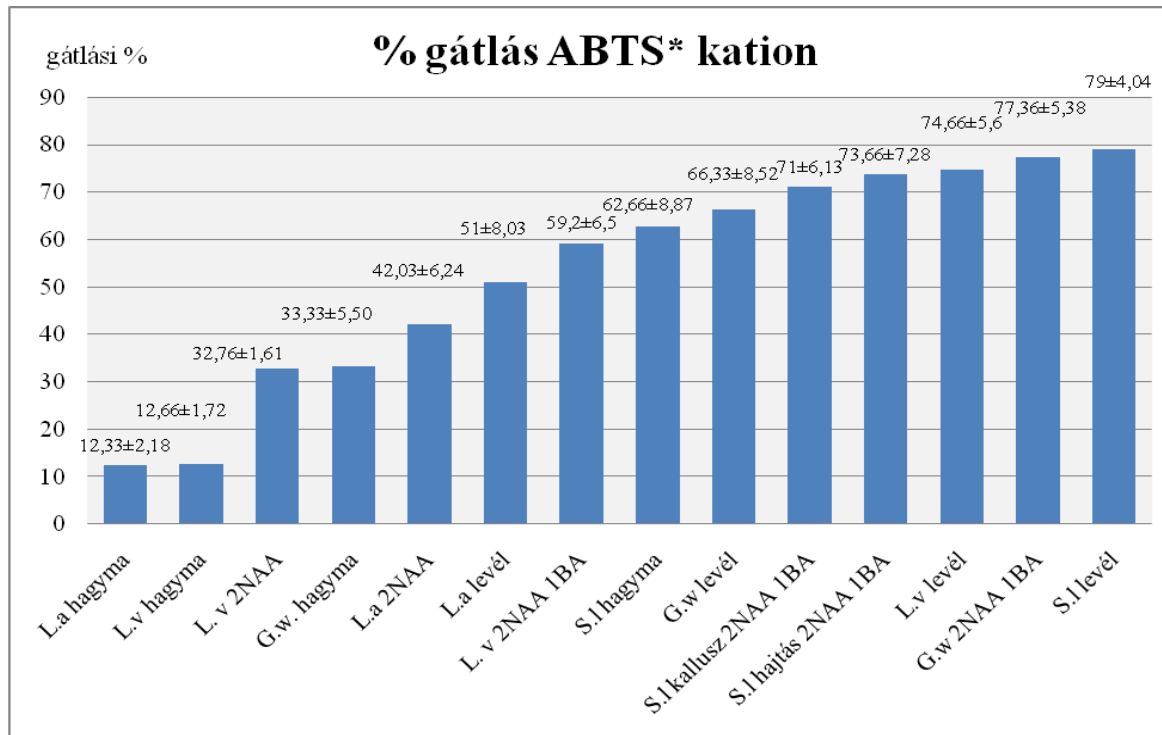
Minta	Összes polifenol (GAE, mg g DW <sup>-1</sup> )	% gátlás ABTS* kation <sup>b</sup>	ml/ mg AA egyenértékű kivonat	0.5 mg/ µM AA egyenértékű kivonatot használtunk	ABTS* gátlás, TEAC (µM/ 0.5 mg kivonatot használtunk)
<b>1a.</b> <i>Galanthus woronowii</i> , szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2 NAA + 1BA <sup>a</sup>	15.31 ± 1.7	77.36 ± 5.38	4.32 ± 0.82	25.00 ± 4.76	25.52 ± 3.08
<b>1b.</b> <i>G. woronowii</i> , levél	14.49 ± 4.15	66.33 ± 8.52	3.90 ± 0.65	22.73 ± 3.95	26.73 ± 4.48
<b>1c.</b> <i>G. woronowii</i> , hagyma	12.00 ± 1.87	33.33 ± 5.50	1.96 ± 0.17	11.50 ± 0.92	14.00 ± 1.08
<b>2a.</b> <i>Leucojum vernum</i> , mikroszaporított növény, 2 NAA	6.17 ± 1.81	32.76 ± 1.61	1.06 ± 0.09	5.98 ± 0.50	10.93 ± 0.52
<b>2b.</b> <i>L. vernum</i> , mikroszaporított növény, 2NAA + 1BA	12.00 ± 2.7	59.2 ± 6.5	3.33 ± 0.50	19.26 ± 2.81	20.78 ± 3.16
<b>2c.</b> <i>L. vernum</i> , levél	22.71 ± 1.77	74.66 ± 5.6	4.36 ± 0.55	25.5 ± 3.25	26.13 ± 3.23
<b>2d.</b> <i>L. vernum</i> , hagyma	4.63 ± 2.25	12.66 ± 1.72	0.72 ± 0.10	4.26 ± 0.69	5.76 ± 2.42
<b>3a.</b> <i>L. aestivum</i> , embriogén kallusz eredetű növény, 2 NAA	12.33 ± 1.5	42.03 ± 6.24	1.71 ± 0.25	10.87 ± 1.46	14.68 ± 1.72
<b>3b.</b> <i>L. aestivum</i> , levél	15.93 ± 2.47	51.00 ± 8.03	2.96 ± 0.61	17.3 ± 2.29	18.83 ± 3.27
<b>3c.</b> <i>L. aestivum</i> , hagyma	4.9 ± 1.52	12.33 ± 2.18	0.71 ± 0.11	4.23 ± 0.72	6.86 ± 1.63
<b>4a.</b> <i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2 NAA + 1 BA	15.93 ± 2.51	71.00 ± 6.13	4.13 ± 0.48	23.71 ± 2.72	24.81 ± 2.98
<b>4b.</b> <i>S. lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2 NAA + 1 BA	12.98 ± 2.03	73.66 ± 7.28	4.29 ± 0.60	24.58 ± 3.34	24.43 ± 4.17
<b>4c.</b> <i>S. lutea</i> levél	23.7 ± 0.66	79.00 ± 4.04	4.90 ± 0.23	28.60 ± 1.44	26.60 ± 0.98
<b>4d.</b> <i>S. lutea</i> hagyma	18.4 ± 4.21	62.66 ± 8.87	3.70 ± 0.47	21.53 ± 2.71	22.26 ± 3.28

**7. táblázat.** *Amaryllidaceae* családba tartozó növények és szövettenyésztéssel előállított minták „gyökfagó” aktivitásának összefoglaló táblázata. AA- aszkorbinsav; <sup>a</sup> jel az első oszlopban a növekedést szabályozó vegyületek (hormonok) koncentrációját (mg l<sup>-1</sup>) jelöli; <sup>b</sup> jel 0,5 mg DW növényi anyag kivonatot tartalmazott 1 ml vizsgálati minta. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10



**15.ábra.** *Amaryllidaceae* családba tartozó növények és szövettenyésztéssel előállított minták összes polifenol tartalmának összefoglaló diagrammja. 0,5 mg DW növényi anyag kivonatot tartalmazott 1 ml vizsgálati minta. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10. Az adatok növekvő sorrendben kerültek bemutatásra.

- G.w 2NAA 1BA:** *Galanthus woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2NAA+1BA
- G.w levél:** *Galanthus woronowii*, levél
- G.w hagyma:** *Galanthus woronowii*, hagyma
- L.v 2NAA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA
- L.v 2NAA 1BA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA+1BA
- L.v levél:** *Leucojum vernum*, levél
- L.v hagyma:** *Leucojum vernum*, hagyma
- L.a 2NAA:** *Leucojum aestivum*, embriogén kallusz eredetű növény, 2NAA
- L.a levél:** *Leucojum aestivum*, levél
- L.a hagyma:** *Leucojum aestivum*, hagyma
- S.l kallusz 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, embriogén kallusz, 2NAA+1BA
- S.l hajtás 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2NAA+1BA
- S.l levél:** *Sternbergia lutea*, levél
- S.l hagyma:** *Sternbergia lutea*, hagyma



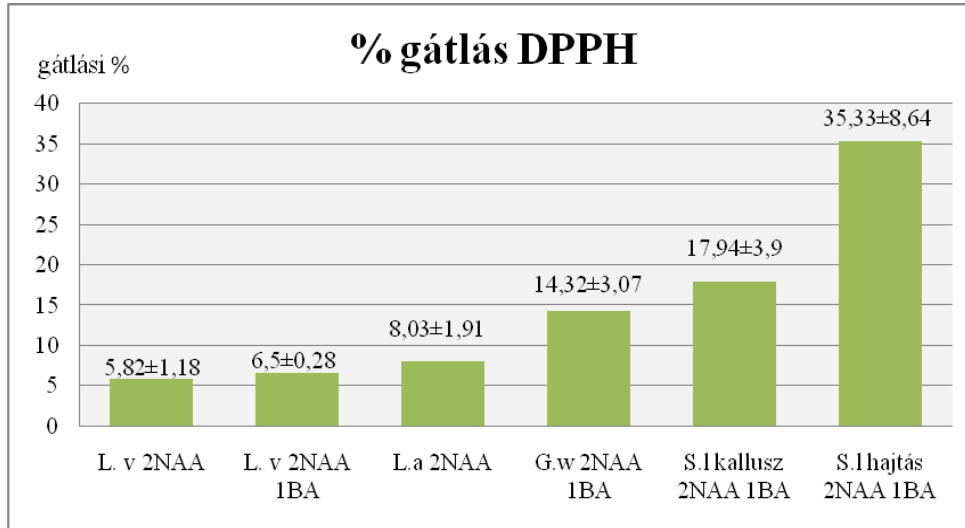
**16.ábra.** *Amaryllidaceae* családba tartozó növények és szövettenyésztéssel előállított minták ABTS „gyökfogó” aktivitásának összefoglaló diagrammja. 0,5 mg DW növényi anyag kivonatot tartalmazott 1 ml vizsgálati minta. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10. Az adatok növekvő sorrendben kerültek bemutatásra.

- G.w 2NAA 1BA:** *Galanthus woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2NAA+1BA
- G.w levél:** *Galanthus woronowii*, levél
- G.w hagyma:** *Galanthus woronowii*, hagyma
- L.v 2NAA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA
- L.v 2NAA 1BA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA+1BA
- L.v levél:** *Leucojum vernum*, levél
- L.v hagyma:** *Leucojum vernum*, hagyma
- L.a 2NAA:** *Leucojum aestivum*, embriogén kallusz eredetű növény, 2NAA
- L.a levél:** *Leucojum aestivum*, levél
- L.a hagyma:** *Leucojum aestivum*, hagyma
- S.l kallusz 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, embriogén kallusz, 2NAA+1BA
- S.l hajtás 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2NAA+1BA
- S.l levél:** *Sternbergia lutea*, levél
- S.l hagyma:** *Sternbergia lutea*, hagyma

DPPH stabil gyököt elsősorban a reakcióképesebb komponensek képesek redukálni, mint például a polifenolos vegyületek (Huang és mtsai., 2005; Ozgen és mtsai., 2006). Az DPPH gyökfogó aktivitást, 1 mg DW növényi anyagra vonatkoztatva kell tekinteni, az antioxidáns aktivitás magas, ha a gátlási értékek  $\geq 60\%$  (Miliauskas és mtsai., 2004; Katalinic és mtsai., 2006). Megállapíthatjuk, hogy mintáink DPPH gyök megkötési képessége alacsony volt. A DPPH megkötésén alapuló módszer és a polifenolok jelenléte között szoros összefüggést nem sikerült kimutatni. Szövettenyészteteink közül a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásainknak volt a legmagasabb értéke, amely közel 40%-os volt (8. táblázat, 17. ábra). Azonban a mi esetünkben is megfigyelhető, hogy az adataink közül a magas polifenol értékeket mutató 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *G. woronowii* szövettenyészet, és a szintén 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* tenyészet magasabb DPPH gyök megkötési képességgel rendelkezett a többi tenyészethez képest. DPPH gyökfogó aktivitását az eredeti növényi részekből származó mintáinkat nem teszteltük.

Minta	% gátlás DPPH <sup>b</sup>	ml/ mg AA egyenértékű kivonat	0.5 mg/ $\mu$ M AA egyenértékű kivonatot használtunk	DPPH gátlás, TEAC ( $\mu$ M/ 0.5 mg kivonatot használtunk)
1. <i>Galanthus woronowii</i> , szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2 NAA + 1BA <sup>a</sup>	14.32 $\pm$ 3.07	1.08 $\pm$ 0.18	6.18 $\pm$ 1.04	6.12 $\pm$ 1.34
2. <i>L. vernum</i> , mikroszaporított növény, 2NAA + 1BA	6.5 $\pm$ 0.28	0.51 $\pm$ 0.02	2.95 $\pm$ 0.14	2.8 $\pm$ 0.11
3. <i>Leucojum vernum</i> , mikroszaporított növény, 2 NAA	5.82 $\pm$ 1.18	0.43 $\pm$ 0.09	2.47 $\pm$ 0.55	2.45 $\pm$ 0.53
4. <i>L. aestivum</i> , embriogén kallusz eredetű növény 2 NAA	8.03 $\pm$ 1.91	0.61 $\pm$ 0.16	3.51 $\pm$ 0.91	2.87 $\pm$ 0.76
5. <i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2 NAA + 1 BA	17.94 $\pm$ 3.9	1.6 $\pm$ 0.26	9.1 $\pm$ 1.5	8.6 $\pm$ 1.5
6. <i>Sternbergia lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások,, 2 NAA + 1 BA	35.33 $\pm$ 8.64	3.15 $\pm$ 0.73	17.93 $\pm$ 4.15	17.6 $\pm$ 4.16

**8. táblázat.** *Amaryllidaceae* családba tartozó szövettenyésztéssel előállított minták DPPH inhibíciójának összefoglaló táblázata. AA- aszkorbinsav; <sup>a</sup> jel az első oszlopban a növekedést szabályozó vegyületek (hormonok) koncentrációját ( $\text{mg l}^{-1}$ ) jelöli; <sup>b</sup> jel 0,5 mg DW növényi anyag kivonatot tartalmazott 1 ml vizsgálati minta. Átlag  $\pm$  SE értékek kerültek bemutatásra,  $n \geq 10$



**17.ábra.** *Amaryllidaceae* családba tartozó növények és szövettenyésztéssel előállított minták DPPH inhibíciójának összefoglaló diagrammja. 0,5 mg DW növényi anyag kivonatot tartalmazott 1 ml vizsgálati minta. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10. Az adatok növekvő sorrendben kerültek bemutatásra.

- G.w 2NAA 1BA:** *Galanthus woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2NAA+1BA
- L.v 2NAA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA
- L.v 2NAA 1BA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA+1BA
- L.a 2NAA:** *Leucojum aestivum*, embriogén kallusz eredetű növény, 2NAA
- S.I kallusz 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, embriogén kallusz, 2NAA+1BA
- S.I hajtás 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2NAA+1BA

#### 4.5.2. Enzimatiskus antioxidánsok kimutatása

A növényeket ért oxidatív stresszhatások elleni védelemben a védőenzimek jelentős szerepet játszanak, hiszen az enzimatiskus folyamatok során játszódik le a szuperoxid gyökök átalakítása a SOD-al, valamint a hidrogén-peroxid lebontása is. Ismert, hogy a peroxidázok a  $H_2O_2$  méregtelenítéséhez szerves redukáló molekulát igényelnek ebben jelentős szerepet játszhat a guajakol és a pirogallol, melyek mesterséges szerves szubsztrátumként szolgálhatnak a növényeink peroxidáz enzim aktivitásának kimutatásában. A festési eljárás során a guajakol és a pirogallol H-donorként viselkedik, amit az enzim képes kihasználni és a poliakrilamid megfestődik (Apel és Hirt, 2004; Dixit és mtsai., 2011; Dunford és mtsai., 1982; Ghadiri és mtsai., 2013; Tauber, 1953-). Ezen módszerek alkalmazása részletes leírásra kerülnek az Anyag és módszer 3.4.2. fejezetében.

A peroxidáz gélek során használt szövettenyészet kivonatok fehérje tartalma  $21,2 \pm 4,35$  (SE) –  $30,9 \pm 5,1$   $\mu\text{g}$  közötti mennyiség volt a *G. woronowii*, *L. vernum* és *L. aestivum*, és 8,5  $\mu\text{g}$  (kallusz), 8,5  $\mu\text{g}$  (hajtások) a *S. lutea* esetében. Ezek a mennyiségek 10  $\mu\text{l}$  mintában voltak jelen, melyeket natív aktivitás gélekre vittünk. Így a fehérje tartalom alkalmas volt enzimaktivitás mérésekhez. A pirogallol-peroxidáz aktivitás a szövettenyészetek közül a 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA+ 1 mg  $\text{l}^{-1}$  BA táptalajon nevelt *S. lutea* kalluszok esetén volt a legmagasabb, de összehasonlítva jelentősen alacsonyabb volt, mint az *A. rusticana* gyökér kivonat esetében (19. ábra c). A többi szövettenyészet közül a vetővirág kallusz aktivitásához közeli értéke egyedül a *L. vernum* a 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növénynek volt, de a kontrollmintánk (*A. rusticana* gyökér) értékét nem közelítette meg (9. táblázat, 18. ábra). Harmadik legmagasabb aktivitást a *L. aestivum* 2 mg  $\text{l}^{-1}$  NAA táptalajon nevelt embriogén kallusz eredetű növényi

mintánk mutatta, majd a *G. woronowii* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon szövettenyésztéssel előállított hajtásminta, *S. lutea* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, végül a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon mikroszaporított növényünk zárta a sort. Ezzel szemben, az eredeti élőhelyükről begyűjtött növények szervei közül a *G. woronowii* levél, *L. vernum* levél és hagyma, esetében volt kimutatható pirogallol-peroxidáz aktivitás, de ezek nem kerültek ábrázolásra. Az eredeti élőhelyről begyűjtött *G. woronowii* hagyma, *L. aestivum* levél és hagyma, *S. lutea* levél és hagyma mintáink peroxidáz enzimaktivitása nem volt kimutatható a pirogallol festés során. (9. táblázat, 18. ábra).

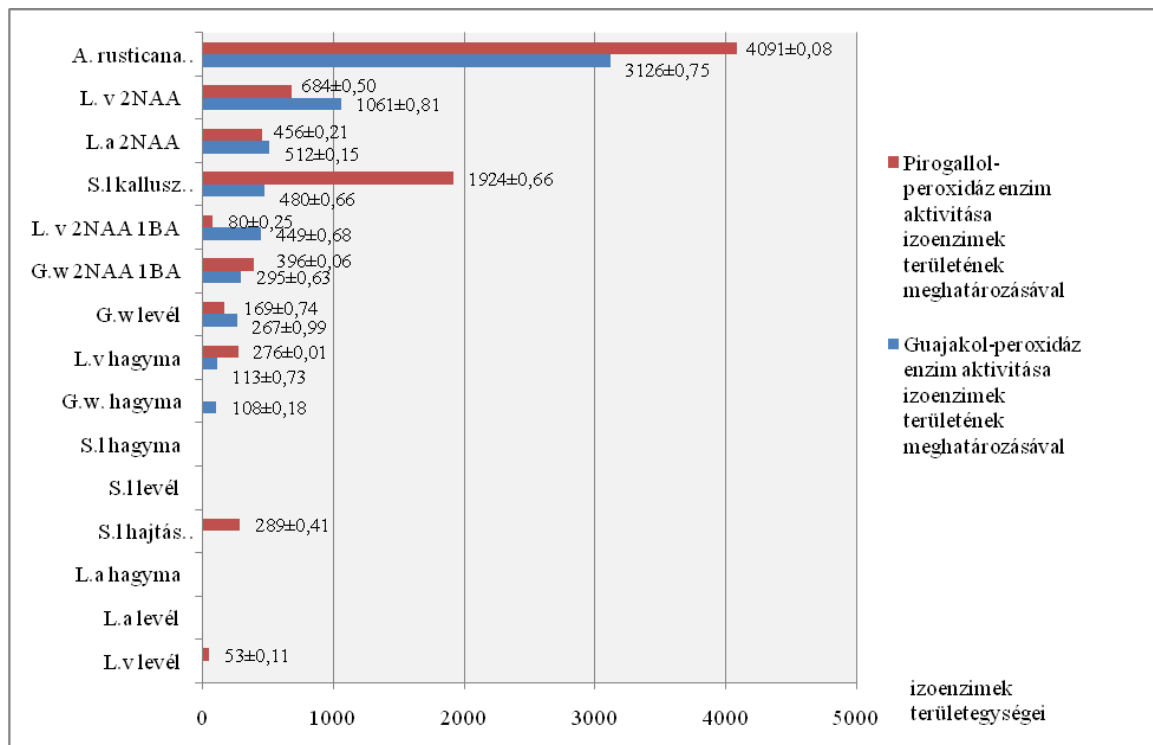
Spektrofotometriás vizsgálatot végeztünk azonos mennyiségű növényi kivonatokból, 2-ME-ra vonatkozóan. Méréseink kimutatták, hogy a vizsgálati pufferben a 2-ME hiánya csak enyhe aktivitásnövekedést indukált, de ez az aktivitás alacsonyabb volt a *S. lutea* és *L. vernum*, 2 mg l<sup>-1</sup> NAA 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormon összetételű táptalajon nevelt minta esetében, mint az *A. rusticana* gyökér kivonatban. Konkrét aktivitás (mM oxidált pirogallol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) 2-ME hiányában a *S. lutea* kivonatok aktivitása 28,29% az *A. rusticana* gyökér kivonat aktivitásának, amit pozitív kontrollként használtunk. A *L. vernum* esetében ez az érték 19,45%. 2-ME jelenlétében a *S. lutea* kivonatok aktivitása 25,86%-a 2-ME-kezelt *A. rusticana* kivonatok aktivitásának és a *L. vernum* esetén ez az érték 7,13% volt (20. ábra).

A guajakol peroxidáz aktivitás gélek azt mutatták, hogy az összes szövettenyészetnek alacsony, vagy nem kimutatható aktivitása volt az *A. rusticana* gyökér kivonattal szemben (19. ábra a). Csökkenő sorrendben a legmagasabb aktivitása a *L. vernum* a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növénynek volt, majd a *L. aestivum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt embriogén kallusz eredetű növényi mintánk, a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* kalluszok, a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup>

BA táptalajon mikroszaporított növényünk, a *G. woronowii* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon szövettenyésztéssel előállított hajtásminta aktivitása volt a legalacsonyabb. A *S. lutea* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásoknak egyedül a szövettenyészetek közül nem volt guajakol-peroxidáz enzim aktivitása (9. táblázat, 18. ábra). Ezzel szemben, az eredeti élőhelyükről begyűjtött növények szervei közül a *G. woronowii* levél és hagyma, *L. vernum* hagyma, esetében volt kimutatható guajakol- peroxidáz tevékenység, de ezek nem kerültek ábrázolásra (9. táblázat, 18. ábra). Az eredeti élőhelyről begyűjtött *L. vernum* levél, *L. aestivum* levél és hagyma, *S. lutea* levél és hagyma mintáink peroxidáz enzimaktivitása nem volt kimutatható a guajakol festés során. Ami az eredeti növényi szerveket illeti, a *G. woronowii* esetében a guajakol peroxidáz aktivitása hasonló a szövettenyészetből készült minták aktivitásához, de az *A. rusticana* gyökér aktivitásához képest alacsonyabb volt. Az összes többi explantátum esetében a guajakol peroxidáz aktivitás nem, vagy nagyon kis mennyiségben volt kimutatható. A spektrofotometriás vizsgálat azt mutatta, hogy a 2-ME kifejezetten gátló hatással volt a guajakol peroxidáz aktivitásokra, szemben a pirogallol-peroxidázzal (az adatokat nem mutatjuk be). Konkrét aktivitás (mM oxidált guaiakol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) 2-ME hiányában a *S. lutea* esetében 32,84%-a, és a *L. vernum* esetében 60,31%-a a torma kivonatok aktivitásának. A pirogallol peroxidázok elektroforetikus vándorlásának sebessége alacsonyabb volt a *G. woronowii* és *S. lutea* minták esetében, mint a *Leucojum* kultúrák vizsgálatánál (19. ábra b). Ezen túlmenően, a pirogallol-peroxidáz aktivitás minta különbözött *L. vernum* és *L. aestivum* kultúráknál, az utóbbi esetben, két izoenzimet lehetett kimutatni (20. ábra. b).

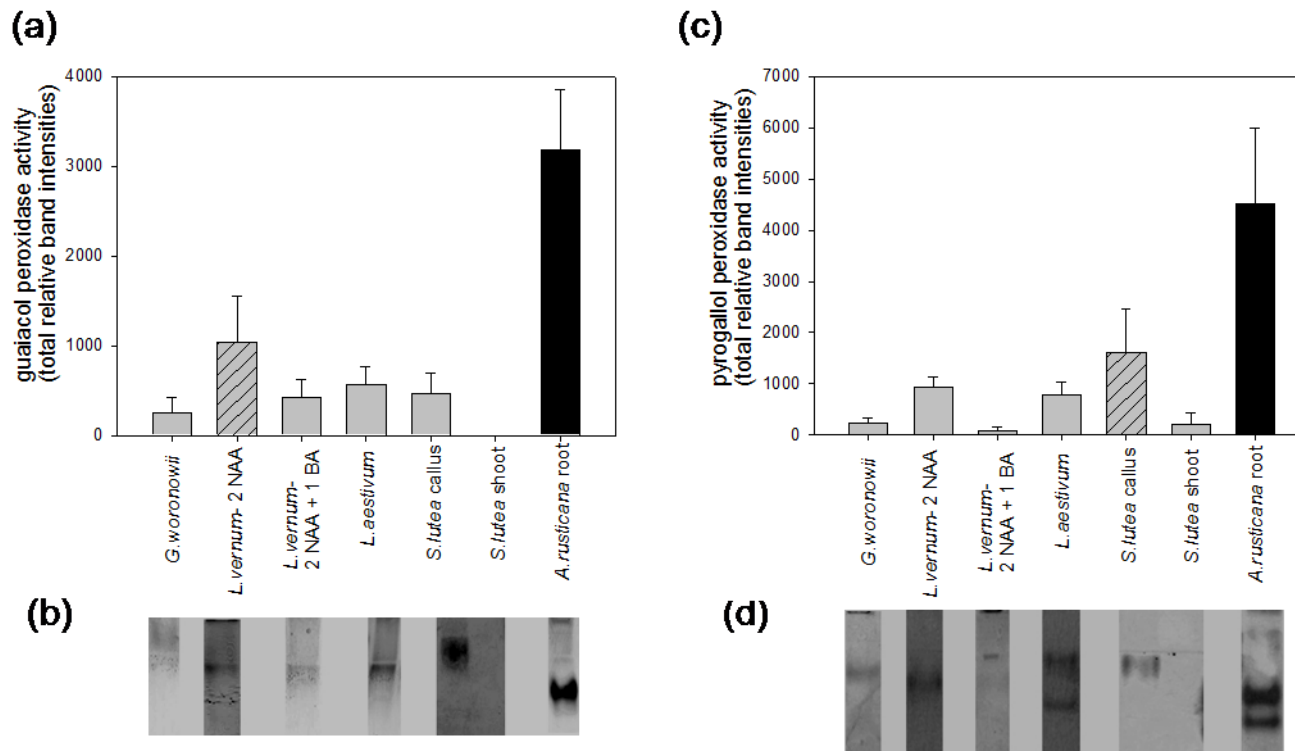
Minta	Guajakol- peroxidáz enzim aktivitása izoenzimek területének meghatározá- sával (a)	Guajakol- peroxidáz enzim aktivitása % (b)	Pirogallol- peroxidáz enzim aktivitása izoenzimek területének meghatározá- sával (a)	Pirogallol- peroxidáz enzim aktivitása % (b)
<b>1a.</b> <i>Galanthus woronowii</i> , szövettenyésztéssel előállított hajtás 2 NAA + 1 BA	295±0,63	9,4	396±0,06	9,7
<b>1b.</b> <i>G. woronowii</i> , levél	267±0,99	8,5	169±0,74	4,1
<b>1c.</b> <i>G. woronowii</i> , hagyma	108±0,18	3,5	0	0
<b>2a.</b> <i>Leucojum vernum</i> , mikroszaporított növény, 2 NAA	1061±0,81	33,9	684±0,50	16,7
<b>2b.</b> <i>L. vernum</i> , mikroszaporított növény, 2NAA + 1 BA	449±0,68	14,4	80±0,25	1,9
<b>2c.</b> <i>L. vernum</i> , levél	0	0	53±0,11	1,3
<b>2d.</b> <i>L. vernum</i> , hagyma	113±0,73	3,6	276±0,01	6,7
<b>3a.</b> <i>L. aestivum</i> , emriogén kallusz eredetű növény, 2 NAA	512±0,15	16,4	456±0,21	11,1
<b>3b.</b> <i>L. aestivum</i> , levél	0	0	0	0
<b>3c.</b> <i>L. aestivum</i> , hagyma	0	0	0	0
<b>4a.</b> <i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2 NAA + 1 BA	480±0,66	15,4	1924±0,66	47,0
<b>4b.</b> <i>S. lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2 NAA + 1 BA	0	0	289±0,41	7,1
<b>4c.</b> <i>S. lutea</i> levél	0	0	0	0
<b>4d.</b> <i>S. lutea</i> hagyma	0	0	0	0
<i>Armoracia rusticana</i> gyökér kivonat	3126±0,75	100	4091±0,08	100

**9. táblázat.** Guajakol-peroxidáz, és pirogallol- peroxidáz enzim aktivitás gélek kiértékelésének összefoglaló táblázata. Az adatok a poliakrilamid géleken megjelenő enzimsávok intenzitására utal, **(a)** a zimogramokon megjelent sávok (izoenzimek) területének meghatározása CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével történt. **(b)** Enzim aktivitása %-ban kifejezve, a torna gyökér kivonatok jelentik a 100%-ot. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10

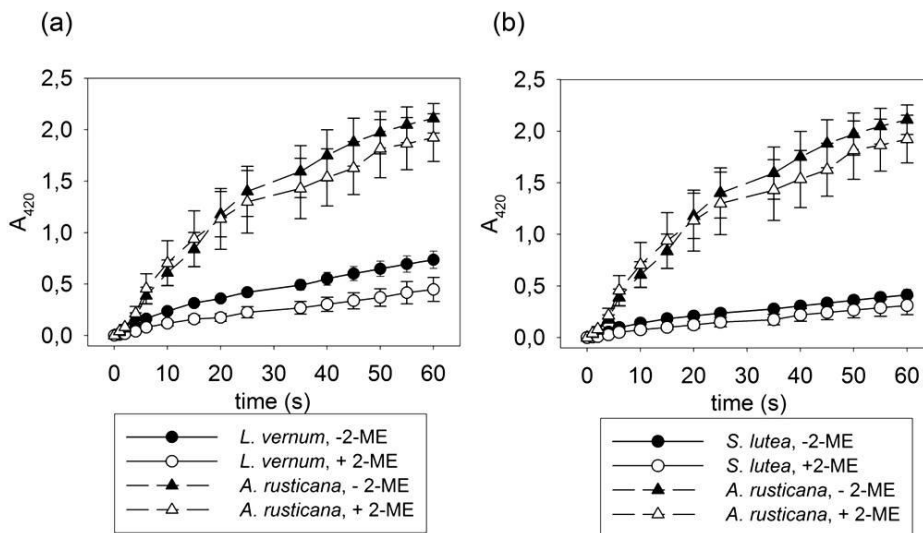


-**G.w 2NAA 1BA:** *Galanthus woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2NAA+1BA  
 -**G.w levél:** *Galanthus woronowii*, levél  
 -**G.w hagyma:** *Galanthus woronowii*, hagyma  
 -**L.v 2NAA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA  
 -**L.v 2NAA 1BA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA+1BA  
 -**L.v levél:** *Leucojum vernum*, levél  
 -**L.v hagyma:** *Leucojum vernum*, hagyma  
 -**L.a 2NAA:** *Leucojum aestivum*, embriogén kallusz eredetű növény, 2NAA  
 -**L.a levél:** *Leucojum aestivum*, levél  
 -**L.a hagyma:** *Leucojum aestivum*, hagyma  
 -**S.I kallusz 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, embriogén kallusz, 2NAA+1BA  
 -**S.I hajtás 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2NAA+1BA  
 -**S.I levél:** *Sternbergia lutea*, levél  
 -**S.I hagyma:** *Sternbergia lutea*, hagyma  
 -**A. rusticana:** *Armoracia rusticana* gyökér kivonat

**18.ábra.** Guajakol-peroxidáz, és pirogallol-peroxidáz enzim aktivitás gélek kiértékelésének összefoglaló diagrammja. Az adatok a poliakrilamid géleken megjelenő enzimsávok intenzitására utalnak, a zimogrammon megjelent sávok (izoenzimék) területének meghatározása CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével történt. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10. Az adatok növekvő sorrendben kerültek bemutatásra.



**19. ábra.** *Amaryliidaceae* szövettenyészetek peroxidáz aktivitásának vizsgálata natív fehérje géleken. (a) teljes relatív sáv intenzitások ábrázolása guajakol-peroxidáz aktivitás esetén (b) gélképek a guajakol festés során (c) teljes relatív sáv intenzitások ábrázolása pirogallol-peroxidáz aktivitás esetén (d) gélképek a pirogallol festés során. A zimogramokon megjelent sávok (izoenzyme) területének meghatározása CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével történt. Enzim aktivitás intenzitása %-ban kifejezve, a torma gyökér kivonatok értékeihez képest, melyek a 100%-ot jelentik. Szürke szín az alacsony, sávozott szín a magasabb, fekete szín pedig a torma enzimaktivitását jelenti.



**20. ábra.** Pirogallol peroxidáz aktivitás (abszorbancia értékek, 420 nm-nél jelzi a pirogallol oxidációjának mértékét  $H_2O_2$  jelenlétében), bemutatása spektrofotometriás mérési vizsgálatok alapján *L. vernum* és *S. lutea* szövettenyészetek enzimkivonataiból. Az adatok 2-merkaptóetanol (2-ME) jelenlétében vagy hiányában megjelenő enzimaktivitásokat mutatják.

Összességében elmondható, hogy a peroxidáz aktivitások kimutathatóak voltak a növényi szövettenyészetekben kivéve a *S. lutea*  $2\text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $1\text{ mg l}^{-1}$  BA táptalajon szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, mert ezeknek nem volt guajakol-peroxidáz enzim aktivitása (9. táblázat, 18. ábra). Azt is kijelenthetjük, hogy a szövettenyészetek peroxidáz enzimaktivitása magasabb volt, mint az eredeti élőhelyről begyűjtött növényekből készült minták aktivitása. Ami arra enged következtetni, hogy a mikroszaporított növényeink hasonlóan a nem enzimatius antioxidánsok eredményeihez (4.5.1. fejezet) a szaporítási körülményekhez képest nem veszítették el antioxidáns tulajdonságaikat, sőt magasabb aktivitással bírnak, mint az eredeti élőhelyről származó minták.

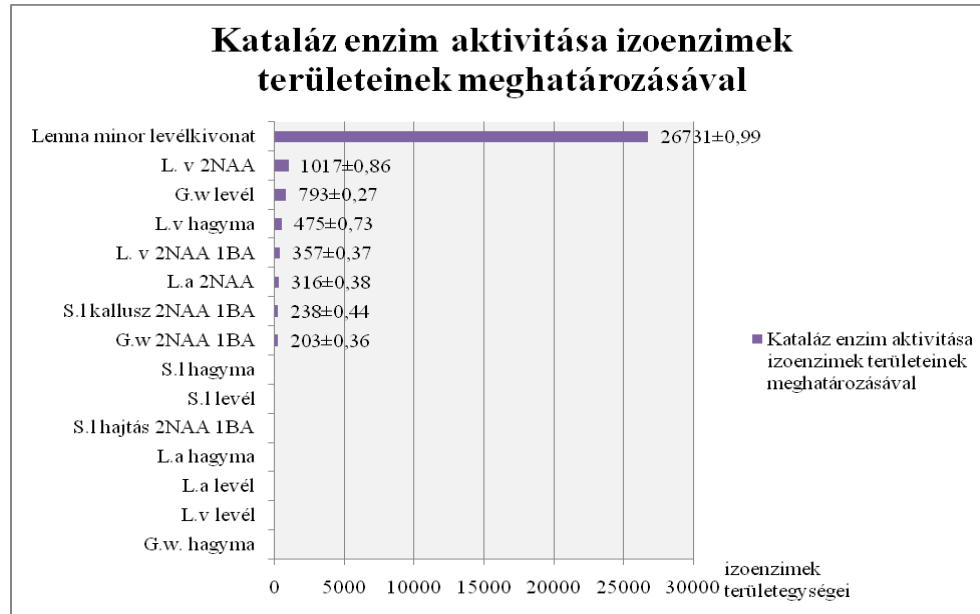
A kataláz (CAT) enzim már a 2.5.2. fejezetben is említésre került, előnye a többi antioxidáns védőrendszerhez viszonyítva, hogy gyors megújulási ciklusa van és alacsony a  $H_2O_2$  iránti affinitása. Másik fontos szempontként meg kell jegyezni, hogy nem igényel semmilyen szerves kosubsztrátumot a  $H_2O_2$  lebontásához. A kataláz enzimaktivitását közvetlenül meghatározza a jelenlévő  $H_2O_2$  koncentráció (Choen és mtsai., 1970; Láng 1998; Smirnoff 2005). Ezért kísérleteink között szerepeltettük kataláz enzim aktivitás vizsgálatot is, ahol kontroll növényként *Lemna minor*, magyar nevén apró békalencse hajtását használtuk fel. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a kataláz enzim aktivitás a szövettenyészetek és az eredeti élőhelyről begyűjtött növényi mintáik esetében is jelentősen elmaradt a kontrollnövényük által mutatott aktivitástól (10. táblázat, 21. ábra). A legmagasabb értéket a szövettenyészetek közül a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növény érte el, utána következett a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon mikroszaporított növényünk, *L. aestivum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt embriogén kallusz eredetű növényi mintánk, 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* kalluszok, végül *G. woronowii* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon szövettenyésztéssel előállított hajtásminta mutatotta a legalacsonyabb aktivitást. A *S. lutea* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásoknak egyedül a szövettenyészetek közül nem volt kataláz enzim aktivitása (10. táblázat, 21. ábra), hasonlóan a guajakol-peroxidáz enzim aktivitáshoz. Ezzel szemben az eredeti élőhelyről begyűjtött növényi mintáink közül jól szerepelt a sorban a *G. woronowii* levél, és a *L. vernum* hagyma is. Azonban a szövettenyészetek közül a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növényünk kataláz enzimaktivitása volt a legmagasabb és az eredeti élőhelyről begyűjtött növényi mintáknál is magasabb volt (10. táblázat, 21. ábra). A *G. woronowii* hagyma, *L. vernum* levél, *L. aestivum*

hagyma és levél, valamint a *S. lutea* hagyma és levél nem mutatott kataláz aktivitást.

Minta	Kataláz enzim aktivitása izoenzimek területének meghatározásával (a)	Kataláz enzim aktivitása % (b)
<b>1a.</b> <i>Galanthus woronowii</i> , szövettenyésztéssel előállított hajtás 2 NAA + 1 BA	203±0,36	0,8
<b>1b.</b> <i>G. woronowii</i> , levél	793±0,27	2,9
<b>1c.</b> <i>G. woronowii</i> , hagyma	0	0
<b>2a.</b> <i>Leucojum vernum</i> , mikroszaporított növény, 2 NAA	1017±0,86	3,8
<b>2b.</b> <i>L. vernum</i> , mikroszaporított növény, 2NAA + 1 BA	357±0,37	1,3
<b>2c.</b> <i>L. vernum</i> , levél	0	0
<b>2d.</b> <i>L. vernum</i> , hagyma	475±0,73	1,8
<b>3a.</b> <i>L. aestivum</i> , embriogén kallusz eredetű növény, 2 NAA	316±0,38	1,2
<b>3b.</b> <i>L. aestivum</i> , levél	0	0
<b>3c.</b> <i>L. aestivum</i> , hagyma	0	0
<b>4a.</b> <i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2 NAA + 1 BA	238±0,44	0,89
<b>4b.</b> <i>S. lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2 NAA + 1 BA	0	0
<b>4c.</b> <i>S. lutea</i> levél	0	0
<b>4d.</b> <i>S. lutea</i> hagyma	0	0
<i>Lemna minor</i> level kivonat	26731±0,99	100

**10. táblázat.** Kataláz enzim aktivitás gélek kiértékelésének összefoglaló táblázata. Az adatok a poliakrilamid géleken megjelenő enzimsávok intenzitására utal, **(a)** a zimogramokon megjelölt sávok (izoenzimek) területének meghatározása CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével történt. **(b)** Enzim aktivitása %-ban kifejezve, az apró békalencse levél kivonatok jelentik a 100%-ot. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra,  $n \geq 10$

Ez a kísérlet arra enged minket következtetni, hogy a szövettenyészeinkben a kataláz enzim aktivitás közel azonos értékeket mutat, vagy magasabbat az eredeti élőhelyről begyűjtött növényeinkhez képest, ahogyan a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növényi mintánk esetében is. A pozitív kontrollhoz (*Lemna* hajtáskivonat) képest a szövettenyészeink alacsony kataláz aktivitást mutattak.



**21. ábra.** Kataláz enzim aktivitás gélek kiértékelésének összefoglaló diagrammja. Az adatok a poliakrilamid géleken megjelenő enzimsávok intenzitására utalnak, a zimogramokon megjelent sávok (izoenzimek) területének meghatározása CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével történt. Átlag ± SE értékek kerültek bemutatásra, n ≥ 10. Az adatok növekvő sorrendben kerültek bemutatásra.

-**G.w 2NAA 1BA:** *Galanthus woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2NAA+1BA  
 -**G.w levél:** *Galanthus woronowii*, levél  
 -**G.w hagyma:** *Galanthus woronowii*, hagyma  
 -**L.v 2NAA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA  
 -**L.v 2NAA 1BA:** *Leucojum vernum*, mikroszaporított növény, 2NAA+1BA  
 -**L.v levél:** *Leucojum vernum*, levél  
 -**L.v hagyma:** *Leucojum vernum*, hagyma  
 -**L.a 2NAA:** *Leucojum aestivum*, embriogén kallusz eredetű növény, 2NAA  
 -**L.a levél:** *Leucojum aestivum*, levél  
 -**L.a hagyma:** *Leucojum aestivum*, hagyma  
 -**S.I kallusz 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, embriogén kallusz, 2NAA+1BA  
 -**S.I hajtás 2NAA 1BA:** *Sternbergia lutea*, szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2NAA+1BA  
 -**S.I levél:** *Sternbergia lutea*, levél  
 -**S.I hagyma:** *Sternbergia lutea*, hagyma  
 -**Lemna minor levélkivonat**

#### 4.5.3. Az enzimatis és nem enzimatis antioxidáns aktivitások összefoglalása

**A nem enzimatis vizsgálatok alapján a legmagasabb értékek a következőképpen alakultak:**

- Az összes polifenol tartalom az eredeti élőhelyről begyűjtött növények esetében a *S.lutea* levél és *L. vernum* levél kivonatok esetében volt a legmagasabb. Szövettenyészteteink közül pedig a: *G. woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelve és a *S. lutea* embriogén kallusz 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelve érte el a legmagasabb értéket.
- ABTS \* kation gátlás TEAC értékre vonatkoztatva két kultúra esetében mutatott magas antioxidáns aktivitást a *G. woronowii* és a *S. lutea* szövettenyésztetek esetében 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormont tartalmazó táptalajon. Eredeti élőhelyről begyűjtött növényeink esetében a legmagasabb értéke a *S.lutea* levél és *L. vernum* levél kivonatoknak volt.
- Mintáink DPPH gyök megkötési képessége alacsonynak bizonyult, egyedül a szövettenyészteteink közül a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásainknak volt magasabb értéke, amely közel 40%-os volt.
- Tehát a legmagasabb nem enzimatis antioxidáns aktivitást az eredeti élőhelyről származó növényeink közül a *S. lutea* levélben és a *L. vernum* levélben mértük. Szövettenyészteteink közül pedig *S. lutea* és a *G. woronowii* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon létrehozott növényeinknek volt a legmagasabb aktivitása.

**Az enzimatisz antiozidáns aktivitás vizsgálatok alapján a legmagasabb értékek a következőképpen alakultak:**

- A pirogallol-peroxidáz enzimaktivitás a szövettényészetek közül a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* kalluszok esetén volt a legmagasabb, de összehasonlítva jelentősen alacsonyabb volt, mint az *A. rusticana* gyökér kivonat esetében. A nem enzimatisz antiozidánsok vizsgálatánál jól szereplő *S.lutea levél* esetében azonban nem volt kimutatható és a *L. vernum* levél esetében nagyon alacsony volt.
- A guajakol-peroxidáz enzim aktivitása az összes szövettényészetben és eredeti élőhelyről származó növényben alacsony vagy nem kimutatható volt.
- A kataláz enzim esetében a legmagasabb aktivitás értéket a szövettényészetek közül a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növény érte el. A többi szövettényészeti minta ettől messze elmaradt, valamint az eredeti élőhelyről származó mintáink közül is csak a *G. woronowii* levél és *L. vernum* hagyma mutatott aktivitást.

Gyógynövényeket és bogyós gyümölcsöket az emberiség a fennállása óta fogyaszt, és a segítségükkel védekeznek a betegségek ellen. A mai modern gyógyszerismeret azonban már alkalmazza a molekuláris biológia, mikrobiológia, műszeres analitika és biotechnológia eredményeit is (Gonda és mtsai., 2010; Miliauskas és mtsai., 2004). Ezért érdemes kísérleteket végezni a védett vagy kerti dísnövényként számon tartott fajok hatóanyagai iránt is, mint például az általunk vizsgált növények esetében is. Gyógynövényekről tudjuk, hogy a növényben viszonylag nagy mennyiségben fellelhető fenolos vegyületek általában korrelálnak a magas antioxidáns aktivitással (Matkowski, 2008). Feltehetően a magas polifenol tartalom vezethető magas antioxidáns aktivitáshoz. Az összes tenyésztet közül a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA+ 1 mg l<sup>-1</sup> BA táptalajon nevelt *S. lutea* kalluszok és hajtások esetén figyelhettük meg, hogy egyedül a guajakol-peroxidáz enzimaktivitása nem volt magas, azonban kiemelkedett az összes antioxidáns aktivitás vizsgálat során. Elmondhatjuk, hogy a *Sternbergia lutea* általunk először leírt szövettenyésztési eljárással előállított mikroszaporított növényünk jó antioxidáns képességgel rendelkezik. Eredeti élőhelyről begyűjtött növényeink esetében azonban nem lehet egyet kiemelni, a kísérletek során a *S. lutea* levél, *L. vernum* levél, mutatott legmagasabb polifenol értéket és ABTS \* gyökfogó képességet. Enzimatisz antioxidáns aktivitása azonban az eredeti élőhelyről begyűjtött növények esetében *G. woronowii* levél és *L. vernum* hagyma és levél kivonatoknak volt. A bogyós gyümölcsökről tudjuk, hogy magas az antioxidáns hatásuk, és rendkívül hasznosak a szabadgyökök elleni védelemben (Wang és mtsai., 1996; Wu és mtsai., 2004). Az általunk vizsgált *Amaryllidaceae* fajok antioxidáns képességét a szakirodalomban megjelent egyes gyógynövények, és bogyós gyümölcsök (szamáca, málna, piros ribiszke, fekete ribiszke) összes polifenol, valamint DPPH gyökfogó képességével (Balogh és mtsai., 2010, 12. táblázat) hasonlítottam össze.

Minta	Összes polifenol (GAE, mg g DW <sup>-1</sup> )	% gátlás DPPH	% gátlás ABTS* kation
bíbor kasvirág ( <i>Echinacea purpurea</i> )	4,1±1,2	6,8±1,5	54
kamilla ( <i>Matricaria recutita</i> )	7,5±0,1	44,7±2,6	32
orvosi körömvirág ( <i>Calendula officinalis</i> )	6,6±0,3	12,9±0,8	11
orvosi somkóró ( <i>Melilotus officinalis</i> )	4,3±0,6	75,9±1,8	33
enyves zsálya ( <i>Salvia glutinosa</i> )	17,1±0,6	91,5±0,5	81
maral gyökér ( <i>Rhaponticum carthomoides</i> )	13,3±0,3	87,6±1,1	72
muskotályzsálya ( <i>Salvia sclarea</i> )	24,0±1,1	92,9±0,4	64
orvosi zsálya ( <i>Salvia officinalis</i> )	22,6±0,9	92,3±0,5	89
<i>Sternbergia lutea</i> levél	23,7±0,66	-	79±4,04
<i>Leucjum vernum</i> levél	22,7±1,77	-	74,66±5,6
<i>Galanthus woronowii</i> , szövettenyésztéssel előállított hajtás, 2NAA+1BA	15,31±1,7	14,32±3,07	77,36±5,38
<i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2NAA+1BA	15,93±2,51	17,94±3,9	71±6,13
<i>Sternbergia lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2NAA+1BA	12,98±2,03	35,33±8,64	73,66±7,28

**11. táblázat.** gyógynövények antioxidáns aktivitása (Miliauskas és mtsai., 2004), és az általunk mért minták legmagasabb antioxidáns aktivitás értékei

Minta	Összes polifenol (GAE, mg g DW <sup>-1</sup> )	% gátlás DPPH
fekete ribiszke ( <i>Ribes nigrum</i> )	közel 50	50felett
málna ( <i>Rubus idaeus</i> )	10-20 között	10-20 között
piros ribiszke ( <i>Ribes rubrum</i> )	7-20 között	20alatt
szamóca ( <i>Fragaria vesca</i> )	10-20 között	20 alatt

**12. táblázat.** Bogyós gyümölcsök antioxidáns aktivitása (Balogh és mtsai., 2010)

Kutatási eredményeink alapján elmondható, hogy az összes polifenol tartalom minden szövettanészeti minta, és eredeti élőhelyről származó növényi részek esetében is megközelítette, sőt meg is haladta a galluszsavra vonatkoztatott összes polifenol tartalmat a fenn bemutatott gyógynövények és a négy bogyós gyümölcs értékeit figyelembe véve.

Az összes tenyészet közül a  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA táptalajon nevelt *S. lutea* hajtások esetében mértük a legnagyobb DPPH gyök gátlási %-ot, ami közel azonos volt, mint a kamilla esetében és egyértelműen magasabb a málna, piros ribiszke és szamóca értékeinél ( 11., 12. táblázat). A hivatkozások alapján kiderül, hogy a mi tenyészeteink megközelítik, sok esetben meg is haladják a fent említett bogyós gyümölcsök és gyógynövények aktivitását. Összehasonlítva a mintáinkat gyógynövényekben és a bogyós gyümölcsökben mért antioxidáns aktivitásokkal, elmondható, hogy mintáink magas polifenol értéket és ABTS \* gyökfogó képességet mutatnak. A DPPH gyök inhibíciójának mértéke azonban nem mondható magasnak mintáink esetében, a gyógynövények és a bogyós gyümölcsök értékeihez viszonyítva.

## 5. Eredmények összefoglalása

Számos *Amaryllidaceae* fajból indukált szövettenyészet esetén használtak növekedést szabályozó auxinokat, mint NAA, IAA, és citokinint, mint például a BA (El Tanchy és mtsai., 2011, Ptak és mtsai., 2010; Resetár és mtsai., 2014, Staikidou és mtsai., 2006). Auxin /citokinin hormon kombinációk növekedés szabályozóként jelentős befolyásolói az embriogén kallusz képződésnek és a növekedésnek ebben a családban. A fent említett auxin hatású hormonok előnyösebbek, mint a 2,4-D (diklór-fenoxi- ecetsav), mert nem valószínű, hogy szomaklonális variabilitást indukálnak, ezért alkalmasabbak csíraplazma létrehozás céljából (Resetár és mtsai., 2014).

Munkánk során célkitűzéseink között szerepelt, hogy növényi szövettenyésztési eljárást dolgozzunk ki **a**, *Galanthus nivalis*, *Galanthus elwessi*, *Galanthus woronowii*, **b**, *Leucojum aestivum*, *Leucojum vernum* és **c**, *Sternbergia lutea* eredeti növényekből.

**a)** *Galanthus nivalis* kallusztényészeteket hoztunk létre  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA és  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA táptalajon hagyma explantátumokból. Ezeket továbbnevelve a kalluszokon intakt, zöld hajtások jelentek meg, melyek stabil fenntartásához és továbbtenyésztéséhez  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkombinációt használtunk (5.a, e, h, k, l ábra). Biztos hajtásképződés után megnöveltük az auxin hatású hormon koncentrációját, és  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú táptalajon megindult a hagymaképzés (6.e ábra). Ezeket továbbnővesztve  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú MS táptalajon zöld hajtásos hagymát tudunk regenerálni (6. f ábra). Metszeteink és azokból készített fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataink bizonyították, hogy gyökérképződés szomatikus embrióból  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA majd  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkoncentráción nevelt hagymán volt jellemző (8.a ábra). *G. nivalis*-ből elsőként hoztunk létre embriogén kallusztényészeteket (Resetár és mtsai.

2014). A *G. elwesii* és *G. woronowii* hóvirág fajok esetében a *G. nivalis* tenyésztése során tapasztalt megfigyeléseinket vettük alapul. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a *G. woronowii* esetében magas auxin hatású hormon koncentráció esetén gyökér és hajtások képződtek, később ezeket  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA  $1+ \text{ mg l}^{-1}$  BA hormonkoncentráción nevelve hagyma képződött (12. ábra d.). A *G. elwesii* szövettenyésztése során szintén alkalmazott táptalajkombináció volt a  $10 \text{ mg l}^{-1}$  NAA  $+1 \text{ mg l}^{-1}$  BA és  $2 \text{ mg l}^{-1}$  +NAA  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormon összetételű MS\* táptalaj, azonban az intenzív zöld hajtás és hagyma megjelenése hosszú távú átoltások során  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA  $+2 \text{ mg l}^{-1}$  IAA, tehát csak auxin hormon tartalmú táptalajon következett be (12. ábra.). Elsőként hoztunk létre *G. woronowii* tenyészeteit. Megállapíthattuk, hogy kiemelkedő növekedési produkcióra képes növényeink alkalmasak későbbi antioxidáns vizsgálatok elvégzésére.

**b)** *G. nivalis* szövettenyészetekkel kapcsolatos AFLP eredményeink nem mutattak genetikai variabilitást az őshonos növények és a szövettenyésztés során előállított növények között. Védett, vagy veszélyeztetett növények *in vitro* szaporítása esetén a genotípus megőrzése különösen fontos.

**c)** *Leucjum aestivum* és *L. vernum* esetében is a magas auxin- alacsonyabb citokinin tartalmú hormonkombinációt alkalmazva volt sikeres a kalluszindukció. Tavaszi tőzike esetében  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA  $+1 \text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú táptalajokon a hajtások, azokon hagymák megjelenését figyeltük meg, embriók megjelenését nem tapasztaltuk. A *L. vernum* fiatal hajtásokat áthelyeztük  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA  $+2 \text{ mg l}^{-1}$  IBA növekedést serkentő hormon összetételű táptalajra, amelyen a hagymák tovább növekedtek és gyökerek differenciálódtak (13. ábra a és c). A nyári tőzike esetében pedig az embriogén kallusz mellett a gyökérzet kialakulását is meg lehetett figyelni  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA tartalmú táptalajon. (13. ábra d, e, f). A növényregenerálási kísérleteink során *in vitro* hagymát tudtunk létrehozni (13. ábra a, b, c, e, g,



szövettenyésztése során a NAA alkalmazása, mint egyedüli növekedésszabályozó és kombinálva BA-val elősegíti a gyökeresedést.

e) Céljaink között szerepelt, hogy a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékének szövettenyésztő szobájában található növénygyűjteményt az *Amaryllidaceae* családból származó *in vitro* előállított védett növényekkel egészítsük ki (Máthé és mtsai. 2012). Kijelenthetjük, hogy sikerrel jártunk.

f) Vizsgálatainkban, a továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a sikeresen előállított *in vitro* növényeink képesek-e antioxidáns aktivitást mutatni. Gyógynövények esetében tudjuk, hogy a növényben viszonylag nagy mennyiségben fellelhető fenolos vegyületek általában korrelálnak a magas antioxidáns aktivitással (Matkowski, 2008). Számos tanulmány számolt be a mi kutatásainkba is bevont *L. aestivum* szövettenyésztéséről (El Tanchy és mtsai., 2011, Bogdanova és mtsai., 2009), azonban egyikük sem vizsgálta antioxidáns aktivitásukat. A *G. reginae-olgae* hóvirág jó példa az *Amaryllidaceae* családból, ugyanis magas antioxidáns aktivitást sikerült kimutatni magas polifenol szint mellett, mind a föld feletti szervekből és a hagymából is (Conforti és mtsai., 2010). A *G. woronowii* és *S. lutea* kultúrák esetében (beleértve a *S. lutea* eredeti hagymát, ami explantátumként szolgált a szövetkultúrához), magas polifenol tartalom párosult magas ABTS \* kation „gyökfogó” aktivitással, míg a *L. aestivum* tenyészetekben alacsony szabadgyökfogó aktivitás volt kimutatható volt annak ellenére, hogy a polifenol-tartalma ezen mintáknak magas volt (7. táblázat, 15, 16. ábra). Összefoglalva elmondható, hogy bár szövettenyésztési feltételek esetében ismert, hogy megváltoztatják a szekunder metabolit termelést és az antioxidáns aktivitást (Matkowski, 2008), az ebben a vizsgálatban részt vett kultúrák képesek voltak megőrizni viszonylag magas antioxidáns aktivitásukat. A természetes auxinok jelenléte fontos az antioxidáns aktivitás megőrzése szempontjából a növény számára (Chaâbani és mtsai., 2015), az

általunk használt NAA azonban egy szintetikus auxin. NAA és BA hormontartalmú táptalaj minden kultúra esetében előfordult, ekkor magas szabadgyök semlegesítő aktivitás volt kimutatható, amikor NAA-t használtunk, mint egyedüli növekedés szabályozót (a két *Leucojum* faj esetében), nem beszélhettünk magas aktivitásról, így a BA, egy citokinin, úgy tűnik, növelni képes az ABTS \* kation gyök befogó aktivitást. Vizsgálatainkból arra lehet következtetni, hogy a szövettenyészeink antioxidáns aktivitása függ a fajoktól (genotípus), nem pedig a tenyészetekben kialakuló, regenerált szövetek típusától. Natív tavaszi tözike virágok és virághagymák viszonylag alacsony antioxidáns aktivitással rendelkeznek, mint néhány brit gyógynövény (Mantle és mtsai., 2000). Ezzel szemben, a mi eredeti *L. vernum* levélmintáinknak magas szabad gyökfogó aktivitása volt (7. táblázat, 16. ábra). A fenti vizsgálatok azt mutatják, hogy a másodlagos metabolit tartalom erősen genotípus és szervfüggő (explantátum függő) akár egyetlen faj esetében is.

A DPPH gyök mérésének előnye, hogy kereskedelmi forgalomban kapható és igen stabil, de erősen fény-, oldószer-, pH -és oxigénfüggő is (Cao és Prior, 1998). Azonban a DPPH gyök semlegesítésén alapuló módszer az élő sejtekben elő nem forduló szabadgyököt használ (Frankel és Meyer, 2000), ami a kísérletekben hátrány, hiszen nem hasonlít, az élő szervezetben fellelhető szabadgyökökhöz. A mi esetünkben nem ez a módszer mutatta a legjobb szabadgyök semlegesítő aktivitási értékeket. Mintáink DPPH gyök megkötési képessége alacsony volt. Szövettenyészeink közül a  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA+  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA táptalajon nevelt *S. lutea* szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásainknak volt a legmagasabb értéke, amely közel 40%-os volt (8. táblázat, 17. ábra).

g) Több szövetkultúra esetén voltak eltérések a szabadgyökfogó aktivitás és a peroxidáz tevékenységek között. A legszembetűnőbb példa a *G. woronowii* és *S. lutea*, ahol mind az embriogén kallusz és a regenerált hajtások is kiváló szabadgyökfogó aktivitással rendelkeztek, míg az enzimatikus antioxidáns (pirogallol peroxidázok) tevékenysége alacsony, vagy nem kimutatható. Szakirodalom szerint azonban, a nem enzimes antioxidáns reakciók, mint az ABTS \* kation gátlási vizsgálatok azt mutatják, hogy a „gyökfogó” képesség a változatos oxigénygyökök révén (Katalinic és mtsai., 2006; Miliauskas és mtsai., 2004), és az enzimes antioxidáns vizsgálatok, mint a peroxidáz tevékenység nem mindig korrelálnak egymással. Így a *G. woronowii* és *S. lutea* esetében kis molekulatömegű vegyületek (polifenolok), és nem enzimatikus antioxidánsok voltak felelősek a magas antioxidáns aktivitásért. A *S. lutea* és *L. vernum* tenyészetek esetében a guajakol peroxidáz aktivitások 2-ME nélküli kivonatok esetén viszonylag magasak voltak. Mivel a 2-ME-ről ismert, hogy gátolja bizonyos peroxidázok aktivitását (Chanwun és mtsai., 2013), ezt a vizsgálati eljárást elvégeztük 2-ME jelenlétében és hiányában is. A spektrofotometriás vizsgálat azt mutatta, hogy a 2-ME kifejezetten gátló hatással volt a guajakol peroxidáz aktivitásokra, szemben a pirogallol-peroxidázzal. Konkrét aktivitás (mM oxidált guaiakol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg protein}^{-1}$ ) 2-ME hiányában a *S. lutea* esetében 32,84%-a, és a *L. vernum* esetében 60,31%-a a torma kivonatok aktivitásának (20. ábra). Azt azonban elmondhatjuk, hogy minden *Amaryllidaceae* szövettenyészet, peroxidáz aktivitása jelentősen alacsonyabb volt, mint a kontrollként ismert torma gyökér kivonatának enzimaktivitása.

Kataláz enzim nem igényel semmilyen szerves kosubsztrátumot a  $\text{H}_2\text{O}_2$  lebontásához. Aktivitását közvetlenül meghatározza a jelenlévő  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció (Choen és mtsai., 1970; Láng, 1998; Smirnoff, 2005;). Kísérleteinkben, a szövettenyészetekben a kataláz enzim aktivitás közel

azonos értékeket mutat, vagy magasabbat az eredeti élőhelyről begyűjtött növényeinkhez képest, ahogyan a *L. vernum* 2 mg l<sup>-1</sup> NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növényi mintánk esetében is. Azonban ezek az értékek messze elmaradnak a *L. minor* vagyis a kontroll mintánktól. Ami arra enged következtetni, hogy az eredeti élőhelyről begyűjtött növényi mintáink és a szövettényészetekben is a kataláz enzim aktivitása alacsony.

Összefoglalva elmondható, hogy sikeresen hoztunk létre szövettényészeteket hat *Amaryllidaceae* fajból. Ezek a kultúrák potenciális jelentőséggel bírnak génbank megőrzése szempontjából a Közép-Európában és az egész Európában megtalálható veszélyeztetett amarilliszfélék tekintetében. A *G. nivalis* esetében, először írtunk le kallusztényészeteket szomatikus embriókból (Resztár és mtsai., 2014). A *G. woronowii* és *S. lutea* szövettényésztése ebben a kutatásban valósult meg először. Négy fajból (*G. woronowii*, *L. vernum*, *L. aestivum*, *S. lutea*) *in vitro* létrehozott növények antioxidáns aktivitását első alkalommal nekünk sikerült elemezni és a természetben található egyedekkel összehasonlítani. *Leucojum aestivum* és a *Sternbergia lutea* esetében embrionális és szomatikus embriókból neveltünk hajtásokat vagy teljes növényeket. Ezzel szemben, *in vitro* hajtásokat vagy egész növényt lehetett előállítani *Galanthus woronowii* és *Leucojum vernum* explantátumokból szomatikus embrió képződése nélkül. A vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy jó szabadgyök semlegesítő aktivitásukat megőrzik, az explantátum forrásként használt eredeti élőhelyről származó növények különböző szerveivel ezek az aktivitások összemérhetőek. A *G. woronowii* és a *S. lutea* kultúrák, a magas nem-enzimatikus antioxidáns aktivitásuk kapcsán, farmakológiai célokra potenciálisan felhasználhatóak, amely további kutatásokat igényel.

## 6. English summary

Nowadays, basic knowledge on nature is important for the education of future generations. The principal aim of this dissertation is to bring some idea about the *Amaryllidaceae* family, in particular the *Galanthus*, *Leucojum* and *Sternbergia* genera. For *Amaryllidaceae in vitro* culture methods were developed for a significant number of endangered and economically important taxa. Several of them may serve as sources for pharmacologically important compounds (alkaloids, lectins) as well.

**a)** *Galanthus nivalis* callus cultures were created from bulb explants on media containing 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA and 10 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA. These calli developed intact green shoots after stable maintenance and cultivation at a 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA hormone combination (fig. 5. a, e, h, k, l). From these shoots, bulblets could be regenerated on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA MS medium (fig. 6. f). *G. elwesii* and *G. woronowii* callus cultures were created from bulb explants on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA and 10 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA medium. *G. elwesii* calli produced intense green sprout bulbs during long-term subculture on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg l<sup>-1</sup> IAA, thus a medium containing only auxin hormone was used (fig. 12.). In case of *G. woronowii* callus at high auxin concentration roots and shoots were formed, the whole plants produced bulblets on a later stage on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA (fig. 12 d.).

**b)** For *Leucojum aestivum* and *L. vernum* lowering auxin content of media was successful in callus/culture initiation and maintenance. For spring snowflake 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 1 mg l<sup>-1</sup> BA containing medium resulted in shoot and bulblet formation. When young shoots were transferred to 2 mg l<sup>-1</sup> NAA + 2 mg l<sup>-1</sup> IBA containing medium, the bulbs have continued to grow and roots differentiated (fig. 13 a, c). For summer snowflake next to the callus

formation, whole plant formation with a complete root system was observed in the presence of 2 mg l<sup>-1</sup> NAA (fig. 13 d, e, f).

c) During the initial tissue culturing of *Sternbergia lutea* on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA and 1 mg l<sup>-1</sup> BA, embryogenic calli (fig. 14 k, l) with shoot differentiation were induced. Shoot multiplication was stimulated at 2 mg l<sup>-1</sup> NAA +1 mg l<sup>-1</sup> BA hormone composition (fig. 14 i, j).

d) AFLP analysis revealed that culture line A is genetically very similar to plant samples derived from the same population from which bulb scale explants used during tissue culture originated.

e) f) In our studies, we looked further for plants produced *in vitro* with potentially high antioxidant activity. High polyphenol content coupled with a high cation ABTS \* radical scavenging activity was observed in the case of *G. woronowii* and *S.lutea* cultures, while the cultures *L. aestivum* had low free radical scavenging activity although the polyphenol content of these samples was high (Table 7, fig. 16). DPPH radical scavenging activity in our tissue cultures was low. Tissue culturing of *Sternbergia lutea* on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA and 1 mg l<sup>-1</sup> BA was the biggest DPPH radical scavenging activity (fig. 17). In conclusion, although for tissue culture conditions are known to alter secondary metabolite production and antioxidant activity (Matkowski, 2008), the cultures involved in this study were able to maintain a relatively high antioxidant activity. From our examinations it can be concluded that the antioxidant activity depends on the species (genotype) and not the nature of *in vitro* regenerated tissues.

g) There were differences between the free radical scavenging activity and peroxidase activities of the tissue cultures examined. For *G. woronowii* and *S. lutea* low molecular weight compounds (polyphenols), and non-enzymatic antioxidants have been responsible for the high antioxidant activity, rather than enzymatic reactive oxygen scavengers.

Spectrophotometric assay showed more pronounced inhibition of guaiacol peroxidase activities by 2-ME, than for pyrogallol peroxidase (data not shown). Specific activities (mM oxidized guaiacol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) in the absence of 2-ME were 32.84% of horseradish extracts for *S. lutea* and 60.31% for *L. vernum*. In the absence of 2-ME guaiacol peroxidase activity of *S. lutea* and *L. vernum* extracts was relatively high. For each tissue culture of *Amaryllidaceae*, pyrogallol peroxidase activity was considerably lower than in the positive control - horseradish extract (fig. 18, 19.). Native gels for catalase showed high activities for *Lemna minor* shoots used as positive controls and low activities for our tissue cultures and native organs used as explants. Among tissue cultures, the highest activities were detected in *Leucojum vernum* plants and *L. aestivum* embryogenic calli grown on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA. Low or no activities were detected in *G. woronowii* cultures, *L. vernum* plants grown on 2 mg l<sup>-1</sup> NAA and 1 mg l<sup>-1</sup> BA and *Sternbergia lutea* cultures (fig. 21.).

In summary, we have successfully created tissue cultures in six *Amaryllidaceae* species. These cultures have potential significance in terms of the gene bank in Central Europe and several of them being endangered *Amaryllidaceae* species found in Europe. We analyzed antioxidant activity for the first time in the four species (*G. woronowii*, *L. vernum*, *L. aestivum*, *S.lutea*) of plants established *in vitro*, and compared them to specimens found in nature. We regenerated shoots or whole plants from embryogenic calli and somatic embryos in *Leucojum aestivum* and *Sternbergia lutea*. In contrast, *in vitro* shoots or whole plants could be produced from *Galanthus woronowii* and *Leucojum vernum* explants without somatic embryo formation. Tissue culturing of *G. woronowii* and *S. lutea* was established for the first time in this study. In our studies we provided evidences for the conservation of their

excellent free radical neutralizing activity and these activities are comparable with various organs derived from original habitat of explants. The *G. worronowii* and *S. lutea* cultures have the potential to be used for pharmacological purposes because of their high non-enzymatic antioxidant activity, however further investigations are required.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek:

**Dr. Máthé Csabának** a hasznos elméleti és gyakorlati útmutatásért és a sok segítségért, mellyel nagymértékben segítette munkámat és a disszertáció elkészítését,

**Dr. Mikóné Dr. Hamvas Mártának**, aki szintén nagyban hozzájárult mind elméleti, mind gyakorlati útmutatásaival a dolgozatom létrejöttéhez

**Dr. Demeter Zitának, Freytag Csongornak, Kalydi Fruzsínának és Juhász Gabriella Petrának**, hogy munkájukkal segítették a dolgozat létrejöttét,

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Mészáros Ilonának, Dr. Vasas Gábornak, Dr. Gonda Sándornak, Dr. Surányi Gyulának, Dr. Papp Lászlónak, Dr. Mosolygó-Lukács Ágnesnek, Dr. Molnár V. Attilának, Garda Tamásnak, Mizsei Edvárdnak, Barabás Évának, Szabó Katalinnak, Barna Erzsébetnek és a SOTE Farmakognózia Tanszék munkatársai közül Prof. Dr. Szóke Évának, Dr. Balázs Andreának és Dr. Ficsor Emesének** a nélkülözhetetlen szakmai segítségéért,

a **Növénytani Tanszék** minden dolgozójának, szakdolgozójának a segítőkészségéért és együttműködéséért, a szüleimnek, és a férjemnek, hogy támogattak a tanulmányaimban, a munkámban.

A disszertáció a Kereskedelmi Bank Rt. által létesített, és a DE TEK által gondozott Universitas Alapítvány támogatásával, és Debreceni Egyetem Tehetséggondozó Program (DETEP) segítségével jöhetett létre, melyek lehetővé tették a kísérletek elvégzéséhez szükséges vegyszerek és eszközök beszerzését.

## 8. Irodalomjegyzék

- Abrankó L., Dernovics M., Fodor M., Gyepes A., Szatura Zs., Woller Á. (2010) Hagyományos, gyors és automatizált módszerek alkalmazása élelmiszerek kémiai vizsgálatára. *Nemzeti Tankönyvkiadó, Digitális Tankönyvtár*. TÁMOP 4.2.5
- Allaga J., Szántóné P. E. (1997) Növényélettani gyakorlatok *Hallgatói jegyzet* Keszthely 65.,70.
- Amako K., Asada K., Gong-Xiang C. (1994) Separate Assays Specific for Ascorbate Peroxidase and Guaiacol Peroxidase and for the Chloroplasmic and Cytosolic Isozymes of Ascorbate Peroxidase in Plants *Plant Cell Physiology*35 (3):497-504
- Ammar W. B., Nauairi I., Zarrouk M., Ghorbel M.H., Jemal F. (2008) Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants *Biologia Plantarum* 52:727
- An Z.W., Xie Z.W., Cheng Z.W., Zhou Z.W., Zhang Z.W., He Z.W., Huang Z. W. (2009) A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment *Analytical Biochemistry* Volume 391, Issue 1.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S. E., Bektasoglu B., Berker K. I., Ozyurt D. (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12: 1496-1547
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55:373-399
- Balogh E., Hegedus A., Stefanovits-Banyai E. (2010) Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae*, (125):332-336
- Balzarini J., Hatse S., Vermeire S., Princen K. (2003) Mannose-Specific Plant Lectins from the *Amaryllidaceae* Family Qualify as Efficient Microbicides for Prevention of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Mikrobicidal potential of plant lectins* 48: 3858-3870.
- Balzarini J., Hatse S., Vermeire K., Princen K. (2007) The  $\alpha(1,2)$ -mannosidase I inhibitor 1-deoxymannojirimycin potentiates the antiviral activity of carbohydrate-binding agents against wild-type and mutant HIV-1 strains containing glycan deletions in gp120. *Febs Letters*, 581: 2060-2064.
- Baskauf C. J., Burke J. M. (2009) Population Genetics of *Astragalus bibullatus* (Fabaceae) Using AFLPs. *Journal of heredity* 100(4):424-431
- Batková P., Pospíšilová J., Synková H. (2008) Production of reactive oxygen

- species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. *Biologia Plantarum*. 52:413-422
- Benner M. S., Braunstein M. D., Weisberg M. U (1995) Detection of DNA polymorphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae) *Plant molecular biology reporter* 147-155
- Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J. (2007) Alkaloids from *Galanthus nivalis*. *Phytochemistry*. 68:1791-1798.
- Berkov S., Reyes-Chilpa R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. (2007) Revised NMR data for Incartine: an Alkaloid from *Galanthus elwesii* *Molecules*12(7):1430-1435
- Berkov S., Codina C., Viladomat, F., Bastida J. (2008) N-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. – *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18: 2263–2266.
- Bhagyalakshmi N. (1999) Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. *Plant cell tissue and organ culture* 58: 205-211.
- Blazquez S., Olmos E., Hernández J.A., Fernández-García N., Fernández J.A.; Piqueras A. (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 97:49-57.
- Blois M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radicals. *Nature* (4617):1198-1200.
- Bogdanova Y., Stoeva T., Yanev S., Pandova B., Molle E., Burrus M., (2009) . Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid biosynthesis during long-term in vitro cultivation of *Leucojum aestivum* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 45:458-465.
- Boots A. W., Haenen G., Bast A. (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical *European Journal of Pharmacology* 585:325-337
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 28, 25-30.
- Brettel R. I.S,W. Wernicke,E. Thomas (1980) Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor* *Protoplasma* 104:141-148
- Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 58:79-110
- Cao G. H., Prior R.L. (1998) Comparison of different analytical methods for

- assessing total antioxidant capacity of human serum *Clinical Chemistry* 44:1309-1315
- Chaâbani G., Tabart J., Kevers C., Dommes J., Khan M.I., Zaoui S. (2015) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid combined to 6-benzylaminopurine on callus induction, total phenolic and ascorbic acid production, and antioxidant activities in leaf tissue cultures of *Crataegus azarolus* L. var. *aronia*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:16.
- Chanwun T., Muhamad N., Chirapongsatunkul N., Churngchow N. (2013) *Hevea brasiliensis* cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express* 3:14.
- Chen L., Yi Zhu X., Li Gu, J. Wu (2005) Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem *Plant cell reports* 24: 401–407
- Choen G., Dembiec D., Marcus J. (1970) M Measurement of catalase activity in tissue extracts *Analytical Biochemistry* 34: 30-38
- Choy G., Solans X., Font-Bardia M., de la Fuente G., Viladomat F., Codina C., Bastida J. (1999) Alkaloids from *Narcissus bujei* (*Amaryllidaceae*) *Phytochemistry*, 50: 183-188.
- Ciampolini F., Shivanna K. R., Cresti M. (1990) The Structure and Cytochemistry of the Pistil of *Sternbergia lutea* (*Amaryllidaceae*) *Annals of Botany* 66 (6): 703-712.
- Citoglua G. S., Acikaraa Ö. B., Yilmaza B.S, Özbekb H. (2012) Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia* 83: 81–87
- Conforti F., Loizzo M.R., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D. (2010) Quantitative determination of Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus reginae-olgae* subsp. *vernalis* and *in vitro* activities relevant for neurodegenerative diseases. *Pharmaceutical Biology* 48:2-9.
- Coppi A., Mengoni A., Selvi F. (2008) AFLP fingerprinting of *Anchusa* (*Boraginaceae*) in the Corso-Sardinian system: Genetic diversity, population differentiation and conservation priorities in an insular endemic group threatened with extinction. *Biological conservation* 141: 2000-2011
- Dalton S. J. (2013) Biotechnology Of Miscanthus *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops* 243-294
- Daniels C.W., Rautenbach F., Mabusela W.T., Valentine A.J., Marnewick J.L.(2011) Comparative antioxidant-capacity and -content of leaves, bulbs, roots, flowers and fruit of *Gethyllis multifolia* L. Bolus and *G. villosa* Thunb. Species. *South African Journal of Botany* 77:711-717.

- Darvishi E., Zarghami R., Mishani C.A., Omid M., Sarkhosh A. (2006) *In vitro* Production of Pathogen-free Plantlets via Meristem Culture in saffron (*Crocus sativus* L.). *Biotechnology* 5: 292-295
- Das K., Roychoudhury A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2:53.
- Davies K. J. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. 50:279-289.
- Davis A. (1999) The genus *Galanthus*. A *Botanical Magazine* monograph. Portland, Oregon: Timber Press.
- Deák T. (2010) Molekuláris markerek alkalmazása a szőlő magvatlanságának követésére és *Rosa* L. taxonok rokonsági viszonyainak vizsgálatára. Doktori értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Szőlészeti és Borászati Intézet, Szőlészeti Tanszék
- Demeter Z., Surányi Gy., Molnár V.A., Sramkó G., Beyer D., Kónya Z., Vasas G., Hamvas M.M., Máthé Cs. (2010) Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus* *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3: 349-353
- Demeter Z., Kanalas P., Máthé C., Cseke K., Szöllősi E., M-Hamvas M., Jámbrik K., Kiss Z., Mészáros I. (2013) Osmotic stress responses of individual white oak (*Quercus* section, *Quercus* subgenus) genotypes cultured *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 71:16-24.
- Després L., Gielly L., Redoutet B., Taberlet P. (2003) Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability *Molecular phylogenetics and evolution* 27:185–196
- Diop M.F, Hehn A., Ptak A., Chre'tien F., Doerper S., Gontier E., Bourgaud F., Henry M., Chapleur Y., Laurain-Mattar D. (2007) Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L.—relationships to galanthamine content. *Phytochem Rev* 6:137–141
- Dixit P., Mukherjee P.K., Ramachandran V., Eapen S. (2011) Glutathione Transferase from *Trichoderma virens* Enhances Cadmium Tolerance without Enhancing Its Accumulation in Transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plos One* 6: e16360
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Bouttasouna D., Stocker P., Vidal N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97: 654-660.
- Dodds J.H., Roberts L.W. (1986) Experiments in plant tissue culture. *Cambridge University Press*.
- Dudits D., Heszky L. (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia. *Agroinform*

- Dunford H.B., Araiso T., Job D., Ricard J., Rutter R., Hager L.P., Wever R., Kast W.M., Boelens R., Ellfolk N., Rönnerberg M. (1982) Peroxidases *The Biological Chemistry of Iron* 89: 337-355
- Dutta G.S., Datta S. (2003) Antioxidant Enzyme Activities during *in vitro* Morphogenesis of *Gladiolus* and the Effect of Application of Antioxidants on Plant Regeneration *Biologia Plantarum* 47:179-183
- El Tahchy A., Bordage S., Ptak A., Dupire F., Barre E., Guillou C. (2011) Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of *Amaryllidaceae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106:381-390.
- Farkas S. (1999) Magyarország védett növényei Mezőgazda Publ., Budapest 295.
- Fáry M., Andrásfalvy A., Czakó M. (1982) A vöröshagyma *in vitro* klónozása és gyakorlati jelentősége *Agrártud. Közlöny* 41. 246-247
- Fay M.F., Chase M.W. (1996) Resurrection of *Themidaceae* for the *Brodiaea alliance*, and recircumscription of *Alliaceae*, *Amaryllidaceae* and *Agapanthoideae* *Taxon* 45: 441-451
- Fodorpatáki L., Szigyártó L. (2009) A növények ökofiziológiájának alapjai. 2. fejezet- A növények kölcsönhatása a környezet biotikus tényezőivel bioaktív anyagcsere-termékek által *Kritérium Könyvkiadó, Kolozsvár.* 27-41.
- Fodorpatáki L., Szigyártó L. (2009) A növények ökofiziológiájának alapjai 8. fejezet- 12. alfejezet Oxidatív stressz és a növények antioxidáns védőrendszere *Kritérium Könyvkiadó, Kolozsvár.* 372-387.
- Frankel E. N., Meyer Á.S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1941
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental research* 50: 151-158
- George E.F., Hall M.A., Geert-Jan De K. (2008) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background.* Springer Dordrecht, The Netherlands
- Ghadiri M., Kariminia H.R., Azad R.R. (2013) Spectrophotometric determination of sulfide based on peroxidase inhibition by detection of purpurogallin formation *Ecotoxicology and environmental Safety* 91: 117–121
- Gonda S., L. Tóth, P. Parizsa, M. Nyitrai, G. Vasas Screening of common *Plantago* species in Hungary for bioactive molecules and antioxidant activity (2010) *Acta Biologica Hungarica* 61 (Suppl.), pp. 45–54
- Grubesić R.J., Vuković J., Kremer D., Vladimir-Knežević S. (2005) Spectrophotometric method for polyphenol analysis: prevalidation and

- application of *Plantago L.* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:837-842.
- Hamid M., Rehman K. (2009) Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* 115:1177-1186.
- Harris H., Hopkinson D.A. (1976) Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North Holland, Amsterdam
- Harvey A.L. (1995) The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacology & Therapeutics* 68:113-128.
- Hegyí Gy., Kardos J., Kovács M., Málnási-Csizmadia A., Micsonai A., Nyitrai L., Pál G., Radnai L., Reményi A., Vekenei I. (2013) Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet ELTE Hallgatói jegyzet: 7.fejezet Elektroforézis technikák, 7.3.Apoliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)
- Heinrich M., Teoh H.L. (2004) Galanthamine from snowdrop- the development of a moder drug againts Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge *Journal of ethnopharmacology* 92: 147-162.
- Huang D. J., Ou B. X., Prior R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.
- Ivanov I., Georgiev V., Berkov S., Pavlov A. (2012) Alkaloid patterns in *Leucjum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal of Plant Physiology* 169: 206-211.
- Jin Z. (2009) *Amaryllidaceae* and *Sceletium* alkaloids *Natural Product Reports* 26: 363-381.
- Juhász L. (2008) Élővilág-védelem Debreceni Egyetem 5. Fejezet-4. Természetvédelmi értékcsoportok Magyarországon
- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 94:550-557.
- Kerényi-N. V., Udvardy L., Baranec T. (2008) Különleges hóvirág változatok a Felvidékről 13(1); 111. oldal
- Király G. (szerk.) (2009): Új Magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei. Határozókulcsok. –Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvafő. 616 old.
- Király G. (szerk) (2007) A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai Lővér Print, Sopron, Magyarország, pp 13-50
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Láng F. (1998) Növényélettan (A növényi anyagcsere). Egyetemi tankönyv. ELTE Etvös Kiadó, Budapest. pp. 862-873, 915-984.
- Láng F. (1998) Növényélettan II. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. Szigeti Z 14. Fejezet- A növények és a stressz 950-1015

- Larcher W. (2001) *Physiological Plant Ecology*. Springer, New-York. 6. fejezet- Plants under stress 345-357, 401-416
- Loh J.P., Kiew, R., Kee A., Gan L. H., Gan Y-Y. (1999) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Provides Molecular Markers for the Identification of *Caladium bicolor* Cultivars. *Annals of Botany* 84: 155-161.
- M.-Hamvas M., Máthé C., Vasas G., Jámbrik K., Papp M., Beyer D., Mészáros I., Borbély G. (2010) Cylindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis. *Acta Biologica Hungarica* 61: 35-48.
- Mantle D., Eddeb F., Pickering A.T. (2000) Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 72:47-51.
- Magyar Közlöny 2012. 128. Szám A vidékfejlesztési miniszter 100/2012. (IX. 28.) VM rendelete 181-190.
- Maróti M. (1976) A növényi szövettenyésztés alapjai Akadémiai Kiadó, Budapest. 7. Fejezet. Az izolált tenyésztés általános technikai problémái: 300-317.
- Máthé Cs. , Demeter Z. , Resetár A. , Gonda S. , Balázs A., Szôke É. , Kiss Z. , Simon Á., Székely V., Riba M. , Garda T. , Gere B., Noszály Zs. , Molnár V. A. , Vasas G. (2012) The plant tissue culture collection at Department of Botany, University of Debrecen -Volume 56 (2) *Acta Biologica Szegediensis*
- Matkowski A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants- a review. *Biotechnology advances* 26:548-560.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85:231-237.
- Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84: 407-412
- Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M. és Rice-Evans C. A. (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Febs Letters*, 384:240-242.
- Mirici S., Parmaksız I., Özcan S., Sanca C., Uranbey S., Sarıhan E. O., Gümüşçü A., Gürbüz B., Arslan N.(2005) Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana* *Plant Cell Tissue and Organ Culture*80(3):239-246
- Mittler R., Hallak Herr E., Orvar Larus B., Camp van W., Willekens H., Inzé D., Ellis E. B. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability

- to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 14165-14170
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revive medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Oran S., Fattash I. (2005) *In vitro* propagation of an endangered medicinal bulbous plant *Sternbergia clusiana* Ker-Gawler (*Amaryllidaceae*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80 (4): 339-402
- Orhan I., Sener B. (2003) Bioactivity-Directed Fractionation of Alkaloids from Some *Amaryllidaceae* Plants and Their Anticholinesterase Activity *Chemistry of Natural Compounds* 39: 383-386
- Orhan I., Yilmaz S. B., Altun M. L., Sener L. B. (2011) Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Appraisal of the Bulb Extracts of Five *Sternbergia* Species *Records of natural products* 5:3 193-201
- Ozgen M., Reese R. N., Tulio A. Z., Scheerens J. C., Miller A. R. (2006): Modified 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1151-1157
- Pavlov A., Berkov S., Courot E., Gocheva T., Tuneva D., Pandova B., Georgiev M., Georgiev V., Yanev S., Burrus M., Ilieva M. (2007) Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems. *Process Biochemistry* 42: 734-739.
- Pawowska B. (2008) Employment of encapsulation-dehydration method for liquid nitrogen cryopreservation of ornamental plant explants propagated *in vitro* *Plant Physiology and Biochemistry In Vitro Culture of Plant Material* 20: 61-71
- Petruska F., Geda O., Resetár A., Ajtay K. (2014) A *Lemna minor*, a *Lemna trisulca* és a *Wolffia arrhiza* tenyészetek cilindrospermopszinnal szembeni érzékenységének összehasonlító vizsgálata. *Hidrológiai Közlemény* 2014/94/1. 76.
- PingHua C., MeiJuan L., ZhiPing X., RuKai C. (2004) Studies on *Galanthus nivalis* agglutinin gene genetic transformation of sugarcane. *Sugarcane* 11:1-6.
- Podani J. (2014) A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana. Vezérfonal egy nem is olyan könnyű tárgy tanulásához. C. függelék-C) A zöld növények (*Viridiplantae*) rendszertana. ELTE Eötvös Kiadó.
- Ptak A., El. Tahchy A., Wyzgolik G., Laurain-Mattar D. (2010) Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in

- Leucojum aestivum* L. cultures *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102:61–67.
- Ptak A. (2010) Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of *Leucojum vernum* L. . *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Methods in *Molecular Biology*, Vol. 589. NY: Humana Press;pp 223–233.
- Ptak A., Tanchy A., Skryzpek e., Wójtowicz T., Laurain- Mattar D. (2013) Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus *Open Life Sciences* 8(6): 591–599
- Rácz G., Rácz -Kottilla E., Szabó L. Gy. (2012) Gyógynövények ismerete. A fitoterápia és az alternatív medicina alapjai. Budapest: Galenus kiadó
- Razdan M.K. (2003) Introduction to plant tissue culture. Science Publisher, Enfield. 14-71
- Reineke A., Karlowsky P. (2000) Simplified AFLP Protocol: Replacement of Primer Labeling by the Incorporation of  $\alpha$ -Labeled Nucleotides during PCR. *Biotechniques* 28: 622-623.
- Resetár A., Demeter Z., Ficsor E., Balázs A., Mosolygó Á., Szőke É., Gonda S., Papp L., Surányi Gy., Máthé Cs.(2014) Growth regulator requirement for *in vitro* embryogenic cultures of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) suitable for germplasm preservation. *Acta Biologica Hungarica* 65:165-177.
- Resetár A., Freytag CS., Kalydi F., Gonda S., M. Hamvas M., Ajtai K., Papp L., Máthé Cs. (2017) Production and antioxidant capacity of tissue cultures from four *Amaryllidaceae* species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86(1):3525
- Rice-Evans C. A., Miller J., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.
- Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66:401-436.
- Sage D.O., Lynn J., Hammatt N. (2000) Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne *Plant Science* 150:209-216
- Sangwan R.S., Gorenflot R. (1975) *In vitro* culture of *Phragmites* tissues. Callus formation, organ differentiation and cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol* 75: 256-269.
- Santos J., Santos I., Salema R. (1998) *In vitro* production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth *Scientia Horticulturae* 76: 205-217
- Sarkadi L. (2007) Kémiai kislexikon Typotex Elektronikus Kiadó Kft. Digitális Tankönyvtár

- Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Müntz K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryogenic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 51:1423–1433.
- Schönfelder I., Schönfelder P. (2001) Gyógynövény határozó. Holló és Társa Könyvkiadó Magyarország Budapest, 22-23,110,116
- Seabrook Janet E. A. , Cumming Bruce G. , Dionne Leo A. (1976) The in vitro induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue *Canadian Journal of Botany*, 54 (9): 814-819
- Sellés M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (1999) Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids *Plant Cell Reports* 18: 646–651.
- Simon T. (2000) A magyarországi edényes flóra határozója. Nemzeti Tankönyvkiadó Budapest, 48-49, 198
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16. 144-158.
- Skoog F., Miller C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-131
- Smirnoff N. (2005) Antioxidants and reaktive oxygen species in plants, Blackwell.
- Staikidou I., Selby C., Hanks G.R. (2006) Development of a medium for in vitro culture of *Galanthus* species based on the mineral composition of bulbs. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81:537-545.
- Stanilova M. I., Ilcheva V. P., Zadorska N. A. (1994) Morphogenetic potential and in vitro micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Reports* 13 (8): 451–453
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V. (2007) Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* 71: 1741-1751
- Szalai I. (2006) A növények élete, ahogyan ma látjuk II. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest. 18. fejezet- A növények és az abiotikus környezet kapcsolata 403-419
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J. O., Dommes J. (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 13:1226-1233.
- Tauber H. (1953) Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 205: 395-400

- Takács A., Molnár V. A. (2014) Az év vadvirága 2013-ban: A nyári tözike (*Leucojum aestivum* L.) *Kitaibelia* 19 (2): 354–364
- Takos A. M., Towards F.R. (2013) Molecular understanding of the biosynthesis of *Amaryllidaceae* alkaloids in support of their expanding medical use *International Journal of Molecular Sciences* 14 (6), 11713–1174
- Tilly-Mandy A., Jambor-Benczur E., Szabo J. (2006) Results with the micropropagation of *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis* 'flore pleno' *Acta Horticulture* 725: 439–444
- Tprdamaz R. (2003) Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikaire* Baker.) bulblets. *Plant Physiology and Biochemistry In Vitro Culture of Plant Material* 16: 121–126
- Tuba Z. (szerk.) (2007) Botanika II. Bevezetés a növénytanba, algológiába, gombatanba és a funkcionális növényökológiába IV.9 A zárvatermők törzsének részletes rendszere 6.6 *Amaryllidaceae*-amarilliszfélék családja Nemzeti Tankönyvkiadó Budapest, 412–413. IV.9
- Van den Berg R., Haenen Guido R.M.M. ,H. van den Berg, Aalt Bast (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures *Food Chemistry* 66: 511–517
- Vasil I.K., Akins O-P. (1982) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum*L. (Wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110: 95–105
- Vishnevetsky J., Zamski E., Ziv M. (2003) Enhanced bud and bulblet regeneration from bulbs of *Nerine sarniensis* cultured *in vitro* *Cell Biology and Morphogenesis* 21:645–650.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research* . 23(21) 4407–4414.
- Wang H., Cao G. H., Prior R. L. (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (44):701–705.
- Wu X. L., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E., Prior R. L. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52):4026–4037
- Yasuyuki K., Mitsuhiro A., Michiyo G., Makiko N., Ryuji H., Hirofumi T., Takeda T. (1998) Oxidative intramolecular phenolic coupling reaction induced by a hypervalent iodine(III) reagent: leading to galanthamine-type *Amaryllidaceae* alkaloids *The Journal of Organic Chemistry* 63 (19) 6625–6633

## 9. A jelölt tudományos tevékenységének a jegyzéke

### Értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Resetár A.**, Freytag Cs., Kalydi F., Gonda S., M-Hamvas M., Ajtay K., Papp L., Máthé Cs. (2017) Production and antioxidant capacity of tissue cultures from four *Amaryllidaceae* species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86 (1):3525 **IF: 0,917**

**Resetár A.**, Demeter Z., Ficsor E., Balázs A., Mosolyó Á., Szőke É., Gonda S., Papp L., Surányi Gy. and Máthé Cs. (2014) Growth regulator requirement for in vitro embryogenic cultures of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) suitable for germplasm preservation 65 (2): 165–177 *Acta Biologica Hungarica* **IF: 0,589**

Máthé Cs. , Demeter Z. , **Resetár A.** , Gonda S. , Balázs A., Szőke É. , Kiss Z. , Simon Á., Székely V., Riba M. , Garda T. , Gere B., Noszály Zs. , Molnár V. A. , Vasas G. (2012) The plant tissue culture collection at Department of Botany, University of Debrecen -Volume 56 (2) *Acta Biologica Szegediensis*

### Hazai folyóiratban magyar nyelven megjelent tudományos és tudományos ismeretterjesztő cikk:

Máthé Cs. **Resetár A.**, Demeter Z. Molnár V. A. Riba M., Garda T. (2013) Védett növények- lombikból. *Élet és Tudomány* 2013/21. 652-654.

**Resetár Anna** (2016) Amarilliszfélék (*Amaryllidaceae*) védelme, különös tekintettel a hóvirágra. *Calandrella-Debrecen* 17-18.145-150.

Máthé Cs., Rátz I., Juhász G.P., Freytag Cs., **Resetár A.** Egy Gyáli Kert kikeleti értékei. *Élet és Tudomány* 2017/10. 304-306.

### Egyéb közlemény:

Petruska Fanni, Geda Orsolya, **Resetár Anna**, Ajtay Kitti A *Lemna minor*, a *Lemna trisulca* és a *Wolffia arrhiza* tenyészetek cilindrospermopszinnal szembeni érzékenységének összehasonlító vizsgálata. (2014) *Hidrológiai Közöny* 2014/94/1. 76.

## **Értekezés témaköréhez kapcsolódó konferencia előadások, posztterek jegyzéke:**

### Előadás:

- 2015**-Fiatal növénybiológusok Előadássorozata – előadás- Enzimátikus és nem enzimátikus antioxidánsok vizsgálata *Amaryllidaceae* fajok szövettenyésztésében- Pécs,2015. 02. 06.
- 2014**-Fiatal gyógynövénykutatók fóruma- előadás -*Amaryllidaceae* fajok szövettenyésztése és antioxidáns aktivitás meghatározása- Budakalász,2014. 02. 14.
- 2012**-Diószegi Szeminárium- előadás – Alkaloid termelésre alkalmas *Galanthus nivalis* szövettenyésztetek előállítására- **Resztár Anna**, Demeter Zita, Máthé Csaba
- 2012**-XIV. MAGYAR NÖVÉNYANATÓMIAI SZIMPÓZIUM- fiatal kutatók előadói verseny I. helyezése- *Galanthus nivalis* (kikeleti hóvirág) *in vitro* szövettenyésztetek előállítása és a morfogenezis vizsgálata, Budapest, 2012. 09. 28.
- 2011**-A XXX. OTDK- pályamunka Növényregenerálás *Galanthus nivalis in vitro* szövettenyésztetekből, Budapest,2011. 04. 21.
- 2010**-XII. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia-pályamunka Címe: A *Galanthus nivalis* (hóvirág) védett faj szövettenyésztése, Sopron, 2010. 04. 07.
- 2010**-Őszi Tudományos Diákköri Konferencia-pályamunkaCíme: Növényregenerálás *Galanthus nivalis in vitro* szövettenyésztetekből, Debrecen, 2010.

### Poszter:

- Resztár Anna**, Demeter Zita, Máthé Csaba, Ficsor Emese, Balázs Andrea, Szőke Éva (2014) The induction of *in vitro* tissue cultures and the study of antioxidant activity in *Amaryllidaceae* species, Szeged, MTA Szegedi Területi Bizottság Székháza
- Resztár A**, Demeter Z, Beyer Dániel, Vasas G, Máthé Cs (2010) *Galanthus nivalis* és *Crocus scpeunsiensis in vitro* tenyésztetek összehasonlító szövettenyésztési vizsgálata. XIII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Szeged, Okt. 2010

### Nemzetközi konferencia részvétel:

- Resztár A.**, Demeter Z., Máthé Cs., Ficsor E., Balázs A., Szőke É.(2013) The induction of *in vitro* tissue cultures and the study of alkaloid production in *Galanthus* species. From medicine to bionics 1<sup>st</sup> European Ph.D. Conference, Budapest