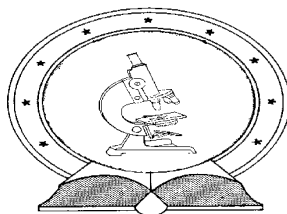


DE-TTK



1949

**Szövettenyészetek alkalmazása fehér tölgy (*Quercus alnemzetség*)
genotípusok ozmotikus stressztoleranciájának a vizsgálatára**

**The use of *in vitro* cultures in the study of osmotic stress tolerance of
individual white oak (*Quercus* section, *Quercus* subgenus) genotypes**

Doktori (PhD) értekezés

Demeter Zita

Témavezető: **Dr. Mészáros Ilona**

Konzulens: **Dr. Máthé Csaba**

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biológia Doktori Program

Debrecen, 2014

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, 20

.....

jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Demeter Zita doktorjelölt 2009-2012. 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, 20

.....

témavezető aláírása

**A fehér tölgy (*Quercus alnemzetség*) taxonokból létrehozott szövettenyészetek
alkalmazása az ozmotikus stressztolerancia vizsgálatára**

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

Írta: Demeter Zita okleveles biológia-kémia tanár
Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája
(Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Mészáros Ilona
Konzulens: Dr. Máthé Csaba

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.....

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzések.....	1
1.1	Bevezetés.....	1
1.2	Célkitűzés	3
2	Irodalmi áttekintés.....	4
2.1	A vizsgált növények jellemzése.....	4
2.1.1	A tölgyek jelentősége.....	4
2.1.2	A <i>Quercus</i> genus elterjedési területei	5
2.1.3	A fontosabb hazai tölgyfajok rendszerezése	5
2.1.4	A kísérletekhez felhasznált tölgyfajok elterjedési területei, ökológiai igénye	6
2.2	A növényi szövettenyésztési eljárásokról és jelentőségükről általánosságban	8
2.2.1	A növényi szövettenyésztésről általánosságban.....	8
2.2.2	A növényi szövettenyésztés jelentősége	9
2.3	Tölgyfajok szövettenyésztése	9
2.4	A stresszről általánosságban	12
2.4.1	A stressz.....	12
2.5	A szárazságstressz	12
2.5.1	A szárazságstressz hatásai.....	12
2.5.2	A növények szárazságstresszhez történő alkalmazkodása	13
2.6	Peroxidázok.....	13
2.7	A dezoxiribonukleázok.....	14
2.8	Szárazságstressz vizsgálata a <i>Quercus</i> fajok esetében.....	15
3	Anyag és módszer	17
3.1	A növényi alapanyag és szövettenyésztés	17
3.1.1	Szövettenyésztési eljárások fejlesztése <i>Crocus heuffelianus</i> felhasználásával	17
3.1.2	Szövettenyésztési eljárások fejlesztése és szövettenyészetek előállítása fehér tölgy taxon explantátumokból.....	18
3.2	Szövettani vizsgálatok	19
3.3	Az ozmotikus (szárazság) stressz kiváltása	20
3.3.1	Felhasznált növényi anyag:.....	20
3.3.2	Az ozmotikummal történő kezelés.....	20
3.4	Nedvestömeg-változás meghatározása	20
3.5	Helyreállítás (recovery) vizsgálata az ozmotikus stresszt követően	21
3.6	Enzimaktivitás vizsgálatok:	21
3.6.1	Növénykivonatok készítése	21
3.6.2	Peroxidáz izoenzimek aktivitásának kimutatása egydimenziós natív poliakrilamid-gélelektroforézissel.....	21
3.6.3	Az egyszálú DNS-t hasító izoenzimek aktivitásának kimutatása egydimenziós poliakrilamid-gélelektroforézissel	22
3.6.4	A poliakrilamid gélek kiértékelése	23
4	Eredmények és megbeszélésük	23

4.1	Szövettenyésztés.....	23
4.1.1	Szövettenyésztési eljárások fejlesztése <i>Crocus heuffelianus</i> felhasználásával	23
4.1.2	Hántolt <i>Quercus robur</i> makkok steril körülmények között történő csíráztatása, és stabil kallusz-vonalak létrehozása	28
4.1.3	Stabil kalluszok előállítása a <i>Lepidobalanus</i> alnemzetség taxonjainak fiatal leveleiből és barkáiból nyert explantátumokból	29
4.1.4	Gyökér morfogenezis.....	35
4.1.5	Hajtás morfogenezis	37
4.2	A PEG 6000 hatása a <i>Quercus</i> taxonok tenyészteteire	42
4.2.1	A PEG 6000 hatása a <i>Quercus</i> kalluszok vízvesztésére	42
4.2.2	A PEG 6000 hatása a <i>Quercus</i> taxonok kalluszainak viabilitására az ozmotikum kimosása után	43
4.2.3	A PEG 6000 hatása a <i>Quercus</i> taxonok peroxidáz enzimeinek aktivitására.....	46
4.2.4	A PEG 6000 hatása a <i>Quercus</i> taxonok ssDN-áz enzimeinek aktivitására	48
4.2.5	A PEG 6000 hatása a <i>Quercus</i> taxonok kalluszaiból regenerált gyökök merisztéma sejtjeinek kromatin szerveződésére	51
4.2.6	Összegzés.....	52
5	Összefoglalás.....	53
6	English summary.....	55
7	Köszönetnyilvánítás:	58
8	Irodalomjegyzék.....	59
9	A jelölt tudományos tevékenységének jegyzéke	72

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

2,4-D: 2,4 –diklór-fenoxi-ecetsav

ABA: abszcizinsav

BA: benzil-amino-purin

DAPI: 4',6'-diamidino-2-fenilindol

DN-áz: dezoxiribonukleáz

DTT: DL-dithiothreitol

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

GA₃: gibberellinsav

GD: Gresshoff és Doy alaptáptalaja

IAA: indolecetsav

IBA: indolvajsav

MS*: Gamborg vitaminnal és szacharózzal kiegészített, agarral szilárdított Murashige és
Skoog táptalaj

NAA: α-naftil-ecetsav

P24: Teasdale-féle alaptáptalaj

PBS: NaCl tartalmú foszfát puffer

PEG: polietilénglikol

PVP: poli-vinil-pirrolidon

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SOD: szuperoxid-dizmutáz

ssDN-áz: egyszálú DNS-t hasító dezoxiribonukleáz

suc: szacharóz

Tris: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol

WPM: fásásszárú növényekre kidolgozott McCown táptalaj

1 Bevezetés és célkitűzések

1.1 Bevezetés

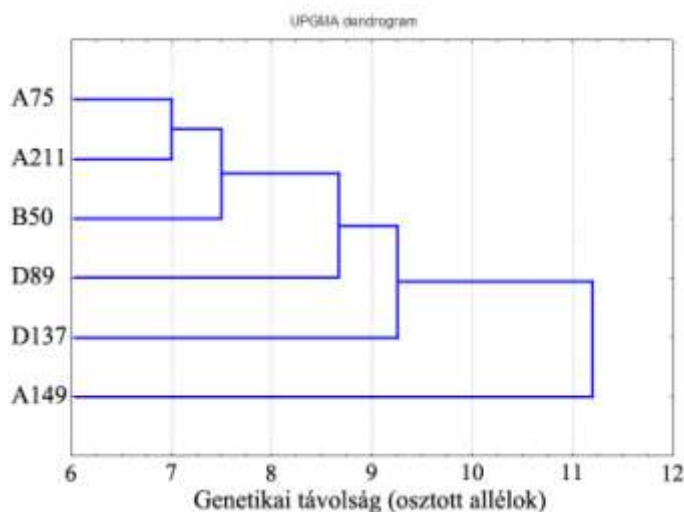
A tölgyek széles körben elterjedtek Európában, és fontos ökológiai és gazdasági szereppel rendelkeznek. A tölgyek genetikai diverzitása nagy. A *Quercus* szekciónál mutatták ki a legnagyobb genetikai és morfológiai variabilitást a *Quercus alnemzetségen* (fehér tölgy) belül (Nixon 1993). A három legfontosabb fehér tölgy a *Quercus robur* L., a *Quercus petraea* (Matt.) Liebl és a *Quercus pubescens* Willd. E három fajon kívül Európa lombos erdeiben további tölgy taxonok -*Quercus dalechampii* Ten., *Quercus polycarpa* Schur, és *Quercus virgiliana* Ten. - is előfordulnak. A *Q. dalechampii* Ten. és a *Q. polycarpa* Schur hasonlít a szűkebb értelemben vett *Q. petraea* -hoz, ezért nagyon gyakran ezt a három taxont egy fajba sorolják, és a tágan értelmezett *Quercus petraea*-ként említik őket. Hasonlóan a *Q. virgiliana* Ten. és a szűkebb értelemben vett *Q. pubescens* Willd. taxonoknak a rangjában nincs megegyezés, önálló fajként és a tágabb értelemben vett *Q. pubescens* alfajának is tekinthetők (Enescu és mtsai. 2012, 2013). A fehér tölgy taxonok fajainak kereszteződése gyakori jelenség (Lepais és mtsai. 2009, Salvini és mtsai. 2009, Lepais és Gerber 2011), ami növeli az összes faj természetes populációjának genetikai diverzitását (Borovics és mtsai. 1998, Gömöry és Schmidtová 2007, Kanalas és mtsai. 2008).

Az európai fehér tölgyek eltérő ökológiai igényűek, és különféle élőhelyeken fordulnak elő. A tölgyek elterjedése főként attól függ, mennyire képesek alkalmazkodni a vízhiányhoz, a vízfelesleghez, illetve a két jelenség váltakozásához. A három legfontosabb fehér tölgy közül a *Q. pubescens* képes a legjobban alkalmazkodni a szárazsághoz, és Európa melegebb szárazabb területein él. (Borovics és mtsai. 1998, Yurukov és Zhelev. 2001, Thomas és mtsai. 2002, Gall és mtsai. 2007, Siam és mtsai. 2009). A *Q. petraea* főként mérsékelt vagy viszonylag száraz termőhelyeken, az alacsonyabb lejtőkön, hegyvonulatokon alkot állományokat, míg a *Q. robur* az alföldek nedvesebb, átmenetileg vizenyősebb területeit népesíti be (Mátyás 1970, 1996). A *Q. dalechampii* Ten. és a *Q. polycarpa* Schur. ökológiai igényükben jobban eltérnek a szűkebb értelemben vett *Q. petraea*-tól, mert szárazságtűrőbbek, és melegebb területeken élnek. A *Q. virgiliana* Európa délebbre eső szárazabb élőhelyein fordul elő (Keresztesi 1967, Simon 1992). Ezek a tölgytaxonok, és hibridjeik jobban el tudják viselni a meleg, száraz nyári periódusokat. Ezért a tágabb értelemben vett *Quercus petraea* szárazságtűrőbb taxonjai és hibridjei fontossá válhatnak a korszerű erdészet számára, ami a jó minőségű fával rendelkező, de a nagyobb szárazságtoleranciájú természetes állományok megőrzését tartja szem előtt, a napjainkban tapasztalható, az európai tölgyállományt jelentősen befolyásoló klímaváltozás, a globális felmelegedés, a száraz periódusok gyakoriságának növekedése miatt (Matula 2008).

A magyarországi természetközeli erdők legnagyobb részét a kocsánytalan tölgy és a csertölgy kevert állományai (*Quercetum petraeae-cerris*) teszik ki. Ezt az erdőtípust reprezentálja az interdiszciplináris, hosszú távú bioszféra-kutatási program területe Sikfőkúton (Jakucs 1985), mely az 1972-ben történt alapítása óta, több nemzetközi kutatócsoporttal, kutatóhálózattal -mint pl. az IBP (International Biological Programme), az UNESCO, a MAB (Man and the Biosphere Programme), és a LTER-Europe (Long Term Ecological Research Network) – állt és jelenleg is áll kapcsolatban. Ez a kutatási terület 20,46° K földrajzi hosszúságon és 47,90° É földrajzi szélességen, 270-340 m tengerszint feletti magasságon található, az erdő és erdőössztyepp öv határán egy 2 – 3° -os délkeleties kitétségű dombvidéken helyezkedik el. A klimatikus változások hatásai meghatározóak ezen a területen (Mészáros és mtsai. 2007). Ezen a klimatikus változások hatásainak kitett területen már 40 éve intenzív erdő megfigyelő kutatások zajlanak. Az erdőállomány

összetétele jelenleg *Quercus cerris* és a *Quercus* szekció taxonjainak dominanciájával jellemezhető (Mészáros és mtsai. 2007, Kanalas és mtsai. 2009).

A 80-as évek végén nagymértékű tölgypusztulás következett be Európaszerte (Vieitez és mtsai. 2012), beleértve a Sikfőkúti erdőállományt is, ahol kocsánytalan tölgyek nagymértékű egészségromlását figyelték meg. Levélmorfológiai jellegek vizsgálatán alapuló taxonómiai elemzések szerint, a vizsgált terület fehér tölgy állományának nagy részét (70-72 %) a szűkebb értelemben vett *Quercus petraea* - teszi ki. Emellett előfordul még az állományban *Q. polycarpa* (1 %), *Q. virgiliana* (2,5 %), és *Q. pubescens* (4 %). A fehér tölgy állomány 22-23 %-a feltételezett hibridek közé sorolható: *Q. petraea* x *Q. daleschampii*, *Q. petraea* x *Q. polycarpa*, *Q. petraea* x *Q. pubescens*, *Q. petraea* x *Q. virgiliana* és *Q. virgiliana* x *Q. pubescens* (Kanalas és mtsai. 2008, 2009). Az erdőállományból a taxonómiai vizsgálatok eredményei alapján, feltehetően szárazságra érzékenyebb, illetve vízhiánnyal szemben ellenállóbb *Quercus* nemzetségbe tartozó taxonokat választottunk ki *in vitro* tenyészetek létrehozásához. A kísérletekbe bevont taxonok genetikai kapcsolatát, mikroszatellit analízissel is vizsgáltuk (Demeter és mtsai. 2014). A rügyminták DNS vizsgálata alapján, a *Q. petraea* (A149) genetikailag elkülönül az összes többi vizsgált taxontól, beleértve a *Q. pubescens* (A75) és *Q. virgiliana* (B50) is. A feltételezett *Q. petraea* x *Q. pubescens* (D89) illetve a *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* (A211) hibridek pedig ugyan abban a klaszterben találhatóak, mint a *Q. pubescens* (A75) és *Q. virgiliana* (B50). A *Q. petraea* x *Q. dalechampii* (D137) feltételezett hibridje is távolabbi rokonságban van a *Q. petraeaval*, és bár a többi taxonnal azonos klaszterbe tartozik, de ezektől is relatíve jobban elkülönül (1. ábra) (Demeter és mtsai. 2014).



1. ábra: A szárazságstressz vizsgálatokba bevont kódokkal jelölt tölgy taxonok genetikai távolságát mutató klaszter dendrogramm (Demeter és mtsai. 2014)

A növényi szövettenyésztési eljárások magukban foglalják a kallusz- és a sejtkultúrákat, valamint nagyszámú növény mikroszaporítását. Tanszékünk jó tapasztalattal rendelkezik a növényi szövettenyésztés szakterületén. Sikeresen állítottuk elő természetvédelmi szempontból fontos, védett *Crocus* fajok axenikus kultúráit (Demeter és mtsai. 2010). A növényi szövettenyésztetek jól kontrollálható, stabil kísérleti rendszerek, melyek modellrendszerként alkalmazhatóak és felhasználhatóak az abiotikus stresszfaktorok fiziológiai és biokémiai hatásainak tanulmányozásához. *In vitro* kultúrákat használtak fel az

abszcizinsav (továbbiakban ABA) embrió érési folyamatok során betöltött szerepének vizsgálatánál a *Quercus ilex* esetében (Mauri és Manzanera 2004), vagy a dehidrin fehérjék tanulmányozása folyamán a *Quercus robur*-ban (Šunderlíková és mtsai. 2009). *Quercus robur* szövettenyészetekben és *in vitro* létrehozott öt éves klónokban tanulmányozták a szárazság- és oxidatív stressz ellen védekező mechanizmusokat, stresszmetabolitokat, és az antioxidáns enzimeket, mint amilyen a szuperoxid-dizmutáz (továbbiakban SOD) és kataláz (Racchi és mtsai. 2001, Spieß és mtsai. 2012), az ozmotikus stresszindukált gének azonosításához pedig *Q. robur* és *Q. petraea* sejtszuspenziókat használtak fel (Porth és mtsai. 2005).

A tölgyek eltérően reagálnak az egyszerű és összetett környezeti stresszhatásokra (Gieger és Thomas 2005).

A szövettenyészetek jelentősége éppen abban rejlik, hogy ezekben az *in vitro* kultúrákban, a terepi fák összetett környezeti stressz hatásainak vizsgálata helyett/mellett, kontrollált körülmények között tudjuk tanulmányozni a különféle taxonok különböző stresszre adott válaszait. Az axenikus kultúrák alkalmazása lehetővé teszi a kiválasztott stresszhatás vizsgálatát, a terepi környezetben fellépő egyéb összetett környezeti hatások befolyásoló tényezőitől elkülönítve.

A vegetatív szervekből és merisztéma szövetekből létrehozott *in vitro* tenyészetek jól tükrözik az eredeti növény genotípusát, míg az embriók és a csíranövények genetikai összetétele bizonytalan a fehér tölgy taxonok fajai között fellépő hibridizáció lehetősége miatt.

A növények szárazságtűrő képességére kiválóan lehet következtetni az antioxidáns védőrendszer jelenlétéből és aktivitásából (Noctor és Foyer 1998, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Roldán-Arjona és Ariza 2009). A peroxidázok az antioxidáns enzimrendszer tagjai, amelyek csökkentik a szárazságstressz hatására megemelkedett reaktív oxigénformák (ROS) szintjét.

Abban az esetben, amikor az oxidatív stressz meghaladja az antioxidáns védőrendszer kapacitását, bekövetkezik a DNS és RNS állomány károsodása, melyet a nukleázok, többek között a szubsztrátként szimplaszálú nukleotidokat használó nukleázok aktivitásnövekedése kísér (Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Huang és mtsai. 2008, Roldán-Arjona és Ariza 2009). Az különféle stressz hatások citológiai szinten is vizsgálhatóak. A kromatinszerkezet érzékeny indikátora számos stressztípusnak, mely főként aktívan osztódó szövetekben, mint pl. gyökércsúcsban tanulmányozható a leghatékonyabban (Samardakiewicz és Woźny 2005, Huang és mtsai. 2008, Beyer és mtsai. 2009, 2012, Jámbrik és mtsai. 2011, Silva és mtsai. 2011).

Szárazság-/ ozmotikus stresszhatást *in vitro* körülmények között széles körben hiperozmotikus koncentrációjú polietilénlikol 6000 (továbbiakban PEG 6000) felhasználásával váltanak ki a magasabb rendű növényekben (lásd Guóth és mtsai. 2010).

1.2 Célkitűzés

Célul tűztük ki, hogy a Síkfőkút kutatási terület erdőállományában előforduló fehér tölgy taxonok ozmotikus és szárazságstressz tűrő képességét egy általunk kidolgozott *in vitro* modellező kísérleti rendszerben tanulmányozzuk.

A munkánk első lépéseként, célunk volt, hogy megfelelő *in vitro* módszert dolgozzunk ki. Ehhez, a *Quercus* fajoktól taxonómiai szempontból távol eső, de a tölgyekhez hasonlóan magas polifenol tartalmú (amely potenciálisan gátolja a kultúrák növekedését) ugyanakkor *in vitro* könnyen tenyészthető *Crocus* kallusztényeszeteit állítottuk elő.

Az előző tapasztalatok alapján, a munka érdemi részéhez kapcsolódó célkitűzéseket a következők szerint fogalmaztuk meg:

- a tölgy taxonok vegetatív szerveiből, stabil szövettényészetek előállítása,
- kallusvonalak létrehozása és hosszú távú fenntartása,
- a kallusok egy részéből tovább folytatva a kísérleteket, szervek, embriók és növények előállítása

A létrehozott életképes kallusz és szervtényészetek felhasználásával vizsgálni kívántuk, hogy milyen fiziológiai változásokat eredményez az ozmotikus stressz, különös tekintettel

- a nedvestömeg változásra,
- a regenerációs képességre,
- a kromatin szerveződésre,
- a peroxidáz és DNáz aktivitásra.

Alapfeltevésünk az volt, hogy a szárazsággal szemben érzékenyebb (*Q. petraea sensu stricto*) illetve ellenállóbb (*Q. pubescens*, *Q. virgiliana*) taxonok explantátumaiból származó szövettényészetek ozmotikus stresszre adott válaszreakciói eltérőek lesznek, míg hibridjeik (a *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa*, a *Q. petraea* x *Q. pubescens*, és a *Q. petraea* x *Q. dalechampii* ebben a sorrendben) átmenetet fognak képezni a két szélsőérték között.

Célul tűztük ki ennek a hipotézisnek az ellenőrzését. Ha az *in vitro* kísérletek igazolják feltevésünket a szárazsággal szemben érzékenyebb (*Q. petraea*) és szárazságtűrőbb (*Q. pubescens* és *Q. virgiliana*) taxonok esetében, akkor a kidolgozott rendszer a kevésbé ismert tűrőképességű, feltételezett hibrid taxonok vízhiányra adott válaszreakcióinak vizsgálatára is felhasználható.

Kísérleteinkkel igazolni kívánjuk, hogy az *in vitro* tenyészetek olyan egyszerűsített, stresszbiológiai kutatásokban általánosan alkalmazható kísérleti modell rendszerek, melyekben vizsgálni lehet a különböző genetikai háttérrel rendelkező tölgy taxonok szárazságtűrő képességét.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A vizsgált növények jellemzése

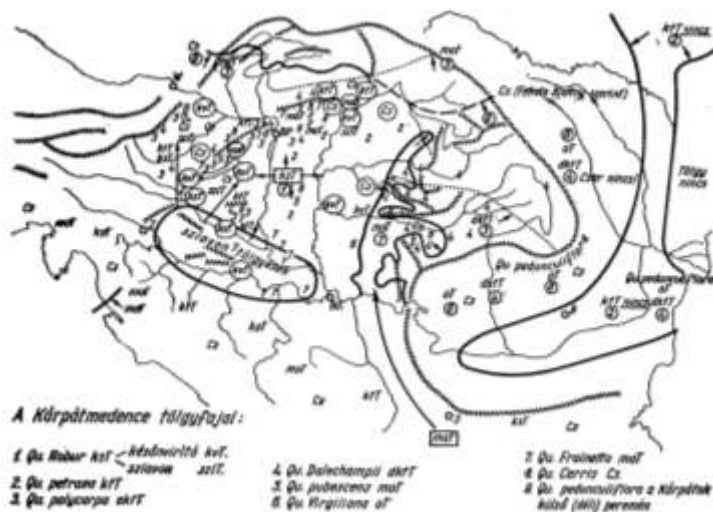
2.1.1 A tölgyek jelentősége

A hagyományok alapján Olaszország és San Marino címernövénye a tölgy, tekinthető a legrangosabb fának. E széles körben elterjedt *Quercus* nemzetséget, régebben számos nép szent faként kezelte, istenekkel hozta összefüggésbe, vallási rituálék kellékének használta. Előfordul a görög irodalomban, és különféle népek mondáiban, történeteiben, hiedelmeiben is. A nemes tölgyek fája az európai fák közül a legkeményebb, legtartósabb, legszilárdabb, legjobb villámfelfogó. Jól lehet hasítani és megmunkálni. Tüzeléshez, cserzéshez, magas-, mély- és hajóépítészethez használják fel őket főként. A hordók, vasúti talpfák, parketták, lépcsők, vízikerekek, zsilipek, épületek, bútorok, kartonok, farostlemezek, forgácslemezek készülnek belőlük (Merkle és Nairn 2005, Borhidi 2008, Vieitez és mtsai. 2012). A fiatal fák kérgéből, olyan gyógyhatású főzetet lehet készíteni, amit belsőleg hasmenés, gyomor- és bélvérzés, míg külsőleg izzadás, gyulladás és aranyér ellen használnak fel. A tölgy egyszemű makkterméseiben nagy mennyiségben található cseranyag és keményítő, ezért nem pusztán az erdő vadja és a tenyésztett disznók számára fontos táplálékforrás, hanem kiszáritva és liszté őrölve kenyeret lehet készíteni belőle, megpirítva pedig kávépótlóként illetve csemegének is lehet fogyasztani. A kocsánytalan tölgy hamuban piritott édes makkja a legízletesebb a tölgymakkok közül (Borhidi 2008).

2.1.2 A *Quercus* genus elterjedési területei

A *Quercus* genus olyan faj és formagazdag nemzetség, melynek képviselői megtalálhatóak Észak- és Közép-Amerikában, Kolumbiában, Délnyugat-, Dél-, Délkelet- és Kelet-Ázsiában, Afrika legészakiabb részén és Európában. A legtöbb tölgyfaj a mérsékelt övi lombos erdő övének legszárazabb és legmelegebb részét foglalja el, és válik a flóra meghatározó elemévé. Ezek a zónák nagy kiterjedésben Észak-Amerika keleti részén, Kelet-Ázsiában valamint Nyugat- és Közép-Európában alakultak ki (Röhrig és Ulrich 1991, Mátyás 1996). A tölgyesek produkciója a vegetációs időszakban fellépő vízhiányos időszakok miatt, alatta marad a bükkösökének vagy gyertyánosokénak, azonban a vízért folyó versengés növeli a fajgazdagságot. Közép-Európa mérsékelt kontinentális klímájában a dombvidékek társulásait alkotják a zárt tölgyesek, melyek délkelet felé haladva fokozatosan átadják helyüket a xerofil bokor- és karszterdőknek. A Kárpát-medence, Havasalföld és Kelet-Európa síkságain az erdőpuszta nyílt, ligetes tölgyesei átmeneti övezetet képeznek a kelet-európai kontinentális fűves puszták felé. Magyarország legelterjedtebb, erdőtársulása, a magyar domb- és hegyvidékek alacsonyabb fekvéseiben elterjedt, xero- és mezofil cseres-kocsánytalan tölgyes (*Quercetum petraea-cerris*). Ezek a tölgyállományok aránylag mélyebb termőréteget igényelnek, fatermő képességük jó. Meghatározó fajok a *Quercus petraea* és *Quercus cerris*, kísérő tölgyfajaik a *Quercus pubescens* (Mátyás 1996).

A tölgyek elterjedését a Kárpát-medence térségében a 2. ábra szemlélteti Mátyás (1967) alapján (Keresztesi 1967).

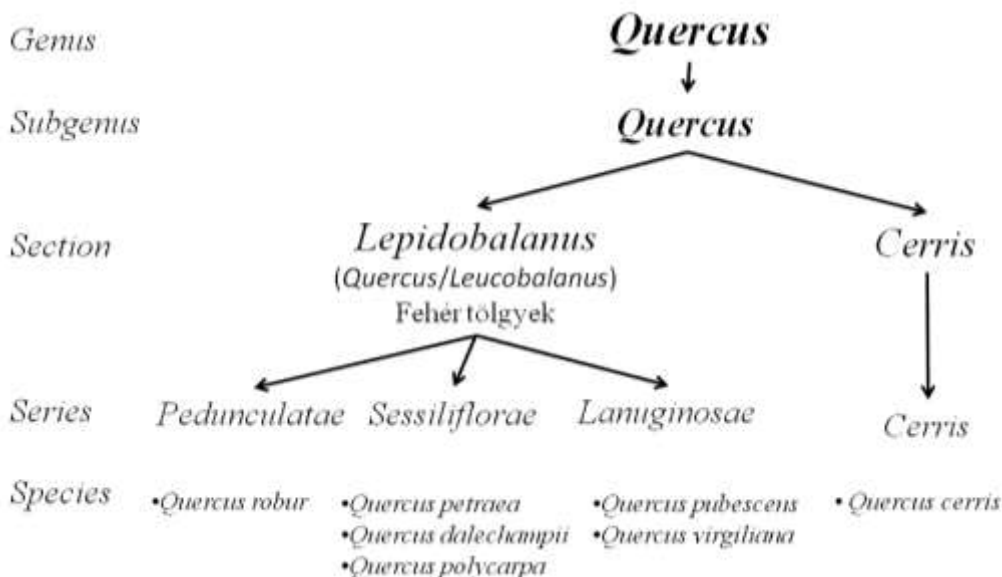


2. ábra: Tölgyek elterjedése a Kárpát-medencében (Keresztesi 1967)

2.1.3 A fontosabb hazai tölgyfajok rendszerezése

A *Quercus* L. nemzetség Földünk északi féltekéjének egyik nagy zárvatermő nemzetsége, ami mintegy 400–450 fajjal rendelkezik. A tölgyek (*Quercus* L.), rendszertanilag a zárvatermők (*Angiospermae*) törzsébe, kétszikűek (*Dicotyledones*) osztályába, kupacsosok (*Fagales*) rendjébe és a bükkfélék (*Fagaceae*) családjába tartoznak. A nemzetség tagjai a *Quercus dentata* kivételével $2n = 24$ kromoszómával rendelkeznek, három erdőszetileg fontos tölgyfaj: a *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus rubra* esetében azonban kimutattak egy 13. számfeletti, a többi kromoszómánál kisebb, morfológiailag eltérő kromoszómát is (Mátyás 2002).

A fontosabb hazai tölgyfajok további rendszertani besorolását a 3. ábra tünteti fel (Nixon 1993, Kézdy 2002, Kanalas és mtsai. 2008).



3. ábra: Fontosabb hazai tölgyfajok rendszertani besorolása (Nixon 1993, Kézdy 2002, Kanalas és mtsai. 2008)

2.1.4 A kísérletekhez felhasznált tölgyfajok elterjedési területei, ökológiai igénye

2.1.4.1 Quercus petraea

A *Quercus petraea*, *Quercus polycarpa*, *Quercus dalechampii*. olyan taxonok, melyek rangjában nincs megegyezés. Képviselőik a levél morfológiai bélyegek alapján jól elkülöníthetőek, ezért önálló fajnak is tekinthetőek, azonban nagymértékben kereszteződnek egymással és azonos környezeti feltételek között elegyesen fordulnak elő, átmeneti alakok kíséretében. Ezért ezeket a taxonokat a *Quercus petraea* alfajaiként tartják számon (Keresztesi 1967, Mátyás 1970, Simon 1992, Bartha 1997, Borhidi 2008, Kanalas és mtsai. 2008).

A tágabb értelemben vett kocsánytalan tölgy Magyarország klímazonális fafaja, amely a tenyésztőterületein uralkodó klíma által kialakított körülményekhez, talajviszonyokhoz a legjobban tudott alkalmazkodni. Elterjedési területeire, ami 200 m-től 700 m tengerszint feletti magasságra tehetőek, 550 mm-800 mm közé eső csapadékmennyiség jellemző (Keresztesi 1967).

A szűken értelmezett *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: kocsánytalan tölgy a kedvező szöveti felépítésű és színű elsőrendű fája miatt az iparban leginkább keresett, legértékesebb nemes tölgyünk. Közép-európai elterjedésű, atlantikus-mediterrán viselkedésű, mérsékelt üde vízháztartású domb és hegyvidékeink mezofil és xerofil tölgyeseinek és bokorerdőinek domináns fa faj, minden kitettségén fellelhető (Keresztesi 1967, Simon 1992, Bartha 1997).

A *Quercus dalechampii* Ten.: dárdáskarjú kocsánytalan tölgy, vagy aranytölgy szintén elsőrendű fa. Dél-európai elterjedésű, kelet-mediterrán-balkáni, kontinentális mérsékelt üde vízháztartású domb és hegyvidékeink mezofil tölgyeseinek állományalkotója vagy elegyfaja. Nagyobb kiterjedésű állományai Romániában vannak (Keresztesi 1967, Simon 1992, Koblízek 1993, Matula 2008).

A *Quercus polycarpa* Schur: erdélyi vagy sokmakkú kocsánytalan tölgy fája szintén elsőrendű. Főleg balkáni-elő-ázsiai elterjedésű, ahonnan egészen az Erdélyi-szigethegységig felhúzódik. Kontinentális, mérsékeltén üde vízháztartású domb- és alacsony hegyvidékeink meszes alapkőzetet kedvelő xerotherm nyílt bokorerdőinek állományalkotó vagy elegyfája (Keresztesi 1967, Simon 1992, Koblizek 1993, Matula 2008, 2009).

2.1.4.2 *Quercus pubescens*

A tágan értelmezett molyhos tölgy, a következő két, nálunk nagymértékben kereszteződő taxonokra különíthető el: *Quercus pubescens* és *Quercus virgiliana*. Ezeknek a taxonoknak a rangjában nincs megegyezés, önálló fajként és alfajként is tekinthetők egyaránt, képviselőik morfológiai bélyegek alapján jól elkülöníthetőek, azonos környezeti feltételek között egyenesen fordulnak elő, átmeneti alakok kíséretében (Keresztesi 1967, Mátyás 1970, Simon 1992, Bartha 1997, Kézdý 2002, Kanalas és mtsai. 2008, Enescu és mtsai. 2012).

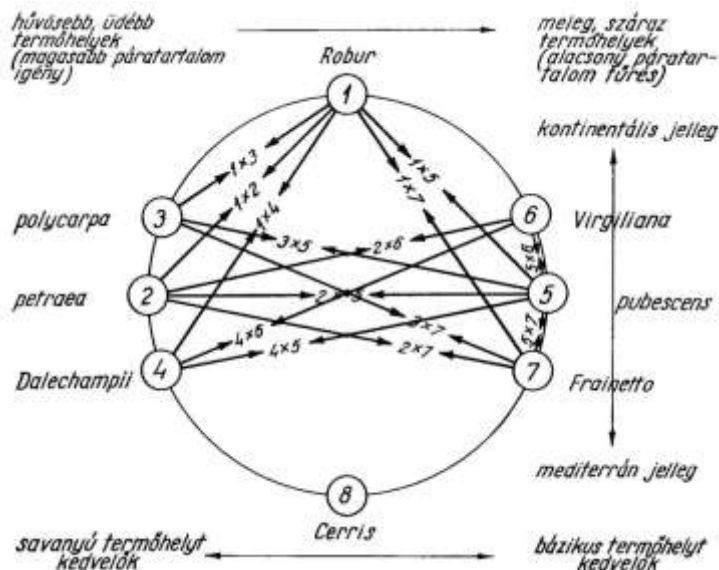
A tágabb értelemben vett molyhos tölgy gazdaságilag kis értékű faj, talajvédelmi, erdővédelmi és esztétikai szempontból azonban jelentős. Szélsőségesen száraz, sekély termőrétegű, kopárosodó, melegebb, erősebb napsugárzásnak kitett termőhelyek, déli lejtők jellegzetes faja. Elterjedési területei az alacsonyabb dombvidékek és az alsóbb hegyrészek 150-400 m tengerszint feletti magasságán fordulnak elő, ahol az évi csapadék mennyisége nem haladja meg 750 mm-t. Nagyon jó az alkalmazkodó képessége, valamennyi tölgyfaj közül ennek van a legtöbb hibridje (Keresztesi 1967, Simon 1992, Borovics és mtsai. 1998, Yurukov és Zhelev 2001, Thomas és mtsai. 2002, Gallé és mtsai. 2007, Siam és mtsai. 2009, Brullo és mtsai. 2012, Enescu és mtsai. 2012). A szűken értelmezett *Quercus pubescens*: molyhos tölgy fája erdészeti szempontból másod- vagy harmadrendű fa, ami a száraz klímához való alkalmazkodás révén alakul ki. Silány, száraz területeken eltörpült cserjeszerű, kedvező körülmények között 15 m magasra is megnőhet. Közép- és dél-európai, kaukázusi, kisázsiai elterjedésű, szubmediterrán-atlantikus viselkedésű, száraz vízháztartású, meszes alapkőzetű xerotherm területek bokorerdőinek domináns faja. Több meleget és nagyobb szárazságot képes elviselni, mint a kocsánytalan tölgy (Keresztesi 1967, Simon 1992, Camarda 2003, Gallé és mtsai. 2007, Siam és mtsai. 2009).

A *Quercus virgiliana* Ten.: olasz molyhos tölgy sűrű, széles koronájú másodrendű fa. Dél-európai, Appennini félszigeten is honos, északon a Kárpátok vonulatáig terjedő melegkori reliktum. Szubmediterrán-kontinentális viselkedésű, száraz vízháztartású, meszes alapkőzetű xerotherm dombok területek bokorerdőinek, síkvidéki elősztyeppéknek domináns vagy kísérő faja (Keresztesi 1967, Simon 1992, Coldea és mtsai. 2010, Ofletea és mtsai. 2011).

2.1.4.3 A *Lepidobalanus alnemzetség* hibridjei

A *Lepidobalanus alnemzetség* fajainak kereszteződése gyakori jelenség (Lepais és mtsai. 2009, Salvini és mtsai 2009, Lepais és Gerber 2011), ami helyenként hibridekben gazdag, interspecifikus populációk alakulásához vezet. A hibridek eredetére ilyenkor jellegelemzéssel következtetnek vissza (Simon 1992, Borovics 1997, 1999, Kanalas és mtsai. 2008, 2009).

Az általuk vizsgált tölgyfajok és hibridjeik rendszerét ökológiai vonatkozásban Mátyás Vilmos (1967) ábrája szemlélteti (Keresztesi 1967) (4. ábra).



4. ábra: A Kárpát-medence tölgy fajainak ökológiai rendszere és az ismert hibridizációs utak (Mátyás 1967)

2.2 A növényi szövettenyésztési eljárásokról és jelentőségükről általánosságban

2.2.1 A növényi szövettenyésztésről általánosságban

A növényi szövettenyésztési eljárások magukba foglalják a kallusz, a sejtuszuspenziós és a protoplaszt tenyésztéseket, valamint az *in vitro* növényregenerálási és mikropropagációs eljárásokat. A szövettenyésztési módszerek azon az elven alapulnak, hogy minden élő növényi sejt totipotens. Megfelelő körülmények között, a differenciálódott szövetekből származó élő sejtek, képesek dedifferenciálódás során, folyamatosan osztódó, merisztematikus állapotú sejttekké (kalluszt, hegyszövetet) alakulni, majd redifferenciálódás során újra teljes növényé fejlődni. (Dudits és Heszký 2003, Razdan 2003, Szalai 2006). A morfogén folyamatok szabályozása növényi hormonok egymás közötti arányának manipulálásával valósul meg (Skoog és Miller 1957, Kamada és Harada 1981, Rajasekaran és mtsai. 1987, Etienne és mtsai. 1993, Fernández-Guijarro és mtsai. 1995, Razdan 2003, George és mtsai. 2010). Az *in vitro* tenyésztet kialakításához, bármilyen élő sejtet tartalmazó növényi rész alkalmas (Maróti 1976). Tenyésztet a legkönnyebben proembriókból, kambális és merisztéma szövetekből lehet előállítani, mert ezekben az explantátumokban sok az osztódó, differenciálatlan sejt. A differenciálódott szövetek esetében, egy dedifferenciálódási folyamat beindítása, kalluszindukció is szükséges, ami gyakran növényi hormonok, elsősorban auxinok és citokininek hozzáadásával valósítható meg (Dudits és Heszký 2003, Razdan 2003). Az izolált tenyészetekben a sterilitás alapvető követelmény.

A megfelelő összetételű táptalajra helyezett explantátumon, megfelelő steril körülmények között, fajtól függően néhány nap vagy akár több hét elteltével megindul a kalluszképződés folyamata. A kalluszosodást gyakran szövetduzzadás előzi meg. A növekedés üteme, mértéke, a differenciálódás foka fajtól, genotípustól és a tenyésztés körülményeitől függően eltérő (Maróti 1976). A kalluszk sejttöszetetele relatíve heterogén, főként parenchimatikus sejtek alkotják. A kalluszk fejlődésének, differenciálódásának irányát az auxin és citokinin

típusú hormonok megfelelő arányai befolyásolják (Fernández-Guijarro és mtsai. 1995, Dudits és Heszky 2003, Razdan 2003, George és mtsai. 2010).

Az egyedfejlődés egyik kiváltható és fenntartható módja az embriogenezis, az így keletkező szomatikus embrió növényké fejlődik. Ez a folyamat egyetlen sejtől indul ki, és morfológiailag nagyon hasonlít a zygótikus embriogenezishez. A szomatikus embriókban kisebb, vagy hiányzik a szuszpenzor és a sziklevél (Razdan 2003, Demeter és mtsai. 2010). Az ontogenezis másik bevált módja az organogenezis, amit több sejt generál együttesen, és szervek megjelenését eredményezi. Egypólusú tenyésztő kúpok jönnek létre a járulékos merisztéma differenciálódás során kialakult, centrálisan csoportosult tracheida központok körül, amely továbbfejlődésének irányát a tápközeg hormon tartalma határozza meg. A viszonylag magas auxin koncentráció főként gyökér, míg az alacsony rügy képződését váltja ki. Az ellentétes pólusregenerálódást, az előző szerv kialakulását követően, egy eltérő hormon-összetételű új táptalajon lehet kiváltani (Skoog és Miller 1957, Dudits és Heszky 2003, Razdan 2003, Haraszty 2004).

2.2.2 A növényi szövettenyésztés jelentősége

A növényi szövettenyésztési eljárások költsége viszonylag alacsony. A növényi szövettenyészetek alkalmasak:

- egyedfejlődés tanulmányozására
 - laboratóriumi modell kísérleti rendszerek kidolgozására
 - ivaros úton nehezen szaporítható növények tömeges előállítására
 - haploid, poliploid és homozigóta diploid genomú egyedek létrehozására
 - fiziológiai összeférhetlenség elemzésére
 - transzgénikus növények előállítására
 - fajok, fajták gyors felszaporítására és konzerválására (mélyfagyasztott sejtenyészetek és embriókultúrák)
 - másodlagos anyagcseretermékek (pl. gyógyszerek, gyógyhatású anyagok) termelésére (sejtszuspenziós tenyészetekben)
 - vírus és kórokozómentes növények előállítására
- (Dudits és Heszky 2003, Szalai 2006, Demeter és mtsai. 2010)

2.3 Tölgyfajok szövettenyésztése

A tölgyek szaporítása hagyományos módszerekkel, vegetatív szervekkel, nehezen oldható meg, és a makkok sem tárolhatóak sokáig, mert csírázó képességüket hamar elveszítik (Hendry és mtsai. 1992, Sanchez és mtsai. 1996, Racchi és mtsai. 2001). A vegetatív szaporítás azonban nélkülözhetetlen a jó minőségű genotípusok fenntartásához, fejlesztéséhez, és a génkészlet megőrzéséhez (Savill és Kanowski 1993). Az utóbbi időben sikerült a *Quercus* nemzetség számos fajára, mint pl. *Q. cerris*, *Q. suber*, *Q. alba*, *Q. galuca*, *Q. leucotrichophora*, *Q. rubra*, *Q. acutissima* és a *Q. robur* kidolgozni mikroszaporítási eljárásokat, melyhez akár 100 évnél idősebb növényből is származhatnak az explantátumok. Ezeknek az eljárásoknak egy részét az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A *Quercus* nemzetség fajainak mikropropagációjára kidolgozott eljárások.

Faj	Lépések	Explantátum/ inokulum	kindulási	Táptalaj	Hormon (mg ^l ⁻¹)	Morfogén válasz	Hivatkozás
<i>Q. alba</i>	1.	hajtás szegmentek		MS	2NAA 0,1BA	kallusz	Lei és mtsai. 1999
<i>Q. acutissima</i>	1.	levél		MS	2NAA 0,1BA	kallusz	Tanaka és mtsai. 1995
<i>Q. bicolor</i>	1.	barka		MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	1D 1BA	kallusz	Gingas (1991)
	2.	kallusz		MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	1BA	embrió	
	3.	embrió		1/2MS	nincs	növény	
<i>Q. cerris</i>	1.	sziklelevél		WPM	10 IBA 1BA/ 10IBA 0,5BA	kallusz	Pretova és mtsai. 1993
<i>Q. leucotrichophora Q. glauca</i>	1.	makk		3 % szacharóz agaros víz	nincs	csírázik	Purohit és mtsai. 2002
	2.	csíranövény hajtása, nódusza		MS/WPM	5BA 1GA ₃	hajtás sokszorozás	
	3.	mikrohajtás		1/2WPM	3IBA	Hajtás gyökereztetés	
<i>Q. petraea</i>	1.	portok		WPM	0,1-5BA 0,1-5D	kallusz	Jørgensen 1993
	2.	kallusz		WPM	0,5BA	embrió	
	3.	embrió		WPM	nincs	növény	
<i>Q. serrata</i>	1.	makk		MS	0,1D 0,1BA	kallusz	Sasamoto és Hosoi 1992
<i>Q. robur</i>	1.	makk		P24	1D 0,1BA	kallusz	Wilhelm és mtsai. 2004
	2.	kallusz		P24	0,2BA	embrió	
<i>Q. robur</i>	1.	levél		MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	0,05NAA 0,1BA	kallusz	Martinez és mtsai. 2003
<i>Q. robur</i>	1.	hipokotil és gyökércsúcs		MS 1 mg ^l ⁻¹ kazein	2NAA 2BA/ 2IBA 2BA	embrió	Zegzouti és mtsai. 2001
<i>Q. robur</i>	1.	hajtás szegment		WPM	0,2BA	hajtás sokszorozás	Racchi és mtsai. 2001
	2.	hajtás		1/3WPM	2IBA	gyökerezés	
<i>Q. robur</i>	1.	internódium levéldarabok		MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	4NAA 0,5-1BA	kallusz	Cuenca és mtsai. 1999, San-José és mtsai. 2010
	2.	kallusz		MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	0,1NAA 0,1BA/ 0,1IBA 0,1BA	embrió	

	3.	embrió	MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	nincs/ 0,1BA	növény	
<i>Q. robur</i>	1.	rügy	MS	0,5-2BA	hajtás	Civínová és Sladky 1990
	2.	hajtás	1/2MS	0,1-1IBA	gyökerezés	
<i>Q. robur</i>	1.	hajtás nódusz	GD	0,2BA/0,1BA	hajtás sokszorozás	San-José és mtsai. 2010
<i>Q. robur</i>	1.	levél	MS	10NAA 2,3BA/ 4NAA 0,5BA	kallusz	Toribio és mtsai. 2004
	2.	kallusz	MS	nincs/ 0,1NAA 0,1BA/ 0,05NAA 0,1BA	embrió	
<i>Q. rubra</i>	1.	levél	MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	1NAA 0,02BA	kallusz	Rancillac és mtsai. 1996
<i>Q. rubra</i>	1.	hajtás szegmentek	MS	5NAA 0,1BA	kallusz	Gary és mtsai. 1979
<i>Q. rubra</i>	1.	levél	MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	1D 1BA	kallusz	Gingas (1991)
<i>Q. rubra</i>	1.	hajtás szegment	MS	5NAA 0,1BA	kallusz	Seckinger 1979
	2.	kallusz	MS	1-5NAA 0-5BA	gyökér	
<i>Q. rubra</i>	1.	sziklevél	MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	0,1D	kallusz	Vengadesan és Pijut 2009
	2.	kallusz	MS 500 mg ^l ⁻¹ kazein	nincs	embrió	
	3.	érett embrió	MS	0,1BA 0,1GA ₃	növény	
<i>Q. rubra</i>	1.	rügyező hajtás	GD	0,5BA/ 0,1BA	hajtás	Vieitez és mtsai. 2009
	2.	hajtás	GD	5IBA	gyökerezés előkészítés	
	3.	hajtás	GD csökkentett szacharóz tartalom	nincs	gyökerezés	
<i>Q. suber</i>	1.	barka	MS 1 % aktív szén	nincs	embrió	Pintos és mtsai. 2007

A tenyészeteket kallusz indukcióhoz általában sötétben, míg a növényregeneráláshoz és hajtássokszorozáshoz 16h/8h fény/sötét fotoperiódusban $-30-60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű megvilágításon inkubálják. Többféle alaptáptalaj bizonyult alkalmasnak a tenyésztés során. A legelterjedtebben az MS-t (Murashige és Skoog 1962) alkalmazzák, a *Quercus robur* tenyészetek esetében azonban a fásszárú növényekre kidolgozott McCown tápközeg (továbbiakban WPM), a Gresshoff és Doy alaptáptalaj (továbbiakban GD) (Gresshoff és Doy 1972) és a Teasdale féle alaptáptalaj (továbbiakban P24) (1992) táptalajok is jól alkalmazhatóak. Az alaptáptalajok főként 3 w/v % szacharózt tartalmaztak (Rancillac és mtsai. 1996, Cuenca és mtsai. 1999, Pinto és mtsai. 2002, Purohit és mtsai. 2002, Zegzouti és mtsai. 2001, Toribio és mtsai. 2004, Wilhelm és mtsai. 2004, Pintos és mtsai. 2007, Vengadesan és Pijut 2009, Vieitez és mtsai. 2009, San-José és mtsai. 2010). A tölgy szövettényeszetrekre jellemző, hogy többlépéses kezelési folyamat szükséges ahhoz, hogy az explantátumokból kiindulva végül teljes növényt kapjunk. A különféle fejlődési stádiumok eltérő hormonösszetételeket és arányokat igényelnek.

2.4 A stresszről általánosságban

2.4.1 A stressz

A stressz a normálistól eltérő, szervezet működését terhelő, az életfolyamatokat gátló környezeti hatás, amely a stresszválaszt kiváltva, a növény anatómiájában, morfológiájában, fiziológiájában, biokémiai és molekuláris folyamataiban olyan változást eredményez, ami élettani alkalmazkodáshoz vezet (Láng 1998, Szalai 2006, Fodorpatáki 2009). A stresszhatás időtartama a minőségtől függően változó (Taiz és Zeiger 2002). A stressz hatására bekövetkező, génexpressziós módosulások és metabolikus változások, úgy módosítják a sejtek összetételét, hogy az újonnan keletkező enzimek, stresszfehérjék, stresszmetabolitok (antioxidánsok és ozmotikusan aktív anyagok), stresszhormonok (abszcizinsav, etilén, jazmonát) és másodlagos anyagcseretermékek segítségével minél jobban tudjon alkalmazkodni a növény a kedvezőtlen körülményekhez (Borraccino és mtsai. 1989, Láng 1998, Larcher 2001, Wang és mtsai. 2003, Mahajan és Tuteja 2005, Szalai 2006).

A stressz megnyilvánulása alapján kétféle lehet. Az egyik az eustressz (hasznos stressz), ami fokozza a fiziológiai aktivitást, a másik pedig a distressz, ami olyan erős, krónikus megterhelés, amely a fiziológiai aktivitás csökkenéséhez, az anyagcsere-folyamatok károsodásához és végül a növény pusztulásához vezethet (Larcher 2001, Wang és mtsai. 2003, Fodorpatáki 2009). A két szélsőséges típus között folytonos az átmenet, ami a kiváltó stresszor mértékétől, intenzitásától függ.

2.5 A szárazságstressz

2.5.1 A szárazságstressz hatásai

A szárazságstressz fokozatosan lép fel, és a hatását a stressz tartóssága fokozza. Vízhányástresszt eredményez a száraz talaj, az erős párolgás, a talaj magas sókoncentrációja, a fagy, és a talaj sekélysege, aminek következtében a gyökérrendszer terjeszkedése korlátozott (Láng 1998, Mahajan és Tuteja 2005, Verslues és mtsai. 2006, Fodorpatáki 2009).

A vízhányástressz gátolja a sejtfalképződést és a megnyúlásos növekedést (Szalai 2006). Hatására fokozódik a stresszhormonok (pl. abszcizinsav, etilén) termelődése, a sztómazáródás, a kavitációs embólia kialakulása, az oxidatív stressz, és a lebontó enzimek (pl. hidrolázok, lipázok, proteázok) aktivitása, míg mérséklődik az anyagszállítás, a felépítő folyamatokban résztvevő enzimek aktivitása, károsodnak a zöld színtestek és a mitokondriumok. (Cochard és mtsai. 1992, Schmadel-Hageböiling és mtsai. 1997, Boo és

Jung 1999, Larcher 2001, Rizhsky és mtsai. 2002, Taiz és Zeiger 2002, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Perales és mtsai. 2005).

2.5.2 A növények szárazságstresszhez történő alkalmazkodása

A növények vízhiány stresszhez történő alkalmazkodásának három módja az elkerülés, az eltűrés és az ellensúlyozás.

A szárazságot elkerülő növények életsiklusa rövid, a vegetatív és reprodukív életszakasza nedves időszakra korlátozódik. Ezek a növények a száraz periódust a létrehozott kiszáradástól védett, gyakran vízdékony fejlődés gátló anyagokat tartalmazó magok vagy kitartó/szaporító képletek, - mint pl. a hagyma, hagymagumó, rizóma - formájában vészelik át (Larcher 2001, Taiz és Zeiger 2002, Szalai 2006, Lambers 2008).

Eltűrést alkalmaznak az olyan növények, melyek protoplazmája könnyen kiszárad anélkül, hogy az bármiféle károsodást szenvedne, a vízhiány megszűnését követően rehidratálódás során, pedig lépésről lépésre rekonstruálják a sejtalkotókat és helyreállítják a biokémiai folyamatokat. A dehidratáció fokozódásával, még mielőtt a metabolizmus majdnem leáll, beindul egy létfontosságú védekező mechanizmus, génexpressziós folyamatok hatására a növény stresszfehérjéket, polipeptideket, és stresszmetabolitokat állít elő és halmoz fel, hogy károsodás nélkül meg tudja őrizni a sejtplazma és sejtmag makromolekuláit, a citoskeletális és membránrendszert (Larcher 2001, Taiz és Zeiger 2002, Lambers 2008).

Ellensúlyozás során a növények olyan stratégiákat vetnek be, hogy a szárazság ellenére megőrizték a szövetek megfelelő hidratáltsági állapotát, és megelőzzék a protoplazma vízvesztését.

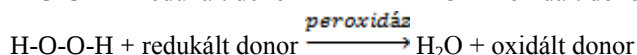
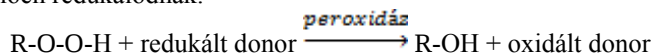
Csökkentik a párologtatási felületet, és a transzport távolságot, a kutikuláris és a sztomákon keresztüli párologtatást, növelik a gyökér-hajtás arányt (Kolb és mtsai. 1990, Larcher 2001, Leuschner és mtsai. 2001, Mittler 2002, Rizhsky és mtsai. 2002, Taiz és Zeiger 2002, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Lambers és mtsai. 2008, Pallardy 2008).

Fokozzák a sejtfal rugalmasságát, ozmoregulációs folyamatokat indítanak be, fokozzák az ionfelvételt, megnövelik az ozmotikusan aktív- (pl. mannitol, trehalóz, mioinozitol, szorbitol), és védő vegyületek, antioxidáns metabolitok (aszcorbinsav, glutation), és enzimek (SOD, peroxidázok), stresszfehérjék és aminosavak (prolin, glicin-betain, dimetilszulfoniopropionát, ozmotin) koncentrációját (Foyer és Halliwell 1976, Borraccino és mtsai. 1989, Monk és mtsai. 1989, Faria és mtsai. 1996, Noctor és Foyer 1998, Acar és mtsai. 2001, Wang és mtsai. 2003).

2.6 Peroxidázok

A peroxidázok olyan, a növényi szövetekben elterjedt vastartalmú végoxidázok, amik protohem proszterikus csoportot tartalmaznak.

Ezek az enzimek működésük során a kosubsztrátként funkcionáló hidrogén-donor vegyületeket oxidálják el. A szubsztrát szerepét betöltő peroxidok, a következő egyenletnek megfelelően redukálódnak.



(Farkas 1984, Láng 1994, Allison és Schultz 2004)

A legtöbb peroxidáznak a hidrogéndonorra nézve kicsi a specifitása, azonban akadnak olyan reakciók is, melyekben az enzim (pl. aszkorbát-peroxidáz) ko-szubsztrát specifikus. Általában a lehetséges hidrogén donorok a fenolok és fenolszármazékok, aszkorbinsav, indolecetsav (továbbiakban IAA), aminok, citokróm-c, és szerves ionok. A fenolok és fenolszármazékok peroxidatív oxidálódása során színes polimerizálódott termékek keletkeznek (Dunford és mtsai. 1982, Yamasaki és mtsai. 1997, Dixit és mtsai. 2011)

A peroxidázoknak számos izoenzimje létezik, amelyek a specifitásukban, a reakciójuk lefutásában eltérhetnek egymástól. A peroxidázok polimorfizmusát gyakran használják fel taxonómiai és populáció vizsgálatokhoz. A peroxidázok a növényben mindenütt megtalálhatóak. Jelen vannak a kloroplasztiszokban, peroxisómákban, a citoszolban, a sejtfalban és a vakuólumokban, szolubilis vagy kötött állapotban. Eloszlásuk az egyes szövetekben, szervekben az egyedfejlődés során változik (Houston 1982, Farkas 1984, Ye és mtsai. 1990, Siegel 1993, Láng 1994).

Mivel a peroxidázok génjeinek a transzkripcióját a SOD működésének mellékterméke a H_2O_2 aktiválja, ezért a növekvő SOD aktivitás, hatására a peroxidázok szintje és aktivitása növekszik.

A peroxidázok sokféle élettani szerepet látnak el a növény szervezetében (Farkas 1984, Ye és mtsai. 1990, Siegel 1993, Láng 1994).

Részt vesznek

- a másodlagos sejtfalvastagodásban, a lignin, szuberin szintézisében,
- a peroxidáz reakció révén a fenolos vegyületek oxidálásában, a koniferil és más alkoholok polimerizálásában,
- a flavonoidok lebontásának a kezdő lépéseiben,
- az egyedfejlődés, embriogenezis szabályozásában, az auxinok (IAA), valamint az etilén bioszintézisében,
- az oxidatív stressz, patogén, növényevő támadás elleni védekezésben, stressz rezisztencia kialakításában.

2.7 A dezoxiribonukleázok

A dezoxiribonukleázok (DN-áz) a nukleázok csoportjába tartozó enzimek, melyek a DNS vázában a foszfodiészter kötések hidrolitikus felbontását katalizálják (Láng 1998). A nukleinsavak olyan polinukleotid vegyületek, melyeknek fiziológiás körülmények között nagy a stabilitásuk, ezért *in vivo* csak hidrolitikus enzimek segítségével bonthatóak fel. A növények sejtmagjában, kloroplasztiszában és mitokondriumában található nukleinsav állomány degradációja szeneszcencia, apoptotikus szabályozási és növénypatológiai folyamatok során, illetve stressz hatására következhet be. Ezeknél a folyamatoknál nagymértékű nukleáz aktivitásemelkedés következik be (Wilson 1975, Smart 1994, Roldán-Arjona és Ariza 2009). Wilson (1975) alapján a nukleázok az alábbi szempontok szerint csoportosíthatóak.

1. Szubsztrát specifitás szempontjából léteznek csak RNS-t, csak DNS-t, illetve DNS-t és RNS-t egyaránt hasító enzimek. A DNS-t hasító enzimek között dupla szálú DNS-t (dsDN-áz) illetve szimpla szálú DNS-t hasító enzimeket (ssDN-áz) különböztetünk meg.
2. A hasítás helye alapján megkülönböztetünk endonukleázokat, exonukleázokat, és endo-exo nukleázokat. Míg az endonukleázok a polinukleotid lánc belsejében hasítva oligonukleotidokat hoznak létre, addig az exonukleázok a lánc végéről indulva egymás után egyesével hasítják le a nukleotidokat. Az endo-exo nukleázok mindkét módon képesek hasítani.

3. A foszfodiészter kötések hasításának módja szerint, mivel a foszfodiészter kötés mindkét irányból hasítható. Az RN-áz I és RN-áz II csoportokba tartoznak azok az enzimek, amik a nukleinsavak kötéseinek hasítása során 3'-foszfát és 5'-hidroxil véget eredményeznek. Tömegük 17-25 kDa tartományba esik. A hasítás során 5'-foszfát és 3'-hidroxil véget eredményező hidrolázok a 31-35 kDa-os nukleáz I és a 100 kD feletti exonukleáz II enzimek közé sorolhatóak, melyek rendelkeznek DNS bontó tulajdonsággal is (Wilson 1975, Green 1994).

A nukleáz enzimaktivitások eltérőek lehetnek attól függően, hogy milyen környezeti hatások érik a növényeket, és a növény mely szerveiben, szöveteiben, életciklusának mely szakaszában mérjük őket. Számos növényben identifikálták a nukleázokat. Ilyen nukleázok az *Arabidopsis* szenescencia indukált bifunkcionális nukleáza (*BFN1*), *Hordeum vulgare* egyedfejlődése során fellépő időzített szenescenciája, és sóstressz során indukálódó nukleázai (*BEN1*, *Bunc1*), a *Zinnia elegans* xilogenezise, és apoptózisa során működő nukleáza (*ZEN1*) a *Petunia* pártájának időzített szenescenciája során fellépő etilénindukált nukleáza (*PhNUC1*). Ezek a vizsgált nukleázok főként I típusú, endonukleáz aktivitású extra- vagy intracelluláris enzimek, melyek hőstabil glikoproteinek (Wilson 1975, Farkas 1982, Muramoto és mtsai. 1999, Pérez-Amador és mtsai. 2000, Langston és mtsai. 2004, Leśniewicz és mtsai. 2010).

A szimpla szálú DNS-t bontó enzimek indukcióját és a nukleázok aktivitásának emelkedését kiválthatják mechanikai sérülések, különféle stresszhatások (pl. szárazság vagy sóstressz), cianotoxinok, reaktív oxigénformák felhalmozódásai, vírus, baktérium és gomba patogének okozta fertőzésekre kialakított hiperszenzitív válaszreakciók, illetve szabályozottan lezajló időzített szenescencia folyamatok (Mittler és Lam 1995, Wood és mtsai. 1997, Muramoto és mtsai. 1999, Pérez-Amador és mtsai. 2000, Langston és mtsai. 2004, Leśniewicz és mtsai. 2010, Jámbrik és mtsai. 2011). A DN-ázok részt vesznek a növény saját sérült DNS-ének a javításában, a patogének DNS-ének degradálásában, illetve a stresszhatások membránkárosító hatására beinduló, vagy szenescencia folyamán bekövetkező apoptotikus folyamatok DNS állomány tipikus létra mintázatot mutató szegmentekre történő hasításában. Az apoptózis során lezajló DNS állomány bontásából származó nukleotidokat, foszfort és nitrogént a növény remobilizálja, és az intenzíven növekedő ép sejtek, tápanyagként újrahasznosítják (Peitsch és mtsai. 1993, Lam 1997, Muramoto és mtsai. 1999, Langston és mtsai. 2004, Mittler és mtsai. 2009, Leśniewicz és mtsai. 2010).

2.8 Szárazságstressz vizsgálata a *Quercus* fajok esetében

A tölgyfajok egy része - *Quercus pubescens*, *Quercus cerris* - mélyre hatoló szétterjedő gyökérzettel adaptálódik a szárazsághoz, mert minél mélyebben gyökerezik a fa, annál jobban tudja fedezni a szükséges vízigényét (Valentini és mtsai. 1995). Ezzel szemben más fajok a vízfelhasználási hatékonyságukat fokozzák. A *Q. ilicifolia*, *Q. prinus*, és *Q. ilex* a vízfelhasználási hatékonyságot úgy növeli, hogy az ozmotikus potenciál és a gázcseré összehangolásával alacsonyan tartja az intercelluláris szén-dioxid szintet, a levelek konduktanciáját és vízpotenciálját (Abrams és mtsai. 1990, Valentini és mtsai. 1995).

A szárazságtűrőbb tölgyfajok csökkenteni tudják a gázcserenyílásaik szabályozásával a párologtatásból származó vízvesztést, anélkül hogy a szénasszimilációs folyamataik zavart szenvednének a sztómazáródás során, mert a nagyobb koncentrációban lévő védőpigmentek (xantofilok) (Mészáros és mtsai. 2007) és az aktívabb antioxidáns rendszer segítségével képesek megfelelően eloszlatni a többletenergiát és hatástalanítani a magas hőmérséklet, erős sugárzás és fényfelesleg hatására képződő reaktív oxigénformákat (Epron és Dreyer 1993, Faria és mtsai. 1996).

Az ozmotikus stressz következtében létrejövő reaktív oxigén formák hatására a szárazságtűrőbb tölgyeknél jelentősen megnövekedik a SOD és aszkorbát-peroxidáz, glutation-reduktáz, dehidroaszkorbát-reduktáz és monodehidroaszkorbát-reduktáz, kataláz aktivitása, míg a szárazságra érzékenyebb taxonoknál ez a folyamat kisebb, vagy jelentéktelen mértékben játszódik le (Sehmer és mtsai. 1995, Faria és mtsai. 1996, Schwanz és Polle 1998, Marabottini és mtsai. 2001). A szárazságstressz fokozódásával, a szárazságtűrőbb tölgyeknél később következik be az antioxidáns védőrendszer károsodása, a lipidek, aszkorbát és glutation oxidációjának fokozódása. A magasabb szén-dioxid szint növeli az antioxidáns védőrendszer stabilitását, csökkenti a növényben az oxidatív károsodás mértékét, és növeli a SOD aktivitását (Schwanz és Polle 2001).

Az antioxidáns védőrendszer összetevőinek az aránya és aktivitása eltérő az embriók, a csíranövények, a szövettenyészetek és *in vitro* nevelt növények, különböző szöveteiben, és a fejlődési stádiumok különböző szakaszaiban (Hendry és mtsai. 1992, Racchi és mtsai. 2001). A *Q. robur* makkjai kiszáradásra érzékenyek (Roberts 1973). Az ilyen típusú makknak a szikleveleiben az antioxidáns enzimeken van a hangsúly, a SOD és glutation reduktáz aktivitása hatszor magasabb, mint a tengelyben. A tengelyben viszont a védő vegyületek, az aszkorbinsav, α -tokoferol és a glutation pool található meg nagyobb mértékben. A szomatikus embriók ozmotikus viszonyait a dehidrinek szabályozzák, a magok fejlődésének és az embriók érésének a védelmét szolgálva. Egyes dehidrin gének csak ozmotikus stressz hatására aktiválódnak a szomatikus embriókban, a csemeték leveleiben (Suderliková és mtsai. 2009). A kataláz aktivitás általában magasabb a levelekben, mint a hajtásokban. A kalluszokban differenciálódás során, gyökérképződés hatására emelkedett meg az antioxidáns enzimek aktivitása. A szövettenyészetek hajtásaiban mind a kataláz, mind a SOD aktivitása magasabb volt, mint a csíranövényekben, ami azzal magyarázható, hogy az *in vitro* tenyésztési körülmények eltérése a természetes környezeti hatásoktól, stresszfaktorként működik. Ilyen zavaró tényező lehet a növény számára a magas hormonszint, a tápközeg nagy tápanyagtartalma, bizonyos ionok nagy koncentrációban való jelenléte, a szűk közeg, melyek mind elősegítik a sejtek metabolizmusának módosulását, és a védekező rendszer aktiválását (Racchi és mtsai. 2001).

A tölgyfajok a vízfelhasználási hatékonyságukat a levelek és gázcserenyílások méretének csökkentésével, keskenyebb és kevésbé perforált farészek és nagyobb vízraktárak létrehozásával, is képesek fokozni (Abrams 1990, Mészáros és mtsai. 2011). Amíg a rövid ideig tartó, vagy enyhe szárazságstressz hatására gyorsan metabolizálható monoszacharidok: glükóz, fruktóz, galaktóz halmozódnak fel a sejtekben, addig a tartósabb, vagy erősebb stressz, a stabilabb és hatásosabb ozmolitikumok: diszacharidok, quercitol és mannitol akkumulációját eredményezik. A nitrogéntartalmú ozmoprotektánsok közül a prolin, hidroxyprolin, metilprolin és trigonellin koncentrációja emelkedik meg a szárazságstressz hatására (Spieß és mtsai. 2012).

Quercus robur in vitro létrehozott öt éves klónjaiban a szárazságstressz 588 gén aktiválódását eredményezi. A jelzésért, szabályozásért felelős gének főként a szárazságstressz első évében, míg a stressz-válaszért felelős gének nagy része a második évben aktiválódik. Serkenti a növény azokat a géneket, melyek a védővegyületek képződésének, a keményítő bomlásának, a levélpödörödésnek, szeneszenciának, transzportfolyamatoknak és kutikulaszintézisnek a transzkripciós faktorait kódolják, míg a fotoszintézissel összefüggő gének nagy része inaktiválódik. A transzkripciós szinten végbemenő változások, a szárazságstressz tartósságával párhuzamosan folyamatosan erősödnek, és összhangban vannak a morfológiai és metabolikus szinten bekövetkező stressz-válaszokkal. Az enyhe két évig tartó huzamosabb szárazságstressz adaptációs folyamatokat vált ki a tölgyben, amelyek az irreverzibilis sérülések bekövetkezésének esélyét

lecsökkentik, biztosítva ezzel a túlélést, és megkönnyítik a helyreállást a kedvezőtlen körülmények megszűnését követően (Spieß és mtsai. 2012).

A szárazságtűrőbb tölgyek hajtás- és gyökérrendszere, vízpotenciálja, vízszállító elemeinek átmérője, sztóma konduktanciája optimális körülmények között kisebb, mint a szárazságra érzékenyebb fajoké, azonban a vízhiány bennük váltja ki a legkisebb mértékű változást, asszimilációs ráta és nedváramlás csökkenést, víz- és ozmotikus potenciál ingadozást, hajtásnövekedés gátlást, és a kavitációs embólia is később alakul ki. A szárazságérzékenyebb tölgyeknél az ozmotikus-stressz hamarabb vált ki enyhe levélhervadást, levélpödörödést, szórványos korai levélsárgulást és levélhullást (Abrams 1990, Abrams és mtsai. 1990, Bréda és mtsai. 1993, Valentini és mtsai. 1995, Leuschern és mtsai. 2001, Manes és mtsai. 2006, Siam és mtsai. 2009, Mészáros és mtsai. 2011).

3 Anyag és módszer

3.1 A növényi alapanyag és szövettenyésztés

3.1.1 Szövettenyésztési eljárások fejlesztése *Crocus heuffelianus* felhasználásával

A tölgy taxonokkal tervezett vizsgálatainkhoz a szövettenyészetek előállítására rutinszerűen használható eljárást kellett kidolgoznunk. E munka során összegyűjtöttük a szakirodalomban javasolt módszereket, és különböző növényi objektumokkal előzetes vizsgálatokat végeztünk. A szövettenyésztéshez alkalmas eljárás kidolgozásához szükséges előzetes vizsgálatok egyik részét *Crocus heuffelianus* (Iridaceae) explantátumaival végeztük. Az explantátumok 2007. március-május időszakban kerültek begyűjtésre Radnalajosfalváról (Beszterce-Naszod megye, Románia). Ennél a fajnál a szövettenyésztést a *Crocus sativus* és *Crocus cancellatus* mikroszaporítására kidolgozott szakirodalom alapján terveztük meg (Bhagyalakshmi és mtsai. 1999, Plessner és Ziv 1999, Chen és mtsai. 2003, Darvishi és mtsai. 2006, Ray és Bhattacharya 2008). Explantátumként gyökeret, levelet, virágkezdeményt, hagymagumót, hajtáscsúcsot, és steril körülmények között csírázó embriókat próbáltunk ki. A csírázó embriókat olyan *Crocus* magokból nyertük, melyeket 2 hónapon át 5°C-on, sötétben tároltunk, majd sterilizést követően 12 órán keresztül 0,5 mg l⁻¹ (1,5 μM) gibberellinsavat (továbbiakban GA₃) tartalmazó folyékony MS*-ben áztattunk, és a kezelést követően 15°C-on MS*-on neveltünk tovább sötétben. A felületi sterilizálás során a szerveket 3x10 percig áztattuk 10 v/v %-os Domestos oldatban és 3x5 percig öblítettük steril vízzel. Az explantátumokat az előkészítésüket követően auxin és citokinin eltérő arányú elegyét tartalmazó 0,8 w/v % Difco-agarral, és 2 w/v % szacharózzal kiegészített, Gamborg vitamint (Gamborg és mtsai. 1968) tartalmazó Murashige és Skoog alaptáptalajra (1962) (továbbiakban MS*) helyeztük. A növényregenerálás indukciójához módosítottuk az auxin-citokinin arányokat, és lecsökkentettük a hormonkoncentrációkat a kiindulási összetételhez képest. Azt is megvizsgáltuk, hogy a makro- és mikroelemek koncentrációjának csökkentése, illetve a szénforrás mennyisége az MS táptalajban milyen hatással van az embriógén kalluszokra és a szomatikus embriókra. A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és 22+–20°C/18+–20°C fény- és hőmérsékletperióduson neveltük. Fényen történő nevelés esetén, a fényinrenzitás 60 μmol m⁻² sec⁻¹ volt.

3.1.2 Szövettenyésztési eljárások fejlesztése és szövettenyészetek előállítása fehér tölgy taxon explantátumokból

3.1.2.1 *Quercus robur* kalluszok előállítása

A szövettenyésztéshez alkalmas eljárás kidolgozásához végzett előzetes vizsgálatok második csoportjában, a Debreceni Egyetem Botanikus Kertjében kb. 95 éves *Quercus robur* fáról származó makkokat használtuk fel. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk, milyen mértékben adaptálhatóak a *Crocus heuffelianus* tenyésztése során alkalmazott eljárások, és a továbbiakban vizsgált taxonokkal azonos genuszba tartozó *Q. robur* mikroszaporításával kapcsolatos szakirodalmak módszerei. A *Quercus robur* makkokat 2009 októberében gyűjtöttük. 2 héten át 5°C-on, sötétben tároltuk. Ezt követően a felületükön sterilizáltuk (2x15 perc 30 v/v %-os NaOCl oldat és 3x5 perc steril vizes öblítés), majd lehántoltuk és hormonmentes illetve gibberellint vagy auxint és citokinint tartalmazó MS* táptalajon neveltük (2. táblázat).

2. táblázat: A *Quercus robur* embriók sterilen történő csíráztatásához, és kalluszok előállításához kipróbált hormonkombinációk

	GA ₃ (mg l ⁻¹)	2,4-D (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)	BA (mg l ⁻¹)
1.	-	-	-	-
2.	25	-	-	-
3.	50	-	-	-
4.	100	-	-	-
5.	-	1	-	0,1
6.	-	-	-	2
7.	-	-	0,05	2

3.1.2.2A síkfőkúti cseres-tölgyes állomány fehér tölgy taxonjainak vizsgálatához szükséges szövettenyészetek előállítása

A Síkfőkút Projekt kutatási terület cseres-tölgyes erdőállománya a Bükk hegység délnyugati lábánál Egertől 6 km-re (47,90° É- 20,46° K, 270-340 m t.sz.f) terül el, közel a zárt erdő és erdősztyepp zóna határához. Az erdőállományban előforduló fehér tölgy taxonok szárazságtűrő képességének összevetéséhez *in vitro* tenyészeteket alkalmaztunk. A kallusztenyészetek létrehozásához 2010 kora tavaszán (március-április) az erdőállományban 10 fáról (95-100 éves) 1-2 cm átmérőjű és 20—30 cm hosszúságú rügyekkel teli ágak kerültek benyújtásra. A síkfőkúti explantátumok az alább felsorolt, kóddal ellátott, és levélmorfológiai bélyegek alapján azonosított taxonok fájáról származtak:

A149: *Quercus petraea*

A71: *Quercus petraea*

A75: *Quercus pubescens*

D89: *Quercus petraea* x *Quercus pubescens* hibrid

A85: *Quercus petraea* x *Quercus pubescens* hibrid

B50: *Quercus virgiliana*

A211: *Quercus virgiliana* x *Quercus polycarpa* hibrid

D137: *Quercus dalechampii* x *Quercus petraea* hibrid

C211: *Quercus polycarpa*

C102: *Quercus petraea* x *Quercus polycarpa* hibrid

K28: *Quercus petraea* x *Quercus dalechampii* hibrid

Az összes explantátum ugyanarról a kutatási területről, azonos ökológiai körülmények közül, genotípusonként egyetlen kiválasztott fáról származnak.

Ezen taxonok szövettenyésztését az előzetes kísérleteink, és a *Q. robur* mikroszaporítására kidolgozott módszerek alapján terveztük meg (Cuenca és mtsai. 1999, Toribio és mtsai. 2004, Wilhelm és mtsai. 2004, San-José és mtsai. 2010).

A Síkfőkútról származó rüggyel teli ágakat vízben, szobahőmérsékleten tárolva 1 héten belül rügyfakadásra készítettük. Az éppen kibomló kb. 1 cm² területű fiatal leveleket és éretlen barkákat használtuk fel explantátumnak. A szövettenyésztési eljárásokat sterilfülke alatt hajtottuk végre. A felületükön sterilizett (3x5 perc 10 v/v %-os Domestos oldat és 3x5 perc steril vizes öblítés) explantátumokat néhány szűrővel megsebesítettük, majd auxin és citokinin eltérő arányú elegyét tartalmazó (3. táblázat) alaptáptalajra (4. táblázat) helyeztük. Minden táptalajt 0,8 w/v % Difco-agarral (ViaLab) szilárdítottunk. A WPM alaptáptalajokat 3 w/v %, az MS táptalajokat pedig 2 w/v % szacharózzal egészítettük ki. A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és 22±2°C/18±2°C fény/sötét hőmérsékletperióduson neveltük hőlégszuszítással üveg illetve steril műanyag petricsészékben. A nevelőtérben a fényintenzitás 30 µmol m⁻² sec⁻¹ volt.

3. táblázat: A fiatal levél és barka explantátumok kalluszindukciójához alkalmazott hormonkombinációk

Hormon kombinációk	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
NAA (mg l ⁻¹)	10	4	4	4	4	2	1	0,5	0,5
BA (mg l ⁻¹)	2,3	2,5	1	0,5	0,1	2	0,04	4	1

4. táblázat: A felhasznált alaptáptalaj típusok

táptalajkiegészítők	alaptáptalajok							
	WPM				MS*			
500 mg l ⁻¹ kazein	+	+	-	-	+	+	-	-
100 mg l ⁻¹ aszkorbinsav	+	-	+	-	+	-	+	-
táptalajtípusok	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.

A stabil kallusz vonalakon, a hormonok mennyiségének, arányának és minőségének megtartásával és módosításával próbáltunk organo- és embriogenezist indukálni.

3.2 Szövettani vizsgálatok

A szövettani vizsgálatokhoz 20 µm-es metszeteket készítettünk Leica Jung Histoslide 2000 mikrotóm (Leica, Nussloch, Németország) felhasználásával. A metszést megelőzően a szövetdarabokat 16 órán keresztül fixáltuk 4 v/v % formaldehidet tartalmazó egyszeres erősségű foszfát pufferes sóoldatban (továbbiakban PBS), mely 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 7,4-es pH-jú vizes oldata. Ezt követően 3x5percig mostuk 1xPBS-ben, majd a mintákat 5 órára 40 w/v % D-szacharóz tartalmú 1xPBS-be helyeztük a szöveti struktúra jobb megőrzésének érdekében. A metszéshez felhasznált szövetdarabokat fagyasztó médiumba (TBS, Durham, NC, USA) ágyasztuk be, ami polietilénoxid, polivinil alkohol és víz elegye. A fagyasztáshoz szén-dioxidot alkalmaztunk. A metszeteket PBS-ben gyűjtöttük össze (Beyer és mtsai. 2009). Ezt követően a gyökércsúcs hosszmetsetek kromatin állományát Beyer és mtsai. (2009) által közölt és általunk módosított módszerek szerint láthatóvá tettük. Ehhez a metszeteket 15 percig permeabilizáltuk 0,5 v/v % Triton X-100-at tartalmazó 1xPBS-el, majd a 3x5 percig tartó 1xPBS-el történő mosást követően 1 órán keresztül jelöltük 5 µg ml⁻¹ 4',6'-diamidino-2-fenilindollal (DAPI, Fluka, Buchs, Svájc). A mikroszkópos vizsgálatokat Olympus Camedia

4040 digitális kamerával felszerelt Olympus Provis AX-70/A fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A kromatin állományt 320-360 nm-es gerjesztő filterek segítségével vizsgáltuk (Beyer és mtsai. 2009).

3.3 Az ozmotikus (szárazság) stressz kiváltása

3.3.1 Felhasznált növényi anyag:

Az ozmotikus stressz kezeléshez, az alábbi 6 stabil szövettenyészet vonal 3 hetes kalluszait használtuk fel, melyeknek a feltételezett szárazságtűrő képessége az elterjedési területük ökológia feltételei alapján (Keresztesi 1967) esökkenő sorrendben a következő:

1. A75: *Quercus pubescens*
2. B50: *Quercus virgiliana*
3. A211: *Quercus virgiliana* x *Q polycarpa* hibrid
4. D89: *Quercus. petraea* x *Quercus pubescens* hibrid
5. D137: *Quercus dalechampi* x *Quercus petraea* hibrid
6. A149: *Quercus petraea*

3.3.2 Az ozmotikummal történő kezelés

Az ozmotikummal történő kezelést, folyékony WPM-ben oldott PEG 6000: 40 w/v%, 20 w/v%, 10 w/v%, 5 w/v%, 0 w/v% -os sorozatával végeztük 24 órán keresztül, folyamatos 100 rpm-es rázátás mellett (Sharma és Dubey 2004, Lutts és mtsai. 2004, Aazami és mtsai. 2010). A kísérleteket rendszeresen ugyanabban a délelőtti időpontban (8:15-kor) kezdtük meg, hogy a sötét periódust követően, a mintákat a kísérlet megkezdéséig minden esetben azonos ideig érje a megvilágítás. A fény és hőmérséklet viszonyok megegyeztek a szövettenyészetek fényen történő nevelésénél említettekkel. Egy Packard-küvetébe egyszerre egy kalluszt helyeztünk. A tesztrendszerben 5 ml táptalajt használtunk. Az értekezésben összefoglalt eredményeink legalább három független kísérlet adataiból származnak.

3.4 Nedvestömeg-változás meghatározása

A kalluszok ozmotikus kezelés hatására bekövetkező folyadékveszteségének mértékét, nedvestömeg-változás mérésével detektáltuk.

- A kalluszokat külön-külön folyékony WPM tápoldatban 60 percig rázattuk 100 rpm-en New Brunswick rázógépen Packard-küvetében, majd 1000 rpm-en (5000 G fordulaton) 2 másodpercig centrifugáltuk (Janetzki K23, Engelsdorf, Németország), hogy eltávolítsuk róluk a folyadékfelesleget. Ezt követően analitikai mérlegen (AA-200DS, Denver Instrument Company) 4 tizedes jegy pontossággal lemértük a nedves tömegüket. Ezután a mintákat ozmotikus kezelésnek vetettük alá. A kezelést követően, a folyadékfelesleg eltávolítását centrifugával (Janetzki K23, Engelsdorf, Németország) végeztük 1000 rpm-en 2 másodpercig szobahőmérsékleten, majd újra lemértük a minták nedves tömegét analitikai mérlegen. A kalluszok százalékos nedvestömeg változásának mértékét a következő formula alapján számítottuk ki: $\frac{NT_v - NT_k}{NT_k} \times 100$ ahol: NT_v és NT_k a kallusznak a végső és kiindulási nedves tömege. Az eredményeket a Sigma Plot 10.0 statisztikai és grafikai program alkalmazásával értékeltük és ábráztuk.

3.5 Helyreállítás (recovery) vizsgálata az ozmotikus stresszt követően

A PEG kezelt kalluszokat külön-külön folyékony WPM tápoldatban 30 percig rázattuk 100 rpm-en Packard-küvetében, hogy kimossuk belőlük az ozmotikumot. Ezt követően a kalluszokat visszahelyeztük a fenntartó táptalajra, miután a folyadék feleslegét steril szűrőpapírral felitattuk róluk, és nyomon követtük a viabilitásukat, vizsgálva az életképes zöld kalluszsövetek fennmaradásának és növekedésének képességét. 30 nap elteltével a kalluszokat ismét külön-külön folyékony WPM tápoldatban 30 percig rázattuk 100 rpm-en Packard-küvetében, majd 1000 rpm-en 2 másodpercig centrifugáltuk (Janetzki K23, Engelsdorf, Németország), hogy eltávolítsuk róluk a folyadékfelesleget. Ezt követően analitikai pontossággal lemértük a nedves tömegüket, amiből meghatároztuk a százalékos illetve a relatív nedvestömeg növekedés mértékét. A százalékos nedvestömeg növekedés mértékének kiszámításához felhasznált formula: $NT \% = \frac{NT_v - NT_k}{NT_k} \times 100$ ahol NT_v és NT_k a kallusznak a végső és kiindulási nedves tömege (Maróti 1976).

Relatív nedvestömeg változást a következő formula segítségével számítottuk ki: $NT_r = \frac{NT\%_{kezelt}}{\sum NT\%_{kontrolli}}$ ahol NT % kezelt, a kezelt kallusz (PEG 5 %, 10 %, 20 % vagy 40 %) százalékos nedvestömeg növekedése, míg a NT % kontroll, a kezeletlen kalluszok százalékos nedvestömeg növekedése.

A kísérleteket legalább háromszor ismételtük meg, egymástól független, azonos körülmények között tenyésztett azonos explantátum eredetű kalluszokkal. Az eredményeket a Sigma Plot 10.0 program statisztikai és grafikai alkalmazásával értékeltük és ábráztuk.

3.6 Enzimaktivitás vizsgálatok:

3.6.1 Növénykivonatok készítése

Az enzimaktivitások kimutatásához a kontroll és az eltérő koncentrációjú PEG oldatokkal kezelt kalluszokból 1:1 arányban (növény nedves tömege : puffer térfogata) kivonatokat készítettünk 100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH: 7,2, 8 mM $MgCl_2$, 4 mM DL-dithiothreitol (DTT) 1 v/v % Triton X-100, 2 w/v % poli-vinil-pirrolidon (PVP) (Schwanz és Polle 1998, Hernandez és mtsai. 1999, Racchi és mtsai. 2001, Dahai és mtsai. 2009, Akbulut és Cakir 2010, Baque és mtsai. 2010) tartalmú pufferrel. Az izolálás során a növényi anyagot előhűtött dörmozsarakban +4°C-on kvarchomokkal és kivonó pufferrel eldörzsöltük. A sejttartalom hatékonyabb feltárásához az eldörzsölt mintákat folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk, majd újra kiolvastottuk. Ezt követően +4°C-on lecentrifugáltuk (Biofuge pico Kendro Laboratory, Németország) 2x30 percig 13000 rpm-en (15000 G fordulaton), majd a felülúszót felhasználásig kis térfogatokban -80°C-on tároltuk. A kivonatok fehérje tartalmát Bradford (1976) módszerével az oldatok 595 nm-en mérhető fényelnyelése alapján SHIMADZU UV-1601 típusú spektrofotométeren határoztuk meg. A kalibráló sor elkészítéséhez borjú szérum albumint használtunk.

3.6.2 Peroxidáz izoenzimek aktivitásának kimutatása egydimenziós natív poliakrilamid-gélelektroforézissel

Peroxidáz enzimeket széles körben alkalmazott 7,5 %-os nem-denaturáló Laemmli-féle poliakrilamid-gélen (Laemmli 1970) választottuk el. A módszer lényege, hogy kimarad a gélből, a futtató, és a minta pufferből a nátrium-dodecil-szulfát (továbbiakban SDS). Detergens hiányában, a fehérjék mobilitását nemcsak a molekula tömeg határozza meg,

hanem befolyásolja a fehérje töltése, hidrodinamikai mérete és konformációja is, ezért ebben az esetben a peroxidáz enzim valódi méretét nem lehet meghatározni a sávok helyzete alapján. A vizsgált fehérjék sávját *in situ* enzimspecifikus festéssel tettük láthatóvá (Hajósné 1999). Ennek során az inkubáló folyadékhoz olyan szubsztrátot és festéket adtunk, amely az enzim reakció végén látható fény tartományában könnyen detektálható színes festékkomplexet adott (Kereke 1975). A festési eljárás során, a peroxidázoknak azt a tulajdonságát használtuk fel, hogy a H_2O_2 redukálása során H-donor vegyületeket oxidálnak (Láng 1994). Az enzim képes a guajakolt (2-metioxi-fenol), illetve a pirogallolt (1,2,3-trihidroxibenzol) H-donorként felhasználni. A reakció során, a szintelen guajakol oxidációt követően vörhenyes barna színű tetraguajakollá polimerizálódik, míg a pirogallol barna purpurogallinná alakul (Tauber 1953, Dunford és mtsai. 1982, Koduri és Tien 1995, Yamasaki és mtsai. 1997, Allison és Schultz 2004, Dixit és mtsai. 2011, Ghadiri és mtsai. 2013).

A felülrétegző gél mintahelyeire 10 µg fehérjetartalmú kivonatmennyiségeket vittünk fel, melyekhez SDS nélküli mintapuffert adtunk, és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. A mintákat nem forraltuk. Az elektroforézist 20-25 mA/gél áramerősségű egyenárammal, 4°C-on sötétben hajtottuk végre. Az izoenzimek láthatóvá tételéhez a géleket (13x10x0,09 cm) kétféle eljárással kezeltük. A egyik eljárás során a géleket 30-60 percig inkubáltuk 1 mM guajakolt, 10 mM H_2O_2 -ot tartalmazó 100 mM pH: 5,1-es Na-acetát pufferrel. A másik esetben a géleket 1 órán át inkubáltuk 50 mM pH: 7,5-ös K_2HPO_4/KH_2PO_4 pufferben, majd 15-30 percig festettük 20 mM pirogallolt, és 5 mM H_2O_2 -ot tartalmazó 50 mM pH: 7,5-ös K_2HPO_4/KH_2PO_4 pufferben. A sávokat látható fényen detektáltuk.

3.6.3 Az egyszálú DNS-t hasító izoenzimek aktivitásának kimutatása egydimenziós poliakrilamid-gélelektroforézissel

DN-áz enzimek kimutatásához, a széles körben alkalmazott 10 %-os Laemmli-féle poliakrilamid-gélrendszert (Laemmli 1970) használtuk fel. A módszer lényege, hogy az SDS-t tartalmazó poliakrilamid aktivitás gélekbe polimerizáljuk az enzimnek megfelelő szubsztrátot, és a futtatást, mosást és az enzimműködéshez alkalmas körülmények (megfelelő puffer, pH, hőmérséklet, időtartam) között történő inkubálást követően, a szubsztrátot hasító fehérjék sávját negatív festési eljárással tehetjük láthatóvá, melynek során olyan festéket alkalmazunk, ami a szubsztráthoz kötődik (Stein és Hansen 1999, M-Hamvas és mtsai. 2003, Jámbrík és mtsai. 2011). Az egyfonalú DNS-t hasító fehérjék kimutatásához szimpla szálú csirke vér DNS-t (végcc. 15-17 µg ml⁻¹) polimerizáltunk szubsztrátként a gélekbe (13x10x0,15 cm) (Laemmli 1970, M-Hamvas és mtsai. 2003). Az egyfonalú DNS-t, csirke vér DNS denaturálásával (10 perc forralás után hirtelen, jégben történő lehűtés) állítottuk elő.

A felülrétegző gél mintahelyeire 20 µg fehérjetartalmú kivonatmennyiségeket vittünk fel, melyekhez 2 v/v % SDS-t tartalmazó mintapuffert adtunk, és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. A mintákat nem forraltuk. A mintákkal párhuzamosan a relatív molekulatömeg meghatározásokhoz markert is futtattunk. Az elektroforézist 20-25 mA/gél áramerősségű egyenárammal, +4°C-on sötétben hajtottuk végre. Hogy elkerüljük a molekulatömeg marker fehérjék degradálódását, az elektroforézist követően, a markert tartalmazó gélcsíkokat azonnal levágtuk, és Meyer és Lamberts eljárása alapján Coomassie Blue R250-nel megfestettük (Meyer 1965). A festék elektrosztatikus és van der Waals-erővel kötődik a fehérjékhez (Kereke 1975).

Az enzimeket tartalmazó gélrészt, steril bidesztillált vízzel (5 perc), 10 mM pH: 6,8-as Tris-HCl (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol) pufferrel (30 perc), 20 v/v %-os izopropanolt tartalmazó 10 mM pH: 6,8-as Tris-HCl pufferrel (2x10 perc) és újra 10 mM pH: 6,8-as Tris-HCl pufferrel (20perc) mostuk. Ezáltal eltávolítottuk az SDS-t és lehetővé tettük

az enzimek renaturálódását. A géleket ezt követően friss pH: 6,8-as Tris-HCl pufferben 39°C-on, egy éjszakán át (14 óra) inkubáltuk. A DN-áz géleken etidium-bromidos ($0.5 \mu\text{gml}^{-1}$) festést (Gersten és Gabriel 1992) alkalmaztunk. A gélbe polimerizált DNS narancsvörös fluoreszcenciát mutatott 254 nm hullámhosszú UV fényen, míg a DNS-t emésztő enzimek sávjai sötétek maradtak, nem fluoreszkáltak.

3.6.4 A poliakrilamid gélek kiértékelése

A poliakrilamid gélek enzimsávjainak („band”-ek) intenzitását CpAtlas® program felhasználásával határoztuk meg, míg az SDS tartalmú géleken detektált „band”-ek relatív molekulatömegét UVI-TEC® program segítségével állapítottuk meg. A sávintenzitások meghatározásánál minden mintánál ugyanaz az egy sávot vettük figyelembe. Legalább három, egymástól független kísérlet géljeit elemeztük. Az eredményeket a Sigma Plot 10.0 program statisztikai és grafikai alkalmazásával értékeltük és ábráztuk. Az eltérő színű oszlopok a különböző tölgygenotípusok kalluszainál vizsgált tulajdonság változások középértékei. A sávok a szórást jelölik. A csillagok a szignifikáns eltérést jelölik a különböző koncentrációjú PEG 6000 kezelések között ugyanannál a genotípusnál, míg a betűkódok a kalluszvonalak közötti szignifikáns különbségeket mutatják ugyanannál a PEG 6000 kezelésnél. A szignifikáns különbségek $p < 0,05$ (Jámbrik 2011).

4 Eredmények és megbeszélésük

4.1 Szövettenyésztés

4.1.1 Szövettenyésztési eljárások fejlesztése *Crocus heuffelianus* felhasználásával

Életképes, hosszútávon fenntartható embriogén kalluszkultúrák indukciójához a hagymagumóból kiperarált hajtáscsúcs és a steril magvakból fejlődő csíranövény bizonyult a legalkalmasabb explantátumnak. Az axenikus körülmények között tartott magok nagyon kis hányada, 1/10-e volt csírázóképes. A magok csírázása 2-12 hónapos intervallumban következett be. Az explantátumokon 30-60 napos nevelést követően jelentek meg az első generációs kalluszok. A kallusz indukció és fenntartás a 10 mg l^{-1} α -naftil-ecetsav (továbbiakban NAA) és 1 mg l^{-1} BA hormon-összetételű, 2 w/v % szacharózt tartalmazó 0,8 w/v % agarral szilárdított MS* táptalajon volt a leghatékonyabb (5. b., c. ábra). Ezen a táptalajon a kalluszok fejlődése a globuláris stádiumú embriók megjelenéséig tartott (5. j., j'. ábra). Ilyen magas auxin koncentrációt a *Crocus sativus* magház explantátumának esetében a hajtásregenerálás indukciójához használtak (Bhagyalakshmi 1999).

Az embriogenezis és a növényregenerálás eléréséhez számos tenyésztési körülményt próbáltunk ki, az 5. táblázat azokat az egy vagy többlépéses stratégiákat foglalja össze, amelyekkel különféle morfogén válaszokat sikerült kiváltanunk.

Az első stratégia a magas hormonkoncentrációkkal és a nagy auxin aránnyal a kalluszvonalak fenntartásra alkalmas. A második stratégia esetében a hormonkoncentrációk lecsökkentése és ezt követően a citokinin auxin arányának növelése mely a legtöbb esetben hajtásfejlődéshez vezet (Dodds és Roberts 1986) a *C. heuffelianus* esetében is szükséges volt, de csak szomatikus embriogenezishez volt elegendő. A szervkezdemények tovább fejlődéséhez a szacharóz koncentrációjának csökkentésére is szükség volt (Li és Wolyn 1997, Lee és mtsai. 2001, Karamian 2004).

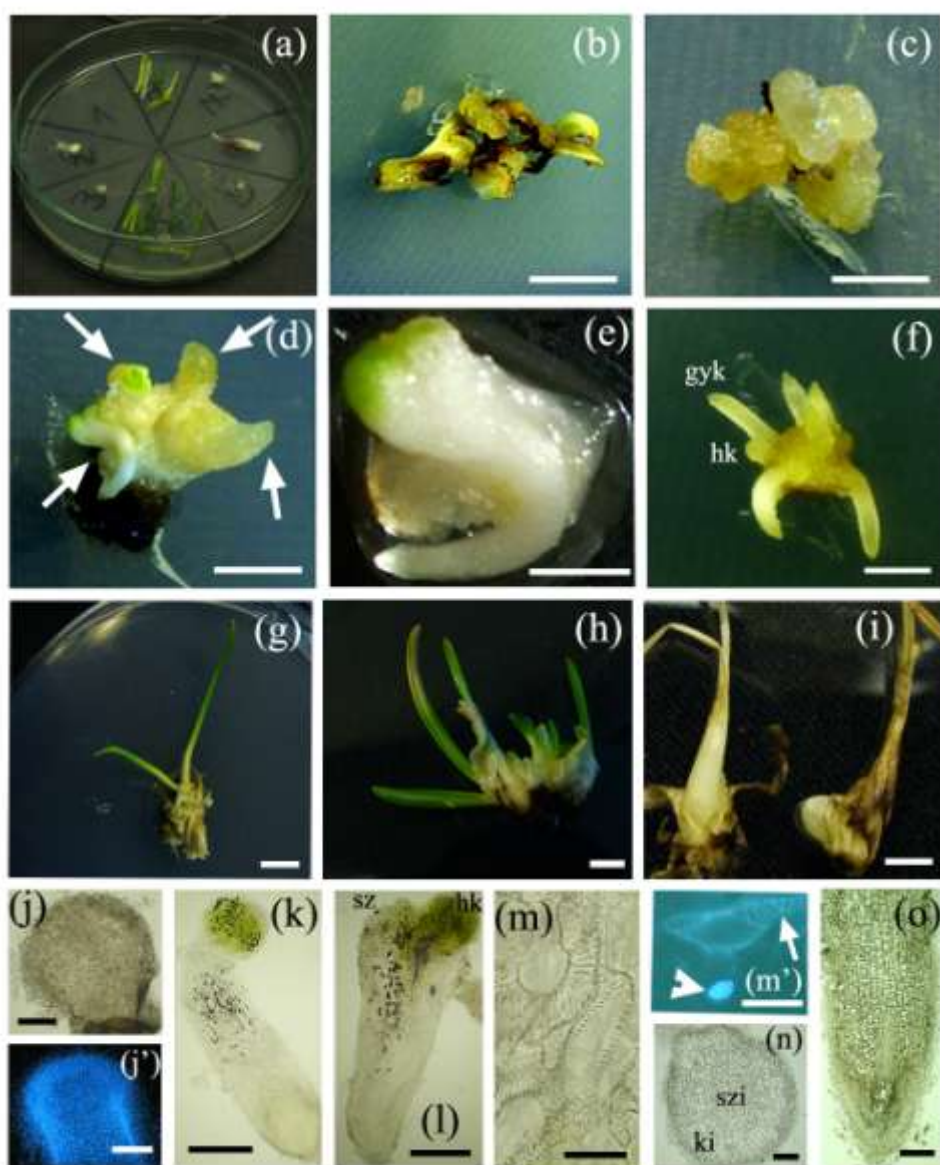
A III.-V. eljárás során, amikor az embriogén kalluszokat közvetlenül hormonmentes táptalajra helyeztük, a kalluszokon gyökerek jelentek meg. Szintén a gyökérkezdemény fejlődése dominált a szomatikus embriókon, amikor egyszerre vagy két lépésben, lecsökkentettük a hormonok mennyiségét, megfordítottuk az auxin /citokinin arányt, a szacharóz mennyiségét 1 w/v %-ra a táptalaj erősségét pedig ¼ -re csökkentettük (5. c. ábra).

Ezek a stratégiák más *Crocus* fajok esetében (*C. sativus*, *C. cancellatus*, *C. pallasii*) hajtásfejlődéshez vezettek (Plessner és Ziv 1999, Karamian és Ebrahimzadeh 2001, Karamian 2007, Ray és Bhattacharya 2008).

A megfigyelésekre alapozva fejlesztettük ki a növényregenerálásra alkalmas három lépésből álló VI. módszert, melynek során először lecsökkentettük a hormonok mennyiségét, miközben megfordítottuk a hormonarányokat (növeltük a citokinin/auxin arányt), ezt követően lecsökkentettük a táptalaj erősségét és a szacharóz mennyiségét, aminek hatására a globuláris stádiumú embriók (5. j., j'. ábra) bipoláris embriókká differenciálódnak (5. k., l. ábra). A *Crocus* genusban és számos egyszikűnél, a szomatikus embriogenezis nagyon hasonló a zgotikus embriogenezishez (Chichiricco' 1989, Sage és mtsai. 2000). A *Crocus heuffelianus* bipoláris embriójának fejlődése eltér a *C. sativusétól*, mert a *Crocus sativus* esetében monopoláris embriók jönnek létre először, és a tipikus bipoláris struktúra csak későbbi stádiumnál jelenik meg (Blazquez és mtsai. 2009). Végül amikor citokinin mennyiségét $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ -ről 2 mg l^{-1} -re növeltük, és a táptalajt 25 mg l^{-1} GA₃-al és 100 mg l^{-1} aszkorbinsavval egészítettük ki, az érett szomatikus embriók növényé differenciálódtak (5. g., h. ábra). Ezen a táptalajon 65 nap elteltével a képződő növényen a hajtások mérete elérte a $20,7 \pm 1.8 \text{ mm}$ -t, a 14 hétre pedig kifejlődött a növényen a hagymagumó is.

5. táblázat: A táptalaj erősségének és hormon összetételének hatása a *C.heuffelianus* embriogén kalluszainak fejlődésére. Az összes tenyésztési stratégia esetében a kiindulási embriogén kallusz 10 mg^l⁻¹ NAA és 1 mg^l⁻¹ BA tartalmú MS* táptalajról származik.

Stratégia	Lépések	Explantátum/ kiindulási inokulum	Táptalaj	Hormon (mg ^l ⁻¹)	Morfogén válasz
I.	1.	hajtás csúcs sebzett embrió	MS*	10NAA 1BA	embriogén kallusz
II.	1.	embriogén kallusz	MS*	0,5NAA 0,05BA	szomatikus embrió
	2.	szomatikus embrió	MS*	0,05NAA 0,5BA	érett embrió
III.	1.	embriogén kallusz	MS*	nincs	gyökér
IV.	1.	embriogén kallusz	MS*	0,5NAA 0,05BA	szomatikus embrió
	2.	szomatikus embrió	¼ MS* +1 % suc	0,05NAA 0,5BA	érett embrió, gyökér
V.	1.	szomatikus embrió	¼ MS* +1 % suc	0,05NAA 0,5BA	érett embrió, gyökér
VI.	1.	embriogén kallusz	MS*	0,05NAA 0,5BA	szomatikus embrió
	2.	szomatikus embrió	¼ MS* +1 % suc	0,05NAA 0,5BA	érett embrió
	3.	érett embrió	¼ MS* +1 % suc	0,05NAA 2BA	növény



5. ábra: Embriógén kalluszok indukciója, embrioegnezis és növényregenerálás a *Crocus heuffelianus* esetében. A jelmagyarázat a következő oldalon található.

a.) A szövettanyészet beindításához kipróbált explantátumok. b.) A hajtáscsúcs explantátumon megjelenő kallusz a 10. héten MS*táptalajon 10 mg^l⁻¹ NAA és 1 mg^l⁻¹ BA jelenlétében c.) Globuláris stádiumú embriókat tartalmazó kallusz MS*táptalajon 10 mg^l⁻¹ NAA és 1 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. d.)-o) A *Crocus heuffelianus* embriogenezisének és növényregenerálásának morfológiája és szövettana. d.) Embriógén kallusz 1 % szacharóz tartalmú ¼ MS*táptalajon 0.05 mg^l⁻¹ NAA és 0.5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. A különböző fejlődési stádiumú szomatikus embriókat a nyilak jelölik. e.) A (d) ábrán bemutatott kalluszon kifejlődött érett szomatikus embrió. f.) ¼ MS*táptalajon 0.05 mg^l⁻¹ NAA , 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében nevelt kallusz, melyen a gyökérkezdemények (gyk) fejlődése erőteljesebb, mint a hajtáskezdeményeké (hk). g.) és h.) Szomatikus embrióból kifejlődő növény a 6. (g) és 9. (h) héten 1 w/v % szacharóz tartalmú ¼ MS*táptalajon 0.05 mg^l⁻¹ NAA , 2 mg^l⁻¹ BA és 25 mg^l⁻¹ GA₃ jelenlétében. i.) Hagymaképződés a szomatikus embrióból kifejlődő növényen 1 w/v % szacharóz tartalmú ¼ MS*táptalajon 0.05 mg^l⁻¹ NAA, 2 mg^l⁻¹ BA és 25 mg^l⁻¹ GA₃ jelenlétében a 14. héten j.) Az MS*táptalajon 10 mg^l⁻¹ NAA és 1 mg^l⁻¹ BA jelenlétében növekedő kalluszon képződő gömb stádiumú embrió kék színű DAPI festett DNS állománya. j'.) Gömb stádiumú embrió fénymikroszkópos képe. k.) Torpedó stádiumú embrió 1 % szacharóz tartalmú ¼ MS*táptalajon 0.05 mg^l⁻¹ NAA és 0.5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében a 30. napon. l.) A torpedó stádiumú embrión elkülönülő sziklevel (sz) és hajtáskezdemény (hk) a 40. napon. m.) A z (l) ábrán látható embrió sziklevelében differenciálódó szállító elemek. m'.) Az (l) ábrán látható embrió sziklevelében differenciálódó szállító elemek (nyíl) másodlagos sejtfalvastagodásának autofluoreszcenciája és a sejtmag hiánya. Kék színnel látható a szomszédos merisztéma sejt DAPI festett sejtmagja (nyílhegy). n.) Fejlett embrió gyököcskéjének keresztmetszeti képe, melyen megfigyelhető a sztéle iniciális (szi) és a kéreg iniciális (ki) elhelyezkedése. o.) Fejlett szomatikus embrió gyököcskéjének hosszmetseti képe. Skála: b-i 4 mm ; j-l 1 mm; m, m' 60 µm; n, o 200 µm

4.1.2 Hántolt *Quercus robur* makkok steril körülmények között történő csíráztatása, és stabil kallusz-vonalak létrehozása

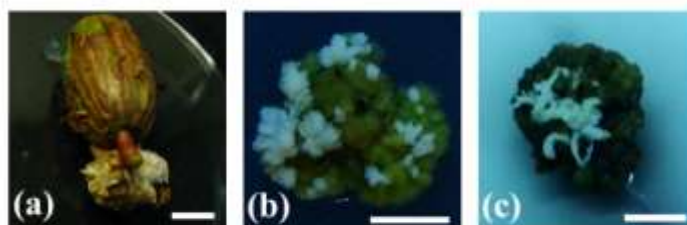
A *Crocus heuffelianus* magoktól eltérően, a *Quercus robur* makkok csírázása hamar, már az első hetet követően megvalósult, hasonlóan a *Q. leucotrichophora* és *Q. glauca* steril körülmények között, 3 w/v % szacharóz tartalmú agaros vizes táptalajon inkubált hántolt makkjaihoz (Purohit és mtsai. 2002). Kísérletünkben a hántolt makkok csírázása függetlennek bizonyult a táptalaj mikro- és makroelem tartalmától, mindegyik táptalaj-kombináción bekövetkezett. A gibberellint tartalmazó táptalajokon fejlődő csíranövények hajtásai megnyúltak, mely a gibberellin megnyúlásos növekedést serkentő hatására vezethető vissza (Gaspar és mtsai. 1996). A növények exogén gibberellinre adott válaszreakciói fajtól függőek. Bár számos fajnál - mint amilyen a zeller, rebarbara, bab – említik, hogy a gibberellin serkenti a levelek növekedését (Wittwer és Bukovac 1958), az *Agave* és *Stephelia* esetében azonban a gibberellin levélnövekedést gátló hatására is találunk példát (Nickell és Tulecke 1959). A *Quercus robur* levélnövekedését szintén korlátozta a hormon, mert gibberellin jelenlétében fejlődő csíranövény levelei kisebbek lettek, mit a kontroll esetében. A gibberellin az esetek többségében alacsony koncentrációban nincs hatással a gyökerekre, nagyobb koncentrációban viszont számos fajnál (*Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Fagopyrum esculentum*, *Pisum sativum*, *Zea mays*) határozottan gátolja a gyökerek elongációját (Wittwer és Bukovac 1958). A gibberellin jelenléte a táptalajban, a *Quercus robur* esetében is a gyökerek elsötétedéséhez vezetett. A gyökerek elhalása annál hamarabb következett be, minél magasabb koncentrációban volt jelen a GA_3 a táptalajban. A szövetek össz hormon koncentrációja, különösen az auxin tartalma jelentős hatással van az adott szövet gibberellinnel szembeni érzékenységére, ezért hathat a gibberellin kezelés különböző módon az eltérő növényi szervekre és szövetekre (Nickell és Tulecke 1959). Ennek következtében lehetséges, hogy míg a GA_3 a *Quercus robur* csíranövényben a szártag megnyúlását serkentette, a levelek és gyökerek növekedését korlátozta. Általában a gibberellinek elősegítik a merisztéma sejtekből kialakított szervek növekedését és fejlődését, gátolják a meristemoidok iniciációját (Gaspar és mtsai. 1996). Ennek ellenére néhány fás szárú haszonnövénynél (*Euonymus* sp., *Forsythia* sp., *Phellodendron* sp.) a gibberellinkezelés nóduszszám gyarapodást váltott ki (Wittwer és Bukovac 1958). A *Quercus* makkok csírázásakor is több hajtás megjelenését tapasztaltuk 25 mg l^{-1} GA_3 jelenlétében.

Még egy genotípuson belül is, a különböző szervekből származó explantátumok eltérő hormon-összetételű táptalajt igényelnek ahhoz, hogy differenciálatlan sejtörmeg képződjön rajtuk. Ezt arra vezetik vissza, hogy a különféle szövetekben, a válaszreakcióért felelős endogén össz hormon-koncentráció eltérő (Kamada és Harada 1981, Rajasekaran és mtsai. 1987, Bhaskaran és Smith 1990, Etienne és mtsai. 1993). Kísérletünkben is, a *Quercus robur* csírázó embriójának különböző részein jelentek meg az első generációs kalluszok, attól függően, milyen volt a táptalaj hormonösszetétele. A kalluszképző és fenntartó kísérletek eredményeit az 6. táblázat foglalja össze. A *Quercus rubra* sziklevelein citokinin hiányában és kevés auxin jelenlétében következett be a kalluszképződés (Vengadesan és Pijut 2009). Wilhelm és mtsai. (2004) is nagyobb arányban alkalmazták az auxin hatású hormont a feldarabolt *Quercus robur* makkok kalluszosodásának beindításához, míg a gyökércsúcsoknál az auxin és citokinin hatású hormonok közel azonos aránya vezetett embriogén kalluszok keletkezéséhez (Zegzouti és mtsai. 2001). A mi kísérleteinkben azonban, az eddigi tapasztalatokkal ellentétben a *Quercus robur* sziklevelén citokinin túlsúly esetén jelentek meg kalluszok (6. b. ábra, 6. táblázat). A Wilhelm és mtsai. (2004) makkjainál használt nagy arányú auxint tartalmazó 4 mg l^{-1} D és $0,1\text{ mg l}^{-1}$ BA kombináció a

mi esetünkben a csíranövény gyökércsúcsánál eredményezett első generációs kalluszokat (6. táblázat, 6. a. ábra). Számos *Quercus* szövtenyésztéssel kapcsolatos tanulmányban számoltak be arról, hogy a BA és a GA₃ jelenléte és az auxin hiánya az inokulumokon hajtássokszorozódáshoz vezetett (Cívínová és Sladký 1990, Racchi és mtsai. 2001, Purohit és mtsai. 2002, San- Vieitez és mtsai. 2009, José és mtsai. 2010), illetve elősegítette az embrióképződést és az embriók hajtásának a kifejlődését (Gingas 1991, Jörgensen 1993, Wilhelm és mtsai. 2004, Vengadesan és Pijut 2009). A mi esetünkben azonban, auxin hiányában és citokinin jelenlétében a hajtássokszorozódás helyett, a csíranövény sziklelevelének proximális része kalluszosodott el (6. táblázat). Auxin hiányában a BA illetve GA₃ jelenléte pedig csak arra volt elegendő, hogy a stabilizálódott sziklevel eredetű kalluszokon, olyan szervezdemények képződését váltsa ki (6. c. ábra), melyeket hosszabb távon nem tudunk fenntartani. Mivel a gibberellinek módosíthatják az endogén auxin háztartást, elősegítve ezzel a hajtásképződést (Gaspar és mtsai. 1996), a kalluszokon megjelenő elporladó képletek feltehetően hajtáskezdemények lehettek.

6. táblázat: A *Quercus robur* kallusz előállításához szükséges explantátumok, növekedés szabályozó anyagok, a kallusz megjelenésének átlagos időtartama, és a szövtenyészet fenntartására alkalmas hormonkombinációk.

Explantátum	Kallusz indukáló táptalaj (mg ^l ⁻¹)	Kallusz megjelenésének átlagos időpontja (hét)	Kallusz fenntartó táptalaj (mg ^l ⁻¹)
csíranövény gyökere	1D 0,1BA	6 hét	4 NAA 0,5BA 4 NAA 1 BA
sziklevel embriótengeylhez kapcsolódó része	2 BA	13 hét	4 NAA 0,5BA 0,5 NAA 4BA 0,05 NAA 2 BA
sziklevel	0,05 NAA 2 BA	29 hét	



6. ábra: kallusz indukció és fenntartás *Quercus robur* embriórészekből. a.) A *Quercus robur* csírázásnak induló embrió gyökerein képződő első generációs kalluszok a 6. héten, MS^{*}táptalajon 1 mg^l⁻¹ D és 0,1 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. b.) *Quercus robur* sziklevel explantátumból származó kallusza 100 mg^l⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon, 2 mg^l⁻¹ BA és 0,05 mg^l⁻¹ NAA jelenlétében. c.) *Quercus robur* sziklevel explantátumból származó kalluszán fejlődő szervezdemények 100 mg^l⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon 4 mg^l⁻¹ BA és 5 mg^l⁻¹ GA₃ jelenlétében. Skála: 5 mm

4.1.3 Stabil kalluszok előállítása a *Lepidobalanus alnemzetség* taxonjainak fiatal leveleiből és barkáiból nyert explantátumokból

12 új stabil kalluszvonalat sikerült létrehozunk a síkfőkúti cseres-tölgyes erdőállományban előforduló fehér tölgy taxonok leveleiből illetve a *Quercus petraea* és *Quercus polycarpa* barkáiból (7. ábra). A 7. táblázatban részletesen megtekinthetők a kísérletekben alkalmazott taxonok, a belőlük származó explantátumok, a kallusz-indukcióhoz és fenntartáshoz

legalkalmasabb növekedést szabályozó anyagok kombinációi, és az elsőgenerációs kalluszk megjelenéséhez szükséges időtartam.

A tölgyek és egyéb más növények pl. *Strelitzia reginae*, *Pinus sylvestris*, *Phoenix dactylifera* szövettenyésztésekor gyakran számoltak be olyan vegyületek megjelenéséről, melyek sötétre színezték a táptalajokat és a szöveteket, csökkentve ezzel a tenyészetek aktivitását, növekedési rátáját (Romano és Martins-Loucao 1992, Laukkanen és mtsai. 1999, Pintos és mtsai. 2007, North és mtsai. 2012). Ilyen vegyületek a mi esetünkben is nehezítették a tenyésztéseink fenntartását. Ezek a sötétedésért felelős, táptalajba is beszivárgó anyagok feltehetően polifenolos vegyületek, hexahidroxi-difenolok, tanninok lehetnek, melyek fenoloxidázok hatására barnulnak meg. A tölgy explantátumok, levelek, barkák, szállító elemek nagymértékben halmoznak fel fenolos vegyületeket, ezért a belőlük származó kallusz- és hajtáskultúrák is gyakran rendelkeznek ezzel a képességgel, sőt az esetek többségében ezek a vegyületek nagyobb koncentrációban lehetnek jelen a kalluszkban, mint más növényi szövetekben (Krajci és Gross 1986, Scalbert és mtsai. 1988, Romano és Martins-Loucao 1992, Bajaj 1993, 1996, Tanaka és mtsai. 1995). A barnulási folyamatokat különféleképpen próbálták csökkenteni. A datolyapálma, borsfajok és papagájvirág szövettenyésztéseiben az aktív szén vezetett eredményhez (Sharma és mtsai. 1980, Madhusudhanan és Rahiman 2000). A mi esetünkben azonban ez a módszer nem vezetett eredményre. PVP jelenléte csökkentette a szövetek fenolos vegyületeinek a kibocsátását az aloévera, nyír és a papagájvirág tenyészetekben (Christiansen és Fønnesbech 1975, Roy és Sarkar 1991, Vaario és mtsai. 1995, North és mtsai. 2012). Tóth és mtsai. (1994) *Quercus robur* tenyésztéseiben az aszkorbinsavas kezelés volt a leghatékonyabb megoldás a barnulás megelőzésére, és a mi esetünkben is kisebb mértékben sötétedett el a 100 mg l⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó táptalaj. A *Quercus suber* tenyészetekben egyik módszernek sem volt számottevő hatása (Romano és Martins-Loucao 1992). Az explantátumok friss vágási felületeinek a táptalajba szivárgó fenolos vegyületeitől úgy védtek meg az inokulumokat Heile-Sudholt és mtsai.-hoz (1986) hasonlóan hogy, a kultúra beindítását követően 48 órán belül friss táptalajra helyezték át a szöveteket. Ez a tenyésztési módszer azonban nem takarékos, nagyon idő- és anyagigényes. Bhat és Chandel (1991) úgy korlátozta a barnulás folyamatát, hogy a vágási felületeket paraffinnal bevonva megakadályozta a fenolos vegyületek táptalajba diffundálását. A mi esetünkben is a tenyészetek és a táptalaj elsötétedését, a termelődő vegyületek táptalajba szivárgásának korlátozásával tudtuk mérsékelni a leghatékonyabban, azáltal hogy áttöltés során úgy helyeztük el a kalluszkokat, hogy megakadályozzuk a táptalaj és a vágott felület érintkezését.

A tölgyeknél alaptáptalajként a legelterjedtebben az MS-t alkalmazzák (pl. Cuenca és mtsai. 1999, Gingas 1991, Vengadesan és Pijut 2009), ami a *Crocus* fajok mikroszaporítására is bevált (Karamian és Ebrahimzadeh 2001, Karamian 2007, Demeter és mtsai. 2010), a *Quercus robur* tenyészetek esetében azonban a WPM (Racchi és mtsai. 2001), a GD (San-José és mtsai. 2010) és a P24 (Wilhelm és mtsai. 2004) táptalajok is közkedveltek. A WPM és MS alaptáptalaj, a bennük megtalálható ionok minőségében csak annyiban tér el egymástól, hogy míg az MS-ben találhatóak jodid ionok, addig a WPM-ben nem. A két táptalaj közötti különbség, főként a makroelemek mennyiségében mutatkozik meg. Kevesebb nitrát- és kalciumion található a WPM táptalajban, mint az MS-ben (Murashige és Skoog 1965, Lloyd és McCown 1981). Bár a *Quercus* tenyésztéseink mindkét alaptáptalajon fenntarthatóak voltak, MS-en a sötétedés intenzívebb volt. A barnulást feltehetően kis mértékben befolyásolta az alaptáptalajokban jelenlévő ionok mennyisége is.

A sejtburjánzás kiváltásához és stabilizálásához, a *Crocus heuffelianus* esetében tapasztaltakhoz hasonlóan auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétére egyaránt szükség volt (7. táblázat). A legáltalánosabban használt auxin típusú hormonok közül a 2,4 –diklór-

fenoxi-ecetsavat (a továbbiakban 2,4-D) általában kalluszindukcióhoz, a NAA-at, IAA-at embrio- és organogenezishez, az IBA-t pedig főként gyökérregeneráláshoz használják (Gaspar és mtsai. 1996). Több irodalomban is említették már, hogy a 2,4-D a táptalajokban, hosszabb idő elteltével szomaklonális variabilitást, tetraploidia létrejöttét, mikroszatellit instabilitást eredményezett, melynek hatására a kalluszok elvesztették morfogén tulajdonságaikat (Endemann és mtsai. 2001, Sánchez és mtsai. 2003 Wilhelm és mtsai. 2004). Valószínűleg erre vezethető vissza a tölgy kalluszaink elnyálkásodása és elpusztulása, amikor az NAA-at 2,4-D-al helyettesítettük. Köztudott az is, hogy az auxin hatású hormonok nagyobb koncentrációban gyomirtó szerek. A letális koncentráció fajspecifikus (Grossmann és mtsai. 2001, Wong 2000). Míg a *Crocus heuffelianus* szövettenyésztésének a fenntartásához 10 mg l⁻¹ NAA szükséges, addig a fehér tölgyek esetében ez a mennyiség már letális koncentrációnak bizonyult, ami a kalluszok elfeketedésében és pusztulásában nyilvánult meg.

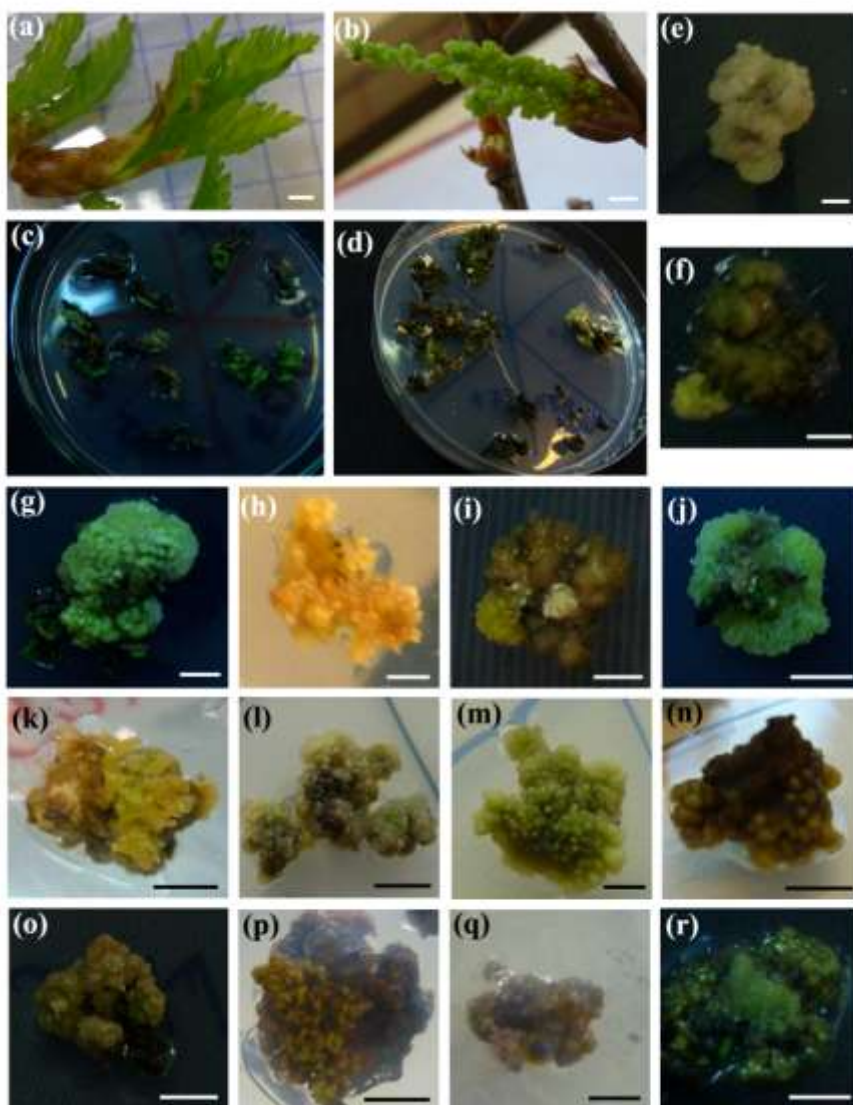
A szakirodalom alapján kipróbált számos hormonkombináció közül, általánosságban a 2-4 mg l⁻¹ NAA és 0.5-1 mg l⁻¹ BA volt a legeredményesebb (7. táblázat, 7. ábra), melyet A *Quercus robur* szövettenyésztésével foglalkozó Cuenca és mtsai. (1999), Toribio és mtsai. (2004) illetve San-José és mtsai. (2010) is sikerrel alkalmaztak rügyekből kipattanó levél explantátumok kalluszindukciójához.

A barkák kalluszindukciójához Gingas (1991) és Jörgensen (1993) auxin hatású hormonként 2,4-D-t használt fel. Míg Gingas (1991) a *Q. bicolor* barkákon auxin/citokinin 1:1 arányú elegyével váltott ki sejtburjánzást, addig Jörgensen (1993) a *Quercus petraea* porzóin tág hormonarányok között (0,1-5 mg l⁻¹ D és 0,1-5 mg l⁻¹ BA) produkált kalluszokat. Mi a tenyésztéseinkben 2,4-D helyett NAA-at használtunk, és az általunk alkalmazott hormonarányok a Jörgensen (1993) által is alkalmazott hormonarányokhoz illeszkedtek (7. táblázat). Jörgensen (1993) *Quercus petraea* porzó eredetű tenyészteti haploid és diploid kalluszokat is tartalmaztak egyaránt. Mindkét típusú kallusz embriogénnek bizonyult, és alkalmas volt a növényregenerálásra. A mi esetünkben is kétféle megjelenésű kalluszvonal jött létre a *Quercus petraea* barkákból. Az egyik világossárga, törékeny, szervkezdemények és embriók létrehozására alkalmatlan (barka/1), míg a másik kompaktabb, élénkzöld, embrio- és organogenezisre hajlamos (barka/2) vonal volt. Lehetséges, hogy a barka és a fiatal levél eredetű kalluszok (7. e., f. ábra) eltérő morfológiája a sejtek különböző kromoszómaszámából adódik. Több közleményben számoltak be arról, hogy egy tenyésztet huzamosabb ideig történő fenntartása során, megjelentek olyan kallusz tömegek is, melyek a tenyésztési körülmények következtében elvesztették morfogén képességüket (Endemann és mtsai. 2001, Sánchez és mtsai. 2003, Wilhelm és mtsai. 2004). A mi esetünkben, az A149-es barka eredetű tenyésztetekben, már az első generációs kalluszoknál mutatkoztak a morfológiai különbségek, és a mutagén hatású hormonok alkalmazását is elkerültük az indukció és fenntartás során, ezért az eltérések nem feltétlenül vezethetőek vissza a kedvezőtlen tenyésztési körülményekre. Ezért további kísérletek szükségesek ahhoz, hogy fel tudjuk tární a barka eredetű kalluszok eltérő megjelenésének az okait.

7. táblázat: A tölgy kallusz előállításához szükséges explantátumok, növekedés szabályozó anyagok, a kallusz megjelenésének átlagos időtartama, és a szövettényészet fenntartására alkalmas hormonkombinációk a 100 mg^l⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajban.

Taxon kódja	Explantátum	Kallusz indukáló táptalaj (mg ^l ⁻¹)	Kallusz megjelenésének átlagos időpontja (hét)	Kallusz fenntartó táptalaj (mg ^l ⁻¹)
A149	levél	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1BA	10 13	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 2,5 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
A149	barka/1	0,5NAA 4 BA	15	0,5 NAA 4 BA 4 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
A149	barka/2	0,5 NAA 4 BA	15	0,5 NAA 4 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 2,5 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
A71	levél	4 NAA 0,5 BA 2 NAA 0,5 BA	34 27	4 NAA 0,5 BA 2 NAA 0,5 BA
A75	levél	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 2,5 BA	12 16	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 2,5 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
D89	levél	4 NAA 1 BA 4 NAA 0,5BA 4 NAA 0,1 BA 2 NAA 0,5 BA	8 15 10 15	4 NAA 2,5 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
A85	levél	4 NAA 2,5 BA	23	4 NAA 2,5 BA
B50	levél	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA	5 7	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 2 NAA 0,5 BA

Taxon kódja	Explantátum	Kallusz indukáló táptalaj (mg l ⁻¹)	Kallusz megjelenésének átlagos időpontja (hét)	Kallusz fenntartó táptalaj (mg l ⁻¹)
A211	levél	4 NAA 2,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 0,1 BA	8 12 15 11	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 2,5 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
D137	levél	10 NAA 2,3 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 0,1 BA 2 NAA 2 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA 0,5 NAA 4 BA	6 8 7 2 1 27 14 2	4 NAA 1 BA 4 NAA 0,5 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
C211	levél	4 NAA 2,5 BA 4 NAA 1 BA	7 23	4 NAA 2,5 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
C211	barka	4 NAA 2,5 BA 2 NAA 0,5 BA	12 27	4NAA 2,5 BA 4NAA 0,5 BA 2NAA 1 BA 2NAA 0,5 BA
C102	levél	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 2,5 BA	17 26 14	4 NAA 2,5 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA
K28	levél	4 NAA 2,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 0,5 BA 4 NAA 0,1 BA	15 10 13 11	4 NAA 0,5 BA 4 NAA 1 BA 4 NAA 2,5 BA 2 NAA 0,5 BA 2 NAA 1 BA



7. ábra: kallusz indukció és fenntartás 100 mg l^{-1} aszkorinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétében. Jelmagyarázat a következő oldalon található.

a.) Síkfőkúti fehér tölgy taxonok genotípusokból származó szövetenyésztet beindításához használt- fiatal levél explantátumok. b.) Fiatal barka explantátumok. c.) A Síkfőkút területéről származó *Quercus* explantátumok első reakciója a kalluszosodást megelőző szövetduzzadás. d.) Első generációs kalluszkok megjelenése a 10. héten. e.) A149 (*Q. petraea*) barka explantátumból származó nem embriogén kallusz 4 mg^l⁻¹ BA és 0,5 mg^l⁻¹ NAA jelenlétében. f.) A149 (*Q. petraea*) barka explantátumból származó embriogén kallusz 4 mg^l⁻¹ BA és 0,5 mg^l⁻¹ NAA jelenlétében. g.) A149 (*Q. petraea*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. h.) A71 (*Q. petraea*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. i.) A75 (*Q. pubescens*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. j.) D89 (*Q. petraea* x *Q. pubescens*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. k.) A85 (*Q. petraea* x *Q. pubescens*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 2,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. l.) B50 (*Q. virgiliana*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 1 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. m.) A211 (*Q. virgiliana* x *Q. polycarpa*) levél explantátumból származó kallusz 2 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. n.) D137 (*Q. dalechampii* x *Q. petraea*) levél explantátumból származó kallusz 2 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. o.) C211 (*Q. polycarpa*) barka explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 2,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. p.) C211 (*Q. polycarpa*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. q.) C102 (*Q. petraea* x *Q. polycarpa*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. r.) K28 (*Q. petraea* x *Q. dalechampii*) levél explantátumból származó kallusz 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA jelenlétében. Skála: 5 mm

4.1.4 Gyökér morfogenezis

A szerv-, embrió- és növényregenerálás sikeressége a tenyésztési körülmények mellett - mint amilyen a növekedésszabályozó anyagok minősége, mennyisége és aránya, az alaptáptalaj összetétele, szénhidráttartalma, a hőmérséklet és fényviszonyok-, nagymértékben függ, még egy fajon belül is a genotípustól, és az explantátum típusától (Duncan és mtsai. 1985, Dodds és Roberts 1986, Máthé és mtsai. 2012).

Hat vonal kalluszain tapasztaltunk gyökérképződést (8. ábra). A vonalakat, a gyökerek megjelenésének átlagos időpontját és a megfelelő hormonösszetételt a 8. táblázat foglalja össze.

A fehér tölgy taxonokból létrehozott tenyészeteinkben a gyökér morfogenezise és a kiváltásához szükséges körülmények eltértek a *Crocus heuffelianus* tenyésztése során tapasztaltaktól. Míg a *Crocus heuffelianus* esetében a hormonkoncentrációk csökkentése során képződő érett embriókból jól reprodukálható módon jöttek létre gyökerek a táptalaj erősségének csökkentésével, vagy a hormonok megvonásával, addig a gyökérképzésre hajlamosabb fehér tölgy genotípusoknál ez a folyamat a hormonok mennyiségének változtatása nélkül, véletlenszerűen következett be a kalluszkok felületén, a fenntartó táptalajokon, a tenyésztés egy meghatározott időszakában.

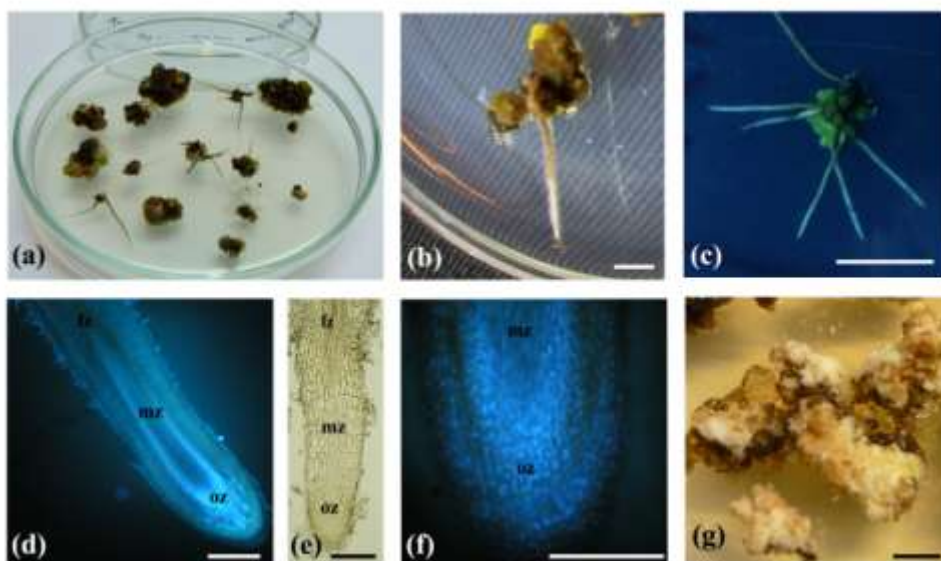
A D137, A211, D89, B50, A75 és K28 vonalak alkalmasak, (8. táblázat, 8. a., b., c., d., e., f. ábra) az A149, A71, C211, C102 és A85 kalluszai pedig alkalmatlanok voltak a gyökérregenerálásra. Seckinger (1979) számolt be hasonló esetről, amikor a *Quercus rubra* hajtás szegmentekből származó kalluszainak periferiáján véletlenszerűen jelentek meg gyökerek az általunk használt fenntartó táptalajainkhoz hasonló hormonösszetételt (1-5 mg^l⁻¹ NAA és 0-5 mg^l⁻¹ BA) esetén. A gyökerek képződésének oka a kalluszfenntartó táptalajon változatlan exogén hormonszint mellett feltehetően az, hogy a huzamosabb ideig tartó tenyésztési körülmények hatására olyan változás következhetett be, mely módosíthatta az endogén hormonok szintjét a szövetekben. A növény az idő elteltével, érzékenyebbé válhatott az auxin hatású hormonokra, fokozódhatott az endogén auxin termelődésének a mértéke, vagy csökkenhetett az endogén citokinin termelődése, ami a belső auxin-citokinin arány növekedéséhez vezethetett (Schenk és Hildebrandt 1972, Vesper és Evans 1978, Gaspar és mtsai. 1996, Dudits és Heszky 2003).

A mikroszatellit- és izoenzimvizsgálatok eredményei összefüggésbe hozhatóak a különféle taxonok és a *Q. petraea* szövetenyésztése során mutatott eltérő válaszokkal. A

gyökérképző vonalak a morfológiai besorolás alapján a *Q. pubescens* és hibridjei, a *Q. virgiliana* és hibridjei illetve a *Q. dalechampii* hibridjei közé tartoznak. Ezek a vonalak a mikroszatellit vizsgálatok alapján genetikailag közelebb állnak egymáshoz (1. ábra), ökológiai igényüket tekintve pedig a szárazságtűrőbb tölgy taxonok közé tartoznak. Azok a vonalak, amelyek a magas auxin/citokinin arány esetén alkalmatlanok voltak a gyökérregenerálásra, morfológiailag a *Q. petraea*, *Q. polycarpa* és a kettő egymással alkotott hibridjének csoportjába sorolhatóak. Mindkét taxon távolabbi rokonságban van a gyökérképző csoporttal (1. ábra), és vízhiánystresszre érzékenyebb taxonként van számon tartva.

8. táblázat: A gyökérregenerálásra hajlamos vonalak, a felhasznált növekedés szabályozó anyagok és a szükséges átlagos idő. A nyíl a megközelítően 3.-4. hónapban bekövetkező táptalajváltást jelzi. A felsorolás a különböző stratégiákat jelöli.

Taxon kódja	Explantátum	Gyökeret indukáló táptalaj (mg l ⁻¹)	A gyökér megjelenés átlagos időpontja (hónap)
A75	levél	• 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,5 BA → 2 NAA 0,5 BA • 4 NAA 2,5 BA → 4 NAA 1 BA	8
D89	levél	• 4 NAA 2,5 BA • 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA • 4 NAA 0,1 BA • 2 NAA 0,5 BA	7
B50	levél	• 4 NAA 0,5 BA → 2 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA → 2 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA	5
A211	levél	• 4 NAA 1 BA → 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,1 BA • 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA	7
D137	levél	• 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA	11
K28	levél	• 4 NAA 1 BA → 4 NAA 2,5 BA → 1 NAA 1 BA • 4 NAA 0,1 BA → 4 NAA 0,5 BA → 1 NAA 1 BA • 4 NAA 1 BA → 4 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA	11



8. ábra: Gyökérregenerálás 100 mg⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétében. a.) B50 (*Q. virgiliana*) levél explantátumból származó kalluszon fejlődő gyökerek 4 mg⁻¹ NAA és 0,5 mg⁻¹ BA jelenlétében. b.) Gyökérképződés az A75 (*Q. pubescens*) levél explantátumból származó kalluszonon 4 mg⁻¹ NAA és 0,5 mg⁻¹ BA tartalmú táptalajon. c.) Gyökérmegjelenés az A211 (*Q. virgiliana* x *Q. polycarpa*) levél explantátumból származó kalluszonon 4 mg⁻¹ NAA és 0,1 mg⁻¹ BA jelenlétében. d.) D137 (*Q. dalechampii* x *Q. petraea*) levél explantátumból származó kalluszon 4 mg⁻¹ NAA és 0,5 mg⁻¹ BA jelenlétében kifejlődő gyökér hosszsz metszeti képe, melyen látszik az osztódási (oz), megnyúlási (mz) és (fz) felszívási zóna. Kék színű a DAPI festett DNS állomány. e.) D89 (*Q. petraea* x *Q. pubescens*) levél eredetű kalluszain 4 mg⁻¹ NAA és 0,1 mg⁻¹ BA jelenlétében fejlődő gyökerek hosszsz metszeti képe melyen látszik az osztódási (oz), megnyúlási (mz) és felszívási (fz) zóna. f.) D89 (*Q. petraea* x *Q. pubescens*) levél eredetű kalluszain 4 mg⁻¹ NAA és 0,1 mg⁻¹ BA jelenlétében fejlődő gyökerek hosszsz metszeti képe, melyen látszik az osztódási (oz) és megnyúlási (mz) zóna kék színű DAPI festett DNS állománya. g.) D89 (*Q. petraea* x *Q. pubescens*) levél eredetű kalluszok szétválasztása 4 mg⁻¹ NAA és 0,1 mg⁻¹ BA tartalmú táptalajokon történő hosszabb távú nevelésének következtében. Skálák: c,g: 5 mm. Skála: d,e,f 500 µm

4.1.5 Hajtás morfogenezis

A tölgy szövettenyészetekre gyakran jellemző, hogy többlépéses kezelési folyamat szükséges ahhoz, hogy az explantátumokból kiindulva végül teljes növényt kapjunk. A különféle fejlődési stádiumok eltérő hormonösszetételeket és arányokat igényelnek (Gingas 1991, Jörgensen 1993, Bajaj 1996, Cuenca és mtsai. 1999, Zegzouti és mtsai. 2001, Toribio és mtsai. 2004, Wilhelm és mtsai. 2004, Vengadesan és Pijut 2009, San-José és mtsai. 2010). Az embrióképződést általában az alacsony hormonkoncentrációk segítik elő, és a növényregenerálás gyakran hormonmentes táptalajon következik be. Előzetes vizsgálataink is ezt igazolták, nemcsak a *Quercus* taxonok, de az ezektől eltérő taxon, a *Crocus heuffelianus* esetében is. Ezekkel az eredményekkel, hozzájárultunk az alacsony citokinin és auxin koncentrációk általános embriogén hatásának bizonyításához (Demeter és mtsai. 2010, 2014). A *Q. bicolor* és *Q. petraea* barka, illetve a *Q. robur* makk eredetű kalluszain auxin

hiányában és kevés citokinin jelenlétében következett be az embriogenezis, míg az érett embriók hormonmentes táptalajon fejlődtek növényné (Gingas 1991, Jörgensen 1993, Wilhelm és mtsai. 2004).

Cuenca és mtsai. (1999), Toribio és mtsai. (2004) és San-José és mtsai. (2010) a szomatikus embriogenezist a *Quercus robur* levéleredetű kalluszain, az auxin és citokinin hatású hormonok koncentrációjának fokozatos csökkentésével váltották ki. Az embrió érése és a növény regenerálása alacsony hormontartalomnál, magas citokinin/auxin arány esetében, vagy hormonmentes táptalajon következett be. Ehhez a stratégiához hasonló módszer segítségével sikerült a *Quercus petraea* esetében szomatikus embriogenezist és hajtásregenerálást előidézni (9. ábra a.-k.). A kísérleteink hajtásindukciót kiváltó hormonösszetételeit, illetve a hajtás megjelenésének átlagos időpontját a 9. táblázat részletezi. Az alacsonyabb auxin tartalmú táptalajon létrejövő szomatikus embriók mindhárom (globuláris, szív és torpedó) fejlődési stádiumot elérték $0-0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA vagy indolvajsav (továbbiakban IBA) illetve $0,5-1 \text{ mg l}^{-1}$ BA jelenlétében (9. táblázat, 9. a.-d. ábra), majd hajtássá differenciálódtak (9. táblázat, 9. e.-k. ábra).

Hajtásképződést tapasztaltunk az A211 (*Q. virgiliana* x *Q. polycarpa*), D137 (*Q. dalechampii* x *Q. petraea*) és a B50 (*Q. virgiliana*) vonalaknál is, de ezek a hajtások a kallusz indukálásra és fenntartásra alkalmazott táptalajokon (B50), vagy a mérsékelt csökkenített NAA és /vagy BA tartalmú táptalajokon (D137, A211) jelentek meg (9. táblázat, 9. ábra l.-n.). Az eltérő fejlődési stádiumok ebben az esetben nem igényeltek más hormon-összetételű táptalajt, sőt az alacsony hormonkoncentrációknál ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BA $\pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$ NAA) a kalluszok, még életképességüket is elvesztették.

Az embrió kialakulásának, érésének és a növény létrejöttének %-os valószínűsége nagymértékben függ, még egy fajon belül is, a genotípustól és az explantátumtól. Számos faj esetében írták le, melyeknél az embriogenezis és növényregenerálás is jó hatékonysággal működött. Általában a juvenilis részekből, éretlen vagy érett embriókból képződő tenyészetek embriogenezise 20 % feletti valószínűséggel következik be, míg a kifejlett szervekből, levél, hajtás, virágképlet kultúráknál az embriogenezis bekövetkezésének gyakorisága kisebb mértékű (Wilhelm 2000). Azoknál a *Quercus robur* genotípusoknál, amelyekkel Toribio és mtsai. (2003) dolgoztak, az embrió-indukciós ráta a levél explantátumokból származó kalluszoknál alacsony volt, viszont a létrejött embriók nagy hányada fejlődött tovább növényné. Az A149, D137, A211, B50 esete azonban a *Quercus rubra* levél explantátumaiból származó tenyészeihez hasonlít, ahol az embriók létrejöttének gyakorisága nagy volt, azonban ezek többsége vagy nem fejlődött tovább, vagy nem képzett életképes csúcsrügyet és nem hozott létre életképes növényt (Gingas és Lineberger 1989, Rancillac és mtsai. 1996). Az életképtelen hajtások regenerálásához az A149 hormonigénye eltért a többi vonalétól (9. táblázat), ami szintén igazolja a mikroszatellit vizsgálatokon alapuló eredményeket, melyek szerint az A149-es vonal genetikailag jól elkülönül a kísérletben szereplő többi taxontól (1. ábra). A morfológiailag behatárolt *Q. pubescens* (A75), és a *Q. petraea*-val alkotott hibridjei (D89, A85), illetve a *Q. polycarpa* (C211), és a *Q. petraea*-val alkotott hibridjei (K28, C102) annak ellenére, hogy a hajtásképzésre hajlamos taxonok klasztereiben találhatóak, a *Quercus rubra* hajtás szegmentekből származó kalluszaihoz hasonlóan, nem képeztek embriókat és hajtásokat, csak hajtáskezdeményeket és/vagy gyökereket hoznak létre véletlenszerűen a kalluszok perifériáján (Gingas 1991). Kísérleteink során előfordult olyan eset is, hogy az A71 levél, és az A149 barka eredetű kalluszai (7. e., h., ábra) nem voltak morfogének, hasonlóan Gingas (1991) *Q. rubra* barka eredetű kalluszaihoz.

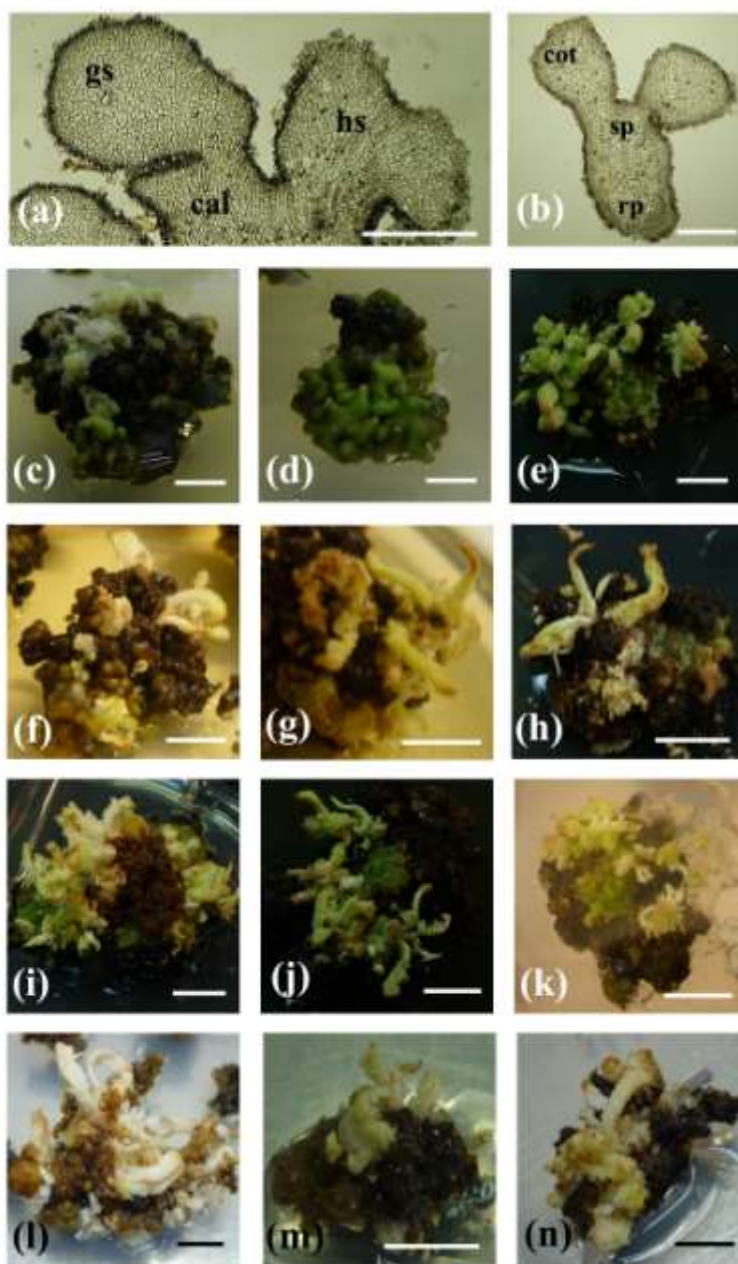
Ezek a megfigyelések, és a mikroszatellit vizsgálatok során meghatározott genetikai távolságok azt mutatják, hogy a tenyésztési körülményekre adott válaszreakciók genotípus függők.

Számos szövettényészet növekedését és/ vagy fejlődését sikerült már serkenteni azáltal, hogy az embriogén kalluszokat megfelelő mértékű ozmotikus stressznek, vagy ABA kezelésnek tették ki, majd megszüntették a stresszhatást. Ennek az eljárásnak a sikeressége nagymértékben függ a genotípustól, és az explantátum típusától is (Thorpe és mtsai. 2008).

A szárazságstresszt a tenyészetekben 0,3-0,7M szorbitol adagolásával, a tenyészetek levegőn történő szárításával, illetve a táptalaj cukortartalmának 6-8 w/v %-ra történő megnövelésével idézték elő (Gingas és Lineberger 1989, Manzanera és mtsai. 1993, Bajaj 1996, Cuenca és mtsai. 1999, Sánchez és mtsai. 2003, S'underlíková és mtsai. 2009, Vengadesan és Pijut 2009). A mi esetünkben sem a szárazságstressz, sem az ABA kezelés nem vezetett eredményhez.

9. táblázat: A hajtás morfogenezisre hajlamos vonalak, a felhasznált növekedés szabályozó anyagok és a szükséges átlagos idő. A nyílak a táptalaj váltást jelölik. Az első váltás előtt átlagosan több mint 4 hónap telt el, míg a későbbi váltások között eltelt hónapok változóak, nem relevánsak. A felsorolások a különböző startégiákat jelölik.

Taxon kódja	Explantátum	Hajtáskezdeményt indukáló táptalaj (mg ^l ⁻¹)	Hajtás-kezdemény megjelenés átlagos időpontja (hónap)
A149	levél	• 4 NAA 0,5 BA → 1 NAA 1 BA → 0,1 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,5 BA → 1 NAA 1 BA → 0,1 NAA 0,5 BA→0,1 IBA 0,4 BA • 4 NAA 0,5 BA → 0,05 NAA 2 BA • 4 NAA 0,5 BA → 4 NAA 2,5 BA → 0,5 NAA 0,5 BA→0,05 IBA 0,1 BA→ 0,1 IBA 0,2 BA • 4 NAA 0,5 BA → 0,5 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,5 BA → 1 NAA 1 BA → 0,05 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,5 BA → 0,5 NAA 0,5 BA → 0,1 NAA 0,5 BA • 4 NAA 0,5 BA → 0,5 NAA 0,5 BA → 0,1 IBA 0,1 BA	18
A149	barka/2	• 0,5 NAA 4 BA → 1 NAA 1 BA → 0,1 NAA 0,1 BA→0,1 IBA 0,1 BA • 0,5 NAA 4 BA → 1 NAA 1 BA → 0,5 NAA 0,5 BA • 0,5 NAA 4 BA → 1 NAA 1 BA → 0,5 NAA 0,5 BA→ 0,1 NAA 0,5 BA • 0,5 NAA 4 BA → 1 NAA 1 BA → 0,5 NAA 0,5 BA→0,1 IBA 0,1 BA→ 0,1 IBA 0,4 BA • 0,5 NAA 4 BA → 4 NAA 0,5 BA → 2 NAA 0,5 BA→ 2 NAA 1 BA	20
B50	levél	• 4 NAA 1 BA • 4 NAA 0,5 BA	13
A211	levél	• 4 NAA 0,5 BA → 4 NAA 1 BA→ 2 NAA 0,5 BA	25
D137	levél	• 4 NAA 1 BA → 4 NAA 0,5 BA→ 2 NAA 0,5 BA • 4 NAA 1 BA → 1 NAA 1 BA→ 0,5 NAA 0,5 BA • 2 NAA 0,5 BA	19



9. ábra: A stabilizált *Quercus* kalluszvonalak hajtás morfogenezise 100 mg^l⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétében. A jelmagyarázat a következő oldalon található.

a.) Globuláris (gs) és szív stádiumú (hs) szomatikus embriók az A149 (*Q. petraea*) 21 napos kalluszokon (cal) 0,1 mg^l NAA és 0,5 mg^l BA jelenlétében b.) Kései szív- korai torpedó stádiumú embrió sziklevéllel hajtás és gyökér primórdiummal 28 napos A149 –es kultúrából 0,1 mg^l IBA és 0,2 mg^l BA tartalmú táptalajon c.) és d.) A149 (*Q. petraea*) embriókat tartalmazó kalluszai 0,1 mg^l IBA és 0,2 mg^l BA tartalmú táptalajon. e.) Hajtások megjelenése A149 (*Q. petraea*) barkaeredetű kalluszain 0,1 mg^l IBA és 0,1 mg^l BA tartalmú táptalajon. f-k.) Hajtások megjelenése A149 (*Q. petraea*) levél eredetű kalluszain (f.) 0,1 mg^l IBA és 0,2 mg^l BA, (g.) 0,05 mg^l NAA és 2 mg^l BA, (h.) 0,5 mg^l NAA és 0,5 mg^l BA, (i.) 0,05 mg^l NAA és 0,2 mg^l BA, (j.) 0,4 mg^l IBA és 0,1 mg^l BA, (k.) 0,1 mg^l IBA és 0,4 mg^l BA jelenlétében. l.) B50 (*Q. virgiliana*) levél explantátumból származó kalluszon keletkező hajtások 4 mg^l NAA és 1 mg^l BA tartalmú táptalajon. m.) A211 (*Q. virgiliana* x *Q. polycarpa*) levél explantátumból származó kalluszokon indukálódott hajtások 2 mg^l NAA és 0,5 mg^l BA jelenlétében n.) D137 (*Q. dalechampii* x *Q. petraea*) levél explantátumból származó kalluszon megjelenő hajtások 2 mg^l NAA és 0,5 mg^l BA tartalmú táptalajon. Skála a. és b. 500 µm. Skála c-n: 1 cm

A szárazságstressz vizsgálatokhoz kiválasztott kalluszvonalak a kalluszok megjelenésétől számítva több mint egy éve álltak fenn, a változatlan növekedési és morfogenetikai sajátosságaikkal stabilnak bizonyultak.

4.2 A PEG 6000 hatása a *Quercus* taxonok tenyésztéire

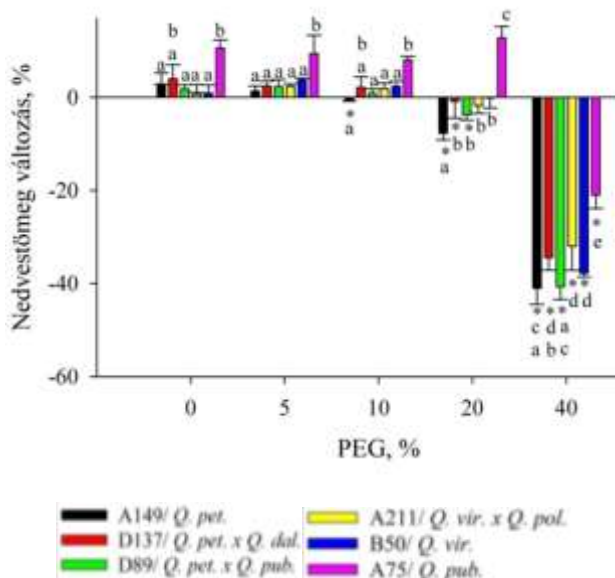
4.2.1 A PEG 6000 hatása a *Quercus* kalluszok vízvesztésére

A PEG 6000-el való ozmotikus kezelést követően a nedvestömeg változás mérése kimutatta, hogy a szárazságra érzékenyebb A149-es (*Q. petraea*) vonal kalluszainál, a PEG 6000-el történő kezelés koncentrációfüggő vízvesztést váltott ki, ami a kalluszok nedvestömegének csökkenésében mutatkozott meg (10. ábra). A vízvesztesség 10 % PEG 6000 hatására kezdődött meg. Ezzel szemben, a szárazságtűrőbb A75 (*Q. pubescens*) és B50 (*Q. virgiliana*) vonalak rezisztensnek bizonyultak a PEG 6000 indukálta vízvesztéssel szemben, mert csak a legnagyobb PEG 6000 koncentráció (40%) váltott ki a kalluszokban nedvestömeg csökkenést (10. ábra). A szárazságtűrőbb és a szárazságra érzékenyebb tölgyek feltételezett hibridjeinek (A211, D137 és D89) PEG 6000 indukált vízvesztése 20 %-os PEG 6000 –nél jelentkezett (10. ábra)

A növények addig képesek a víz felvételére, amíg a vízpotenciáljuk alacsonyabb a talajban lévő víz potenciáljánál. Azok a növények, melyek a vízhiánystresszhez ellensúlyozással próbálnak alkalmazkodni, olyan stratégiákat vetnek be, hogy a szárazság ellenére megőrizték a szövetek megfelelő hidratáltsági állapotát, az energiát a protoplazma kiszáradásának a megelőzésébe fektetik (Larcher 2001, Taiz és Zeiger 2002, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004). Ezek a növények, ozmoregulációs folyamatok beindításával próbálják elkerülni a sejtterefogat és a turgor csökkenését. A szárazságstressz hatására az ozmoreguláció során, a gyökök fokozott ionfelvétellel segítik a sejtekben lejátszódó szervetlen ionok felhalmozását. Fokozódik a hidrolitikus enzimek -α-amiláz, ribonukleáz, proteáz- aktivitása is, amik keményítő és egyéb makromolekulák lebontásával növelik az ozmotikusan aktív szerves anyagok koncentrációját (Taiz és Zeiger 2002, Wang és mtsai. 2003, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Szalai 2006, Fodorpatáki 2009).

Amíg a rövid ideig tartó, vagy enyhe szárazságstressz hatására a *Quercus robur* gyorsan metabolizálható monoszacharidok: glükóz, fruktóz, galaktóz halmozódnak fel a sejtekben, addig a tartósabb, vagy erősebb stressz, a stabilabb és hatásosabb ozmolitikumok: diszacharidok, quercitol és mannitol akkumulációját eredményezik. A nitrogéntartalmú ozmoprotektánsok közül a prolin, hidroxyprolin, metilprolin és trigonellin koncentrációja emelkedik meg a szárazságstressz hatására (Spieß és mtsai. 2012). A stressz során növekszik számos vízben oldódó védő fehérje (LEA fehérjecsoport, ozmotin) szintézise is, melyek stabilizálják a sejtalkotókat, a membránokat és fehérjéket. (Taiz és Zeiger 2002, Wang és mtsai. 2003, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Szalai 2006, Fodorpatáki 2009).

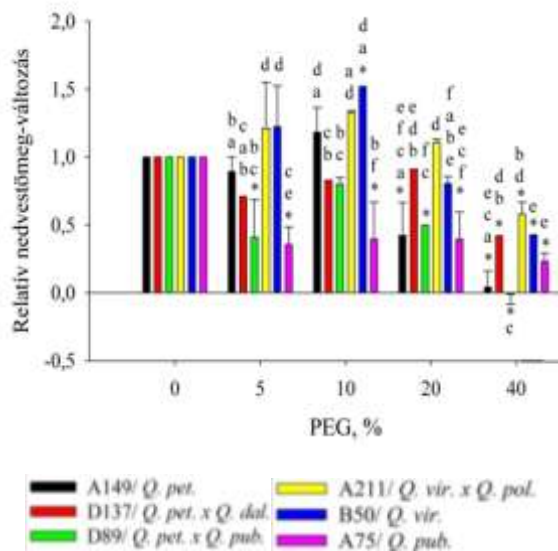
Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a kísérleteinkben szereplő szárazságtűrőbb tölgy taxonok, sikeresebben tudták ellensúlyozni a kedvezőtlen ozmotikus körülményeket. Sejtjeikben hatékonyabban tudták felhalmozni a különféle ozmotikumokat, ezáltal jobban le tudták csökkenteni a vízpotenciáljukat, így magasabb PEG 6000 koncentrációknál is meg tudták akadályozni a víz kiáramlását a sejtekből, tovább megőrizve ezzel a szövetek megfelelő hidratáltsági állapotát.



10. ábra: A kalluszok %-os nedvestömeg-változása PEG 6000 növekvő koncentrációjának hatására. A kísérlethez felhasznált kalluszok 4 mg^l NAA és 0,5 mg^l BA tartalmú 100 mg^l aszkorbinsavval kiegészített WPM táptalajon nőttek. Összesen több mint 12 független vizsgálat történt és, legalább 12 esetben hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az eltérő színű oszlopok a különböző tölgygenotípusok kalluszainál vizsgált nedvestömeg változások középértékei. A sávok a szórást jelölik. A csillagok a szignifikáns eltérést jelölik a különböző koncentrációjú PEG 6000 kezelések között ugyanannál a genotípusnál, míg a betűkódok a kalluszvonalak közötti szignifikáns különbségeket mutatják ugyanannál a PEG 6000 kezelésnél. A szignifikáns különbségek $p < 0,05$.

4.2.2 A PEG 6000 hatása a *Quercus* taxonok kalluszainak viabilitására az ozmotikum kimosása után

Az ozmotikus stresszt követő helyreállítás (recovery) vizsgálata során a nedvestömeg-mérések eredményei azt mutatták, hogy az A149 kalluszainak növekedését a 10 %-os PEG 6000 kezelés enyhén stimulálta, de az ettől töményebb oldatok a növekedést gátolták (11. ábra). Az A211 és a B50 esetében 5-10 % PEG alkalmazásakor a növekedés kismértékű átmeneti serkentését tapasztaltuk. Ugyanakkor a nedvestömeg gyarapodásának a gátlása a B50 esetében 20 % PEG 6000, az A211-nél pedig 40 % PEG 6000 kezelésnél volt észlelhető (11. ábra). A D137, D89 és A75 esetében a PEG 6000 minden alkalmazott koncentrációja gátolta a kalluszok növekedését (11. ábra).



11. ábra: A kalluszoknak a „recovery” alatt bekövetkező relatív nedvestömeg-változása a növekvő koncentrációjú PEG 6000 kezelést követően. A kísérlethez felhasznált kalluszok 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA tartalmú 100 mg^l⁻¹ aszkorbinsavval kiegészített WPM táptalajon nőttek. A kalluszok relatív nedvestömeg-változása a recovery alatt, a PEG kezelést követő 4. héten. Összesen leglább 3 független vizsgálat történt és, legalább 3 esetben hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az eltérő színű oszlopok a különböző tölgygenotípusok kalluszainál vizsgált relatív nedvestömeg-változások középértékei. A sávok a szórást jelölik. A csillagok a szignifikáns eltérést jelölik a különböző koncentrációjú PEG 6000 kezelések között ugyanannál a genotípusnál, míg a betűkódok a kalluszvonalak közötti szignifikáns különbségeket mutatják ugyanannál a PEG 6000 kezelésnél. A szignifikáns különbségek $p < 0,05$

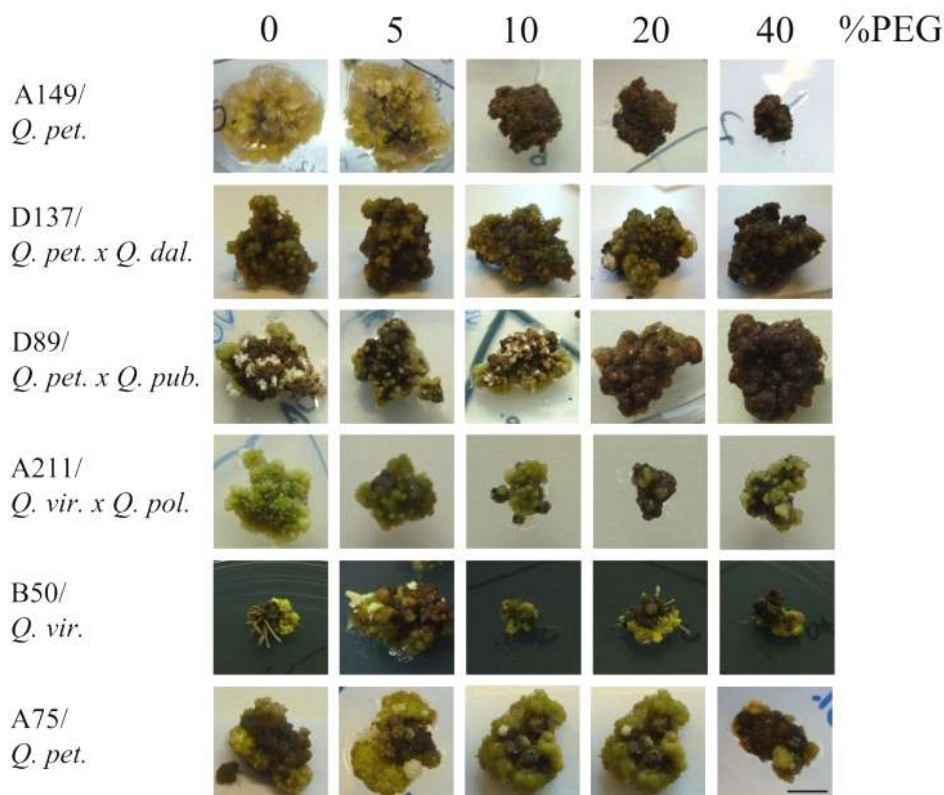
A PEG kezelés hatására az összes kallusz nekrotikus jellegű elbarnulást mutatott, feltehetően a kezelés során bekövetkező stressz hatására felhalmozódó fenolvázias vegyületek miatt. A recovery kísérletekben, az új, életképes, kompakt zöld kalluszok megjelenését a kezelt kalluszok elbarnult felületein a 12. ábra reprezentatív képei foglalják össze.

Az A149 *Q. petraea* vonal esetében, az életképes, zöld kalluszok létrehozásának képessége 10 % PEG kezelést követően kisebb mértékű lett, annak ellenére, hogy ennél a koncentrációnál még nedvestömeg gyarapodást mértünk (11., 12. ábra). Ez azért lehetséges, mert a kallusz tömege nem csak az új sejtek megjelenésével tud gyarapodni, hanem a már meglévő sejtek is képesek differenciálódás során tágulással, sejtanyag lerakódással, és tartalék tápanyagkészlet felhalmozásával hozzájárulni a folyamathoz (Maróti 1976, Dudits és Heszky 2003, Razdan 2003, George és mtsai. 2010). A kalluszok 20 % PEG kezelést követően pedig már nem tudtak regenerálódni 4 hét alatt (11., 12. ábra).

A *Q. petraea* feltételezett hibridjei közül a D89, 20 % PEG kezelést követően vált képtelenné arra, hogy új, életképes zöld kalluszokat produkáljon 4 hét alatt, a D137 estében pedig 40% PEG hatására mérséklődött az új kalluszok megjelenése (12. ábra). Ezzel szemben, az A75, B50 és a *Q. virgiliana* – *Q. polycarpa* feltételezett hibridjének (A211) a kalluszai, még a 40 %-os PEG kezelés által kiváltott ozmotikus stresszt követően is megőrizték a regenerációs képességüket, annak ellenére, hogy a recovery kísérletekben ezeknél a vonalaknál is korlátozta a PEG kezelés a nedvestömeg gyarapodás mértékét (11., 12. ábra).

Ezek alapján a vonalak között eltérés van abban, hogy milyen PEG koncentráció okoz a növényeknél már végleges károsodást. A szárazságra érzékenyebb *Q. petraea* (A149) esetében ez az érték 20 % körülire tehető ugyanúgy, mint a D89 esetében, a szárazságtűrőbb taxonok (A75, B50) pedig nem érték el ezt a stádiumot, még a PEG 6000 40 %-os koncentrációjánál sem (12. ábra).

A recovery vizsgálata során, látszólagos ellentmondás mutatkozott a nedvestömeggyarapodásból megállapított kallusznövekedés mértéke és a kallusz életképessége között. A recovery kísérletek esetében, a viabilitást mutató kalluszok morfológia bélyegei jobban mutatják a szárazságtűrési képességét, mint a nedves tömegben bekövetkezett változások.



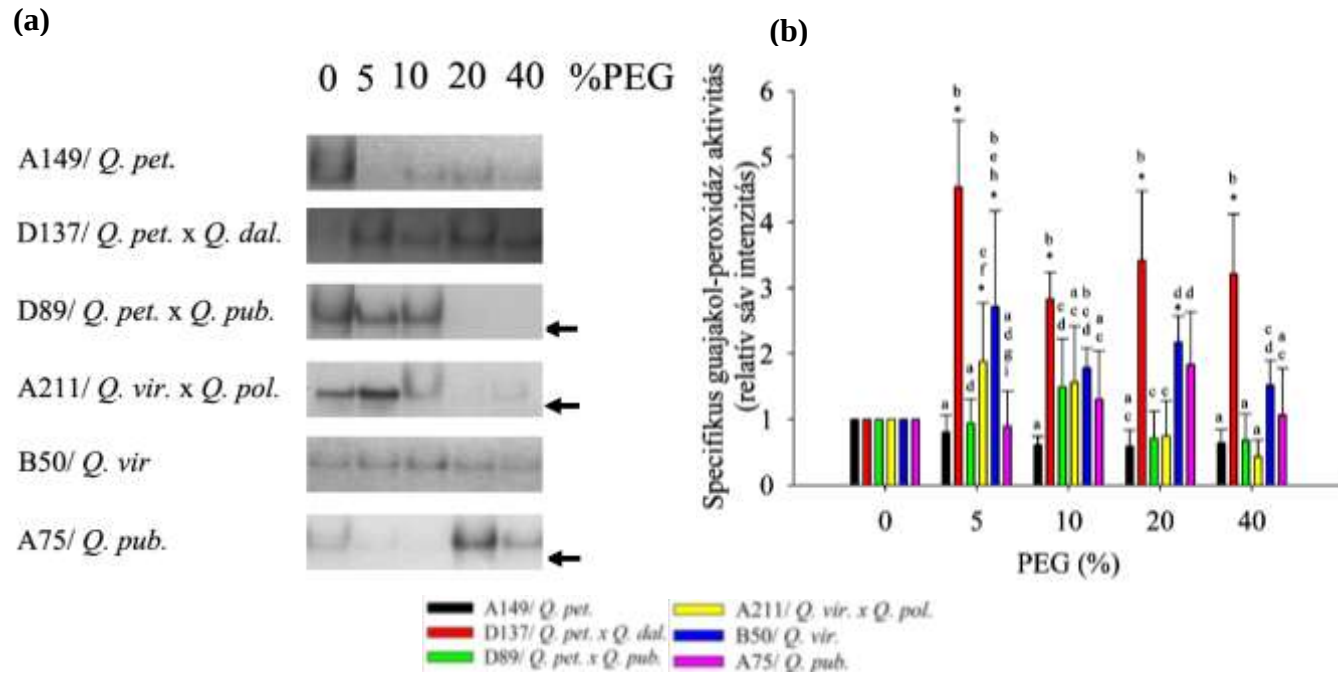
12. ábra: Reprezentatív recovery kísérletek eredményei a különféle genetikai eredetű, eltérő *Quercus* taxonok kalluszain. A PEG 6000 koncentrációsorozattal kezelt kalluszok, melyeket az ozmotikum kimosását követően egy hónapig 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA tartalmú illetve 100mg^l⁻¹ aszkorbinsavval kiegészített WPM táptalajon neveltünk. Skála: 5 mm. Összesen leglább 3 független vizsgálat történt, és a reprezentatív ábránál, leglább 3 esetben az eredmények megegyeztek.

4.2.3 A PEG 6000 hatása a *Quercus* taxonok peroxidáz enzimeinek aktivitására

Valamennyi kedvezőtlen környezeti tényező, megváltoztatva a sejten belüli redoxállapotot, megemeli a növények sejtjeiben a reaktív oxigénformák szintjét, így az oxidatív stressz általános kísérője a legtöbb környezeti stressztényezőnek, mint amilyen a szárazság/ozmotikus stressz is (Mittler 2002). A növények vízhiánystresszhez történő alkalmazkodásához hozzátartozik az oxidatív stresszt megelőző és védő rendszer kapacitásának növelése, az antioxidáns enzimek, mint amilyenek a szuperoxid-dizmutázok, katalázok, peroxidázok aktivitásának növelése (Wang és mtsai. 2003). A stresszhatásokhoz történő alkalmazkodás mértéke összefüggésben áll az oxidatív stresszt kivédő vegyületek és enzimek szintjével és aktivitásával, ami lehetővé teszi, hogy az antioxidáns védőrendszer állapotából következtetni tudjunk arra, hogy a növény milyen mértékben tudja tolerálni a stresszorok hatását (Inzé és Montagu 1995, Láng 1998, Rizhsky és mtsai. 2002, Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Fodorpatáki 2009).

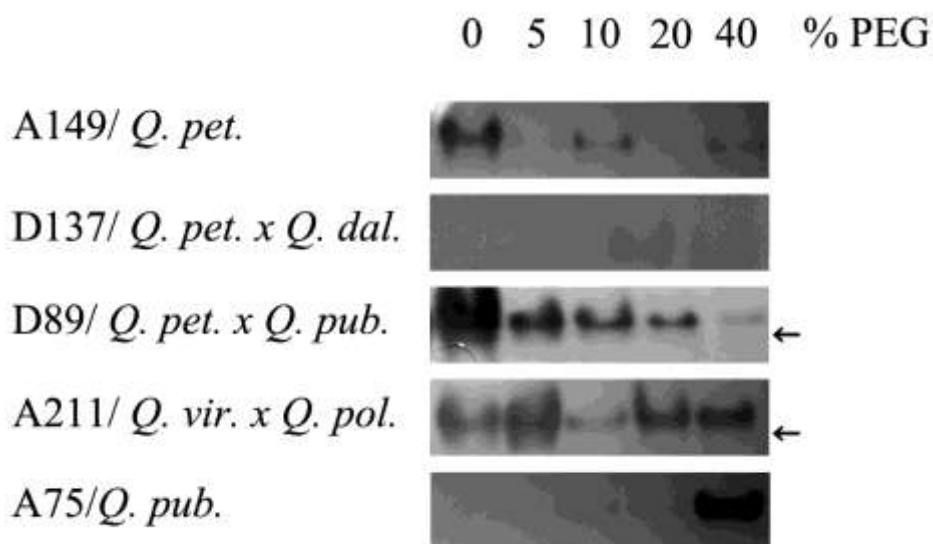
A szárazságtűrő *Quercus suber* antioxidáns védőrendszerének enzimatis és nem enzimatis komponensei egyaránt indukálódtak délben a nyári száraz, erős sugárzással és nagy meleggel jellemezhető napokon (Faria és mtsai. 1996). Ezzel szemben a szárazság- és sóstresszre érzékenyebb *Quercus robur* estében csak a SOD aktivitása és mintázata módosult a NaCl által kiváltott stressz hatására (Sehmer és mtsai. 1995). A *Q. robur* makkjai kiszáradás következtében elveszítik életképességüket, mert a reaktív oxigénformák felhalmozódnak, az antioxidáns enzimek alacsony szintje miatt (Hendry és mtsai. 1992). A szárazságtűrőbb *Quercus robur* genotípusoknál ugyanakkor, több antioxidáns enzim (SOD, aszkorbát-peroxidáz, kataláz, dehidroaszkorbát reduktáz, glutation reduktáz) aktivitásnövekedését is kimutatták (Schwanz és Polle 2001).

A natív géleken az összes vizsgált vonalnál egy domináns, karakterisztikus, jól reprodukálható sáv jelent meg a guaiacol peroxidáz aktivitását illetően. A mikroszatellit vizsgálatok alapján, az egymással közelebbi rokonságban lévő D89, A211 és A75 esetében (1. ábra) a guaiacollal történő festésnél egy alacsonyabb intenzitású, második sávot (izoenzimet) is észleltünk az első sáv közvetlen közelében, ami az A75-nél csak 20 % PEG 6000 kezelés hatására jelentkezett (13. a. ábra nyilak), míg a genetikailag távolabbi vonalaknál, az A149-nél és D137-nél ez a második sáv nem jelent meg (13. a. ábra). A PEG 6000 kezelés kalluszkra gyakorolt hatása függött a genotípusoktól. A szárazságra érzékenyebb A149 esetében a PEG koncentráció növekedésének hatására a kalluszkok guaiacol peroxidáz aktivitása nem változott számottevő mértékben, elhanyagolható átmeneti növekedést követően csökkenést tapasztaltunk (13. ábra). Ezzel szemben, a szárazságtűrőbbnek feltételezett taxonoknál (A75, B50) a PEG kezelés hatására jelentős mértékben megnövekedett a peroxidáz aktivitás (13. ábra). Ebből arra lehet következtetni, hogy szárazságtűrőbb taxonoknál az antioxidáns rendszer feltehetően hatékonyabb volt. A D89-nél kismértékű átmeneti aktivitásemelkedést tapasztaltunk, mely 10 % PEG kezelést követően kezdett el csökkenni (13. ábra). A D89 vonal ozmotikus stresszre adott válaszreakciója peroxidázok szintjén átmenetet képez a két szélső értéket képviselő taxon, a szárazságnak kevésbé ellenálló A149 és a szárazságtűrőbb A75 között, megerősítve a levélmorfológia szerint történő besorolást. Az A211 vonalnál is, ami szintén egy szárazságtűrőbbnek és egy szárazságra érzékenyebbnek feltételezett taxon hibridje, a D89-hez hasonlóan 10 % PEG hatására kezdett el csökkenni a guaiacol-peroxidáz aktivitása (13. ábra). A D137 hasonló tendenciákat mutatott, mint a szárazságtűrő fajok, a peroxidázaktivitás még a 40 %-os PEG kezelés esetében is jóval a kontroll értéke felett volt (13. ábra).



13. ábra: *Quercus* taxonok kalluszainak guajakol peroxidáz aktivitása PEG 6000 növekvő koncentrációjának hatására. A kísérlethez felhasznált kalluszok 4 mg^l⁻¹ NAA és 0,5 mg^l⁻¹ BA tartalmú 100 mg^l⁻¹ aszkorbinsavval kiegészített WPM táptalajon nőttek. a.) A reprezentatív gélek. A nyilak a második sávokat jelölik b.) A CP Atlas szoftver segítségével kiszámított relatív sávintenzitásokkal reprezentált enzimaktivitások. Összesen leglább 3 független vizsgálat történt és, legalább 3 esetben hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az eltérő színű oszlopok a különböző tölgygenotípusok kalluszainál vizsgált guajakol peroxidáz aktivitások középértékei. A sávok a szórást jelölik. A csillagok a szignifikáns eltérést jelölik a különböző koncentrációjú PEG 6000 kezelések között ugyanannál a genotípusnál, míg a betűkódok a kalluszvonalak közötti szignifikáns különbségeket mutatják ugyanannál a PEG 6000 kezelésnél. A szignifikáns különbségek p<0,05.

A pirogallol peroxidáz vizsgálata során, a guaiacol peroxidázhoz hasonló tendenciákat tapasztaltunk. Szintén egy domináns sáv bizonyult karakterisztikusnak és jól reprodukálhatónak minden vonal esetében, mely ugyanazon a helyen jelentkezett a gélen, mint a guaiacol peroxidáz sávjai, és csak a D89 és A211 feltételezett hibrideknél jelentkezett a halvány második sáv az első sáv közvetlen közelében. A D89 kontrolljában jelentkező második sáv kezelés hatására eltűnt. Az A75 (*Quercus pubescens*) esetében a növekvő ozmotikus stressz hatására nőtt a domináns izoenzim aktivitása, ezzel szemben az A149-es (*Quercus petraea*) vonalnál enzimaktivitás-csökkenés következett be (14. ábra). Általános aktivitás csökkenést figyeltünk meg a D89 és A211 feltételezett hibrideknél is, egy kisebb mértékű átmeneti növekedést követően. Az aktivitás csökkenés a guaiacol peroxidázhoz képest a D89-nél alacsonyabb (5%), az A211-nél pedig magasabb (20%) PEG koncentrációknál kezdődött meg. (14. ábra). A D137 feltételezett hibrideknél a kezelt kalluszokban végig magasabb volt az enzimek aktivitása, mint a kontrollban, és 20 % PEG 6000 kezelés hatására következett be a legerőteljesebb intenzitásnövekedés (14. ábra).



14. ábra: *Quercus* taxonok kalluszainak pirogallol peroxidáz aktivitása PEG 6000 növekvő koncentrációjának hatására a reprezentatív géleken. A kísérlethez felhasznált kalluszok 4 mg^l NAA és 0,5 mg^l BA tartalmú 100 mg^l aszkorbinsavval kiegészített WPM táptalajon nőttek. A nyílak a második sávokat jelölik. Összesen legalább 3 független vizsgálat történt, és a reprezentatív géleknél legalább 3 esetben hasonló tendencia volt megfigyelhető. A B50 vonalnál adathiány miatt hiányzik a reprezentatív gél.

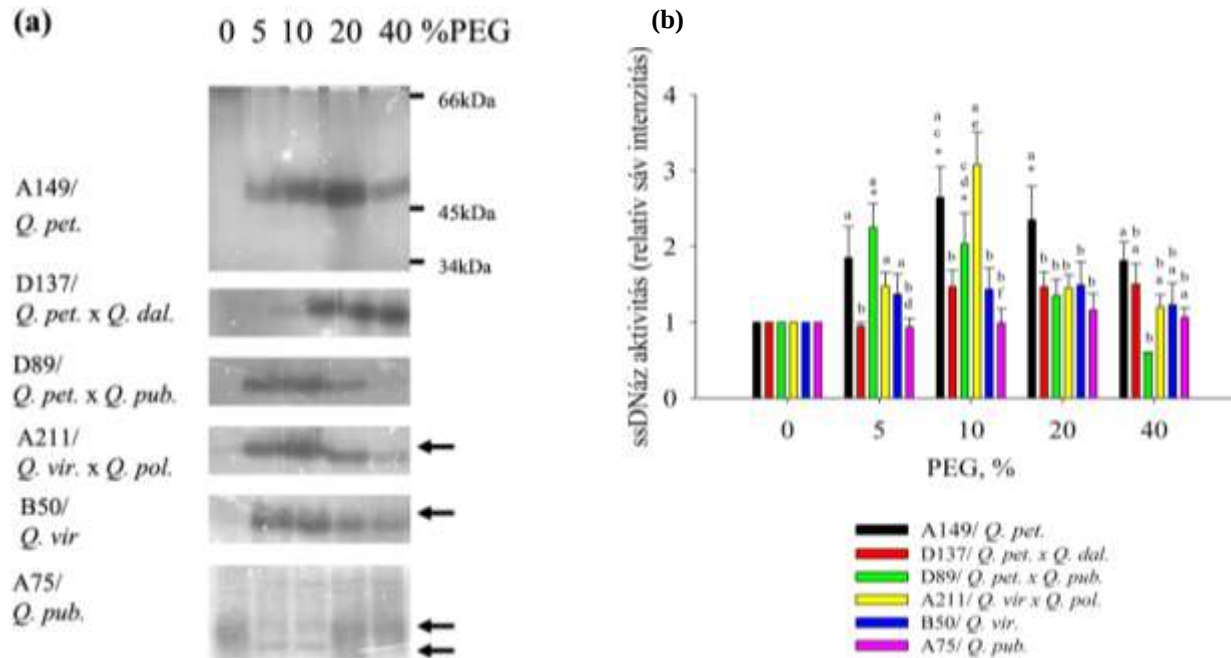
4.2.4 A PEG 6000 hatása a *Quercus* taxonok ssDN-áz enzimeinek aktivitására

A szárazságstressz fokozódásával, fokozatosan károsodik az antioxidáns védőrendszer is, növekedik a lipidek, aszkorbát és glutation oxidációjának mértéke (Schwanz és Polle 2001).

Megfelelő mértékű védekezés hiányában jelentős mértékű károsodás következik be a sejtstruktúrában és a makromolekulákban, ami magába foglalja a DNS szálak felhasadásait

is (Ramachandra Reddy és mtsai. 2004). A DNS oxidatív károsodását követően, hibajavító mechanizmusok indulnak be a sejtekben, és fokozódik a nukleázok aktivitása. A hibajavítás főként a bázisok szintjén nyilvánul meg, de olykor nukleotid egységek kivágása is bekövetkezhet (Roldán-Arjona és Ariza 2009). Számos szárazság-, ozmotikus vagy sóstressz által indukált egyszálú DNS-t hasító nukleázt azonosítottak. Ilyen az árpa Bnucl sóstresszel indukálható 36kDa-nál alig kisebb I. típusú nukleáza, ami feltehetően egy glikoproteid (Muramoto és mtsai. 1999). Számos hidrogén-peroxid és ozmotikus stressz indukált egyszálú DNS-t hasító izoenzim molekulatömege esik 26 és 38 kDa közé, amit a karfiol palántákban vizsgáltak. Közülük két enzim mindkét stressz hatására megjelent (Leśniewicz és mtsai. 2010). A gélek elemzése és kiértékelése során egy domináns, karakterisztikus, jól reprodukálható ozmotikus stressz által befolyásolható ssDN-ázt detektáltunk minden vonalnál, melynek molekulatömege 50 KDa volt (15. a. ábra). A legjobb tudomásunk szerint, nem jellemzőek a növényekre olyan, hasonló molekulatömeg tartományba eső nukleázok, melyek aktivitása abiotikus stressz hatására módosul, bár számos olyan nukleáz létezik, ami több kisebb alegységből áll (Desai és Shankar 2003). Így az 50kDa-os *Quercus* nukleáz természetének feltáráshoz további vizsgálatok szükségesek. Ennek az enzimnek az aktivitása az A149, D137 és D89 vonalak kontrolljaiban kisebb, mint az A211, B50 és A75 kultúrák kontrolljaiban (15. ábra). A PEG 6000 kezelés genotípustól függően hatott a kalluszokra. A közelebbi rokon A211, B50 és A75 (1. ábra) esetében az 5-20 % PEG 6000 kezelés hatására 45-55 kDa tartományban két sáv jelent meg, de a kisebb moláris tömegű sáv intenzitása halványabb (15. a. ábra nyilak). A távolabbi rokonoknál, az A149-nél és a D137-nél csak egy sávot detektáltunk (15. a. ábra). Számos nukleáz olyan glikoprotein, amelyen az egyes glikozidos oldalláncok megléte és hiánya a sejt fiziológiai állapotával van összefüggésben (Desai és Shankar 2003). Lehetséges, hogy a gélen megjelenő dupla sáv ugyanannak az enzimnek az eltérően glikozilált állapotát jelenti.

Az A75 (*Quercus pubescens*) kivételével a növekvő ozmotikus stressz, a kontrollhoz viszonyítva a nukleázok aktivitásában átmeneti növekedést eredményezett. Az aktivitások 5-20 % PEG 6000 jelenlétében érik el a maximumot. A legnagyobb aktivitásnövekedést az A149 (*Quercus petraea*) illetve a feltételezett hibridek a D89 és az A211 esetében tapasztaltuk (15. ábra). A B50 (*Quercus virgiliana*) PEG 6000 kezelésénél az ozmotikum koncentrációjának növelése csekély mértékben stimulálta az ssDN-áz aktivitását (15. ábra). Az A75 esetében az enzimaktivitás nem növekedett jelentős mértékben a PEG kezelés hatására, de az 5-10 % PEG 6000, két erős aktivitású 50 kDa molekulatömegű sáv megjelenését eredményezte (15. ábra). A D137-es feltételezett hibrid hasonló DN-áz aktivitást mutat, mint a szárazságtűrőbb fajok. Ebből arra lehet következtetni, hogy a szárazságra érzékenyebb taxonok antioxidáns rendszere nem bizonyult elég hatékonynak, a felhalmozódó reaktív oxigénformák miatt károsodott a DNS állomány, aminek hatására feltételezhetően indukálódtak a helyreállító folyamatok, amik a nukleáz aktivitás emelkedését vonták maguk után. A szárazságtűrőbb taxonoknál az antioxidáns rendszer feltehetően hatékonyabb volt, így a DNS károsodás is kisebb mértékben következett be.



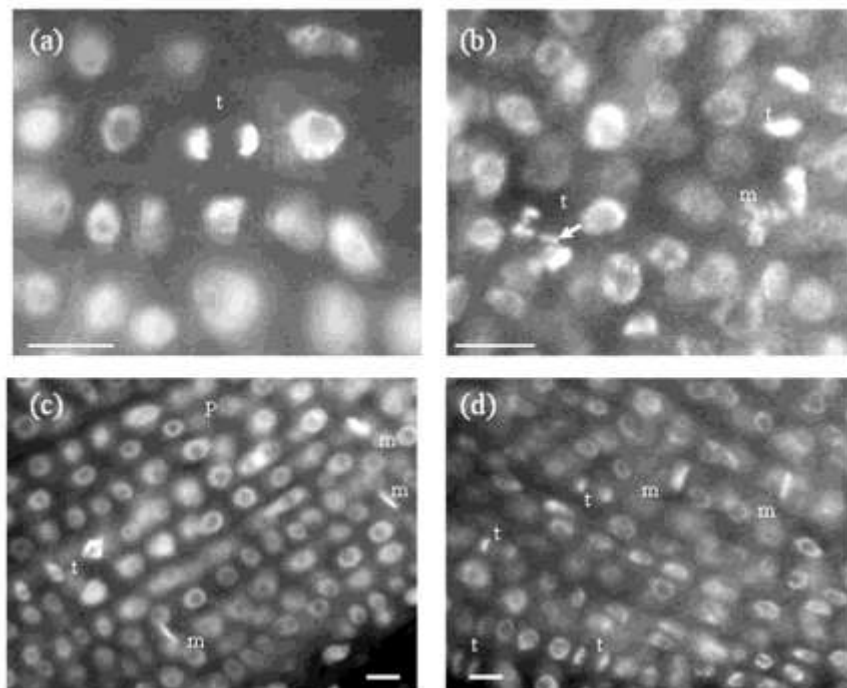
15. ábra: *Quercus* taxonok kalluszainak ssDN-áz aktivitása PEG 6000 növekvő koncentrációjának hatására. A kísérlethez felhasznált kalluszok 4 mg l^{-1} NAA és $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA tartalmú 100 mg l^{-1} aszkorbinsavval kiegészített WPM táptalajon nőttek. a.) A reprezentatív gélek. b.) A CP Atlas szoftver segítségével kiszámított relatív sávintenzitásokkal reprezentált enzimaktivitások. A nyilak a második izoenzim sávot mutatják. Összesen legrább 3 független vizsgálat történt és, legalább 3 esetben hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az eltérő színű oszlopok a különböző tölgygenotípusok kalluszainál vizsgált ssDNáz aktivitások középértékei. A sávok a szórást jelölik. A csillagok a szignifikáns eltérést jelölik a különböző koncentrációjú PEG 6000 kezelések között ugyanannál a genotípusnál, míg a betűkódok a kalluszvonalak közötti szignifikáns különbségeket mutatják ugyanannál a PEG 6000 kezelésnél. A szignifikáns különbségek $p < 0,05$.

4.2.5 A PEG 6000 hatása a *Quercus* taxonok kalluszaiból regenerált gyökerek merisztéma sejtjeinek kromatin szerveződésére

A stresszhatások széles skálájához történő alkalmazkodás mértéke összefüggésben áll az oxidatív stresszt kivédő vegyületek és enzimek szintjével és aktivitásával, ami lehetővé teszi, hogy az antioxidáns védőrendszer állapotából következtetni tudjunk arra, hogy a növény milyen mértékben tudja tolerálni az egyéb stresszorok, mint pl. az elégtelen vízellátottság hatását. A szárazságstressz fokozódásával, fokozatosan károsodik az antioxidáns védőrendszer is (Schwanz és Polle 2001), megfelelő mértékű védekezés hiányában pedig a felszaporodó reaktív oxigénformák károsítják a DNS-t a szerves bázisok oxidálásával, és a molekula gerincét alkotó pentóz-foszfát váz felhasításával. Ez ellen a növények a DNS javító mechanizmusokkal védekeznek (Roldán-Arjona és Ariza 2009). Azonban ha a stresszhatás akkora mértékű, hogy a sejt membránrendszere is károsodik, a sejtben apoptotikus folyamatok indulnak be, melynek során a nukleázok közreműködésével bekövetkezik a DNS létraszerű fragmentálódása (Láng 1998, Pérez-Amador és mtsai. 2000).

A citológiai vizsgálatokból megállapítható, hogy az interfázisban lévő gyökérmerisztéma sejtek, ill. a differenciálódott sejtek kromatin szerveződésében a PEG nem indukált a sejthalálra utaló változásokat (kromatin kondenzációt, sejtmag fragmentációt) (Jámbrik és mtsai. 2011), egyetlen kalluszvonal esetében sem (16. ábra). Azonban a taxonok szárazságtűrő képessége kromatin szerveződés szintjén is összehasonlítható, mert míg az alacsonyabb ozmotikus stressz toleranciával rendelkező D89 vonal esetében 10 %-os PEG kezelést követően a gyökércsúcs merisztéma sejtekben rendellenes mitózist, lemaradó kromoszómák megjelenését tapasztaltuk (16. a., b. ábra), addig az ozmotikus stressz toleráns A75 gyökérmerisztéma sejtjeinek a mitotikus kromatin szerveződése még 40 %-os PEG-gel történő kezelést követően is összevethető volt a kontrolléval (16. c., d. ábra).

A lemaradó kromoszómák (16. b. ábra nyíl) olyan kromoszómák, amiknek nem sikerül elmozdulniuk valamelyik pólus irányába a mitózis során. Ez a jelenség kromoszóma organizációs problémára utal, melynek okát Silva és mtsai. (2011) olyan proteinek inaktiválódására vezetik vissza, melyek a mitotikus orsó működésének szabályozásában vesznek részt. Hasonló osztódási rendellenességről cianobaktérium toxinokkal (Beyer és mtsai. 2009, Jámbrik és mtsai. 2011, Silva és mtsai. 2011) illetve nehézfémekkel kezelt (Samardakiewicz és Woz'ny 2005, Zhang és mtsai. 2009) növényeknél számoltak be. A sejtek működésében bekövetkező rendellenességek első jeleinek tekinthetők a lemaradó kromoszómák, melyek alacsony toxin- illetve nehézfém koncentrációnál rövidebb kezelési időtartamoknál keletkeznek (Beyer és mtsai. 2009, Jámbrik és mtsai. 2011). Kezdetben csak néhány sejtnél észlelhetők, majd a kezelés időtartamának, illetve a káros anyag koncentrációjának növekedésével, a rendellenes sejtek száma növekedik, megjelennek a kromoszómahidak, majd létrejönnek a mikronukleuszok, amit a kromoszómák kondenzálódása követ (Samardakiewicz és Woz'ny 2005, Zhang és mtsai. 2009). Ezeket a kutatásokat a jövőben is folytatni kívánjuk, kutatásainkat kiterjeszteni vizsgálva, hogy a citoskeleton - a mikrotubulusok és a mikrofilamentumok- szerveződése- szárazság-/ozmotikus stressz hatására milyen karakterisztikus változásokat szenvedhet.



16. ábra: PEG kezelés hatása a *Quercus* kalluszekből regenerált gyökerek merisztéma sejtjeinek kromatin szerveződésére. p- profázis; m- metafázis; t- telofázis. a.) D89, kontroll, normál mitózisa jellemző kromatinszerveződés; b.) D89, 10 % PEG kezelés, késői mitózisban kimutatható, lemaradó kromoszóma (nyíl); c.) A75, kontroll, normál mitózisa jellemző kromatinszerveződés, d.) A75, 40 % PEG kezelés, normál mitózisa jellemző kromatinszerveződés. Skálák: 20 μ m. Összesen leglább 3 független vizsgálat történt, és a reprezentatív ábrák esetében legalább 3 alkalommal hasonló tendencia volt megfigyelhető.

4.2.6 Összegzés

A vizsgált kallusz kultúrák ozmotikus kezelést követő vizsgálatainak eredményeit a 10. táblázat foglalja össze. Összességében a szövettényezetekben az ozmotikus stressz által előidézett fiziológiai változások kimutatták, hogy a *Q. petraea* kultúrák szárazságra érzékenyek, míg a *Q. pubescens*, *Q. virgiliana* tenyészetek szárazságtűrőek. Eredményeink megerősítik ezeknek a fajoknak a szárazságtűrésével kapcsolatos előzetes megfigyeléseket, igazolják ezeknek a fajoknak az ökológiai igényét a természetes populációikban, és alátámasztják azt a feltevésünket, miszerint az *in vitro* kultúráink alkalmasak a különböző taxonok stresszválaszának vizsgálatára. Kísérleti rendszerünket így fel tudtuk használni az ismeretlen szárazságtűrő képességű, feltételezett hibridekből létrehozott tenyészetek esetében is. A különböző tölgytaxonok vizsgált genotípusait szárazságtűrő képességük alapján növekvő sorba rendeztük (lásd, 10. táblázat 1. sor kalluszvonalak felsorolása szárazságtűrő képesség alapján balról jobbra növekvő sorrendben).

A D89 (*Q. petraea* x *Q. pubescens*) ozmotikus stresszre adott válasza alapján, ahogyan azt vártuk, átmenetet képez a két szélsőértéket képviselő szülői faj, a szárazságnak kevésbé ellenálló A149 és a szárazságtűrőbb A75 között, a *Q. petraea* és *Q. dalechampii* hibridjének feltételezett D137-es taxon kalluszai az ozmotikus stresszel szemben ellenállónak mutatkoztak, míg a *Q. virgiliana* és *Q. polycarpa* hibridjének feltételezett A211-es vonal kalluszai szárazságra érzékenynek bizonyultak. A mikroszatellit eredmények, viszonylag

nagyobb genetikai távolságot mutattak ki a szárazságot kevésbé és jobban tűró tölgy taxonok között (1. ábra).

Táblázat 10. A PEG 6000-el kezelt tölgykallusz vonalak potenciális ozmotikus-/szárazságstressz tűró képességének összefoglalása a különféle fiziológiai paraméterek alapján. A besorolás jelentős fiziológiai eltéréseken alapul, melyeket kétféle gélen mutattunk ki.

kalluszvonal	A149	D89	A211	D137	B50	A75
vízvesztés	É	Á	Á	Á	T	T
recovery: regenerálódás	É	Á	T	Á	T	T
recovery: nedvestömeg növekedés összevetve az életképességgel	É	Á	T	Á	T	T
peroxidáz	É	Á	Á	T	T	T
ssDN-áz	É	É	É	T	T	T

Rövidítések: É: potenciálisan szárazságra érzékeny, T: potenciálisan szárazságtűrő, Á: Átmenet a potenciálisan szárazságra érzékeny és szárazságtűrő között.

5 Összefoglalás

Munkánk során megfelelő *in vitro* módszert dogoztunk ki a Síkfőkút kutatási terület erdőállományában előforduló fehér tölgy taxonokra, majd a létrehozott stabil szövettenyészetek felhasználásával szigorúan kontrollált körülmények között tanulmányoztuk a különböző taxonokból származó genotípusok ozmotikus és szárazságstressz tűró képességét.

A szövettenyésztéshez alkalmas eljárás kidolgozásához előzetes vizsgálatokat végeztünk az egyszikűek osztályába tartozó *Crocus heuffelianus*-on. Hosszú-távon fenntartható, embriogén kalluszokat hoztunk létre kipreparált hajtáscsúcs és a steril magvakból fejlődő fiatal csíranövény explantátumok felhasználásával 10 mg l⁻¹ NAA és 1 mg l⁻¹ BA hormon-összetételű, 2 w/v % szacharózt tartalmazó 0,8 w/v % agarral szilárdított MS* táptalajon (5. a., b., c. ábra). A növényregenerálás során három lépésből álló tenyésztést alkalmaztunk. A hormonok mennyiségének lecsökkentésével, és a hormonarányok megfordításával szomatikus embriókat hoztunk létre. A táptalaj erősségének és a szacharóz tartalmának csökkentésével, kiváltottuk az embriók érésének a folyamatát. Alacsony NAA koncentrációk mellett, GA₃, aszkorbinsav és 2 mg l⁻¹ BA jelenlétében az érett szomatikus embriók növényné differenciálódtak, majd kifejlődött a növényen a hagymagumó is (5. táblázat, 5. d.-o. ábra).

A fehér tölgy taxonok szövettenyésztését steril körülmények között csírázó *Quercus robur* makkok felhasználásával tanulmányoztuk tovább. Megfigyeltük a GA₃ szártag megnyúlást serkentő, gyökér és levél növekedést korlátozó hatását. A csírázó embrió különböző részein hoztunk létre első generációs kalluszokat eltérő hormon-összetételű táptalajok alkalmazásával, majd a létrejövő kalluszkultúrákat egységesen a kalluszindukáló táptalajtól eltérő 4 mg l⁻¹ NAA, 0,5-1 mg l⁻¹ BA és 100 mg l⁻¹ aszkorbinsavat tartalmazó WPM táptalajon tartottuk fenn hosszú távon (6. táblázat, 6. ábra). Ugyanilyen táptalajt alkalmazott Cuenca és mtsai. (1999), Toribio és mtsai. (2004) és San-José és mtsai. (2010).

Előzetes tapasztalataink felhasználásával stabil, több mint egy éve fennálló, a szárazságstressz vizsgálatokhoz felhasználható, változatlan növekedési és morfogenetikai sajátságokkal rendelkező kalluszokat állítottunk elő a síkfőkúti erdőállományban előforduló fehér tölgy taxonok leveleiből illetve a *Quercus petraea* és *Quercus polycarpa* barkáiból (7. ábra). A kultúrák fenntartását nehezítette a szövetek polifenolos vegyületeket felhalmozó képessége. A tenyészetek és a táptalaj elsötétedését, a termelődő vegyületek táptalajba szivárgásának korlátozásával tudtuk mérsékelni a leghatékonyabban, azáltal hogy az átoltás során úgy helyeztük el a kalluszokat, hogy megakadályozzuk a táptalaj és a vágott felület érintkezését. A sejtburjánzás kiváltásához és stabilizálásához auxin és citokinin hatású hormonok jelenléte is szükség volt. A szakirodalom alapján kipróbált számos hormonszintetizáló kombináció közül általánosságban a 2-4 mg l⁻¹ NAA és 0.5-1 mg l⁻¹ BA volt a legeredményesebb (Cuenca és mtsai. 1999, Toribio és mtsai. 2004, San-José és mtsai. 2010).

A kalluszfenntartó táptalajon huzamosabb ideig nevelt, *Q. pubescens*, *Q. virgiliana*, *Q. dalechampii* és ezek hibridjeinél gyökérképződést tapasztaltunk (8. ábra). Ezek a taxonok közelebbi rokonságban állnak egymással, és ökológiai igényüket tekintve a szárazságtűrőbb fehér tölgyek közé tartoznak. Ezzel szemben a távolabbi rokonságban lévő, vízhiánystresszre érzékenyebb *Q. petraea*, *Q. polycarpa* és a kettő egymással alkotott hibridjének kalluszai alkalmatlanok voltak a gyökérregenerálásra.

Sikerült hajtásképződést kiváltanunk az A149, A211, D137, B50 vonalaknál, azonban ezek a hajtások nem fejlődnek tovább, nem jönnek létre életképes növények (9. ábra). Toribio és mtsai. (2004) eljárásához hasonlóan az A149 (*Q. petraea*) vonal levél és barka explantátumból származó kalluszait alacsonyabb auxin tartalmú táptalajra helyezve sikerült embriogenezist kiváltani. A létrejött szomatikus embriók mindhárom (globuláris, szív és torpedó) fejlődési stádiumot elérték 0-0,1 mg l⁻¹ NAA vagy IBA illetve 0,5-1 mg l⁻¹ BA jelenlétében, majd szintén alacsony auxin és citokinin koncentrációjú táptalajokon hajtássá differenciálódtak. Ezzel szemben a többi vonalnál a hajtások a kallusz indukálásra és fenntartásra alkalmazott táptalajokon (B50), vagy a mérsékeltén csökkentett NAA és /vagy BA tartalmú táptalajokon (D137, A211) jelentek meg (9. táblázat).

Összességében a szövettenyészetekben az ozmotikus stressz által előidézett fiziológiai változások kimutatták, hogy a *Q. petraea* kultúrák szárazságra érzékenyek, míg a *Q. pubescens*, *Q. virgiliana* tenyészetek szárazságtűrőek (10. táblázat).

A szárazságra érzékenyebb taxonoknál, mint amilyen a *Quercus petraea* (A149) a PEG 6000 kezelés koncentrációfüggő vízvesztést váltott ki, ami 10 % PEG 6000-nél kezdődött el, és a kalluszok nedvestömegének csökkenésében mutatkozott meg (10. ábra). A recovery eredmények alapján az életképes zöld kalluszok létrehozásának képessége 10 % PEG kezelést követően nagymértékben lecsökkent (12. ábra), mialatt a peroxidáz aktivitása nem változott számottevő mértékben, vagy csökkent (13. 14. ábra), amihez PEG-indukált, átmeneti szimplaszálú DN-áz aktivitásnövekedés társult, mely 10 % PEG 6000 hatására érte le a maximumát (15. ábra).

Ezzel szemben, a szárazságtűrőbb A75 (*Q. pubescens*) és a B50 (*Q. virgiliana*) vonalak rezisztensnek bizonyultak a PEG 6000 indukálta vízvesztéssel szemben, mert csak a legnagyobb PEG 6000 koncentrációja váltott ki a kalluszokban nedvestömeg csökkenést (10. ábra). Ezek a taxonok még a 40 %-os PEG 6000 kezelés után is képesek voltak új, életképes zöld kalluszokat létrehozni (12. ábra), és a gyökércsúcsok sejtjeiben sem lehetett osztódási rendellenességet megfigyelni (16. d. ábra). Mindeközben az ozmotikus stressz hatására

jelentősen megnőtt a peroxidáz aktivitása (13., 14. ábra), a szimpla szálú DN-áz aktivitása egyenletes maradt, vagy csak csekély mértékben emelkedett meg (15. ábra).

Ebből arra lehet következtetni, hogy a szárazságra érzékeny taxonok antioxidáns rendszere nem bizonyult elég hatékonynak, a felhalmozódó reaktív oxigénformák hatására károsodott a DNS állomány, aminek hatására feltételezhetően indukálódtak a helyreállító folyamatok, amik a nukleázok aktivitásának emelkedését vonták maguk után. A szárazságstressz fokozódásával, fokozatosan károsodtak a védő és hibajavító rendszer enzimejei is. Amikor a káros oxigénformák és szabad gyökök keletkezése és a védekező, kijavító mechanizmusok aktivitása közötti egyensúly megbomlott, a szövetek regenerálódó képessége is lecsökkent, a kalluszok a kimerülés, károsodás fázisába kerültek. A szárazságtűrőbb taxonoknál az antioxidáns rendszer feltehetően hatékonyabb volt, így az egyensúly megmaradt a kísérletben alkalmazott legtöményebb PEG 6000 oldattal történő kezelésnél is.

Eredményeink alátámasztják azt a feltevésünket, miszerint az *in vitro* kultúráink alkalmasak a különböző taxonok stresszválaszának vizsgálatára. Kísérleti rendszerünket így fel tudtuk használni az ismeretlen szárazságtűrő képességű, feltételezett hibridekből létrehozott tenyészetek esetében is. A hibridek ozmotikus stresszre adott válaszai, átmenetet képeztek a két szélsőértéket képviselő szülői faj, a szárazságnak kevésbé ellenálló A149 és a szárazságtűrőbb A75 között. A vizsgálatok alapján, a különböző tölgytaxonok genotípusait a következő növekvő sorrendbe rendeztük szárazságtűrő képességük szerint (10. táblázat): A149, D89, A211, D137, B50 és A75.

A mikroszatellit eredmények, viszonylag nagyobb genetikai távolságot mutattak ki a szárazságot kevésbé és jobban tűrő tölgy taxonok között (1. ábra).

6 English summary

We worked out an *in vitro* procedure for white oak taxa, all are present in the forest stand of Sikfőkút LTER Research Area (NE Hungary). We used the established stable tissue cultures as simple experimental model systems for screening drought/ osmotic stress tolerance of different genotypes of several white oak taxa.

For working up the tissue culture system firstly we used *Crocus heuffelianus* for the preliminary *in vitro* culture experiments. *Crocus heuffelianus* belongs to the monocotyledonous class. We induced a stable embryogenic callus line from shoot primordia and 1 week old seedling explants on MS* medium supplemented with 2% (w/v) sucrose, 10 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA and solidified with 0,8% agar (Fig. 5. a, b, c). Plant regeneration was achieved in 3 steps. Firstly, we decreased auxin/cytokinin concentration and ratio which was efficient in somatic embryo induction. Secondly, a decrease in the strength of culture medium and the concentration of carbon source was used, which was effective in embryo germination. Finally when we added 25 mg l⁻¹ GA₃ and 100 mg l⁻¹ ascorbic acid to the germinating medium and raised the BA concentration to 2 mg l⁻¹ plant regeneration and corm development occurred (Table 5., Fig. 5. d-o).

For working up the tissue culture system, secondly we germinated the embryo from the disinfected decoated seeds of *Quercus robur*, and the 1-weeks old *in vitro* grown seedlings were used as explants. We observed that GA₃ consistently elongated the internodes of the oak, the length of the main stem axis was increased, but the growth of leaf area failed to come, and the frequency of darkening of roots increased with increasing concentration of GA₃. Calli were induced on different parts of the seedling on the media supplemented with

various concentrations of auxins and cytokinins. The growth regulator (PGR) content of culture media used for culture maintenance (4 mg^l⁻¹ NAA and 0.5-1 mg^l⁻¹ BA) was independent of explant type, identical to media used by Cuenca et al. (1999), Toribio et al. (2004) and San-José et al. (2010), and differed from the callus initiation media (Table 6., Fig. 6.).

The results of the preliminary experiments are used for establishing stable callus lines from the young leaves of numerous *Quercus* genotypes belonging to the white oaks from the forest stand of Sikfölkút and the catkins of *Q. petraea* and *Q. polycarpa* (Fig. 7.).

These cultures were suitable for plant osmotic stress response studies. The maintenance of the callus culture was made more difficult by phenolic compounds which were accumulated in high quantities in the calli grown *in vitro*. We could decrease browning by controlling exudation of the phenolic compounds to the culture media: we prevented contacting between the wounded surface of the callus and the media by submerging only the unhurt part of the tissue. Cytokinin and auxin were essential for induction and maintenance of callus cultures. The most suitable medium for the callus induction and maintenance was WPM supplemented with 100 mg^l⁻¹ ascorbic acid, 2-4 mg^l⁻¹ NAA and 0.5-1 mg^l⁻¹ BA. This combination of PGR is identical to media used by Cuenca et al. (1999), Toribio et al. (2004) and San-José et al. (2010).

The lines of (A75) *Q. pubescens*, (B50) *Q. virgiliana*, *Q. dalechampii* and their putative hybrids produced abundant roots, when they were long-term (more than 90 days) cultured on callus induction and maintenance media in case of the high auxin/cytokinin ratio (Fig. 8.). These taxa are closely related confirmed by microsatellite data and belong to the more drought tolerant *Quercus* taxa considering their ecological demands. On the other hand, calli of the drought sensitive *Q. petraea*, *Q. polycarpa* and their putative hybrids which are genetically more distinct to all other taxa were not able of root regeneration. There is a relationship between the root regeneration ability and the drought stress tolerance.

Callus lines of A149, D137, A211 and B50 were capable of shoot regeneration but these shoots were not viable: they couldn't develop into plants (Fig. 9.). Efficient somatic embryogenesis was achieved through a gradual decrease of auxin and cytokinin content and embryo germination and shoot regeneration could be obtained on media with high cytokinin/auxin ratio but an overall low level of PGRs in case of *Quercus petraea*. This strategy is similar to the procedure of Toribio et al. (2004). On the other hand in the case of on D137, A211 and B50 calli shoots appeared on the same media as those used for callus induction (B50), or by a moderate reduction of NAA and/ or BA content (D137, A211).

To sum up, all physiological changes induced by osmotic stress in tissue cultures of selected oak individuals/ taxa indicated that *Q. petraea* cultures were drought sensitive and *Q. pubescens*, *Q. virgiliana* cultures were drought tolerant (Table 10).

The measurement of fresh weight after treatment with the osmoticum revealed that for the drought sensitive A149 line, water loss occurred at 10 % PEG 6000 and increased progressively as PEG 6000 concentrations increased (Fig 10.). The presence of viable, compact, green callus tissue during recovery experiments was decreased after 10% PEG 6000 treatment (Fig. 12.), while there were no significant changes or decreases of guaiacol-peroxidase activities (Figs 13., 14.), and transient increases in nuclease activities were detected as compared to controls, with maximal activities at 10 % PEG 6000 treatment (Fig. 15.).

In contrast, the drought tolerant A75 calli were resistant to water loss that occurred only at 40 % PEG 6000 (Fig 10.). Tissue viability of these genotypes persisted even at 40 % PEG (Fig.12), and PEG 6000 didn't induce changes in chromatin organization. (Fig. 16.). Meanwhile PEG treatments lead to significant increases of peroxidase activities (Figs 13., 14.), and the ssDNase activity didn't increase notably (Fig 15.).

These results mean that ROS cannot be scavenged in drought-sensitive taxa, followed by DNA strand breaks leading to activity increases of nucleases probably involved in repair. Drought-tolerant taxa are expected to be able of scavenging ROS efficiently, thus DNA strand breaks occur probably with less frequency. When the drought stress became more acute the enzymes of scavenge and defense system were progressively impaired. When the balance between the formation of ROS and capacity of repair system was broken off the regeneration capacity of tissue was decreased also, and calli lost their viability. Drought-tolerant taxa are expected to be able of scavenging ROS efficiently, thus DNA strand breaks occur probably with less frequency.

The results of our experiments confirmed previous findings on drought sensitivity of these species and ecological requirements reported for growth in their natural populations habitats, and proved our hypothesis: such *in vitro* cultures can be used for modelling stress responses for taxa where they were not previously studied. Concerning cultures derived from putative hybrids of unknown drought sensitivity, they were intermediary in terms of drought tolerance.

Based on the experiments the genotypes of different oak taxa was graded in accordance with ascending drought tolerance (Table 10.): A149, D89, A211, D137, B50 és A75

In general, microsatellite data confirmed relatively high genetic distances between drought sensitive and drought tolerant oak individuals/taxa (Fig. 1.).

7 Köszönetnyilvánítás:

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Mészáros Ilonának** és konzulensemnek, **Dr. Máthé Csabának**, akik hasznos szakmai és gyakorlati tanácsaikkal, támogatásukkal nagymértékben hozzájárultak a témában való ismereteim megszerzéséhez és doktori értekezésem elkészítéséhez.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Mikóné Hamvas Mártának**, **Dr. Beyer Dánielnek**, **Dr. Jámbrik Katalinnak**, **Kiss Zoltánnak** és **Resetár Annának** nélkülözhetetlen szakmai segítségéért.

Továbbá köszönettel tartozom a DE TEK TTK Növényteni Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozójának, PhD hallgatójának és szakdolgozójának **Dr. Vasas Gábornak**, **Dr. Surányi Gyulának**, **Dr. Molnár V Attilának**, **Sramkó Gábornak**, **Dr. Bácsi Istvánnak**, **Dr. Gonda Sándornak**, **Dr. Oláh Viktornak**, **Havelant Katalinnak**, **Barabás Évának**, **Kökényesi Zsuzsának**, **Szabó Katalinnak**, **Mosolygó Ágnesnek**, **Simon Ádámnak**, **Erdei Oszkárnak**, **Kanalas Pé tinek**, **Zsókának**, **Mika Zsófiának**, **Tándor Ildikónak**, **Jambrovics Károlynak**, **Riba Milánnak**, **Hegedűs Grétának**, **Garda Tamásnak** és **Krisztinek** a munkám során nyújtott segítséget és a baráti légkört, amit kialakítottak, ami ugyanolyan fontos volt számomra, mint maga a kísérleti munka.

Köszönöm a Kereskedelmi Bank Rt. által létesített, és a DE TEK által gondozott Universitas Alapítvány támogatását, amely lehetővé tette a kísérletek elvégzéséhez szükséges vegyszerek és eszközök beszerzését.

És végül, de nem utolsósorban, köszönet **szüleimnek**, **nagynénémnek**, **nagybátyámnak**, **keresztszüleimnek**, a **többi rokonomnak**, és **barátaimnak** segítségükért, biztatásukért, türelmükért, megértésükért, azért, hogy mindig, minden helyzetben mellettem álltak. Köszönöm általános iskolai biológia-tanárnőmnek, **Cziczlavicz Évának**, általános iskolai kémia-tanárnőmnek **Szotákné Tóth Mártának**, és gimnáziumi osztályfőnökömnek **Dr. Gyulainé Szendi Évának**, akik az élővilág szeretetére tanítottak és megerősítettek a természettudományos tárgyak iránt való elhivatottságomban. Köszönöm gimnáziumi angol nyelvtanáromnak **Újhelyi Timeának**, hogy olyan szintű nyelvtudáshoz segített hozzá, amely lehetővé tette számomra a kutatómunkához és a doktori értekezés elkészítéséhez nélkülözhetetlen nemzetközi irodalmak feldolgozását.

8 Irodalomjegyzék

1. Aazami MA, Torabi M, Jalili E (2010) *In vitro* response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. SAFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 9: 4014-4017
2. Abrams MD (1990) Adaptations and responses to drought in *Quercus* species of north-america. TREE PHYSIOLOGY 7: 227-238
3. Abrams MD, Schultz JC, Kleiner KW (1990) Ecophysiological responses in mesic versus xeric hardwood species to an early-season drought in central pennsylvania. FOREST SCIENCE 36: 970-981
4. Acar O, Tiirkan I és Ozdemir F (2001) Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgate* L.) varieties ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM 23: 351-356
5. Akbulut M, Çakır S (2010) The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 48: 160-166
6. Allison SD, Schultz JC (2004) Differential Activity of Peroxidase Isozymes in Response to Wounding, Gypsy Moth, and Plant Hormones in Northern Red Oak (*Quercus rubra* L.) JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY 30: 1363-1379
7. Bajaj YPS (1993) Biotechnology in agriculture and forestry 24 medicinal and aromatic plants V. Springer, Berlin. Faver JM, Scalbert A, Hervé du Penhoat CLM 21. fejezet: *Quercus* ssp (Oak): *In vitro* culture and production of tannins 300-309
8. Bajaj YPS (1996) Biotechnology in agriculture and forestry 35 Trees IV. Springer, Berlin. Manzanera JA, Bueno MA, Pardos JA 1.19. fejezet *Quercus robur* L. (Pedunculate Oak) 322-337
9. Baque Md A, Lee EJ, Paek KY (2010) Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase PLANT CELL REP 29:685–694
10. Bartha D (1997) Fa és cserjehatározó. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 228-229
11. Beyer D, Suranyi G, Vasas G, Roszik J, Erdodi F, M-Hamvas M, Bacsı I, Batori R, Serfozo Z, Szigeti ZM, Vereb G, Demeter Z, Gonda S, Mathe C (2009) Cyindrospormopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured *in vitro*. TOXICON 54: 440-449
12. Beyer D, Tandor I, Konya, Z, Batori R, Roszik J, Vereb G, Erdodi F, Vasas G, M-Hamvas M, Jambrovics K, Mathe Cs (2012) Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*. ANNALS OF BOTANY 110: 797-808
13. Bhagyalakshmi N (1999) Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 58: 205-211
14. Bhaskaran S, Smith RH (1990) Regeneration in Cereal Tissue Culture: a Review. CROP SCIENCE 30: 1328-1337
15. Bhat SR, Chandel KPS (1991) A novel technique to overcome browning in tissue culture. PLANT CELL REPORTS 10: 358-361
16. Blazquez S, Olmos E, Herná'ndez JA, Ferna'ndez-Garcia N, Fernandez JA, 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

17. Boo Y C, Jung J (1999) Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *PLANT PHYSIOLOGY* 155: 255-261
18. Borhidi A (2008) A Zárvertermők Rendszertana Molekuláris Filogenetikai Megközelítésben. PTE Kiadó, Pécs.
19. Borovics A (1997) A kocsánytalan tölgyek levélmorfológiai vizsgálata. *ERDÉSZETI KUTATÁSOK* 86-87: 125-142
20. Borovics A (1999) A kocsányos tölgy és kocsánytalan tölgy fajcsoport elkülöníthetősége: adalékok a hibridek és kiscsoportok megítéléséhez. *ERDÉSZETI KUTATÁSOK* 89: 93-110
21. Borovics A, Somogyi Z, Mátyás C (1998) Conservation of genetic resources of white oaks and beech in Hungary. In: Turok J, Kremer A, de Vries S, compilers. First EUFORGEN meeting on social broadleaves. IPGRI, Róma. 20-28
22. Borraccino G, Dipierro S, Arrigoin O (1989) Interaction of ascorbate free radical reductase with sulphhydryl reagents. *PHYTOCHEMISTRY* 28: 715-717
23. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *ANAL BIOCHEM* 72: 248-254
24. Bréda N, Cochard H, Dreyer E, Granier A (1993) Field comparison of transpiration, stomatal conductance and vulnerability to cavitation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* under water stress. *ANNALS OF FOREST SCIENCE* 50: 571-582
25. Brullo C, Brullo S, Giusso del Galdo G, Guarino R, Siracusa G, Sciandrello S (2012) The class *Querco-fagetea sylvaticae* in sicily: an example of Boreo-temperate vegetation in the central mediterranean region. *ANNALI DI BOTANICA* 2: 19-38
26. Bruschi P, Vendramin GG, Bussotti F, Grossoni P (2000) Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *ANNALS OF BOTANY* 85:325-33
27. Camarda I (2003) Some considerations about diversity, distribution and problems of *Quercus* L. in Sardinia. *BOCCONEA* 16: 65-72
28. Chen S, Zhao B, Wang X, Yuan X, Wang Y (2003a) Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements. *BIOTECHNOLOGY LETTERS* 26: 27-30
29. Chichiricco` G (1989) Embryology of *Crocus thomasi* (Iridaceae). *PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION* 168:39-47
30. Christiansen J. és Fønnesbech M. (1975) Prevention by polyvinylpyrrolidone of growth inhibition of *Hamamelis* shoot tips grown *in vitro* and browning of the agar medium *ACTA HORTICULTURAE* 54: 101-104
31. Cívínová B, Sladký Z (1990) Stimulation of the regeneration capacity of tree shoot segment explants *in vitro* *BIOLOGIA PLANTARUM* 32: 407-413
32. Cochard H, Bréda N, Granier A, Aussenac G (1992) Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q pubescens* Willd, *Q robur* L). *ANNALS OF FOREST SCIENCE* 49: 225-233
33. Coldea G, Fărcaș S; Filipaş L, Ursu T-M; Stoica IA (2010) Syntaxonomic revision of *Quercus virgiliana* ten. And *Quercus pedunculiflora* k. Koch forests from romania. *STUDIA UNIVERSITATIS BABES-BOLYAI BIOLOGIA* 2: 39
34. Cuenca B, San-José MC, Martínez MT (1999) Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *PLANT CELL REPORTS* 18: 538-543
35. Dahai GĆ, Qian GĆ, Hai-Yan XĆ, Fei MĆ, Chang-Ming ZĆ, Jian-Quan L (2009) Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species *TREES* 23:717-728

36. Darvishi E, Zarghami R, Mishani CA, Omid M, Sarkhosh A (2006) *In vitro* Production of Pathogen-free Plantlets via Meristem Culture in saffron (*Crocus sativus* L.). BIOTECHNOLOGY 5: 292-295
37. Demeter Z, Kanalas P, Cseke K, Szöllösi E, M-Hamvas M, Jámbrik K, Kiss Z, Máthé Cs, Mészáros I (2014) The use of *in vitro* cultures for screening osmotic stress tolerance of European white oak (*Quercus* section, *Quercus* subgenus) taxa. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 171:16–24
38. Demeter Z, Surányi Gy, Molnár VA, Sramkó G, Beyer D, Kónya Z, Vasas G, Hamvas MM, Máthé Cs (2010) Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus* PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 3: 349-353
39. Desai NA, Shankar V (2003) Single strand-specific nucleases. FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS 26: 457-491
40. Dixit P, Mukherjee PK, 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
41. Dodds JH, Roberts LW (1986) Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press
42. Dudits D, Heszky L (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform
43. Duncan DR, Williams ME, Zehr BE, Widholm JM (1985) The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. PLANTA 165:322-332
44. Dunford HB, Araiso T, Job D, Ricard J, Rutter R, Hager LP, Wever R, Kast WM, Boelens R, Ellfolk N, Rönnberg M (1982) Peroxidases THE BIOLOGICAL CHEMISTRY OF IRON 89: 337-355
45. Endemann M, Hristoforoglu K, Stauber T, Wilhelm E (2001) Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. BIOLOGIA PLANTARUM 44: 339-345
46. Enescu CM, Șofletea N, Curtu AL (2012) Cluster analysis in pubescent oak taxa from series Lanuginosae: a case study. AGRICULTURAL FOOD ENGINEERING 5:79-84
47. Enescu CM, Curtu AL, Șofletea N (2013) Is *Quercus virgiliana* a distinct morphological and genetic entity among European white oaks? TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY 37: 632-641
48. Epron D, Dreyer E (1993) Longterm effects of drought on photosynthesis of adult oak trees (*Quercus petraea*) and (*Quercus robur*) in a natural stand. THE NEW PHYTOLOGIST 125: 381-389.
49. Etienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E, Carron MP (1993) Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) PLANT SCIENCE 88: 91–96
50. Faria T, García-Plazaola JI, Abadía A, Cerasoli S, Pereira JS, Chaves MM (1996) Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. TREE PHYSIOLOGY 16: 115-123
51. Farkas G (1984) Növényi biokémia. Akadémiai Kiadó, Budapest. 2. fejezet- Légzés: 188-194
52. Fernández-Guijarro B, Celestino C, Toribio M (1995) Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE 41: 99-106

53. Fodorpataki L, Szigyártó L (2009) A növények ökofiziológiája. Kriterion Könyvkiadó, Kolozsvár. 8. fejezet- Életműködési válaszreakciók stresszkezelt környezeti körülményekre: 333-336
54. Foyer CH, Halliwell B (1976) Presence glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
55. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 50: 151-158
56. Ghadiri M, Kariminia HR, Azad RR (2013) Spectrophotometric determination of sulfide based on peroxidase inhibition by detection of purpurogallin formation *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY* 91: 117–121
57. Gallé A, Haldimann P, Feller U (2007) Photosynthetic performance and water relation in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *NEW PHYTOLOGIST* 174: 799-810
58. Gary R, Seckinger, Brent H, Mccown (1979) Production of anomalous structures in *Quercus rubra* callus cultures. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY* 66: 993-996
59. Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996) Review. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *in vitro CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY - PLANT* 2:272-289
60. George EF, Hall MA, Geert-Jan De Klerk (2008) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Springer Dordrecht, The Netherlands
61. Gersten DM, Gabriel O (1992) Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. II. Enzymes modifying nucleic acids. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 203: 181-186
62. Gieger, T Thomas FM (2005) Differential response of two Central-European oak species to single and combined stress factors. *TREES* 19: 607-618
63. Gingas VM (1991) Asexual embryogenesis and plant regeneration from male catkins of *Quercus*. *HORTSCIENCE* 26:1217-1218
64. Gingas VM, Lineberger RD (1989) Asexual embryogenesis and plant regeneration in uercus. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* 17:191-203
65. Gömöry D, Schmidtová J (2007) Extent of nuclear genome sharing among white oak species (*Quercus* L. subgen. *Lepidobalanus* (Endl.) Oerst.) in Slovakia estimated by allozymes. *PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION* 266: 253-264
66. Green PJ (1994) The ribonucleases of higher plants. *ANNUAL REVIEV PLANT PHYSIOLOGY PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 45: 421-15
67. Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *PLANTA* 107: 161-170
68. Grossmann K, Kwiatkowski J, Tresch S (2001) Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 52: 1811-1816
69. Guóth A, Benyó D, Csiszár J, Gallé Á, Horváth F, Cseuz L, Erdei L, Tari I (2010) Relationship between osmotic stress-induced abscisic acid accumulation, biomass production and plant growth in drought- tolerant and –sensitive wheat cultivars. *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM* 32: 719-727
70. Hajósne NM (1999) Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 9. fejezet- Elválasztástechnika: 69-75
71. Haraszy Á (2004) Növénysservezetten és növényéletten. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest. 9. fejezet- A növekedés és fejlődés élettana: 692-698
72. Heile-Sudholt C, Huetteman CA, Preece JE, Van Sambeek JW, Gaffney GR (1986) *In vitro* embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* 6: 189-197

73. Hendry GAF, Einch-Savage WE, Thorpe PC, Atherton NM, Buckland SM, Nilsson KA, Seel WE (1992) Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. NEW PHYTOLOGIST 122: 273-279
74. Hernandez JA, Campillo A, Jimenez A, Alarcon JJ, Sevilla F (1999) Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. NEW PHYTOLOGIST 141: 241-251
75. Houston DB (1983) Stand and seed source variation in peroxidase isoenzymes of *Quercus rubra* L. SILVAE GENETICA 32: 59-63
76. Huang W, XingW, Li D, Liu Y (2008) Microcystin-RR induced apoptosis in tobacco BY-2 suspension cells is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. TOXICOLOGY IN VITRO 22: 328-337
77. Inzé D, Montagu MV (1995) Oxidative stress in plants CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY 6:153-158
78. Jakucs P. (1985) Ecology of an oak forest in Hungary. Akadémiai Kiadó, Budapest.
79. Jámbrík K, Máthé Cs, Vasas G, Beyer D, Molnár E, Borbély G, M-Hamvas M (2011) Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-prefering nuclease activity in *Phragmites australis*. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 168: 678-686
80. Jörgensen J (1993) Embryogenesis in *Quercus petraea*. ANNALS OF FOREST SCIENCE 50: 344-350
81. Kamada H, Harada H (1981) Changes in the Endogenous Level and Effects of Abscissic Acid during Somatic Embryogenesis of *Daucus carota* L. PLANT AND CELL PHYSIOLOGY 22: 1423-1429
82. Kanalas P, Borovics A, Cseke K, Szöllősi E, Oláh V, Fenyvesi A, Mészáros I (2009) Taxonomical, phenological and population genetic research in a Hungarian sessile oak-Turkey oak forest stand (in Hungarian; abstract available in English). TERMÉSZETVÉDELMI KÖZLÖNY 15: 338-346
83. Kanalas P, Szöllősi E, Oláh V, Borovics A, Mészáros I (2008) Small-scale variability in phenological, leaf morphological properties and isoenzyme pattern in sessile oak complex (*Lepidobalanus* sub-genus) in a sessile oak-Turkey oak forest stand. ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 52: 221-223
84. Karamian R, Ebrahimzadeh H (2001) Plantlet regeneration from protoplast-derived embryogenic calli of *Crocus cancellatus*. PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 65: 115-121
85. Karamian R (2004) Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. ACTA HORTICULTURAE 650: 253-259
86. Karamian R (2007) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Protoplast Culture of *Crocus pallasii* Subsp. *hausknechtii*. PAKISTAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES 10: 659-663
87. Keresé I (1975) Fehérje vizsgálati módszerek. Műszaki Könyvkiadó, Budapest. 3.fejezet- Elektroforézis 77-109
88. Keresztesi B (1967) A tölgyek. Akadémiai Kiadó, Budapest. Mátyás V 1.fejezet- A tölgyek dendrológiai ismertetése: 51-90
89. Kézdy P (2002) Taxonómiai vizsgálatok a hazai molyhos tölgy alakkörön (*Quercus pubescens* s. l.) mikromorfológiai bélyegek segítségével. KITAIBELIA 7: 109-117
90. Koblizek J (1993) Distribution of oak species in the Czech Republic. ANNALS OF FOREST SCIENCE 50: 290-293
91. Kolb TE, Steiner KC, McCormick LH, Bowersox TW (1990) Growth-response of northern red-oak and yellow-poplar seedlings to light, soil-moisture and nutrients in

- relation to ecological strategy. *FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT* 38: 65-78
92. Koduri RS, Tien M (1995) Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase role of veratryl alcohol. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 270:22254-22258
 93. Krajci I, Gross GG (1986) Formation of gallotannins in callus cultures from oak (*Quercus robur*). *PHYTOCHEMISTRY* 26: 141-143
 94. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *NATURE* 227: 680-685
 95. Lambers H, Chapin FS, Pons TL (2008) *Plant physiological ecology* Springer, New York. 3. fejezet- Plant Water Relations: 211-214
 96. Láng F (1998) *Növényélettan II. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. Szigeti Z 14. fejezet- A növények és a stressz* 950-1015
 97. Láng F. (Ed.) (1998) *Növényélettan (A növényi anyagcsere). Egyetemi tankönyv. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. pp. 862-873, 915-984.*
 98. Láng F (1994) *A növényi anyagcsere élettana III. egyetemi jegyzet. Eötvös Loránt Tudományegyetem Természettudományi Kar, Budapest. 4.fejezet – A redukált koenzimek oxidációja: 97-109*
 99. Langston BJ, Bai S, Jones ML (2005) Increases in DNA fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 56: 15–23
 100. Larcher W (2001) *Physiological Plant Ecology. Springer, New-York. 6. fejezet- Plants under stress* 345-357, 401-416
 101. Laukkanen H, Häggman H, Kontunen-Soppela S, Hohtola A (1999) Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 106: 337–343
 102. Lee EK, Cho DY, Soh WY (2001) Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *PLANT CELL REPORTS* 20: 408–415
 103. Lei ZT, Jervis J, Helm RF (1999) C-Glycosidic ellagitannins from white oak heartwood and callus tissues. *PHYTOCHEMISTRY* 5: 751-756
 104. Lepais O, Gerber S (2011) Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex. *EVOLUTION* 65: 156–170
 105. Lepais O, Petit RJ, Guichoux E, Lavabre JE, Alberto F, Kremer A, Gerber S (2009) Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *MOLECULAR ECOLOGY* 18: 2228-2242
 106. Leśniewicz K, Pienkowska J, Poreba E (2010) Characterization of nucleases involved in seedling development of cauliflower. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 167: 1093-1100
 107. Leuschner CH, Backes K, Hertel D, Schipka F, Schmitt U, Terborg O, Runge M (2001) Drought responses at leaf, stem and fine root levels of competitive *Fagus sylvatica* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. trees in dry and wet years. *FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT* 149: 33–46
 108. Li B, Wolyn DJ (1997) Interactions of ancymidol with sucrose and anaphthaleneacetic acid in promoting asparagus (*Asparagus officinalis* L.) somatic embryogenesis. *PLANT CELL REPORTS* 16: 879–883

109. Lloyd DG, McCown BH (1981) Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. PROCEEDINGS INTERNATIONAL PLANT PROPAGATORS' SOCIETY 30: 421–427
110. Lutts S, Almansouri M, Kinet JM (2004) Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. PLANT SCIENCE 167: 9-18
111. Madhusudhanan K, Rahiman BA (2000) The Effect of Activated Charcoal Supplemented Media to Browning of *In Vitro* Cultures of *Piper* species BIOLOGIA PLANTARUM 43: 297-299
112. Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses. ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 2: 139-158
113. Manes F, Vitale E, Donato E, Giannini M, Puppi G (2006) Different ability of three Mediterranean oak species to tolerate progressive water stress. PHOTOSYNTHETICA 44: 387-393
114. Manzanera JA, Astorga R, Bueno MA, (1993) Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. SILVAE GENET 42: 90-93
115. Marabottini R, Schraml C, Paolacci AR, Sorgona A, Raschi A, Rennenberg H, Badiani M (2001) Foliar antioxidant status of adult Mediterranean oak species (*Quercus ilex* L. and *Q. pubescens* Willd.) exposed to permanent CO₂-enrichment and to seasonal water stress. Environ Pollution 115:413-23
116. Maróti M (1976) A növényi szövettenyésztés alapjai Akadémiai Kiadó, Budapest. 7. fejezet- Az izolált tenyésztés általános technikai problémái: 300-317
117. Martinez MT, Ballester A, Vieitez AM (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. CRYOBIOLOGY 46: 182-189
118. Máthé Cs, Mosolygó Á, Surányi G, Beke A, Demeter Z, Tóth VR, Beyer D, Mészáros I, M-Hamvas M (2012) Genotype and explant-type dependent morphogenesis and silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures. AQUATIC BOTANY 97:57-63
119. Matula R. (2009) Analysis of ecology of a little known white oak *Quercus polycarpa* Schur, using geobiocoenological typology. JOURNAL OF LANDSCAPE ECOLOGY 2:29–40
120. Matula R. (2008) Comparison of general tree characteristics of less known oak species *Quercus dalechampii* Ten. and *Quercus polycarpa* Schur. JOURNAL OF FOREST SCIENCE 8:333–339
121. Mátyás Cs. (1996) Erdézet i ökológia Mezőgazda Kiadó, Budapest 8. fejezet- Magyarország természetes és természetközeli erdőtársulásai: 142-146
122. Mátyás V. (1970): Genus *Quercus*. In: SOÓ R.: Synopsis florae vegetationisque Hungariae (A magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve) IV.- Akadémiai kiadó, Budapest, pp.: 507-540
123. Mátyás Cs (2002) Erdészeti - természetvédelmi genetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. Bordács S, Borovics A, Mátyás Cs Tölgyek 11. fejezet
124. Mauri PV, Manzanera JA (2004) Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY - PLANT 40: 495-498
125. Merkle SA, Nairn CJ (2005) Hardwood tree biotechnology. IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT 41:602-619

126. Mészáros I, Kanalas P, Fenyvesi A, Kisa J, Nyitrai B, Szöllősi E, Oláh V, Demeter Z, Lakatos Á, Ander I (2011) Diurnal and seasonal changes in stem radius increment and sap flow density indicate different responses of two co-existing oak species to drought stress. *Acta Silv. ACTA SILVATICA ET LIGNARIA HUNGARICA* 7: 97-108
127. Mészáros I, Veres Sz, Kanalas P, Oláh V, Szöllősi E, Sávári É, Lévai L, Lakatos Gy (2007) Leaf growth and photosynthetic performance of two co-existing oak species in contrasting growing seasons. *ACTA SILVATICA ET LIGNARIA HUNGARICA* 3: 7-20
128. Meyer TS, Lamberts BL (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS* 107: 144-145
129. M-Hamvas M, Máthé Cs, Molnár E, Vasas G, Grigorszky I, Borbély Gy (2003) Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *sinapis alba* L. seedlings. *AQUATIC TOXICOLOGY* 62: 1-9
130. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* 7: 405-410
131. Mittler R, Lam E (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 34: 209-221
132. Mittler R, Lam E (1995) Physiological identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *THE PLANT CELL* 7: 1951-1962
133. Monk SL, Fagerstedt KV, Crawford RMM (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *PHYSIOLOGY PLANTARUM* 76: 456-459
134. Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T, Takabe T (1999) Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *GENE* 234: 315-321
135. Murashige T, Skoog F (1962) A revive medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 15: 473-497
136. Nickell LG, Tulecke W (1959) Responses of Plant Tissue Cultures to Gibberellin. In *Botanical Gazette. The University of Chicago Press, Chicago.* 245-250
137. Nixon KC (1993) Infrageneric classification of *Quercus* (*Fagaceae*) and typification of sectional names. *ANNALS OF FOREST SCIENCE* 50: 25-34
138. Noctor G, Foyer C (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 49: 249-279
139. North JJ, Ndakidemi PA, Laubscher CP (2012) Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF THE PHYSICAL SCIENCE* 7: 638-646
140. Ofletea NS, Enescu MC, Curtu LA. (2011) Small-scale morphological descriptors analysis in four Romanian oak stands reported to series *Lanuginosae* SIMK. *Bulletin of the Transilvania University of Bras, ov. Series II: Forestry Wood Industry. AGRIC FOOD ENGYNEERY* 4:77-84
141. Pallardy SG (2008) *Physiology of woody plants.* Academic Press, Massachusetts 12. fejezet – Transpiration and Plant Water Balance: 325-366
142. Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J (1993) Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in

- nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). THE EMBO JOURNAL 12: 371-377
143. Perales L, Arbona V, Gomez-Cadenas A, Cornejo MJ, Sanz A (2005) A relationship between tolerance to dehydration of rice cell lines and ability for ABA synthesis under stress. PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 43: 786-792
 144. Pérez-Amador MA, Abler ML, De Rocher J, Thompson DM., van Holol A, LeBrasseur ND, Lers A, Green PJ (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. PLANT PHYSIOLOGY 122: 169-179
 145. Pinto G, Valentim H, Costa A (2002) Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT 38: 569-572
 146. Pintos B, Manzanera JA, Bueno MA (2007) Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 164 : 1595-1604
 147. Plessner O, Ziv M (1999) *In vitro* propagation and secondary metabolite production in *Crocus sativus* L. Negbi M. Saffron *Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers Overseas Publishers Association N.V. 137-148
 148. Porth I, Koch M, Berenyi M, Burg A, Burg K (2005) Identification of adaptation-specific differences in mRNA expression of sessile and pedunculate oak based on osmotic-stress-induced genes. TREE PHYSIOLOGY 25: 1317-1329
 149. Pretova A, Ostrolucka Mg, Samrov II (1993) Morpho-histological examination of calli, somatic embryos and other structures derived *in-vitro*. BIOLOGIA 48: 451-456
 150. Purohit VK, Tamta S, Chandra S (2002) *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE 69: 121-133
 151. Racchi ML, Bagnoli F, Balla I, Danti, S (2001) Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and *in vitro* micropropagated oak (*Quercus robur* L.). PLANT CELL REPORTS 20: 169-174
 152. Rajasekaran K, Hein MB, Davis GC, Carnes MG, Vasil IK (1987) Endogenous Growth Regulators in Leaves and Tissue Cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 130: 13-25
 153. Ramachandra Reddy A, Viswanatha KC, Munusamy V (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 161: 1189–1202
 154. Rancillac M, Klinguer A, Klinguer S (1996) Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L). PLANT GROWTH REGULATION 20: 67-73
 155. Ray A, Bhattacharya S (2008) Storage and plant regeneration from encapsulated shoot tips of *Rauvolfia serpentina* — An effective way of conservation and mass propagation SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY 74: 776–779
 156. Razdan MK (2003) Introduction to plant tissue culture. Science Publisher, Enfield. 14-71
 157. Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. PLANT PHYSIOLOGIST 130: 1143-1151
 158. Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. SEED SCITECHNOL 1:499–514
 159. Röhrig E, Ulrich B, (1991) Ecosystem of the world 7. Temperate deciduous forests. Elsevier Science Publishing Company, New York. 1. fejezet- Introduction: 2-4
 160. Roldán-Arjona T, Ariza RR (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. MUTATION RESEARCH 681: 169–179

161. Romano A, Martins-Loucao MA (1992) Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus suber* L.): Establishment problems. SCIENTIA GENMDENSIS 18: 17-27
162. Roy SC, Sarkar A (1991) *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. SCIENTIA HORTICULTURAE 47: 107-113
163. Sage DO, Lynn J, Hammat N (2000) Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St Keverne. PLANT SCIENCE 150: 209–216
164. Salvini D, Bruschi P, Fineschi S, Grossoni P, Kjær ED, Vendramin GG (2009) Natural hybridisation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. Within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting. PLANT BIOLOGY 11:758-765
165. Samardakiewicz S, Woźny A (2005) Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. AQUATIC BOTANY 83: 289-295
166. Samuel R, Pinsker W, Ehrendorfer F (1995) Electrophoretic analysis of genetic variation within and between populations of *Quercus cerris*, *Quercus pubescens*, *Quercus petraea* and *Quercus robur* (Fagaceae) from eastern. AUSTRIAN BOTANICA ACTA 173:1-9
167. Sánchez MC, Martínez MT, Valladares, Ferro SE, Viéitez AM (2003) Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 160: 699-707
168. Sanchez MC, SanJose MC, Ballester A, Viéitez AM (1996) Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. TREE PHYSIOLOGY 16: 673-680
169. San-José MC, Corredoira E, Martinez MT, Vidal N, Valladares S, Mallón R, Vieitez AM (2010) Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees PLANT CELL REPORTS 29: 661-671
170. Sasamoto H, Hosoi Y (1992) Callus proliferation from the protoplasts of embryogenic cells of *Quercus serrata*. PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE 29: 241-245
171. Savill PS, Kanowski PJ (1993) Tree improvement programs for European oaks: goals and strategies. ANNALS OF FOREST SCIENCE 50: 368-383
172. Scalbert A, Monties B, Favre JM (1988) Polyphenols of *Quercus robur*: Adult tree and *in vitro* grown calli and shoots. PHYTOCHEMISTRY 27: 3483–3488
173. Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY 50: 199-204
174. Schmadel-Hageböling HE, Engel C, Schmitt V, Wild A (1998) The combined effects of CO₂, ozone and drought on rubisco and nitrogen metabolism of young oak trees (*Quercus petraea*) CHEMOSPHERE 36: 789-794
175. Schwanz P, Polle A (1998) Antioxidative systems, pigment and protein contents in leaves of adult mediterranean oak species (*Quercus pubescens* and *Q. ilex*) with lifetime exposure to elevated CO₂. PHYTOL 140: 411-423
176. Schwanz P, Polle A (2001) Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 52: 133-143
177. Seckinger GR, McCown, BH, Struckmeyer BE (1979) Production of anomalous structures in *Quercus rubra* L. callus cultures. AMERICAN JOURNAL OF BOTANY 66: 993-996

178. Sehmer L, Alaoui-Sosse B, Dizengremel P (1995) Effect of salt stress on growth and on the detoxifying pathway of pedunculate oak seedlings (*Quercus robur* L.). JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 147: 144–151
179. Sharma DR, Kumari R, Chowdhury JB (1980) *In vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. EUPHYTICA 29: 169–174
180. Sharma P, Dubey RS (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. PLANT SCIENCE 167: 541–550
181. Siam AMJ, Radoglou KM, Noitsakis B, Smiris P (2009) Differences in ecophysiological responses to summer drought between seedlings of three deciduous oak species. FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT 258: 35–42
182. Siegel BZ (1993) Plant peroxidases-an organismic perspective. PLANT GROWTH REGULATION 12: 303–312
183. Silva DSBS, Garcia ACFS, Mata SS, Oliveira B, Estevam CS, Scher R, Pantaleao SM (2011) Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY 21: 92–99
184. Simon T (1992) A magyarországi edényes flóra határozója. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
185. Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY 11: 118–131
186. Smart MC (1994) NEW PHYTOLOGIST: Tansley Review No. 64 Gene expression during leaf senescence 126, 419–448
187. Spieß N, Oufir M, Matušiková I, Stierschneider M, Kopecky D, Homolka A, Burg K, Flucha S, Hausman JF, Wilhelma E (2012) Ecophysiological and transcriptomic responses of oak (*Quercus robur*) to long-term drought exposure and rewatering. ENVIRONMENTAL AND EXPERIMENTAL BOTANY 77: 117–126
188. Stein JC; Hansen G (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. PLANT PHYSIOLOGY 121: 71–79
189. Šunderlíková V, Salaj J, Kopecky, Salaj T, Wilhem E, Matusíková I (2009) Dehydrin genes and their expression in recalcitrant oak (*Quercus robur*) embryos. PLANT CELL REPORTS 28:1011–1021
190. Szalai I (2006) A növények élete, ahogyan ma látjuk II. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest. 18. fejezet- A növények és az abiotikus környezet kapcsolata 403–419
191. Taiz L, Zeiger E (2002) Plant Physiology Sinauer Associates Inc. Kiadó, Sunderland, Massachusetts. 25. fejezet- Stress Physiology: 591–602
192. Tanaka N, Shimomura K, Ishimaru K (1995) Tannin production in callus cultures of *Quercus acutissima*. PHYTOCHEMISTRY 40: 1151–1154
193. Tauber H (1953) Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 205: 395–400
194. Teasdale R (1992) Formulation of plant culture media and applications therefore. International Publication no. WO 92/07460, patent no. Europe: 92902531.0, Forbio Pty Ltd., Queensland, Australia
195. Thomas FM, Blank R, Hartmann G (2002) Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. FOREST PATHOLOGY 32: 277–307
196. Thorpe T, Stasolla C, Yeung EC, de Klerk GJ, Roberts A, George EF (2008) The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects,

- and support systems. In: George EF, Hall MA, de Klerk GJ, Editors. Plant propagation by tissue culture, 3rd Edition, Vol. 1- The background. Dordrecht : Springer: 115-173.
197. Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM (2004) Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. PLANT CELL TISSUE ORGAN CULTURE 76: 283-287
 198. Tóth K, Haapala T, Hohtola A (1994) Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments BIOLOGIA PLANTARUM 36: 511-517
 199. Vaario LM, Otomo Y, Soda R, Ide Y (1995) Plant regeneration from root tissue and establishment of root culture of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). PLANT TISSUE CULTURE LETTERS 12: 251-258
 200. Valentini R, Scarascia Mugnozza G, De Angelis P, Matteucci G (1995) Coupling water sources and carbon metabolism of natural vegetation at integrated time and space scales. AGRICULTURAL AND FOREST METEOROLOGY 73: 297-306
 201. Vengadesan G, Pijut PM (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE 97:141-149
 202. Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. THE PLANT JOURNAL 45: 523-539
 203. Vesper MJ, Evans ML (1978) Time-dependent Changes in the Auxin Sensitivity of Coleoptile Segments. AMERICAN SOCIETY OF PLANT BIOLOGISTS 61: 204-208
 204. Vieitez AM, Corredoira E, Ballester A (2009) *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE 98: 135-145
 205. Vieitez AM, Corredoira E, Martínez MT, San-José MC, Sánchez C, Valladares S, Vidal N, Ballester A (2012) Review: Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. EUROPEAN JOURNAL OF FOREST RESEARCH 131:519–539
 206. Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. PLANTA 218: 1–14
 207. Wilhelm E (2000) Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT 36:349-357
 208. Wilhelm E, Hristoforoglu K, Fluch S (2004) Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). PLANT CELL REPORTS 23: 790-795
 209. Wilson CM (1975) Plant nucleases. Annual Review. PLANT PHYSIOLOGY 26: 187-208
 210. Wittwer SH, Bukovac MJ (1958) The effects of gibberellin on economic crops. ECONOMIC BOTANY 12: 213-255
 211. Wong PK (2000) Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. CHEMOSPHERE 41: 177–182
 212. Wood M, Power JB, Davey MR, Lowe KC, Mulligan BJ (1998) Factor affecting single strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). PLANT SCIENCE 131:149-159
 213. Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N (1997) Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H₂O₂ AMERICAN SOCIETY OF PLANT BIOLOGISTS 15: 1405-1412

- 214.Ye XS, Pan SQ, Kuc J (1990) Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. PHYTOPATHOLOGY 80: 1295-1299
- 215.Yurukov S, Zhelev P (2001) The woody flora of Bulgaria: A review. SCHWEIZERISCHE ZEITSCHRIFT FUR FORSTWESEN 152: 52-60
- 216.Zegzouti R, Arnould MF, Favre JM (2001) Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. ANNALS OF FOREST SCIENCE 58: 681-690
- 217.Zhang S, Zhang H, Qin R, Jiang W, Liu D (2009) Cadmium induction of lipid peroxidation and effects on root tip cells and antioxidant enzyme activities in *Vicia faba* L. ECOTOXICOLOGY 18:814–823

9 A jelölt tudományos tevékenységének jegyzéke

Értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

Demeter Z, Surányi G, Molnár A, Sramkó G, Beyer D, Kónya Z, Vasas G, M-Hamvas M, Máthé C (2009) The production of somatic embryos capable of plant regeneration from shoot tip explants of *Crocus heuffelianus*. PCTOC-JOURNAL OF PLANT BIOTECHNOLOGY 100: 349-353. IF: 1.27

Mészáros I, Kanalas P, Fenyvesi A, József K, Nyitrai B, Szöllősi E, Oláh V, Demeter Z, Lakatos Á, Ander I (2011) Diurnal and Seasonal Changes in Stem Radius Increment and Sap Flow Density Indicate Different Responses of Two Co-existing Oak Species to Drought Stress. ACTA SILVATICA AND LIGNARIA HUNGARICA 7: 97-108

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 the Department of Botany, University of Debrecen ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 56:179-182

Demeter Z, Kanalas P, Cseke K, Szöllősi E, M-Hamvas M, Jámbrík K, Kiss Z, Máthé Cs, Mészáros I (2014) The use of *in vitro* cultures for screening osmotic stress tolerance of European white oak (*Quercus* section, *Quercus* subgenus) taxa. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 171: 16-24. IF: 2,791

Értekezés témaköréhez kapcsolódó konferencia előadások, poszterek jegyzéke

Máthé Cs, Demeter Z, Vasas G, Molnár VA, Surányi G (2009) The establishing of tissue cultures from *Crocus* species originated from the Carpathian Basin and their use in the search for economically important products. III. International Symposium on saffron biology and technology: forthcoming challenges in cultivation, research and economics, Krokos, Kozani, Greece, 2009. 05. 20-24. Poszter.

Resetár A, Demeter Z, Beyer Dániel, Vasas G, Máthé Cs (2010) *Galantus nivalis* és *Crocus scepunsiensis* *in vitro* tenyészetek összehasonlító szövettani vizsgálata. XIII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium, Szeged, 2010. 10. Poszter.

Kanalas P, Fenyvesi A, Kis J, Nyitrai B, Oláh V, Szöllősi E, Demeter Z, Mészáros I (2012) Comparative measurements of sap flow and trunk radial shrinkage in mature trees of two co-occurring oak species. In: International Conference Biological Reactions of Forests to Climate Change and Air Pollution, Kaunas, Litvánia, 2012.05.18-24. p. 227. Poszter

Mészáros I, Kanalas P, Nyitrai B, Kis J, Fenyvesi A, Oláh V, Demeter Z, Szöllősi E (2012) Diurnal and seasonal variation in stem radius and water status of mature sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and turkey oak *Quercus cerris* L. trees in relation to weather conditions. Biological Reactions of Forests to Climate Change and Air Pollution. In: International Conference Biological Reactions of Forests to Climate Change and Air Pollution, Kaunas, Litvánia, 2012.05.18-24. p. 98. Előadás

Mészáros I, Kanalas P, Nyitrai B, Kis J, Fenyvesi A, Oláh V, Demeter Z, Szöllősi E (2013) Changes in stem radial growth increment and water status in two co-occurring oak species in relation to climatic variables in contrasting growing seasons. In: Arena C, Battipaglia G, Cherubini P, De Micco V, Sass-Klaassen U (eds.) Proceedings of International Symposium On Wood Structure In Plant Biology and Ecology, Naples, Italy, 2013. 04. 17-20. p. 181. Előadás

Mészáros I, Nyitrai B, Kanalas P, Kis J, Fenyvesi A, Oláh V, Demeter Z, Szöllősi E (2013) Leaf water relations, sap flow density and stem radial changes in two co-existing oak species. In: Wohlgemuth T, Priewasser K (eds.) Abstracts of ClimTree 2013 International Conference on Climate Change and Tree Responses in Central European Forests, Zürich, Birmensdorf, 2013. 09. 1-5. p.54. Előadás

Egyéb tudományos közlemények jegyzéke

Beyer D, Surányi G, Vasas G, Roszik J, Erdődi F, M-Hamvas M, Bácsi I, Bátor R, Serfőző Z, M. Szigeti Z, Vereb G, Demeter Z, Gonda S, Máthé C (2009) Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured *in vitro*. TOXICON 54: 440-449. IF: 2.12

Máthé Cs, Mosolygó Á, Surányi Gy, Beke A, Demeter Z, R. Tóth V, Beyer D, Mészáros I, M-Hamvas M (2012) Genotype and explant-type dependent morphogenesis and silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures. AQUATIC BOTANY 97: 57-63 IF: 2.08

Resetár A, Demeter Z, Ficsor E, Balázs A, Mosolygó A, Szőke E, Gonda S, Papp L, Surányi G, Máthé C (2014) Growth regulator requirement for *in vitro* embryogenic cultures of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) suitable for germplasm preservation. Acta Biologica Hungarica 65:165-77 IF: 0.504

Ismeretterjesztés:

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