

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Thesis of PhD dissertation

Védett *Amaryllidaceae* fajok szövettenyésztése és antioxidáns aktivitásuk vizsgálata

**Production and antioxidant activity of tissue cultures from
Amaryllidaceae species**

Juhászné Resetár Anna

Témavezető: Dr. Máthé Csaba



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

1.Bevezetés

Az amarilliszfélék (*Amaryllidaceae*) családja a *Magnoliophyta* törzsbe, azon belül az egyszikűek kládjába, a spárgavirágúak (*Asparagales*) rendjébe tartozó növény család. Számos *Amaryllidaceae* fajt kerti növényként is termesztnek, ezzel szemben sok vadon termő veszélyeztetett vagy védett Európában, például a Magyarországon is védettnek számító kikeleti hóvirág (*Galanthus nivalis*) (Farkas, 1999; Fay és Chase, 1996; Király és mtsai., 2007; Podani, 2014). Így e fajok megőrzése természetvédelmi, és konzervációbiológiai szempontból is fontos. Ezen nemzetségek közül ötöt ismerünk közelebbről: az *Amaryllis* (amarillisz), *Galanthus* (hóvirág), *Leucojum* (tözike), *Sternbergia* (vetővirág), *Narcissus* (nárcisz) nemzetségeket. A növények megőrzésére egyik alkalmas módszer lehet az *in vitro* szövettenyésztés, mely jelenthet kallusz (hegszövet), sejtszuspenziós és protoplaszt tenyészeteket, valamint növényregenerálási és mikropropagációs eljárásokat. A szövettenyésztési eljárás azon az elven alapul, hogy megfelelő körülmények között minden már specializálódott növényi sejt képes dedifferenciálódás során totipotenssé válni, vagyis az osztódóképességét visszanyerni, majd differenciálatlan sejtömeget (kalluszt) és bármilyen szerv- vagy szövet típust, akár egész növényt is létrehozni (Dudits és Heszky, 2003; Razdan, 2003). A kalluszosodás természetes és szintetikus citokinin és/vagy auxin típusú hormonokkal indukálható, mely többszöri átoltással

folyamatosan fenntartható és szaporítható. A növényi szövettenyésztési eljárások alkalmazásával nagyszámú *in vitro* kultúrákat hozhatunk létre, amelyek később szerepet játszanak a faj/csíraplazma megőrzésében és másodlagos anyagcsere termékek létrehozásában. Ez azt jelenti, hogy fenntarthatunk természetes élőhelyükön megtalálható, többnyire védett fajokat, amelyek biológiailag aktív vegyületeket képesek előállítani, és laboratóriumi körülmények között is hatóanyagot termelni. Néhány fontos példa erre a *Galanthus elwesii*, *Leucojum aestivum* és a sárga nárcisz (*Narcissus pseudonarcissus*) (El Tahchy és mtsai., 2011; Ivanov és mtsai., 2012). Génbankot alapíthatunk, amely farmakognóziailag szempontból fontos növényeket tartalmaz. Az *in vitro* génbankok szerepe jelentős, hiszen tenyészedényekben, kontrollált körülmények között nevelhetünk és tárolhatunk egyedeket, melyek genetikailag azonosak az eredeti élőhelyről begyűjtött növényekkel, és farmakológiai szempontból is jelentősek. A genetikai azonosság azonban nem mindig biztosított a szövettenyésztési eljárások alkalmazása során, hiszen a sok esetben használt növekedés serkentő hormonok, különös tekintettel a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavra képesek genetikai variabilitást okozni, ami konzervációbiológiai szempontból lényeges szempont (Dudits és Heszky, 2003). Az antioxidánsokról ismeretes, hogy fontos szerepet játszanak az élőlények oxidatív stresszel szembeni védelmében során. A növények antioxidáns védőrendszere rendkívül sok alkotó elemből tevődik össze, amely összehangoltan képes együttműködni a szervezetet károsító

szabadgyökökkel szemben, és biztosítja a megfelelő működést. A sejtek számos antioxidáns tulajdonságú folyamattal vagy molekulával rendelkezhetnek. Ezek számszerű kimutatására egyre nagyobb az igény, ennek megoldására több analitikai eljárást fejlesztettek ki. Az antioxidánsok aktivitása a vizsgált rendszerre vonatkozó, összes antioxidáns vegyület együttes szabadgyök semlegesítő („gyökfogó”) hatását jelenti, jelen esetünkben az *in vitro* szövettenyésztéssel előállított növényi részekre vonatkoztatva (Blois, 1958; Brand és mtsai., 1995).

2.Célkitűzés

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

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

c) *Leucojum aestivum* (nyári tőzike), *Leucojum vernum* (tavaszi tőzike) szövettényésztési eljárásának kidolgozása és növényregenerálás

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

e) Növényi szövettényésztet gyűjtemény (*in vitro* védett növények, más modellnövények pl *Phragmites australis*) bővítése és fenntartása a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszékén

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

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

g) natív poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) a peroxidáz és kataláz enzimek aktivitásának kimutatására

3. Anyag és módszer

3.1. A szövettenyészetek indukciója

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

3.2. *Galanthus nivalis* szövettana

G. nivalis hajtás és kallusz darabok metszésével preparátumokat készítettünk majd ezeket szövettani vizsgálatoknak vetettük alá mikroszkóp segítségével. A folyamat első lépéseként 3.7%-os formaldehidben fixáltuk 16 órán át a kallusz, ill. hajtásdarabokat, majd 4 órán át NaCl tartalmú foszfát pufferben (PBS) oldott 40%-os szacharózba áztattuk. Ezt követően 30 mikrométer vastagságú metszeteket készítettünk. A metszetek készítése, hajtás, illetve kallusz darabokból történt, fagyasztásos technikával LEICA Histoslide 2000 mikrotommal. A vizsgálatot egy OLYMPUS PROVIS AX-70 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük.

3.3. A *Galanthus nivalis* tenyészetek genetikai variabilitás vizsgálata

A kutatások során a DNS-polimorfizmus vizsgálatához a PCR-technikán alapuló AFLP-módszert (Amplified Fragment Length Polymorphism) alkalmaztuk. Az AFLP protokolt a Vos és mtsai. 1995-ben közölt cikk alapján végeztük. A restriktív fragmentek felszaporítására egy lépéses PCR reakciót alkalmaztunk. A DNS fragment mintázat detektálása poliakrilamid gélelektroforézissel és ezüstkézzel történt.

3.4. Enzimatisuk antioxidánsok vizsgálata: gélelektroforézis és gélfestés

3.4.1. Növénykivonatok készítése

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

3.4.2. Natív poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A peroxidáz enzimek elválasztását Laemmli-féle 7,5%-os nem-denaturáló poliakrilamid-gélen vittük véghez (Laemmli, 1970). A fehérje kivonatokat 7,5 % (w/v) poliakrilamid gélen futtattuk 4°C-on, sötétben. Az elektroforézis és a mintapuffer puffer összetétele nem tartalmazott SDS-t. A pirogallol peroxidázok kimutatására a natív gélt inkubáltuk 1 órát 50 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 pufferben (pH = 7,5), majd hozzáadtunk 20 mM pirogallolt és 5 mM H_2O_2 -t és 15-30 percig ugyanebben a pufferben áztattuk. Torma gyökér kivonatot (*Armoracia rusticana*) használtunk pozitív kontrollként, amely ismert kiváló peroxidáz tevékenységéről (Hamid és Rehman, 2009). A guajakol festés során a géleket 30-60 percig inkubáltuk 10 mM H_2O_2 -ot tartalmazó 100 mM pH: 5,1-es, Na-acetát, pufferben. A kataláz enzimek kimutatására szolgáló gélt 10 mM H_2O_2 -ot tartalmazó pufferben áztattuk 15 percig. Ezután kálium-ferricianid (K_3FeCN_6) és vas (III)-klorid hexahidrátot ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) tartalmazó oldatban 15 percig inkubáltuk. Sötétzöldre festett félt kaptunk ahol a megjelenő enzimsávok átlátszóan tűnnek ki. A sávokat látható fényen detektáltuk. Apró békalencse (*Lemna minor*) levél kivonatot használtunk pozitív kontrollként (Petruska és mtsai., 2014).

3.4.3. A poliakrilamid gélek kiértékelése

A poliakrilamid géleken megjelenő enzimsávok („band”-ek) intenzitását CpAtlas® gél elemző szoftver segítségével értékeltük ki. Az adatok ábrázolásához Microsoft Office Excel 2007 és Systat Sigma Plot 10.0 programokat használtunk.

3.5. Nem enzimátikus antioxidánsok vizsgálata

3.5.1. Polifenolmérés

Az összes polifenol tartalmat Singleton és Rossi 1965-ben leírt módosított módszere alapján mértük (Grubestic, 2005; Singleton és Rossi, 1965). 25 mg liofilizált (Christ Alpha 1-2 LD fagyaszttva szárító; Martin Christ, Osterode, Germany) növényi szövettenyészet mintát porítottunk dörzsmozsárban, majd 30%-os MeOH-ban extraháltunk (Disruptor Genie; Bohemia, NY, USA) 70° C-on 15percig. Ezt követően a mintáinkat centrifugáltuk (Heraeus Biofuge) 10 percig 13000 rpm-en 15000 rpm fordulaton. A felülúszónkat ezután 8-szorosára hígított Folin-Ciocalteu (FC) reagenst, 233 mM Na₂CO₃-ot és 30%-os MeOH-t tartalmazó elegyhez adtuk. Galluszsavat alkalmaztunk standardként és a növényi minták összes fenol tartalmát galluszsav ekvivalensben (GAE), mg G⁻¹ DW fejeztük ki (Jurij és mtsai., 2005). 720 nm hullámhosszon, Shimadzu UV-VIS 1602 spektrofotométer (Shimadzu, Kyoto, Japán) segítségével mértük a minták abszorbanciáját.

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

A vizsgálatok során a polifenol méréshez készített növényi mintát használtuk fel. Aszkorbinsavat (AA) és a 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-karbonsavat (Trolox) használtunk standardként. A szabadgyök semlegesítő aktivitást elsősorban a 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-szulfonsav) gyök kation (ABTS * kation) gátlási vizsgálatával mértük (Katalinic és mtsai., 2006; Miliauskas, 2004). 10 mg ABTS-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) 2,6 ml bidesztillált vízben oldottunk, ehhez 1,72 mg K-perszulfátot adtunk. EtOH-val hígítottunk, hogy az abszorbancia 0,7 körül legyen, az abszorbanciát 734 nm-en mértük EtOH-al szemben. A gátlás kiszámítása százalékosan a következő képlettel történik: $[(A_0 - A_\infty) / A_0] \times 100$, ahol A_0 az ABTS * kationt tartalmazó reakcióelegy abszorbanciáját jelenti a 0. időpontban és A_∞ a 6. percben mért abszorbancia. 0,01 g DPPH-t oldottunk 25 ml EtOH-ban, ebből hígítottunk, hogy az abszorbancia $0,900 \pm 0,015$ legyen. Az abszorbanciát 515 nm-en mértük EtOH-al szemben. 6 perces méréseket végeztünk. A gátlás kiszámítása százalékosan a következő képlettel történik: $[(A_0 - A_\infty) / A_0] \times 100$, ahol A_0 a DPPH gyököt tartalmazó reakcióelegy abszorbanciáját jelenti a 0. időpontban és A_∞ a 6. percben mért abszorbancia. A szabadgyökfogó és peroxidáz/kataláz aktivitások vizsgálatára, legalább öt független kísérletet, és két párhuzamos mérést végeztünk minden növényi minta esetében.

4. Összefoglalás és új tudományos eredmények

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

a) *Galanthus nivalis* kallusztényészeteket hoztunk létre 2 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA és 10 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA táptalajon hagyma explantátumokból. Ezeket továbbnevelve a kalluszokon intakt, zöld hajtások jelentek meg, melyek stabil fenntartásához és továbbtenyésztéséhez 2 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA hormonkombinációt használtunk. Hajtásképződés után megnöveltük az auxin hatású hormon koncentrációját, és 10 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA tartalmú táptalajon megindult a hagymaképzés. Ezeket továbbnővesztve 2 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA tartalmú MS táptalajon zöld hajtásos hagymát tudtunk regenerálni. Metszeteink és azokból készített fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataink bizonyították, hogy gyökérképződés szomatikus embrióból 10 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA majd 2 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA hormonkoncentráción nevelt hagyma explantátumok esetében volt jellemző. *G. nivalis*-ből elsőként hoztunk létre embriogén kallusztényészeteket (Resztár és mtsai. 2014). A *G. elwessi* és *G. woronowii* hóvirág fajok esetében a *G. nivalis* tenyésztése során tapasztalt megfigyeléseinket vettük alapul. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a *G. woronowii* esetében magas auxin hatású hormon koncentráció esetén gyökér és hajtások

képződtek, később ezeket 2 mg l^{-1} NAA+ 1 mg l^{-1} BA hormonkoncentráción nevelve hagyma képződött. A *G. elwesii* szövetenyésztése során szintén alkalmazott táptalaj kombináció volt a 10 mg l^{-1} NAA+ 1 mg l^{-1} BA és 2 mg l^{-1} NAA+ 1 mg l^{-1} BA hormon összetételű MS* táptalaj, azonban az intenzív zöld hajtás és hagyma megjelenése hosszú távú átoltások során 2 mg l^{-1} NAA+ 2 mg l^{-1} IAA, tehát csak auxin hormon tartalmú táptalajon következett be. Elsőként hoztunk létre *G. woronowii* tenyészeteket. Megállapíthattuk, hogy kiemelkedő növekedési produkcióra képes növényeink alkalmasak későbbi antioxidáns vizsgálatok elvégzésére.

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

c) *Leucojum aestivum* és *L. vernum* esetében is a magas auxin-alacsonyabb citokinin tartalmú hormonkombinációt alkalmazva volt sikeres a kalluszindukció. Tavaszi tőzike esetében 2 mg l^{-1} NAA+ 1 mg l^{-1} BA tartalmú táptalajokon a hajtások, azokon hagymák megjelenését figyeltük meg, embriók megjelenését nem tapasztaltuk. A *L. vernum* fiatal hajtásokat áthelyeztük 2 mg l^{-1} NAA 2 mg l^{-1} IBA növekedést serkentő hormon összetételű táptalajra, amelyen a hagymák tovább növekedtek és gyökerek differenciálódtak. A nyári tőzike esetében pedig az embriogén kallusz mellett a gyökérzet

kialakulását is meg lehetett figyelni 2 mg l⁻¹ NAA tartalmú táptalajon. A növényregenerálási kísérleteink során *in vitro* hagymát tudtunk létrehozni és gyökérképzést indukálni a már meglévő kalluszainkon növényhajtásainkból a nyári és a tavaszi tőzike esetében is. A kalluszokat továbbtenyésztve azt tapasztaltuk, hogy amennyiben az auxin (NAA) mellett a táptalaj citokinint (BA) is tartalmazott, hajtáskezdemények fejlődtek.

d) *Sternbergia lutea* szövettenyésztése során a 2 és 5 mg l⁻¹ NAA +1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajokon gyors növekedésű kalluszok képződtek, melyeken szomatikus embriókat láthattunk. Ezeket tovább passzálva 2 mg l⁻¹ NAA +1 mg l⁻¹ BA táptalajon levélkezdemények megjelenését figyelhettük meg. Elsőként hoztunk létre *S. lutea* szövettenyészeteket. Az általános szabály szerint, ha a táptalajban az auxinok és citokininek aránya kiegyensúlyozott, a fiatal szövetből differenciálatlan sejtömeg (kallusz) jön létre. Azonban, ha az auxin/citokinin arány nő, és az auxin koncentrációja emelkedik a kalluszon gyökerek jelennek meg. Ha a citokinin koncentrációját növeljük, akkor pedig hajtásképződés indul be (Dudits és Heszky, 2003). Ezek a morfogenetikus válaszok jól megfigyelhetőek *G. woronowii* és *L. aestivum* kultúrák esetében, ahol auxinok (NAA és IBA kombinálva a *G. woronowii*, és egyedüli hormonként a NAA *L. aestivum* esetében) citokininek nélkül fejtenek ki gyökereztető hatást. A NAA és a BA kombináció a hajtások képződését indukálta a *L. aestivum* vagy gyenge gyökereztető hatást fejtett ki a *G. woronowii* esetében. Az IBA

hormon alkalmazása során ismeretes, hogy elősegíti a gyökérbőrképződést sok szövettenyésztésben (George és mtsai., 2008). Mivel az auxinok és citokininek is szükségesek mindkét vegetatív szerv normális differenciálódásához (Murashige és Skoog, 1962), ezért valószínű, hogy *G. woronowii* és *L. aestivum* kultúrák is tartalmaznak endogén citokinineket, melyek szükségesek mind a gyökér és a hajtástermeléshez is, így egy auxin (pl NAA) egyedüli jelenléte a táptalajban, együtt az endogén citokininnel elősegíti teljes növény fejlődését. Azonban a *L. vernum* szövettenyésztése során a NAA alkalmazása, mint egyedüli növekedésszabályozó és kombinálva BA-val elősegíti a gyökeresedést.

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

f) Vizsgálatainkban, a továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a sikeresen előállított *in vitro* növényeink képesek-e antioxidáns aktivitást mutatni. Gyógynövények esetében tudjuk, hogy a növényben viszonylag nagy mennyiségben fellelhető fenolos vegyületek általában korrelálnak a magas antioxidáns aktivitással (Matkowski, 2008). Számos tanulmány számolt be a mi kutatásainkba is bevont *L. aestivum* szövettenyésztéséről (El Tanchy és mtsai., 2011, Bogdanova és mtsai., 2009), azonban egyikük sem

vizsgálta antioxidáns aktivitásukat. A *G. reginae-olgae* hóvirág jó példa az *Amaryllidaceae* családból, ugyanis magas antioxidáns aktivitást sikerült kimutatni magas polifenol szint mellett, a föld feletti szervekből és a hagymából is (Conforti és mtsai., 2010). A *G. woronowii* és *S.lutea* kultúrák esetében (beleértve a *S. lutea* eredeti hagymát, ami explantátumként szolgált a szövetkultúrához), magas polifenol tartalom párosult magas ABTS * kation „gyökfógó” aktivitással, míg a *L. aestivum* tenyészetekben alacsony szabadgyökfógó aktivitás volt kimutatható volt annak ellenére, hogy a polifenol-tartalma ezen mintáknak magas volt. Összefoglalva elmondható, hogy bár szövettenyésztési feltételek esetében ismert, hogy megváltoztatják a szekunder metabolit termelést és az antioxidáns aktivitást (Matkowski, 2008), az ebben a vizsgálatban részt vett kultúrák képesek voltak megőrizni viszonylag magas antioxidáns aktivitásukat. A természetes auxinok jelenléte fontos az antioxidáns aktivitás megőrzése szempontjából a növény számára (Chaâbani és mtsai., 2015), az általunk használt NAA azonban egy szintetikus auxin. NAA és BA hormontartalmú táptalaj minden kultúra esetében előfordult, ekkor magas szabadgyök semlegesítő aktivitás volt kimutatható, amikor NAA-t használtunk, mint egyedüli növekedés szabályozót (a két *Leucojum* faj esetében), nem beszélhetünk magas aktivitásról, így a BA, egy citokinin, úgy tűnik, növelni képes az ABTS * kation gyök befógó aktivitást. Vizsgálatainkból arra lehet következtetni, hogy a szövettenyészteink antioxidáns aktivitása függ a fajoktól

(genotípus), nem pedig a tenyészetekben kialakuló, regenerált szövetek típusától. Natív tavaszi tözike virágok és virághagymák viszonylag alacsony antioxidáns aktivitással rendelkeznek, mint néhány brit gyógynövény (Mantle és mtsai., 2000). Ezzel szemben, a mi eredeti *L. vernum* levélmintáinknak magas szabad gyökfogó aktivitása volt. A fenti vizsgálatok azt mutatják, hogy a másodlagos metabolit tartalom erősen genotípus és szervfüggő (explantátum függő) akár egyetlen faj esetében is.

A DPPH gyök mérésének előnye, hogy kereskedelmi forgalomban kapható és igen stabil, de erősen fény-, oldószer-, pH -és oxigénfüggő is (Cao és Prior, 1998). A mi esetünkben nem ez a módszer mutatta a legjobb szabadgyök semlegesítő aktivitási értékeket. Mintáink DPPH gyök megkötési képessége alacsony volt. Szövettenyészeink közül a 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA táptalajon nevelt *S. lutea* szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásainknak volt a legmagasabb értéke, amely közel 40%-os volt.

g) Több szövetkultúra esetén voltak eltérések a szabadgyökfogó aktivitás és a peroxidáz tevékenységek között. A legszembetűnőbb példa a *G. woronowii* és *S. lutea*, ahol az embriogén kallusz és a regenerált hajtások is kiváló szabadgyökfogó aktivitással rendelkeztek, míg az enzimátikus antioxidáns (pirogallol peroxidázok) tevékenysége alacsony, vagy nem kimutatható. Szakirodalom szerint azonban, a nem enzimes antioxidáns reakciók, mint az ABTS * kation gátlási vizsgálatok azt mutatják, hogy a

„gyökfógó” képesség a változatos oxigéngyökök révén (Katalinic és mtsai., 2006; Miliauskas és mtsai., 2004), és az enzimes antioxidáns vizsgálatok, mint a peroxidáz aktivitás mérése, nem mindig korrelálnak egymással. Így a *G. woronowii* és *S. lutea* esetében kis molekulatömegű vegyületek (polifenolok), és nem enzimatis antioxidánsok voltak felelősek a magas antioxidáns aktivitásért. A *S. lutea* és *L. vernum* tenyészetek esetében a guajakol peroxidáz aktivitások 2-ME nélküli kivonatok esetén viszonylag magasak voltak. Mivel a 2-ME-ről ismert, hogy gátolja bizonyos peroxidázok aktivitását (Chanwun és mtsai., 2013), ezt a vizsgálati eljárást elvégeztük 2-ME jelenlétében és hiányában is. A spektrofotometriás vizsgálat azt mutatta, hogy a 2-ME kifejezetten gátló hatással volt a guajakol peroxidáz aktivitásokra, szemben a pirogallol-peroxidázzal. Konkrét aktivitás (mM oxidált guaiakol min^{-1} mg protein $^{-1}$) 2-ME hiányában a *S. lutea* esetében 32,84%-a, és a *L. vernum* esetében 60,31%-a a torma kivonatok aktivitásának. Azt azonban elmondhatjuk, hogy minden *Amaryllidaceae* szövettenyészet, peroxidáz aktivitása jelentősen alacsonyabb volt, mint a kontrollként ismert torma gyökér kivonatának enzimaktivitása.

A kataláz enzim nem igényel semmilyen szerves kosubsztrátumot a H_2O_2 lebontásához. Aktivitását közvetlenül meghatározza a jelenlévő H_2O_2 koncentráció (Choen és mtsai., 1970; Láng, 1998; Smirnoff, 2005). Kísérleteinkben, a szövettenyészteinkben a kataláz enzim aktivitás közel azonos értékeket mutat, vagy magasabbat az eredeti élőhelyről begyűjtött növényeinkhez képest, ahogyan a *L. vernum* 2

mg l⁻¹ NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növényi mintánk esetében is. Azonban ezek az értékek messze elmaradnak a *L. minor* vagyis a pozitív kontroll mintánktól. Ami arra enged következtetni, hogy az eredeti élőhelyről begyűjtött növényi mintáink és a szövettenyészteteinkben is a kataláz enzim aktivitása alacsony.

A nem enzimátikus vizsgálatok alapján a legmagasabb értékek a következőképpen alakultak:

-Az összes polifenol tartalom az eredeti élőhelyről begyűjtött növények esetében a *S.lutea* levél és *L. vernum* levél kivonatok esetében volt a legmagasabb. Szövettenyészteteink közül pedig a: *G. woronowii*, szövettenyésztéssel előállított hajtás 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA táptalajon nevelve és a *S. lutea* embriogén kallusz 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA táptalajon nevelve érte el a legmagasabb értéket.

-ABTS * kation gátlás TEAC értékre vonatkoztatva két kultúra esetében mutatott magas antioxidáns aktivitást a *G. woronowii* és a *S. lutea* szövettenyészetek esetében 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA hormont tartalmazó táptalajon. Eredeti élőhelyről begyűjtött növényeink esetében a legmagasabb értéke a *S.lutea* levél és *L. vernum* levél kivonatoknak volt.

-Mintáink DPPH gyök megkötési képessége alacsonynak bizonyult, egyedül a szövettenyészteteink közül a 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA táptalajon nevelt *S. lutea* szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtásainknak volt magasabb értéke, amely közel 40%-os volt.

-Tehát a legmagasabb nem enzimátikus antioxidáns aktivitást az eredeti élőhelyről származó növényeink közül a *S. lutea* levélben és

a *L. vernum* levélben mértük. Szövettenyészetek közül pedig *S. lutea* és a *G. woronowii* 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA táptalajon létrehozott növényeinknek volt a legmagasabb aktivitása.

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

-A pirogallool-peroxidáz enzimaktivitás a szövettenyészetek közül a 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA táptalajon nevelt *S. lutea* kalluszok esetén volt a legmagasabb, de összehasonlítva jelentősen alacsonyabb volt, mint az *A. rusticana* gyökér kivonat esetében. A nem enzimatisz antiozidánsok vizsgálatánál jól szereplő *S.lutea levél* esetében azonban nem volt kimutatható és a *L. vernum* levél esetében nagyon alacsony volt.

-A guajakol-peroxidáz enzim aktivitása az összes szövettenyészetben és eredeti élőhelyről származó növényben alacsony vagy nem kimutatható volt.

-A kataláz enzim esetében a legmagasabb aktivitás értéket a szövettenyészetek közül a *L. vernum* 2 mg l⁻¹ NAA táptalajon nevelt mikroszaporított növény érte el. A többi szövettenyészeti minta ettől messze elmaradt, valamint az eredeti élőhelyről származó mintáink közül is csak a *G. woronowii* levél és *L. vernum* hagyma mutatott aktivitást.

Új tudományos eredmények:

1.A *G. woronowii* és *S. lutea* szövettenyésztése ebben a kutatásban valósult meg először. A *G. nivalis* esetében, pedig először írtunk le

kallusztényészeteket szomatikus embriókból (Resetár és mtsai., 2014).

2. Négy fajból (*G. woronowii*, *L. vernum*, *L. aestivum*, *S. lutea*) *in vitro* létrehozott növények antioxidáns aktivitását első alkalommal nekünk sikerült elemezni és a természetben található egyedekkel összehasonlítani.

3. *Leucojum aestivum* és a *Sternbergia lutea* esetében szomatikus embriókból neveltünk hajtásokat vagy teljes növényeket. Ezzel szemben, *in vitro* hajtásokat vagy egész növényt lehetett előállítani *Galanthus woronowii* és *Leucojum vernum* explantátumokból szomatikus embrió képződése nélkül.

4. A fenti *in vitro* tenyészetekben elsőként mi írtuk le az antioxidáns aktivitásokat. A vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy az *in vitro* tenyészetek jó szabadgyök semlegesítő aktivitásukat megőrzik, az explantátum forrásként használt eredeti élőhelyről származó növények különböző szerveivel ezek az aktivitások összemérhetőek.

5. A *G. woronowii* és a *S. lutea* kultúrák, a magas nem-enzimatikus antioxidáns aktivitásuk kapcsán, farmakológiai célokra potenciálisan felhasználhatóak, amely további kutatásokat helyez kilátásba.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék nyilvánítani témavezetőmnek: Dr. Máthé Csabának a sok hasznos gyakorlati és elméleti tanácsért, Dr. Mikóné Dr. Hamvas Mártának, Dr. Demeter Zitának, Freytag Csongornak, Kalydi Fruzsínának és Juhász Gabriella Petrának, hogy munkájukkal segítették a dolgozat létrejöttét. Köszönetemet szeretném kifejezni

Dr. Mészáros Ilonának, Dr. Vasas Gábornak, Dr. Gonda Sándornak, Dr. Surányi Gyulának, Dr. Papp Lászlónak, Dr. Mosolygó-Lukács Ágnesnek, Dr. Molnár V. Attilának, Garda Tamásnak, Mizsei Edvárdnak, Barabás Évának, Szabó Katalinnak, Barna Erzsébetnek és a SOTE Farmakognózia Tanszék munkatársai közül Prof. Dr. Szőke Évának, Dr. Balázs Andreának és Dr. Ficsor Emesének a nélkülözhetetlen szakmai segítségéért, a Növénytani Tanszék minden dogozójának, szakdolgozójának a segítőkészségéért és együttműködéséért, a szüleimnek, és a férjemnek, hogy támogattak a tanulmányaimban, a munkámban.

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

English summary

1. Introduction

Nowadays, basic knowledge on nature is important for the education of future generations. This dissertation deals with tissue cultures of the *Amaryllidaceae* family, in particular the *Galanthus*, *Leucojum* and *Sternbergia* genera. For *Amaryllidaceae in vitro* culture methods were developed for a significant number of endangered and economically important taxa. Several of them may serve as sources for pharmacologically important compounds (alkaloids, lectins) as well. The aim of this study was to produce tissue cultures capable of efficient plant regeneration from European naturally occurring protected and/or pharmacologically important Amaryllidaceae species, and to test them for antioxidant activities in order to select tissue cultures that scavenge efficiently oxygen radicals. Bulb explants were collected from *Galanthus nivalis*, *G. elwesii*, *G. woronowii*, two *Leucojum* species and *Sternbergia lutea*- *G. nivalis* and *Leucojum* species being Hungarian isolates. Mostly α -naphthalene acetic acid (NAA) and benzyladenine (BA) were used as growth regulator combinations for the induction and maintenance of tissue cultures and further antioxidant activity studies. Total phenolic content, % inhibition of ABTS radical (ABTS*) cation,

DPPH inhibition, peroxidase and catalase enzyme activities on native polyacrylamide gels were studied and showed differences between cultures. We also aimed to study the genetic polymorphism of *G. nivalis* tissue cultures.

2. Aims of this study

a) to develop *in vitro* culture methods and plant regeneration from *Galanthus nivalis* , *Galanthus elwesii*, *Galanthus woronowii*. *G. woronowii* cultures and *G. nivalis* embryogenic calli were produced for the first time.

b) to develop *in vitro* culture methods and plant regeneration from *Leucojum aestivum*, *Leucojum vernum*

c) to develop *in vitro* culture methods and plant regeneration from *Sternbergia lutea* for the first time

d) analysis of genetic polymorphism of *G. nivalis* tissue cultures

e) to broaden the plant tissue culture collection at Department of Botany, University of Debrecen

f) determination of phenolic contents and free radical scavenging capacities of the above tissue cultures. Total phenolic content was assayed by a modified Folin-Ciocalteu (FC) method, free radical scavenging capacities were assayed with the aid of: ABTS (2,2'-

azino-di-(3-ethylbenzotiazolin)-6-sulphonic acid), DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl).

g) to assay the activities of enzymatic antioxidants (peroxidases and catalases) of the above tissue cultures on native activity polyacrylamide gels.

3. Materials and methods

3.1. Establishment of tissue cultures

Leaf, root and bulb scale explants from *G. nivalis*, *G. elwesii*, *G. woronowii*, *L. aestivum*, *L. vernum*, *S. lutea* were surface sterilized for 30 min. with 10% (v/v) Domestos solution, followed by three washes with sterile ion- exchanged water. Explants were placed on culture media consisting of MS basal medium (Murashige Skoog, 1962) supplemented with Gamborg's vitamins (Gamborg et. al., 1968) 2 % (w/v) sucrose (Molar, Budapest, Hungary), 0.8 % agar (Difco, Lawrence, KS, USA) and growth regulator combinations involving α -naphthalene acetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA) and indole-3-acetic acid (IAA) as auxins and benzyladenine (BA) as a cytokinin. In general, 2-4 explants were transferred to Petri dishes containing culture media solidified with 0.8 % (w/v) Bacto-agar (Difco, Lawrence, KS, USA). Physical conditions of *in vitro* culture were 14/10 (light/dark) photoperiod (white fluorescent light, $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with temperatures of $22/18 \pm 2^\circ\text{C}$. Regeneration potential of tissue cultures was evaluated after 32-38 days of

subculture in at least five independent experiments, followed by their analysis for antioxidant capacities.

3.2. Method of microscopical analysis of *G. nivalis* tissue cultures

For microscopical analysis tissues were fixed overnight in 3,7% (v/v) formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). After fixation, samples were washed with PBS and placed in 40% (w/v) sucrose for 16 h to protect tissues during freeze sectioning. Tissues were embedded in TBS tissue freezing medium (TBS, Durham, NC, USA). Sections of 10–15 μm thickness were made by a Leica Jung Histoslide 2000 microtome (Leica, Nussloch, Germany). Sections were collected in PBS. Sections of embryogenic calli or regenerated shoots/ plants of 15-20 μm thickness were examined under bright-field with an Olympus Provis AX-70 (Olympus, Tokyo, Japan) fluorescence microscope. Autofluorescence of cell walls was examined at 320-360 nm excitation wavelengths.

3.3. The analysis of genetic polymorphism of *G. nivalis* tissue cultures

The amplification of fragments from restriction digestion was performed by one-step PCR reaction. The detection of DNA fragments has occurred with polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. Az AFLP procedure was performed following Vos et al. (1995).

3.4. Peroxidase and catalase activity gels

The activity of peroxidase and catalase was assayed on polyacrylamide gels. Enzymatic H₂O₂ scavenging (peroxidase) activities were analyzed on native 7.5 % polyacrylamide gels. Crude enzyme extracts of plant tissue samples were prepared in a buffer containing 150 mM NaCl (Reanal, Budapest, Hungary), 14.6 mM 2-mercaptoethanol (2-ME, Sigma-Aldrich) in 10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich) pH 8.0 (Schlereth et.al., 2000). Buffers were added at a 2:1 buffer: tissue FW ratio. After repeated centrifugations at 15,000 rpm with a Heraeus Biofuge, the protein contents of 10 µL of supernatants were checked with the Bradford method (Bradford, 1976) followed by their loading onto the gels. Each sample contained 3.5-4 mg (FW equivalent) of plant material. Guaiacol peroxidase activity gels were prepared and analyzed (Demeter et. al., 2010). For the detection of pyrogallol peroxidase bands, native gels were incubated in 50mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer, pH 7.5, then stained for 15-30 min in the same buffer containing 20 mM pyrogallol and 5 mM H₂O₂. The oxidation product (purpurogallin) was detected as a pattern of dark-brown coloured bands. Root extracts of horseradish (*Armoracia rusticana*) known for high peroxidase activities (Hamid et. al., 2009). were used as positive controls. Their activity was considered as 100% and all activities of *Amaryllidaceae* tissue cultures were compared to this value. The gel for the detection of catalase enzymes was incubated in 10 mM H₂O₂ and 50 ml water for 15 minutes, then incubated for 15

minutes in a solution containing potassium ferricyanide - $K_3[Fe(CN)_6]$ - and iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). We obtained a dark green coloration where the enzyme activity bands appeared. Bands were detected in visible light. Native gels for catalase showed high activities for *Lemna minor* shoots used as positive controls (Petruska et al., 2014).

3.5. Data analysis

Gels were analyzed with the aid of CP Atlas® software. Total band intensities were calculated on the basis of peak areas given by the enzyme activities, then plotted with the aid of Systat Sigma Plot 10.0® software.

3.6. Total phenolic content and free radical scavenging activity

For the determination of phenolic contents and free radical scavenging capacities, samples of tissue cultures were lyophilized in a Christ Alpha 1-2 LD freeze dryer (Martin Christ, Osterode, Germany) and extracts were prepared in 30 % (v/v) methanol. Samples were incubated in a waterbath for 15 min at 70 °C for improving the efficiency of extraction, then subjected to prolonged tissue disrupting with a Disruptor Genie (Bohemia, NY, USA) and centrifugated (15,000 rpm, Heraeus Biofuge), then supernatants were used. This method was efficient as proven by the absence of polyphenols after a second extraction from the same lyophilisate. For the photometric procedures presented below (assay of total phenolic content and ABTS*/DPPH* inhibition), the ratio between samples

and 30% methanol was set up to obtain a supernatant containing 25 mg DW mL⁻¹ plant material. These supernatants were used for spectrophotometric assays- where each ml of reaction mixtures contained 0.5 mg DW of plant material for achieving the most accurate results. Total phenolic content was assayed by a modified Folin-Ciocalteu (FC) method as described (Singleton and Rossi, 1965; Grubestic et. al.,2005). Briefly, 8-fold diluted FC reagent and a final concentration of 233 mM Na₂CO₃ was used in the assay. A₇₂₀ of samples was measured with a Shimadzu UV-VIS 1602 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) and this photometer was used for the assay of free radical scavenging capacities as well. Gallic acid was used as standard and total phenolic content of plant samples was expressed as gallic acid equivalent (GAE), mg g⁻¹ DW. Free radical scavenging activity was measured by the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS* cation) inhibition assay as described (Miliauskas et al., 2004; Katalinic et al., 2006). ABTS was purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA. Briefly: for the ABTS* cation inhibition, ABTS radical was produced with potassium persulfate (K₂S₂O₈) and the solution diluted with ethanol to reach an A₇₃₄ value of 0.7. Plant samples were added thereafter. The percentages of radical inhibition were calculated according to the following formula: [(A₀-A_∞)/A₀] x 100, where A₀ is the absorbance of ABTS* cation at the start of the scavenging reaction and A_∞ is the absorbance at the 6th minute of the reaction. Ascorbic acid (AA) and 6-Hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) were used as standards. AA equivalents and Trolox equivalent antioxidant capacities (TEAC) were calculated, based on the extrapolation of ABTS* cation inhibition values to the calibration curves of standards. 0,01 g DPPH diluted with 25 ml EtOH to reach an A_{515} value of 0,9. The percentages of radical inhibition were calculated according to the following formula: $[(A_0 - A_{\infty})/A_0] \times 100$, where A_0 is the absorbance of DPPH at the start of the scavenging reaction and A_{∞} is the absorbance at the 6th minute of the reaction.

4. Summary of results

a) *Galanthus nivalis* callus cultures were created from bulb explants on media containing 2 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA and 10 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA. These calli developed intact green shoots after stable maintenance and cultivation at a 2 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA hormone combination. From these shoots, bulblets could be regenerated on 2 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA containing, modified MS medium. *G. elwesii* and *G. woronowii* callus cultures were created from bulb explants on 2 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA and 10 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA containing media. *G. elwesii* calli produced intense green shoots with bulblets during long-term subculture on 2 mg l⁻¹ NAA + 2 mg l⁻¹ IAA, thus a medium containing only auxin hormone was used. In case of *G. woronowii* callus at high auxin

concentration roots and shoots were formed, the whole plants produced bulblets on a later stage on 2 mg l⁻¹ NAA +1 mg l⁻¹ BA.

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

c) For *Leucojum aestivum* and *L. vernum* lowering auxin content of media was successful in callus/culture initiation and maintenance. For spring snowflake 2 mg l⁻¹ NAA +1 mg l⁻¹ BA containing medium resulted in shoot and bulblet formation. When young shoots were transferred to 2 mg l⁻¹ NAA +2 mg l⁻¹ IBA containing medium, the bulbs have continued to grow and roots differentiated. For summer snowflake next to the callus formation, whole plant formation with a complete root system, was observed in the presence of 2 mg l⁻¹ NAA

d) During the initial tissue culturing of *Sternbergia lutea* on 2 mg l⁻¹ NAA and 1 mg l⁻¹ BA, embryogenic calli with shoot differentiation were induced. Shoot multiplication was stimulated at 2 mg l⁻¹ NAA+ 1 mg l⁻¹ BA hormone composition.

e) f) In our studies, we looked further for plants produced *in vitro* with potentially high antioxidant activity. High polyphenol content coupled with a high cation ABTS * radical scavenging activity was observed in the case of *G. woronowii* and *S.lutea* cultures, while the cultures of *L. aestivum* had low free radical scavenging activity although the polyphenol content of these samples was high. DPPH radical scavenging activity in our tissue cultures was low. Tissue

culturing of *Sternbergia lutea* on 2 mg l^{-1} NAA and 1 mg l^{-1} BA resulted in the highest DPPH radical scavenging activity. In conclusion, although tissue culture conditions are known to alter secondary metabolite production and antioxidant activity (Matkowski, 2008), the cultures involved in this study were able to maintain a relatively high antioxidant activity. From our examinations it can be concluded that the antioxidant activity depends on the species (genotype) and not the nature of *in vitro* regenerated tissues.

g) There were differences between the free radical scavenging activity and peroxidase activities of the tissue cultures examined. For *G. woronowii* and *S. lutea* low molecular weight compounds (polyphenols), and non-enzymatic antioxidants have been responsible for the high antioxidant activity, rather than enzymatic reactive oxygen scavengers. Spectrophotometric assay showed more pronounced inhibition of guaiacol peroxidase activities by 2-ME, than for pyrogallol peroxidase (data not shown). Specific activities ($\text{mM oxidized guaiacol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) in the absence of 2-ME were 32.84% of horseradish extracts for *S. lutea* and 60.31% for *L. vernum*. In the absence of 2-ME guaiacol peroxidase activity of *S. lutea* and *L. vernum* extracts was relatively high. For each tissue culture of *Amaryllidaceae*, pyrogallol peroxidase activity was considerably lower than in the positive control - horseradish extract. Native gels for catalase showed high activities for *Lemna minor* shoots used as positive controls and low activities for our tissue

cultures and native organs used as explants. Among tissue cultures, the highest activities were detected in *Leucojum vernum* plants and *L. aestivum* embryogenic calli grown on 2 mg l⁻¹ NAA. Low or no activities were detected in *G. woronowii* cultures, *L. vernum* plants grown on 2 mg l⁻¹ NAA and 1 mg l⁻¹ BA and *Sternbergia lutea* cultures.

The highest polyphenol content and radical scavenging activity:

-High polyphenol content coupled with a high cation ABTS * radical scavenging activity was observed in the case of *G. woronowii* and *S.lutea* cultures, and *S.lutea* leaves, *L.vernum* leaves.

-DPPH radical scavenging activity in our tissue cultures was low. Tissue culturing of *Sternbergia lutea* on 2 mg l⁻¹ NAA and 1 mg l⁻¹ BA resulted in the highest DPPH radical scavenging activity.

The highest peroxidase and catalase activity:

- The highest catalase activities were detected in *Leucojum vernum* plants and *L. aestivum* embryogenic calli grown on 2 mg l⁻¹ NAA. Low or no activities were detected in *G. woronowii* cultures, *L. vernum* plants grown on 2 mg l⁻¹ NAA and 1 mg l⁻¹ BA and *Sternbergia lutea* cultures.

Scientific significance of the results of this PhD thesis:

In summary, we have successfully created tissue cultures in six *Amaryllidaceae* species. These cultures have potential significance in terms of the gene bank in Central Europe and several of them being endangered *Amaryllidaceae* species found in Europe. We analyzed antioxidant activity for the first time in the four species (*G. woronowii*, *L. vernum*, *L. aestivum*, *S.lutea*) of plants established *in vitro*, and compared them to specimens found in nature. We regenerated shoots or whole plants from embryogenic calli and somatic embryos in *Leucojum aestivum* and *Sternbergia lutea*. In contrast, *in vitro* shoots or whole plants could be produced from *Galanthus woronowii* and *Leucojum vernum* explants without somatic embryo formation. Tissue culturing of *G. woronowii* and *S. lutea* was established for the first time in this study. In our studies we provided evidences for the conservation of their excellent free radical neutralizing activity. These activities are comparable with various organs derived from the original habitats. The *G. woronowii* and *S. lutea* cultures have the potential to be used for pharmacological purposes because of their high non-enzymatic antioxidant activity, however further investigations are required.

10. Acknowledgments

I am grateful to my supervisor, Csaba Máthé for his support during my research. I thank Márta Hamvas Mikóné, Zita Demeter, Csongor Freytag, Fruzsina Kalydi, Petra Gabriella Juhász, Ilona Mészáros, Gábor Vasas, Sándor Gonda, Gyula Surányi, László Papp, Ágnes Mosolygó-Lukács, Attila V. Molnár, Tamás Garda, Edvárd Mizsei, Éva Barabás, Katalin Szabó, Erzsébet Barna, Éva Szőke, Andrea Balázs, Emese Ficsor for helping in the sampling and laboratory work. I am very grateful to my parents and my husband. This research was supported by Universitas Foundation and DETEP.

Irodalomjegyzék/References:

- Bhagyalakshmi N. (1999) Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. *Plant cell tissue and organ culture* 58: 205-211.
- Blois M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radicals. *Nature* (4617):1198-1200.
- Bogdanova Y., Stoeva T., Yanev S., Pandova B., Molle E., Burrus M. (2009) . Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid biosynthesis during long-term in vitro cultivation of *Leucojum aestivum* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 45:458-465.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 28, 25-30.
- Cao G. H., Prior R.L. (1998) Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum *Clinical Chemistry* 44:1309-1315
- Chaâbani G, Tabart J., Kevers C., Dommes J., Khan M.I., Zaoui S. (2015) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid combined to 6-benzylaminopurine on callus induction, total phenolic and ascorbic acid production, and antioxidant activities in leaf tissue cultures of *Crataegus azarolus* L. var. *aronia*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:16.
- Chanwun T., Muhamad N., Chirapongsatunkul N., Churngchow N. (2013) *Hevea brasiliensis* cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express* 3:14.
- Chen L., Yi Zhu X., Li Gu, J. Wu (2005) Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem *Plant cell reports* 24: 401–407
- Choen G., Dembiec D., Marcus J. (1970) M Measurement of catalase activity in tissue extracts *Analytical Biochemistry* 34:

- Conforti F., Loizzo M.R., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D. (2010) Quantitative determination of Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus reginae-olgae* subsp. *vernalis* and *in vitro* activities relevant for neurodegenerative diseases. *Pharmaceutical Biology* 48:2-9.
- Darvishi E., Zarghami R., Mishani C.A., Omid M., Sarkhosh A. (2006) *In vitro* Production of Pathogen-free Plantlets via Meristem Culture in saffron (*Crocus sativus* L.). *Biotechnology* 5: 292-295
- Dudits D., Heszky L. (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia. *Agroinform*
- El Tahchy A., Bordage S., Ptak A., Dupire F., Barre E., Guillou C. (2011) Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of *Amaryllidaceae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106:381-390.
- Farkas S. (1999) Magyarország védett növényei Mezőgazda Publ., Budapest 295.
- Fay M.F., Chase M.W. (1996) Resurrection of *Themidaceae* for the *Brodiaea alliance*, and recircumscription of *Alliaceae*, *Amaryllidaceae* and *Agapanthoideae* *Taxon* 45: 441-451
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental research* 50: 151-158
- George E.F., Hall M.A., Geert-Jan De K. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. Springer Dordrecht, The Netherlands
- Grubescic R.J., Vuković J., Kremer D., Vladimir-Knežević S. (2005) Spectrophotometric method for polyphenoly analysis: prevalidation and application of *Plantago* L. species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:837-842.
- Hamid M., Rehman K. (2009) Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* 115:1177-1186.
- Ivanov I., Georgiev V., Berkov S., Pavlov A. (2012) Alkaloid patterns in *Leucosium aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal of Plant Physiology* 169: 206-211.

- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 94:550-557.
- Király G. (szerk) (2007) A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai Lövér Print, Sopron, Magyarország, pp 13-50
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Láng F. (1998) Növényélettan (A növényi anyagcsere). Egyetemi tankönyv. ELTE Etvös Kiadó, Budapest. pp. 862-873, 915-984.
- Láng F. (1998) Növényélettan II. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. Szigeti Z 14. Fejezet- A növények és a stressz 950-1015
- Mantle D., Eddeb F., Pickering A.T. (2000) Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 72:47-51.
- Máthé Cs. , Demeter Z. , Resetár A. , Gonda S. , Balázs A., Szöke É. , Kiss Z. , Simon Á., Székely V., Riba M. , Garda T. , Gere B., Noszály Zs. , Molnár V. A. , Vasas G. (2012) The plant tissue culture collection at Department of Botany, University of Debrecen -Volume 56 (2) *Acta Biologica Szegediensis*
- Matkowski A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants- a review. *Biotechnology advances* 26:548-560.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85:231-237.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revive medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Petruska F., Geda O., Resetár A., Ajtay K. (2014) A *Lemna minor*, a *Lemna trisulca* és a *Wolffia arrhiza* tenyészetek cilindrospermopszinnal szembeni érzékenységének összehasonlító vizsgálata. *Hidrológiai Közlöny* 2014/94/1. 76.
- Podani J. (2014) A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana. Vezérfonal egy nem is olyan könnyű tárgy tanulásához. C. függelék-C)A zöld növények (*Viridiplantae*) rendszertana. ELTE Eötvös Kiadó.
- Razdan M.K. (2003) Introduction to plant tissue culture. Science

Publisher, Enfield. 14-71

- Resztár A., Demeter Z., Ficsor E., Balázs A., Mosolygó Á., Szőke É., Gonda S., Papp L., Surányi Gy., Máthé Cs.(2014) Growth regulator requirement for in vitro embryogenic cultures of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) suitable for germplasm preservation. *Acta Biologica Hungarica* 65:165-177.
- Santos J., Santos I., Salema R. (1998) *In vitro* production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth *Scientia Horticulturae* 76: 205-217
- Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Müntz K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryogenic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 51:1423–1433.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16. 144-158.
- Smirnoff N. (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants, Blackwell.

A jelölt tudományos tevékenységének a jegyzéke

Értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

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

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

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

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

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

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

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

Egyéb közlemény:

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

Értekezés témaköréhez kapcsolódó konferencia előadások, poszterek jegyzéke:

Előadás:

2015-Fiatal növénybiológusok Előadássorozata – előadás-Enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok vizsgálata *Amaryllidaceae* fajok szövettényészetiben- Pécs,2015. 02. 06.

2014-Fiatal gyógynövénykutatók fóruma- előadás -*Amaryllidaceae* fajok szövettényésztése és antioxidáns aktivitás meghatározása- Budakalász,2014. 02. 14.

2012-Diószegi Szeminárium- előadás – Alkaloid termelésre alkalmas *Galanthus nivalis* szövettényészetek előállításá- **Resetár Anna**, Demeter Zita, Máthé Csaba

2012-XIV. MAGYAR NÖVÉNYANATÓMIAI SZIMPÓZIUM- fiatal kutatók előadói verseny I. helyezés- *Galanthus nivalis* (kikeleti

hóvirág) *in vitro* szövettényészetek előállítására és a morfogenezis vizsgálata, Budapest, 2012. 09. 28.

2011-A XXX. OTDK- pályamunka Növényregenerálás *Galanthus nivalis in vitro* szövettényészetekből, Budapest, 2011. 04. 21.

2010-XII. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia-pályamunka Címe: A *Galanthus nivalis* (hóvirág) védett faj szövettényésztése, Sopron, 2010. 04. 07.

2010-Őszi Tudományos Diákköri Konferencia-pályamunka Címe: Növényregenerálás *Galanthus nivalis in vitro* szövettényészetekből, Debrecen, 2010.

Poszter:

Resetár Anna, Demeter Zita, Máthé Csaba, Ficsor Emese, Balázs Andrea, Szőke Éva (2014) The induction of *in vitro* tissue cultures and the study of antioxidant activity in *Amaryllidaceae* species, Szeged, MTA Szegedi Területi Bizottság Székháza

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, Okt. 2010

Nemzetközi konferencia részvétel:

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