Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Thesis of PhD dissertation

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

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

1 Bevezetés

A fehér tölgyek (*Quercus* szekció, *Quercus* szubgenusz) általánosan elterjedtek Európában. A tölgy fajokra jelentős genetikai diverzitás jellemző. A *Quercus* alnemzetségen belül a *Quercus* szekcióban mutatták ki a legnagyobb genetikai és morfológiai variabilitást (Nixon 1993, Herzog 1996, Gailing és mtsai. 2007). 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 T*en., *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 tekinthetőek. (Keresztesi 1967, Mátyás 1970, Borhidi 2008, Kanalas és mtsai. 2008 Enescu és mtsai. 2012).

A magyarországi erdős területek legnagyobb részét a kocsánytalan és csertölgy kevert állománya (*Quercetum petraeae-cerris*) teszi ki. Ezt az erdőtípust reprezentálja az interdiszciplináris, hosszú távú ökológiai kutatási program területe Síkfőkúton a Bükk-hegységben (Jakucs 1985).

Az európai fehér tölgyek ökológiai igénye eltérő, különböző élőhelyeken fordulnak elő, és az elterjedésük főként attól függ, mennyire képesek alkalmazkodni a vízhiányhoz, a vízfelesleghez, illetve a két jelenség váltakozásához (Jones 1959, Johnson és mtsai. 2002). 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, Gallé és mtsai. 2007, Siam és mtsai. 2009). A *Q. petraea* főként mérsékelten vagy viszonylag száraz termőhelyeken, alacsonyabb lejtőkön, hegyvonulatokon alkot állományokat, míg a *Q. robur* az alföldek nedvesebb, átmenetileg

vizenyősebb területeit népesíti be (Jones 1959, Aas 1998). A *Q. dalechampii* Ten. (Theodoropoulos és mtsai. 1995) és *Quercus polycarpa* Schur (Matula 2009) ökológiai igényükben jobban eltérnek a szűkebb értelemben vett *Q. petraea*-tól, mert szárazságtűrőbbek, és melegebb területeken élnek. A *Quercus virgiliana* Európa délebbre eső szárazabb élőhelyein fordul elő (Ofletea és mtsai. 2011).

Napjainkban az európai tölgyállományt jelentősen befolyásoló klímaváltozás. Globális felmelegedés, a száraz periódusok gyakoriságának növekedése tapasztalható, ami hatással van az ökológiai és gazdasági szempontból jelentős *Q. petraea* állományokra is. A fehér tölgyek közül, a szárazsághoz legjobban alkalmazkodó, de gazdasági szempontból másodrendű, kevésbé jelentős *Q. pubescens* (molyhos tölgy) és *Q. virgiliana* (olasz molyhos tölgy) introgressziója következett be Európa nem mediterrán területein a 80-as évek nagy csúcsszáradásos tölgypusztulását követően (Vieitez és mtsai. 2012).

A fehér tölgy taxonok fajainak kereszteződése gyakori jelenség (Lepais és mtsai. 2009, Lepais és Gerber 2011, Salvini és mtsai. 2009), ami növeli az összes faj természetes populációjának genetikai diverzitását (Borovics és mtsai. 1998, Gömöry és Schmidtová 2007, Kanalas és mtsai. 2008). Mivel a korszerű erdészet a jó minőségű fával rendelkező, de a nagyobb szárazságtoleranciájú természetes állományok megőrzését tartja szem előtt, ezért a tágabb értelemben vett *Q. petraea* szárazságtűrőbb taxonjainak és hibridjeinek egyre növekszik a jelentősége.

A növényi szövettenyészetek, amelyek magukban foglalják a kallusz- és a sejtkultúrákat, valamint nagyszámú növény mikroszaporítását is, jól kontrollálható, stabil kísérleti rendszerek, melyek modellrendszerként alkalmazhatóak és felhasználhatóak az abiotikus stresszfaktorok fiziológiai és biokémiai hatásainak tanulmányozásához.

A vegetatív szervekből és merisztematikus szövetekből létrehozott *in vitro* kultúrák jobban tükrözik az eredeti növény/explantátumok genotípusát, mint az embriók és a csíranövények, amelyek genetikai összetétele bizonytalan. A DE Növénytani Tanszéke jelentős tapasztalattal rendelkezik olyan fajok *in vitro* tenyészeteinek előállításában - beleértve a szomatikus

embriókkal rendelkező kalluszok előállítását is - amelyek szövettenyészeteit korábban nem írták le (Demeter és mtsai. 2010).

A kocsányos és kocsánytalan tölgyek sejt- és kallusz kultúrái kiválóan alkalmazhatóak modellként az ozmotikus stresszel összefüggő transzkripciós, és egyéb fiziológia válaszok tanulmányozásához szöveti, sejt és molekuláris szinten (Gleeson és mtsai. 2004, Porth és mtsai. 2005, Šunderlíková és mtsai. 2009).

A peroxidázok az antioxidáns enzimrendszer tagjai, melyek csökkentik a szárazságstressz hatására megemelkedett reaktív oxigénformák (ROS) szintjét. Az antioxidáns védőrendszer jelenlétéből és aktivitásából jól lehet következtetni a növény szárazságtűrő képességére (Ramachandra Reddy és mtsai. 2004). Abban az esetben, amikor az oxidatív stresszt a növény antioxidáns védőrendszere nem tudja kivédeni, bekövetkezik a DNS és RNS állomány károsodása, melyet a nukleázok, többek között a szubsztrátként szimplaszálú nukleinsavakat használó nukleázok, aktivitásának a növekedése kísér (Ramachandra Reddy és mtsai. 2004, Roldán-Arjona és Ariza 2009).

Az abiotikus stresszhatások citológiai szinten is vizsgálhatóak. A kromatinszerkezet változása érzékeny indikátora számos stressztípusnak, mely főként aktívan osztódó szövetekben, mint pl. gyökércsúcsban tanulmányozható a leghatékonyabban (Samardakiewicz és Woźny 2005, Beyer és mtsai. 2009, Jámbrik és mtsai. 2011, Silva és mtsai 2011, Beyer és mtsai. 2012).

A magasabbrendű növényekben szárazság-/ozmotikus stresszhatást *in vitro* körülmények között széles körben hiperozmotikus koncentrációjú PEG 6000 felhasználásával váltanak ki, mert a növény nem tudja metabolizálni, és az alkalmazása során esetleg fellépő mellékhatások elhanyagolhatóak (Hohl and Schopfer 1991, Guóth és mtsai. 2010).

2 Célkitűzés

Célunk volt, hogy a Síkfőkút Projekt kutatási terület cseres-tölgyes 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* kallusztenyészeteket állítottuk elő.
Az előző tapasztalatok alapján, a munka érdemi részéhez kapcsolódó célkitűzéseket a következők szerint fogalmaztuk meg:

- a tölgy taxonok vegetatív szerveiből, stabil szövettenyészetek előállítása,
- kalluszvonalak létrehozása és hosszú távú fenntartása,
- a kalluszok egy részéből tovább folytatva a kísérleteket, szervek, embriók és növények előállítása

A létrehozott életképes kallusz és szervtenyészetek 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, hogy a szárazsággal szemben érzékenyebb (*Q. petraea sensu stricto)* illetve ellenállóbb (*Q. pubescens, Q. virgiliana)* taxonok explantátumaiból származó szövettenyészetek ozmotikus stresszre adott válaszreakciói eltérőek lesznek, míg hibridjeik (*Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* a *Q. petraea* x *Q. pubescens, Q. petraea* x *Q. dalechampii)* átmenetet fognak képezni a két szélsőérték között.
Célul tűztük ki ennek a hipotézisnek az ellenőrzését. Ha az *in vitro* kísérletek igazolják feltevéseinket a szárazsággal szemben érzékenyebb (*Q. petraea)* és szárazságtűrőbb (*Q. pubescens* and *Q. virgiliana)* taxonok esetében, akkor a kidolgozott rendszer a kevésbé ismert tűrőképességű, feltételezett hibrid taxonok vízhiányra adott válaszreakcióinak vizsgálatára is felhasználható.

3 Anyag és módszer

3.1 Előzetes vizsgálatok szövettenyészetek előállításához és növényregeneráláshoz *Crocus heuffelianus* explantátumok felhasználásával

Előzetes vizsgálatainkat, az egyszikűek osztályába tartozó *Crocus heuffelianuson végeztük, melyet* 2007. március -május időszakban kerültek begyűjtésre Radnalajosfalváró (Beszterce-Naszod megye, Romania). Explantátumként gyökeret, levelet, virágkezdeményt, hagymagumót, hajtáscsúcsot, és steril körülmények között csírázó embriókat próbáltunk ki. A felületi sterilezést (3X10 perc 10%-os Domestos oldat és 3x5 perc steril vizes öblítés), előkészítést követően az expalntátumokat 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. Auxin hatású hormonként α-naftil ecetsavat (NAA) citokinin hatású hormonként pedig 6-benziladenint (BA) és kinetint (KN) használtunk. A növényregenerálás során módosítottuk az auxin-citokinin arányokat, és lecsökkentettük a hormonok, az alaptáptalaj szénforrásának, makro- és mikroelemeinek koncentrációját. A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és 22+–2 °C/18+–2 °C fény/sötét hőmérsékletperióduson neveltük 60 μmol m^{-2} sec^{-1} fényerőn. A *Crocus heuffelianus* szövettenyésztését a *Crocus sativus* és *Crocus cancellatus* mikroszaporítására kidolgozott szakirodalmak alapján terveztük meg (Bhagyalakshmi és mtsai. 1999, Plesssner és Ziv 1999, Chen és mtsai. 2003, Darvishi és mtsai. 2006, Ray és Bhattacharya 2008).

3.2 Kallusztenyészetek előállítása a fehér tölgy taxonokból.

Az erdőállományban előforduló fehér tölgy taxonok szárazságtűrő képességének összevetéséhez *in vitro* tenyészeteket alkalmaztunk. A szövettenyésztéshez alkalmas eljárás kidolgozásához további előzetes vizsgálatokat végeztünk, explantátumként a Debreceni Egyetem Botanikus Kertjéből származó kb. 95 éves *Quercus robur* steril körülmények között csíráztatott makkjainak felhasználásával.

Az ökofiziológiai kísérletekhez szükséges kallusz tenyészetek létrehozásához 2010 kora tavaszán (március-április) a Síkfőkúti erdőállományban *Q. petraea, Q. pubescens, Q. virgiliana* és feltételezett hibridjeinek 95-100 éves fáiról 1-2cm átmérőjű és 20—30 cm hosszúságú rügyekkel teli ágak kerültek begyűjtésre, melyeket szobahőmérsékleten tárolva 1 héten belül rügyfakadásra késztettük. Az éppen kibomló kb. 1cm^2 felületű fiatal leveleket és éretlen barkákat használtuk fel explantátumnak, felületi sterilezést (3x5 perc 10%-os Domestos oldat és 3x5 perc steril vizes öblítés) követően. Az összes explantátum ugyanarról a kutatási területről, azonos ökológiai körülmények közül származik. Az explantátumok genotípusonként egyetlen kiválasztott fáról származtak. A vizsgált taxonokat levélmorfológia alapján határozták meg (Borovics 1997, Kanalas és mtsai. 2008, 2009), és a genetikai kapcsolatokat mikroszatellit analízis támasztja alá (Demeter és mtsai. 2014).
A kalluszok indukcióját és fenntartását a 3% D-szacharózzal kiegészített 0,8% Difco-agarral (Difco, Lawrence, KS, USA) szilárdított, auxin és citokinin eltérő arányú elegyét tartalmazó WPM táptalajon (Woody Plant Medium, Lloyd and McCown 1980) váltottuk ki. A kísérletben auxin hatású hormonként 0.05 – 4 mg l^{-1} (0.53-21.5 μM) α-naftil ecetsavat (NAA) és 0.05 - 1 mg l^{-1} (0.25-0.5 μM) indol-3-vajsavat (IBA), míg citokinin hatású növekedés szabályozó anyagként 0.1 - 4 mg l^{-1} (0.44-17.7 μM) N^6-benzilaminopurint (BA) alkalmaztunk. Az összes növekedés szabályozó anyag Sigma-Aldrich –tól (Budapest, Magyarország) származott. A szövettenyésztési eljárások megtervezéséhez előzetes kísérleteink tapasztalatait és a következő szakirodalmakat használtuk fel: Tanaka és mtsai. (1995), Seckinger és mtsai. (1979), Cuenca és mtsai. (1999), Toribio és mtsai. (2004) és Demeter és mtsai. (2010). A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és 22+–2 °C/18+–2 °C fény/sötét hőmérsékletperióduson neveltük 30 μmol m^{-2} sec^{-1} fényerőn.

3.3 Az ozmotikus stressz kiváltása

Az agarral szilárdított WPM táptalajon növekedő kalluszokat ugyanolyan összetételű folyékony táptalajba helyeztük (2ml táptalaj 10 ml-es steril műanyag edényekben, Labsystem, Budapest, Hungary) és 24 órán át enyhe rázatás mellett (100 rpm) 0-40 % (w/v)

polietilén glikol 6000-el (PEG 6000, VWR, Leuven, Belgium) kezeltük.

3.4 Nedvestömeg-változás meghatározása

A kalluszok ozmotikus kezelés hatására bekövetkező folyadékveszteségének mértékét, nedvestömeg-változás mérésével detektáltuk. A kalluszok nedves tömegét a PEG 6000 kezelés kezdetén és végén mértük meg. A tömegmérés előtt, a folyékony táptalaj felesleget enyhe, a kallusz életképességét, vagy növekedést nem korlátozó centrifugálással (1000 rpm, 5 s, Heraeus Biofuge, Kendro Laboratory Products, Harau, Germany) távolítottuk el. A kalluszok százalékos nedvestömeg -változásának kiszámítása a kísérletet megelőzően és követően mért nedves tömegek közötti különbségeken alapul.

Az enzimaktivitásokat a 24 órás ozmotikus kezelést követően mértük.

3.5 Helyreállás (recovery) vizsgálata az ozmotikus stresszt követően

A PEG kezelt kalluszokat külön-külön folyékony WPM tápoldatban 30 percig rázattuk 100 rpm-en Packard-küvettában, 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 kalluszszövetek fennmaradásának és növekedésének képességét. 30 nap elteltével megmértük a regenerált kalluszok nedvestömegét a 3.4 fejezetben leírt módszer alapján.

3.6 Növénykivonatok készítése

Az enzimaktivitások kimutatásához a kontroll és az eltérő koncentrációjú PEG oldatokkal kezelt kalluszokat folyékony nitrogénben porrá őröltük, majd 1:1 arányban (növény nedves tömege : puffer térfogata) 100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 (VWR) pH: 7,2, 8 mM $MgCl_2$ (Reanal, Budapest), 4 mM DTT (Sigma) 1 v/v % Triton X-100 (Reanal), 2 w/v PVP (Merck) tartalmú pufferrel

homogenizáltuk. A homogenizátumot +4 °C-on 2x30 percig 15000xg fordulaton centrifugáltuk (Biofuge pico Kendro Laboratory Németország), majd a felülúszót nyers fehérje kivonatként használtuk fel. A kivonatok fehérjetartalmát Bradford (1976) módszerével határoztuk meg, bovin szérum albumint használva standardként. A kivonatokat felhasználásig kis térfogatokban -80 °C-on tároltuk.

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

DN-áz enzimek aktivitását, módosított 10%-os Laemmli-féle poliakrilamid-gélrendszerrel (Laemmli 1970) vizsgáltuk Jámbrik és mtsai. (2011) leírása alapján. A fehérje kivonatot (20 µg/ mintahely) molekulasúly marker (Sigma-Aldrich) mellett SDS és szimpla szálú csirke vér DNS-t tartalmazó poliakrilamid gélen futtattuk 4 °C-on. Az enzimek renaturálását követően, a géleket friss pH 6,8-as Tris-HCl pufferben 39 °C-on, egy éjszakán át (14 óra) inkubáltuk. Ezt követően etídium-bromidos (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) (0.5 µg ml^{-1}) festést (Gersten és Gabriel 1992) alkalmaztunk, amit UV fényen vizsgáltunk. A szimpla szálú nukleáz aktivitás etídium-bromiddal nem festődő sötét sáv formájában detektálható.

3.8 Peroxidáz izoenzimek aktivitásának kimutatása egydimenziós natív poliakrilamid-gélelektroforézissel

A peroxidáz aktivitást poliakrilamid-gélrendszeren (Laemmli 1970) vizsgáltuk. A fehérje kivonatokat (10 µg/ mintahely) 7,5 % (w/v) poliakrilamid gélen futtattuk 4°C-on. A géleken (13x10x0,09 cm) az izoenzimek sávjait kétféle módon tettük láthatóvá. Egyik esetben 1mM guajakolt és 10mM H_2O_2-ot tartalmazó 100m M pH 5,1-es Na-acetát pufferben tartottuk a géleket 30-60 percig, a másik esetben a géleket 1 órán át inkubáltuk 50mM pH 7,5-ös K_2HPO_4/KH_2PO_4 pufferben, majd 15-30 percig festettük 20mM pirogallolt, és 5mM H_2O_2-ot tartalmazó 50mM pH 7,5-ös K_2HPO_4/KH_2PO_4 pufferben. A peroxidáz aktivitás látható fényen a tetraguajakol illetve a

purpurogallin sötét sávjainak formájában detektálhatóak (Tauber 1953, Dixit 2011, Ghadiri és mtsai. 2013).

3.9 A poliakrilamid gélek kiértékelése

A poliakrilamid gélek enzimsávjainak („band”-ek) intenzitását CpAtlas® program felhasználásával állapítottuk meg. A relatív sávintenzitások meghatározásához a kontroll aktivitásának értékét 1-nek vettük.
Az ssDNáz izoenzimjeinek molekuláris tömegét UVI-TEC® program segítségével becsültük meg.

3.10 Szövettani vizsgálatok

A szövettani vizsgálatokhoz 20µm-es metszeteket készítettünk Leica Jung Histoslide 2000 mikrotóm (Leica, Nussloch, Németország) felhasználásával. A metszést megelőzően a szövetdarabokat 16 órán keresztül fixáltuk 4% formaldehidet (Reanal) tartalmazó 1xPBS-ben. Ezt követően 3x5percig mostuk 1xPBS-ben, majd a mintákat 5 órára 40% D-szacharóz (VWR) tartalmú 1xPBS-be helyeztük a szöveti struktúra jobb megőrzésének érdekében. A metszéshez felhasznált szövetdarabokat fagyasztó médiumba (TBS, Durham, NC, USA) ágyaztuk be, amit ezután szén-dioxid felhasználásával lefagyasztottunk. A metszeteket PBS-ben gyűjtöttük össze (Beyer és mtsai. 2009)

A gyökércsúcs hosszmetszetek kromatin állományát Beyer és mtsai. (2009) által közölt és általunk módosított módszerek szerint tettük láthatóvá. 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. Az kromatin állományt 320-360 nm-es gerjesztő filter segítségével vizsgáltuk (Beyer és mtsai. 2009).

3.11 Adatok elemzése

Az összes kísérletet legalább négy alkalommal hajtottuk végre, kísérletenként minden genotípus hat párhuzamos mintáján, és a reprezentatív kísérletek eredményeit felhasználva vontuk le a következtetéseket. A mennyiségi adatok statisztikai kiértékeléséhez, átlagértékek kiszámításához és grafikus ábrázolásához Sigma Plot 10.0 programot használtuk. A grafikonok a megfelelő genotípusú egyedek kalluszainak vizsgálatából származó reprezentatív eredmények átlagértékeit ± SE ábrázolják.

4 Új tudományos eredmények és megbeszélésük

4.1 Szövettenyésztési eljárások fejlesztése *Crocus heuffelianus* felhasználásával

Életképes, hosszútávon fenntartható embriogén kalluszkultúrák indukciójához a hagymagumóból kipreparált hajtáscsúcs és a steril magvakból fejlődő csíranövény bizonyult a legalkalmasabb explantátumnak. Az axenikus körülmények között tartott magok nagyon kis hányada csírázott ki több hónap elteltével. Az embriogén kallusz indukció és fenntartás a 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 volt a leghatékonyabb. A magas hormonkoncentrációk és a nagy auxin arány a kalluszvonalak fenntartásra alkalmasnak bizonyultak.

A hormonkoncentrációk lecsökkentése és ezt követően a hormonarányok megfordítása érett embriókat eredményez. A hormonmentes táptalajon, a kalluszokon gyökérképződés következett be. 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. A növényregenerálásra három lépésből álló tenyésztés volt a legalkalmasabb. Ennek 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,

kiváltva az embriók érésének folyamatát. Végül 0,5mgl^{-1}-ről 2 mgl^{-1} re növeltük a BA mennyiségét, és a táptalajt 25 mg l^{-1} GA_3-el és 100 mg l^{-1} aszkorbinsavval egészítettük ki., melynek hatására az érett szomatikus embriók növénnyé differenciálódtak, majd kifejlődött a növényen a hagymagumó is. Az aszkorbinsav a táptalajban antioxidáns szerepet tölt be, amely csökkenti a szövetek barnulásának folyamatait (Tóth és mtsai. 1994, Noctor és Foyer 1998).

4.2 Szövettenyészetek létrehozása fehét tölgy taxonokból.

4.2.1 *Quercus robur* kallusz-vonalak létrehozása

Sikerült egy hét elteltével a hántolt *Q. robur* makkokat kicsíráztatni, a táptalaj mikro- és makroelem tartalmától függetlenül. Bár 25 mgl^{-1} GA_3 jelenlétében több hajtás megjelenését tapasztaltuk, a gibberellint tartalmazó táptalajon a szártagok megnyúlása mellett, a levelek a kontrollhoz képest kisebbre nőttek, és a gibberellin koncentrációjának növekedésével fokozódott a gyökerek elsötétedése is. Míg a GA_3 a *Q. robur* csíranövényben a szártag megnyúlását serkenti, a levelek és gyökerek növekedését korlátozza. Ezek a jelenségek a gibberellin általános hatásaira vezethetőek vissza, miszerint serkentik a sejtek megnyúlásos növekedését, miközben gátolják a merisztemoidok iniciációját (Gaspar és mtsai. 1996).

Az auxint és citokinint tartalmazó táptalajokon a hormonarányoktól függően, a csírázó embriók különböző részein jelentek meg első generációs kalluszok. A gyökereken abban az esetben képződött kallusz, amikor auxint tartalmazott nagyarányban a táptalaj. Citokinin túlsúly esetén, a szikleveleken jelentek meg kalluszok, míg auxin hiányában, de citokinin jelenlétében a sziklevél proximális (az embriótengelyhez kapcsolódó) szövetei kalluszosodtak el. A létrejövő kalluszok hosszú távú fenntartására azonban az indukáló táptalajoktól eltérően, az explantátum típusától függetlenül a Cuenca és mtsai. (1999), Toribio és mtsai. (2004) illetve San-José és mtsai. (2010) által is felhasznált 4mgl^{-1}NAA, 0,5-1mgl^{-1} BA és 100 mgl^{-1} aszkorbinsav tartalmú táptalaj bizonyult a legalkalmasabbnak.

4.2.2 Levél és barka eredetű kalluszvonalak létrehozása fehér tölgy taxonokból

A síkfőkúti erdőállományban előforduló fehér tölgy taxonok leveleiből illetve a *Q. petraea* és *Q. polycarpa* barkáiból sikerült stabil, több mint egy éve fennálló, a szárazságstressz vizsgálatokhoz felhasználható, változatlan növekedési és morfogenetikai sajátságokkal rendelkező kalluszokat előállítani. A *Q. petraea* barkákból a kalluszvonalak megjelenése kétféle volt: az egyik egy kompaktabb embrio- és organogenezisre hajlamos, a másik pedig egy világossárga törékeny, szervkezdemények és embriók létrehozására alkalmatlan kallusz vonal. A kalluszok indukciójához és fenntartásához a 100 mgl^{-1} aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalaj bizonyult a legalkalmasabbnak.

Mivel a tölgy levelek és barkák nagymértékben halmoznak fel fenolos vegyületeket, a belőlük származó kalluszok is rendelkeznek ezzel a képességgel (Krajci és Gross 1986, Romano és Martins-Loucao 1992, Bajaj 1993, 1996). Ezek a polifenolos vegyületek a sérült, vágási felületeken szabadulnak fel, és szivárognak a táptalajba, ahol barnulást eredményezve, csökkentik a szövetek aktivitását, nehezítik a tenyészetek fenntartását. A tenyészetek és a táptalaj elsötétedését, a termelődő vegyületek táptalajba szivárgásának korlátozásával tudtuk mérsékelni a leghatékonyabban, azáltal hogy átoltás során úgy helyeztük el a kalluszokat, hogy magakadályozzuk a táptalaj és a vágott felület érintkezését.

A sejtburjánzás kiváltásához és stabilizálásához auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétére is szükség volt. A szakirodalom alapján kipróbált számos hormonkombináció közül általánosságban a 2-4 mgl^{-1} NAA és 0.5-1 mgl^{-1} BA volt a legeredményesebb.

4.2.3 Gyökér morfogenezis

Magas auxin/citokinin arány esetén gyökérképződést tapasztaltunk a kalluszfenntartó táptalajon huzamosabb ideig nevelt *Q. pubescens, Q. virgiliana, Q. dalechampii* és ezek hibridjeinek vonalainál, melyek a mikroszatellit vizsgálatok alapján genetikailag közelebb állnak egymáshoz, ökológiai igényüket tekintve pedig a

szárazságtűrőbb tölgy taxonok 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.

4.2.4 Hajtás morfogenezis

Sikerült hajtásképződést kiváltanunk az A149, A211, D137, B50 vonalaknál, azonban ezek a hajtások nem fejlődnek tovább, nem jönnek létre életképes növények. 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 mgl^{-1} NAA vagy IBA illetve 0,5-1 mgl^{-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 mérsékelten csökkentett NAA és/vagy BA tartalmú táptalajokon (D137, A211) jelentek meg. Az eltérő fejlődési stádiumok ebben az esetben nem igényeltek más hormon-összetételű táptalajt, sőt az alacsony hormonkoncentrációknál (0,1mgl^{-1} BA±0,05 mgl^{-1}NAA) a kalluszok még életképességüket is elveszítették. Ezek az eltérések szintén igazolják a mikroszatellit vizsgálatokon alapuló eredményeket, melyek szerint az A149-es vonal genetikailag jól elkülönül a kísérletben szerepelő többi taxontól. Az A75, D89, A85, C211, K28, C102 vonalak annak ellenére, hogy a hajtásképzésre hajlamos taxonok klasztereiben találhatóak, nem képesek embriókat és hajtásokat képezni, csak szervkezdeményeket és/vagy gyökereket hoznak létre véletlenszerűen a kalluszok perifériáján. Az A71 levél, és az A149 barka eredetű kalluszai nem mutattak morfogén választ. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a tenyésztési körülményekre adott válaszreakciók genotípus és explantátum típus függőek.

4.3 A PEG 6000 hatása a *Quercus* kalluszok vízvesztésére.

A PEG 6000-el való ozmotikus kezelést követően a nedvestömeg változás mérése kimutatta, hogy az *Q. petraea* (A149) esetében már

10 % PEG 6000 hatására vízveszteség lépett fel, melynek mértéke az ozmotikum koncentrációjának emelkedésével egyre jobban nőtt (10. ábra). A *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* hibrid (A211), *Q. dalechampii* x *Q. petraea* hibrid (D137) és a *Quercus petraea* x *Quercus pubescens* (D89) vízvesztése 20 %-os PEG 6000 –nél jelentkezett, míg a legellenállóbbnak a *Q. pubescens* (A75) és a *Q. virgiliana* (B50) bizonyult, melynél a vízvesztést csak a PEG 6000 40 %-os oldata váltotta ki. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a kísérletünkben szereplő szárazságtűrőbb tölgy taxonok, sikeresebben tudták ellensúlyozni a kedvezőtlen ozmotikus körülményeket.

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

Az ozmotikus stresszt követő helyreállás (recovery) vizsgálata során a *Q. petraea* (A149) vonal gyarapodási és életképes zöld kalluszokat létrehozó képessége már 10 % PEG kezelést követően csökkent, 20% PEG kezelés hatására pedig a kalluszok már nem tudtak regenerálódni a PEG kezelés megszüntetését követő 4 hét alatt. A *Q. petraea* hibridjei közül a D89 20% PEG kezelés megszűnését követő 4 hét alatt nem volt képes új, életképes zöld kalluszokat produkálni, a D137 esetében pedig 40 % PEG hatására mérséklődött az új kalluszok megjelenése. Ezzel szemben, a *Q. pubescens* (A75), a *Q. virgiliana* (B50) és a *Q. virgiliana*-*Q. polycarpa* 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.

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

Egy domináns peroxidáz sáv jelenlétét sikerült kimutatni a natív géleken. A mikroszatellit vizsgálatok alapján az egymással közelebbi rokonságban lévő *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* hibrid (A211), *Q. petraea* x *Q. pubescens* hibrid (D89) és *Q. pubescens* (A75) esetében a guaiacollal történő festésnél egy alacsonyabb intenzitású második sávot is észleltünk, ami a *Q. pubescens* (A75) -nél csak

kezelés hatására jelentkezett, míg a genetikailag távolabbi, a *Q. petraea* (A149) és *Q. dalechampii* x *Q. petraea* hibrid (D137) taxonoknál ez a második izoenzim nem jelent meg.

A szárazságra érzékenyebb *Q. petraea* (A149) esetében a PEG koncentráció növekedésével a kalluszok guaiacol peroxidáz aktivitása nem változott számottevő mértékben, elhanyagolható átmeneti növekedést követően csökkenést tapasztaltunk. Ezzel szemben, a szárazságtűrőbb *Q. pubescens* (A75) és *Q. virgiliana* (B50) taxonoknál a PEG kezelés a peroxidáz aktivitás jelentős mértékű növekedését váltotta ki. Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy az utóbbi taxonoknál az antioxidáns rendszer aktivitása ozmotikus (szárazság) stressz során nagyobb szerepet játszik a károsodások elkerülésében. A *Q. petraea* x *Q. pubescens* hibrid (D89) és a *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* hibrid (A211) esetében az ozmotikus stressz erősödésével párhuzamosan előbb a peroxidáz aktivitásának a kismértékű átmeneti emelkedését, majd csökkenést tapasztaltuk. Ez arra utal, hogy ennek a két hibridnek az ozmotikus stresszre adott válaszreakciója a peroxidázok szintjén átmenetet mutat a szárazsággal szemben kevésbé ellenálló *Q. petraea* A149 és a szárazságtűrőbb *Q. virgiliana* A75 között, megerősítve a levélmorfológia szerint megállapított taxonómiai kapcsolataikat. A *Q. dalechampii* x *Q. petraea* hibrid (D137) peroxidáz aktivitása a szárazságtűrő fajokhoz hasonlóan még 40%-os PEG kezelés esetében is jóval a kontroll értéke felett volt. A pirogallollal történő festésnél, hasonló tendenciákat tapasztaltunk.

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

A szimplaszálú DN-áz aktivitás vizsgálatok során, szintén a genetikai távolsággal összefüggő eredményeket kaptunk. A közelebbi rokon *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* hibrid (A211), *Q. virgiliana* (B50) és *Q. pubescens* (A75) esetében PEG 6000 kezelés hatására 45-55 kDa tartományban két sáv jelent meg, míg a távolabbi rokon a *Q. petraea* (A149) és *Q. dalechampii* x *Q. petraea* hibrid (D137) taxonoknál csak egy. Számos nukleáz olyan glikoprotein, amelyben az egyes glikozidos kötéssel kapcsolódó szénhidrát 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 állapotait jelenti.

Az 50kD-os tartományba eső domináns sávok intenzitását értékeltük ki. A *Q. petraea* (A149), *Q. dalechampii* x *Q. petraea* hibrid (D137), és *Q. petraea* x *Q. pubescens* hibrid (D89) vonalak kontrolljainak az enzimaktivitása kisebb volt, mint a *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* hibrid (A211), *Q. virgiliana* B50 és A75 *Q. pubescens* kontrolljaié.

A PEG 6000 kezelés hatása összefüggésben van a tenyészet genotípusával. A szárazságra érzékenyebbnek tartott A149-nél a PEG által indukált, szimplaszálú DN-áz aktivitásának a növekedését tapasztaltuk, mely 10 % PEG kezelésnél érte el a maximumát. A szárazságtűrőbb taxonok közül a *Q. pubescens* (A75) vonalnál a nukleáz aktivitása nem, a *Q. virgiliana* (B50) vonalnál pedig csak csekély mértékben emelkedett. A *Q. dalechampii* x *Q. petraea* hibrid (D137) a szárazságtűrőbb taxonokhoz (A75, B50) hasonló DN-áz aktivitást mutat, míg a *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* (A211) és *Q. petraea* x *Q. pubescens* (D89) hibridek a *Q. petraea* (A149) vonalhoz viselkedtek hasonlóan.

Az eredmények alapján megállapíthattuk, hogy a szárazságra érzékenyebb taxonok antioxidáns rendszere nem bizonyult elég hatékonynak, és a felhalmozódó reaktív oxigénformák miatt a DNS állomány károsodott, a helyreállító folyamatok aktiválódtak, amelyek 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.

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

Az alacsonyabb ozmotikus stressz toleranciával rendelkező D89 vonal esetében a gyökércsúcs merisztéma sejtekben rendellenes mitózist detektáltunk - lemaradó kromoszómák jelentek meg 10 %-os PEG kezelést követően. Az ozmotikus stressz toleráns A75 vonalnál azonban ezt nem tapasztaltuk: a mitotikus kromatin szerveződése még 40 %-os PEG-gel történő kezelést követően is

összevethető volt a kontroll sejtekkel. Az interfázisban lévő gyökérmerisztéma sejtek, ill. a differenciálódott sejtek kromatin szerveződésében a PEG nem indukált a sejthalálra utaló változásokat egyetlen kalluszvonal esetében sem.

Összességében a szövettenyészetekben az ozmotikus stressz által előidézett fiziológiai változások a *Q. petraea* szárazsággal szembeni nagyobb érzékenységét jelezték összevetve a *Q. pubescens és Q. virgiliana* fajokkal. Az eredményeink megerősítik az ezeknek a fajoknak a szárazságtűrésével kapcsolatos előzetes megfigyeléseket, és igazolják ezeknek a fajoknak az ökológiai igényét a természetes populációikban. A kidolgozott kísérleti rendszer alkalmasnak bizonyult arra, hogy egyes tölgyfajok hibridjeinek a szárazságtűrő képességéről információt nyerjünk. A kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy vizsgált hibrid taxonok átmenetet képeznek a szárazságra érzékeny *Q. petraea* és a szárazságtűrő *Q. pubescens* között. A várakozásainkkal ellentétben, amit a levél morfológiai jellegek alapján történő rendszertani besorolásán alapult, a *Q. petraea* x *Q. dalechampii* hibrid (D137) kalluszai az ozmotikus stresszel szemben ellenállóbbnak, míg a *Q. virgiliana* x *Q. polycarpa* hibrid (A211) kalluszai szárazságra érzékenyebbnek mutatkoztak, mint a *Q. petraea* x *Q. pubescens* hibrid (D89) kalluszai. A mikroszatellit eredmények kimutatták, hogy a szárazságot kevésbé és jobban tűrő tölgy taxonok között nagyobb a genetikai távolság, mint a hasonló tűrőképességű taxonok között.
Az eredményeink igazolják, hogy a tölgy szövettenyészetek olyan egyszerűsített, kísérleti modell rendszerek, melyekben vizsgálni lehet a különböző genetikai háttérrel rendelkező tölgyfajok és hibridjeik szárazság- és ozmotikus stresszre adott válaszreakcióit. Az eredményeik arra utalnak, hogy a stresszhez történő alkalmazkodás mértéke összefüggésben áll az oxidatív stresszt kivédő vegyületek és enzimek szintjével és aktivitásával. A stressz felléptekor az antioxidáns védőrendszer aktivitásának az emelkedése csökkenti a DNS oxidatív károsodásának mértékét a szárazságtűrő taxonok esetében.

5 Introduction

White oaks (*Quercus* section, *Quercus* subgenus) are widely distributed in Europe. High genetic and morphological variability has been reported for the *Quercus* section (=Lepidobalanus; or white oaks sensu Nixon 1993) of the *Quercus* subgenus (Herzog 1996, Gailing et al. 2007). The three main white oak species are *Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus pubescens* Willd.. Several other oak taxa have also been distinguished from the European broadleaved forests, of which *Quercus dalechampii* Ten., *Quercus polycarpa* Schur, and *Quercus virgiliana* Ten. are important. The two former ones resemble to *Quercus petraea* sensu stricto and are usually included in the aggregate of *Quercus petraea* sensu lato, while *Quercus virgiliana* belongs to the aggregate of *Quercus pubescens* sensu lato (Schwarz 196 a,b)

In Hungary mixed forests of sessile oak and Turkey oak (*Quercetum petraeae-cerris*) cover the largest part of forested area. The Síkfőkút Long-term Ecological Research Site (Bükk Mountains, north-eastern Hungary) represents this forest type (Jakucs 1985)

European white oaks differ in the preference for ecological conditions and grow in various habitats. The distribution of oaks is mostly dependent on their capacity to resist drought or excess of water in the soil or even the two phenomena successively (Jones 1959, Johnson et al. 2002). Among the three main white oak species *Q. pubescens* is the most drought tolerant one and occupies warm and xeric sites in Europe (Borovics et al. 1998, Yurukov and Zhelev 2001, Thomas et al. 2002, Gallé et al. 2007, Siam et al. 2009). *Q. petraea* grows predominantly on mesic or relatively dry sites on lower altitude slopes and ridges, whereas *Q. robur* can populate lowland sites with wet and temporarily waterlogged soils (Jones 1959, Aas 1998). *Q. dalechampii* Ten. (Theodoropoulos et al. 1995) and *Q. polycarpa* Schur (Matula 2009) are distinct from *Q. petraea* sensu stricto in ecological requirements and both are more drought tolerant and grow in warmer sites. *Q. virgiliana* have been described from arid sites of southern Europe (Ofletea et al. 2011).

Nowadays human activities cause increasing atmospheric concentration of greenhouse gases, thus driving global warming. *Q. petraea*, an economically important species is predicted to be affected by climate change. Currently the introgression of *Q.*

pubescens and *Q. virgiliana* in non-mediterranean regions of Europe has been reported after the die-back of sessile oak trees in the '80s in Europe. These species are drought resistant, but economically less important.

Interspecific hybridization is very common between the species of the white oaks (Lepais et al. 2009, Salvini et al. 2009, Lepais and Gerber 2011), which increases the genetic diversity in natural populations of all species (Borovics et al. 1998, Gömöry and Schmidtová 2007, Kanalas et al. 2008). Those oak species or their hybrids that are more capable to stand dry and hot summer periods and the quality of their timber is as good as the *Q. petraea*'s could be important tools for the future forestry.

The identification of taxa was based on leaf morphological traits and microsatellite analysis and showed that *Q. petraea* is genetically distinct to all other taxa examined.

Plant tissue culture techniques including callus and cell suspension cultures offer many advantages – e.g. they provide fully controllable systems - for physiological/biochemical studies. *In vitro* cultures established from vegetative tissues are more likely to reflect the genetic background of original plants/explants, than e.g. seedlings with uncertain genetic origin. In our department we also established several tissue cultures from protected monocotyledonous plants for example *Crocus heuffelianus* (Demeter et al. 2010).

Even though *in vitro* cultures represent different developmental stages and gene expression patterns than mature plants, cell and callus cultures of sessile oak and pedunculate oak proved to be excellent models and are currently used for in the study of osmotic stress-related transcriptional changes and other physiological responses. They are thought to be suitable for physiological studies at tissue, cell and molecular level (Gleeson et al. 2004, Porth et al. 2005, Šunderlíková et al. 2009).

Peroxidases play a role in the scavenging of reactive oxygen species (ROS) known for elevated levels during drought. The presence of scavenging systems is a good indicator of drought tolerance (Ramachandra Reddy et al. 2004). In the absence of protection against oxidative stress, DNA and RNA damage occurs. This may be accompanied by increases in the activity of nucleases, among them, single strand preferring (SSP) nucleases (Ramachandra Reddy et al. 2004, Roldán-Arjona and Ariza 2009).

The effects of several stress factors can be studied in actively dividing meristematic tissues, e.g. root tips at cytological level, because the structure of chromatin is a sensitive indicator of stress (Samardakiewicz and Woźny 2005, Beyer et al. 2009, Jambrik et al. 2011, Silva et al. 2011, Beyer et al. 2012).

PEG 6000 is widely used for modeling osmotic stress in higher plants, due to minimal side-effects and the incapability of plant cells to metabolize it (see Hohl and Schopfer 1991, Guóth et al. 2010 for examples).

6 Goals of the study

The main goal of this study was to offer a model system based on *in vitro* cultures of selected individual white oak trees for the estimation of their genotype-dependent drought tolerance.
The importance of this model system is that we can examine physiological responses in axenic *in vitro* cultures under controlled conditions, instead of studying the effect of environmental stress in major trees, avoiding potential superimposing effects of multiple environmental conditions.

In the first step we wanted to establish stable *in vitro* cultures

- For working out tissue culture procedures preliminary we wanted to investigate the microporpagation of *Crocus heuffelianus* in order to gain experiences from *in vitro* cultures. Though *Crocus* which were relatively more easily maintainable is highly far related from *Quercus* but also produce polyphenols. Our aim was apply these observations to work out the micropropagation method for the more difficult cultivable *Quercus* taxa.

- The goal of this study was to establish a procedure for creating stable axenic tissue cultures (involving callus, organ, embrio culture and plant regeneration) from the genotypes of several taxa of the white oaks and their putative hybrids, all are present in the forest stand of Síkfőkút LTER Research Area (NE Hungary).

In the second step we wanted to screen physiological responses produced by drought/ osmotic stress in the callus and organ cultures of several genotypes of different *Quercus* taxa. The studied physiological responses included:

- the increase of fresh weight
- the capacity of recovery
- the organization of chromatin
- the activity of peroxidase and ssDN-ase

Our basic hypothesis was that osmotic stress responses will be different for *in vitro* cultures derived from explants of drought sensitive individuals from those of drought resistant genotypes. If *in vitro* experiments, changes of fresh weight increases, peroxidase and nuclease activities confirm the expected responses for non-hybrid individuals/ taxa (i.e. drought sensitivity of *Q. petraea* and tolerance of *Q. pubescens* and *Q. virgiliana*), they can be used for monitoring of drought responses of cultures derived from *Quercus* genotypes (e.g. putative hybrids) with unknown sensitivity.

7 Materials and methods

7.1 Preliminary investigation for working out tissue culture procedures with *Crocus heuffelianus* explants

We used *Crocus heuffelianus* for the preliminary *in vitro* culture experiments. *Crocus heuffelianus* belongs to the monocotyledonous class. Whole plants of *Crocus heuffelianus* were collected in March-May 2007. from Radnalajosfalva (Romania). Corms, roots, foliage leaves, shoot primordia within corms and sterile germinating embryos were the source explants tested for callus induction. The surface sterilized (rinsing with 10 % (v/v) Domestos bleach for 3X10 min. and washing with sterile distilled water for 3x5 min.) and prepared explants were cultured on Murashige and Skoog basal medium (MS medium, Murashige and Skoog 1962) supplemented with 2 % (w/v) sucrose, B5 vitamins (Gamborg et al. 1968). The medium was solidified with 0.8 % (w/v) Difco Bacto agar. The auxins used were α-naphthaleneacetic acid (NAA) and the cytokinins

were 6-benzyladenine (BA) and kinetin (KIN). For plant regeneration we tested a decrease of auxin/cytokinin ratio, concentration of hormones, carbon sources, and strength of culture medium. Cultured conditions were 14/10 (light/dark) photoperiod with temperatures of 22/18 ± 2°C. Light intensity was increased to 60 μmol $m^{-2}s^{-1}$. The design of the growth regulator (PGR) content of tissue culture media was based on the methods of micropropagation of *Crocus sativus* and *Crocus cancellatus* (Bhagyalakshmi et al. 1999, Plessner et Ziv 1999, Chen et al. 2003, Darvishi et al. 2006, Ray et Bhattacharya 2008).

7.2 Establishment of tissue cultures from white oaks

For working out appropriate tissue culture system we carried out preliminary experiments. Firstly we germinated the embryo from disinfected decoated seeds of *Q. robur* from Botanical Garden of University of Debrecen, and the 1-weeks old *in vitro* grown seedlings were used as explants.

For establishing the tissue culture for this study, young (2-4 years old) shoots from mature trees of *Q. petraea* (Mattuschka) Lieblein, *Q. pubescens* Willd., *Q. virgiliana* Ten. and from putative hybrids were collected from the Síkfőkút Research Area, North-Eastern Hungary, before bud break at early spring of 2010 and transferred to laboratory. All plant material originated from the same research area, i.e. ecological conditions were the same for all explants. These explants were collected from a selected single tree per genotype and used for tissue culture and subsequent physiological experiments. The identification of taxa was based on leaf morphological traits and microsatellite analysis and showed that *Q. petraea* is genetically distinct to all other taxa examined. The shoots were kept under conditions of 22 ± 2 °C, 20 μmol m^{-2} s^{-1} PFD and 12/12 h photoperiod to form young leaves of 12 ± 4 mm length and male catkins. After flushing leaves were used as explants for the induction of tissue cultures, after surface sterilizing methods (immersing into 10 % Domestos solution for 3X5 min than rinsing with distilled water for 3X5 min) .

The induction and maintenance of callus production was achieved on WPM medium (Woody Plant Medium, Lloyd and McCown 1980) solidified with 0.8 % (w/v) agar (Difco, Lawrence,

KS, USA). PGRs used were 0.05 – 4 mg L^{-1} (0.53-21.5 μM) α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.05 - 1 mg L^{-1} (0.25-0.5 μM) indole-3-butyric acid (IBA) as auxins and 0.1 - 4 mg L^{-1} (0.44-17.7 μM) N^6-benzyladenine as a cytokinin. All PGRs were from Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary. The design of PGR content of tissue culture media was based on our observation of previous experiments and the methods of Seckinger et al. (1979), Tanaka et al. (1995), Cuenca et al. (1999), Toribio et al. (2004) and Demeter et al. (2010). Physical conditions for *in vitro* culture were: 14/10 h photoperiod with a photon fluence rate of 10 μmol $m^{-2}s^{-1}$ during the light period and temperatures of 22 ± 2 °C/ 18 ± 2 °C.

7.3 PEG treatments

Callus cultures grown on solidified WPM medium were transferred on liquid medium of the same composition (2 mL culture medium in 10 mL sterile plastic flasks, Labsystem, Budapest, Hungary) and treated for 24 h with 0-40 % (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, VWR, Leuven, Belgium). During treatments with the osmoticum, cultures were gently shaken (100 rpm) on a rotatory shaker (E. Bühler KS-15, E. Bühler GmbH, Hechingen, Germany).

7.4 Analysis of the percentage of fresh weight increase

Fresh weight (FW) of calli was measured at the start and the end of PEG 6000 treatments. Before FW measurement at the start of experiments, excess liquid medium was removed by gentle centrifugation without affecting callus growth and viability (1000 rpm, 5 s on a Heraeus Biofuge, Kendro Laboratory Products, Harau, Germany). Percentage of FW increase was calculated on the basis of the difference between FW at the end and at the start of experiments.

Enzyme activities were measured directly after treatments with the osmoticum.

7.5 Recovery experiments

Following PEG 6000 treatments, cultures from PEG containing medium were washed out two times by gentle shaking (100 rpm) in

the presence of liquid culture medium lacking the osmoticum followed by further culture on agar- solidified medium for 30 days. Fresh weight of recovered calli was also measured as described earlier. Beside FW measurements at the start and end of culture period, the presence of viable, green callus tissue at the end of culture was monitored as well.

7.6 Preparation of callus extracts

For the determination of enzyme activities, control and PEG 6000 treated calli were collected, pulverized in liquid nitrogen, and homogenized with 100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 (VWR) pH: 7,2, 8 mM $MgCl_2$ (Reanal, Budapest), 4 mM DTT (Sigma) 1 V/V% Triton X-100 (Reanal), 2 w/v PVP (Merck). The homogenates were centrifugated (13.000 x g, 2x30 min, Biofuge) the supernatant was used as crude protein extract. Protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. The extract was stored in -80 °C until using up.

7.7 SSP nuclease activity gels

The activity of SSP nucleases was assayed on polyacrylamide gels, basically as described before (Jámbrik et al. 2011). Protein extracts (20 µg/well) were loaded on SDS- and single- stranded DNA containing polyacrylamide gels along with a molecular weight marker (Sigma-Aldrich). Electrophoresis was performed at 4 °C. After renaturation of enzymes, gels were incubated in Tris-HCl, pH 6.8 (14 h, 39 ^oC) for assaying their activity, stained with 0.5 µg ml^{-1} ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) and examined with an UV transilluminator. SSP nuclease activities appeared as clear bands, not stained with ethidium-bromide.

7.8 Peroxidase activity gels

The activity of peroxidase was assayed on polyacrylamide gels. Protein extracts (10 µg /well) were loaded on native 7.5 % (w/v) polyacrylamide gels. Electrophoresis was performed at 4 °C, followed by gel staining in the first case for 30-60 min in a buffer

containing 100 mM sodium acetate (VWR), 10 % (v/v) hydrogen peroxide and 1 mM guaiacol. or in the second case incubating for 60 min in buffer 50mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH7,5, afrter than staining for 15-30 min in a buffer 50mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,5 supplemented with 20mM pirogallolt, and 5mM H_2O_2.

Peroxidase activity was visible due to dark-coloured tetraguaiacol or purporogallin bands (Tauber 1953, Dixit 2011, Ghadiri et al. 2013).

7.9 Method of polyacrylamide gel pattern evaluation

Total enzyme activities on gels were quantified with the aid of CpAtlas® software and expressed as relative band intensities, where the value of control activities was 1. The molecular weight of ssDNase isoenzymes was estimated with the UVI-TEC® software.

7.10 Method of microscopical analysis

For microscopical analysis tissues were fixed overnight in 4% (v/v) formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). After fixation, samples were washed with PBS and placed in 40% (w/v) sucrose for 4 h to protect tissues during freeze sectioning. Tissues were embedded in TBS tissue freezing medium (TBS, Durham, NC, USA). Sections of 10–15 mm thickness were made by a Leica Jung Histoslide 2000 microtome (Leica, Nussloch, Germany). Sections were collected in PBS.

For evaluation of mitotic changes the chromatin structure of 4 mm long root tips was stained as described before (Beyer et al. 2009) and modified in our laboratory. Longitudinal sections were permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 (Reanal) for 15 minutes, then were washed with PBS, and stained with 5 µg ml^{-1} 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Fluka, Buchs, Switzerland) for 1 h.

Visualization of chromatin was carried out using an Olympus Provis AX-70/A fluorescence microscope equipped with an Olympus Camedia 4040 digital camera. Autofluorescence and nuclear DNA were observed with the aid of a 320–360 nm excitation filter.

7.11 Data analysis

All experiments were performed at least four times with six parallel samples per experiment for each genotype and representative experiments are presented in the Results section. The mean ± SE of quantitative data was calculated and plotted with the aid of Sigma Plot 10.0 software, where it was appropriate. Plots represent mean ± SE values for different calli/ the respective individual genotype.

8 New scientific results and discussion

8.1 Development of tissue culture procedures using *Crocus heuffelianus* explants

Shoot primordia from corms and 1 week old seedlings were the most suitable for establish stable callus culture from *Crocus heuffelianus*. A low percentage of axenic seeds could germinate, and germinating was started after several months. We induced an embryogenic callus lines from those 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. The high auxin/cytokinin concentration and ratio was suitable for maintenance of embryogenic calli. Decreasing the hormone concentration and subsequent inverting the auxin/cytokinin ratio led to embryogenesis. Root regeneration required the direct transfer of embryogenic calli to hormone-free medium or ¼ diluted MS* medium supplemented with 1% sucrose, decreased auxin /citokinin concentration. Plant regeneration was achieved in 3 steps. Firstly a decrease of auxin/cytokinin concentration and ratio then 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} GA_3 and 100 mg l^{-1} ascorbic acid to the germinating medium and raised the BA concentration to 2 mgl^{-1} plant regeneration and corm development was obtained.

8.2 4.1.1. Establishment of tissue culture from white oak taxa

8.2.1 Establishment of callus culture from *Q. robur*

The germination of *Q. robur seeds* was achieved in 1 week irrespective of the contents of micro and macroelements of media. In the presence of 25 mgl^{-1} GA_3 multiple shoots were induced from the intact embryos. Gibberellins consistently elongated the internodes of the oak, the length of the main stem axis was increased, but the growth of the leaf area was failed to come, and the frequency of darkening of roots increased with increasing concentration of GA_3. These results coincide with the general effect of gibberellins. Gibberellins increase cell division, but inhibit the differentiation of meristems, and diminish or prevent the formation of roots (Gaspar et al. 1996).

On the media supplemented with various concentrations of auxins and cytokinins calli were induced on different parts of the seedling. Calli could be obtained from the root of the seedling on media with high cytokinin/ auxin ratio. On media with inverse growth regulator ratio, calli developed from the cotyledons. Callus induction from cotyledon tissues proximal to the embryo axis was achieved in the auxin free medium supplemented with BA. 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.

8.2.2 Establishment of callus cultures from young leaves and catkins of taxa from the field of research

We have established stable callus lines from the catkins of *Q. petraea* and *Q. polycarpa* and from young leaves of numerous *Quercus* genotypes belonging to the *Quercus* section of *Quercus* subgenus. These cultures were suitable for plant osmotic stress response studies. We established two lines of callus from catkins of *Q. petraea*. One of them was compact and embryogenic, while the other was light yellow, fragile and recalcitrant to *in vitro*

manipulation. The most suitable basal medium for the callus induction and maintenance was WPM supplemented with 100 mgl^{-1} ascorbic acid. Phenolic compounds are known to accumulate in high quantities to various parts of the oaks including bark, wood, leaves and calli *grown in vitro* (Krajci and Gross 1986, Romano and Martins-Loucao 1992, Bajaj 1993, 1996). The increase of browning of the tissue and culture media was a reaction to injury when tissues are wounded. When we prevent contacting between the wounded surface of the callus and the media by submerging only the unhurt part of the tissue into media, we could control exudation of the phenolic compounds to the culture media, and could moderate browning. Cytokinin and auxin were essential for induction and maintainance of callus cultures. The most suitable PGR combinations for callus induction and maintenance were genotype dependent but in general were 2-4 mg L^{-1} NAA with 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).

8.2.3 Root morphogenesis

The lines of Q. *pubescens, 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. 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.

8.2.4 Shoot morphogenesis

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) Callus lines of D137, A211 and B50 were capable of shoot regeneration as well, but this was achieved either on the same media as those used for callus induction (B50), or by a moderate reduction of NAA and/ or BA content (D137, A211). At low PGR concentrations (0.1 mg L^{-1} BA ± 0.05 mg L^{-1} NAA) they have lost viability (data not shown). These distinct morphogenetic responses showed different genetic origin of explants and confirmed microsatellite data. Nevertheless these shoots were not viable: they couldn't develop into plants. Calli of D89 and A75, A85, C211, K28, C102 were not capable of shoot differentiation at all. These taxa were only capable of randomly producing organoids and /or adventitious roots from the periphery of calli. The calli of A71 and one of the A149 calli derived from catkins didn't show morphogenetic response during the cultivation. It should be noted however, that the success of regeneration in tissue cultures is strongly dependent on genotype, explant type and culture conditions.

8.3 Effect of PEG 6000 on water loss of calli

The measurement of fresh weight after treatment with the osmoticum revealed that for the drought sensitive A149, water loss occurred at 10 % PEG 6000 and increased progressively as PEG 6000 concentrations increased. In contrast, A75 and B50 (drought stress tolerant) were resistant to water loss that occurred only at 40 % PEG 6000. Putative hybrids were intermediate with respect to the effects of the osmoticum, water loss of A211, D137, D89 occurred at 20% PEG 600. We suppose that the more drought tolerant taxa could counterbalance more successfully the disadvantageous osmotic conditions. These taxa may accumulate more efficiently osmotically active compounds in their cells therefore decreasing their water potential, and preventing water loss.

8.4 Recovery

At recovery after osmotic stress, changes of FW showed that for A149, callus growth was slightly stimulated by 10 % PEG 6000, but inhibited at higher concentrations, while for A211 and B50 there was a transient stimulation at 5-10 % PEG 6000. 40 % PEG 6000 inhibited the growth of A211 calli and 20-40 % PEG 6000 inhibited

the growth of B50 calli after washout of the osmoticum. In case of culture lines D137, D89 and A75, there was a general inhibition of callus growth by PEG 6000. Concerning the presence of viable, compact, green callus tissue during recovery experiments, we have made the following observations. For A149 (*Q. petraea*), this type of tissue was not present at pretreatment with 10-40 % PEG 6000: it was replaced by necrotic-like, browning tissue that suggested the accumulation of phenolic compounds as a stress reaction. In contrast, for A75 (*Q. pubescens*) and B50 (*Q. virgiliana*), tissue viability persisted even at 40 % PEG. D89 as a putative hybrid between *Q. petraea* and *Q. pubescens*, was intermediate in this respect: callus viability was lost only at 20-40 % PEG. The putative hybrids D137 and A211 behaved similarly to A75 and B50.

8.5 Effect of PEG 6000 on activity of peroxidase in *Quercus in vitro* cultures

Concerning peroxidase activities, one band with strong activity appeared in all investigated cultures in case of both methods of detection. In case of D89, A211 and A75 a minor additional band of guiacol peroxidase appeared. Interestingly, this band was inducible by PEG in case of A75, that is, it was detectable only during osmotic stress. This additional band further supported microsatellite data: in case of the genetically more distinct lines A149 (*Q. petraea*) and D137 it was not present, while it appeared in genetically related culture lines mentioned.

In case of presumably drought sensitive taxa, PEG induced insignificant transient increases, no significant changes or decreases of guaiacol-peroxidase activities in callus. In contrast, for presumably drought-tolerant taxa (A75, B50), PEG treatments led to significant increases of peroxidase activities. This means that ROS cannot be scavenged in drought-sensitive taxa but drought-tolerant taxa are expected to be able of scavenging ROS efficiently. A decreasing activity could be observed in the case of putative hybrids D89 and A211 as well, but transient increases were detectable, showing the intermediate response between the drought sensitive A149 and the more drought tolerant A75 confirming the taxonomic identity determined by the analysis of leaf morphological traits. Calli of D137 showed similar trends to the drought tolerant taxa. The

activity of peroxidase was higher than the control even in the case of 40% PEG 6000 treatment. There were similar tendency when we used pirogallol for the detection of peroxidase enzyme bands.

8.6 Effect of PEG 6000 on the activity of ssDNase in *Quercus in vitro* cultures

Activity gels revealed that SSP nuclease isoenzyme(s) with molecular weight(s) in the range of 45-55 kDa were present and active in all culture lines. In the genetically related lines A211, B50 and A75, two bands appeared at PEG 6000 treatments, both in the molecular weight range of 45-55 kDa. PEG 6000 induced the appearance of one additional band. It should be noted however, that many nucleases are glycoproteins and the presence or absence of glycoside residues depends on the physiological state of cells (Desai and Shankar 2003). Therefore it is possible that double bands detected reflect a single protein with different glycosylation states.

We analysed one dominant band which was detected at 50 kDa. In control cultures, this activity was weaker in lines A149, D137 and D89 as compared to A211, B50 and A75. The effects of PEG 6000 treatments were dependent on culture line/ genotype. Except A75 (*Q. pubescens*) cultures, osmotic stress induced transient increases in nuclease activities as compared to controls, with maximal activities at 5-20 % PEG 6000. The strongest activity increases were detected for A149 (*Q. petraea*) and the putative hybrids D89 and A211. In case of B50 and D137 there was only a slight stimulation of SSP nuclease activity by PEG. In case of A75, PEG 6000 did not increase notably the enzyme activity.

This means 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.

8.7 Effect of PEG 6000 on the organization of chromatin in callus-derived roots of *Quercus* taxa

In root tip meristematic cells of less drought stress tolerant D89 line, the formation of lagging chromosomes was induced by treatment with 10 % PEG 6000.
Nevertheless, chromosome organization of the more osmotic stress tolerant A75 line was normal even after PEG 6000 treatment. The control root tip meristematic cells were comparable with those treated with 40 % PEG6 000. PEG 6000 didn't induce change in chromatin organization that would be related to programmed cell death or necrosis.

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 9). This 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. In spite of our expectations based on taxonomic identity determined by the analysis of leaf morphological traits, calli of D137 (a putative hybrid between *Q. petraea* and *Q.dalechampii*), showed to be more tolerant, while calli of A211 (a putative hybrid between *Q. virgiliana* and *Q. polycarpa*) showed to be less tolerant to osmotic stress than calli of D89 (a putative hybrid between *Q. petraea* and *Q.pubescens*). In general, microsatellite data confirmed relatively high genetic distances between drought sensitive and drought tolerant oak individuals/ taxa.

Our results confirm that tissue cultures of oak are suitable, simplified experimental model systems for screening drought/ osmotic stress responses of field grown oak plants with different genetic background and could be of general applicability for plant stress biology research.

This study indicates that drought/osmotic stress tolerance is associated to increased capacity of scavenging reactive oxygen species and hence less susceptibility to DNA damage.

Irodalomjegyzék/References

1. Aas G. (1998) Morphologische und ökologische Variation mitteleuropäischer *Quercus*-Arten: Ein Beitrag zum Verständnis der. Biodiversität. Libri Botanici: Band 19. Eching: IHW-Verlag. 213

2. 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
3. Bajaj YPS (1996) Biotechnology in agriculture and forestry 35 Trees IV. Springer, Berlin. Manzanera JA, Bueno MA, Pardos JA I.19. fejezet *Quercus robur* L. (Pedunculate Oak) 322-337
4. Beyer D, Suranyi G, Vasas G, Roszik J, Erdodi F, M-Hamvas M, Bacsi I, Batori R, Serfozo Z, Szigeti ZM, Vereb G, Demeter Z, Gonda S, Mathe C (2009) Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (Phragmites australis) plantlets cultured *in vitro*. TOXICON 54: 440-449
5. 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
6. Bhagyalakshmi N (1999) Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE 58: 205-211
7. Borhidi A (2008) A Zárvatermők Rendszertana Molekuláris Filogenetikai Megközelítésben. PTE Kiadó, Pécs.

8. Borovics A (1997) A kocsánytalan tölgyek levélmorfológiai vizsgálata. ERDÉSZETI KUTATÁSOK 86-87: 125-142
9. 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
10. 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
11. 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
12. Cuenca B, San-Jose M, Martinez MT (1999) Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. PLANT CELL REPORTS 18: 538-543
13. Darvishi E, Zarghami R, Mishani CA, Omidi M, Sarkhosh A (2006) *In vitro* Production of Pathogen-free Plantlets via Meristem Culture in saffron (*Crocus sativus L.*). BIOTECHNOLOGY 5: 292-295
14. 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
15. Demeter Z, Kanalas P, Cseke K, Szőllősi 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
16. Desai NA, Shankar V (2003) Single strand-specific nucleases. FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS 26: 457-491
17. 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

18. Enescu CM, Şofletea N, Curtu AL (2012) Cluster analysis in pubescent oak taxa from series Lanuginosae: a case study. AGRICULTURAL FOOD ENGINEERING 5:79-84
19. Gailing O, Wachter H, Heyder J, Schmittz HP, Finkeldey R. (2007) Chloroplast DNA analysis in oak stands (*Quercus robur* L.) in North Rhine-Westphalia with presumably Slavonian origin: Is there an association between geographic origin and bud phenology? JOURNAL OF APPLIED BOTANY AND FOOD QUALITY 81:165–71
20. 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
21. 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
22. 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
23. Gersten DM, Gabriel O (1992) Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. II. Enzymes modifying nucleic acids. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 203: 181-186
24. Gleeson D, Lelu-Walter MA, Parkinson M (2004) Influence of exogenous l-proline on embryogenic cultures of larch (Larix leptoeuropaea Dengler), sitka spruce (Piceasitchensis (Bong, Carr.) and oak (*Quercus robur* L.) subjected to cold and salt stress. ANNUAL FOREST SCIENCE 61:125–128

25. Gömöry D, Schmidtová J. Extent of nuclear genome sharing among white oak species (*Quercus* L. subgen. Lepidobalanus (Endl.) Oerst.) in Slovakia estimated by allozymes. PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION 2007; 266:253-264

26. 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
27. Herzog S. (1996)Genetic inventory of European oak populations: consequences for breeding and gene conservation. ANNALS OF FOREST SCIENCE 53:783–93
28. Hohl M, Schopfer P. (1991) Water relations of growing maize coleoptiles. PLANT PHYSIOLOGY 95:716–22
29. Jakucs P. (1985) Ecology of an oak forest in Hungary. Akadémiai Kiadó, Budapest
30. Jámbrik 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-preferring nuclease activity in Phragmites australis. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 168: 678–686
31. Johnson PS, Shifley SR, Rogers R. (2002) The ecology and silviculture of oaks. CABI Publishing: New York. 503
32. Jones EW. (1959) Biological flora of the British Isles – *Quercus* L. J ECOLOGY 47: 169–222
33. Kanalas P, Borovics A, Cseke K, Szőllősi 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
34. Kanalas P, Szőllősi E, Oláh V, Borovics A, Mészáros I (2008) Small-scale variability in phenological, leaf morphological properties and isoenzyme pattern f sessile oak complex (*Lepidobalanus* sub-genus) in a sessile oak-Turkey oak forest stand. ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 52: 221-223
35. Keresztesi B (1967) A tölgyek. Akadémiai Kiadó, Budapest. Mátyás V 1.fejezet- A tölgyek dendrológiai ismertetése: 51-90

36. Krajci I, Gross GG (1986) Formation of gallotannins in callus cultures from oak (*Quercus robur*). PHYTOCHEMISTRY 26: 141-143
37. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. NATURE 227: 680-685
38. Lepais O, Gerber S (2011) Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex. EVOLUTION 65: 156–170
39. 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
40. 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
41. Matula R. (2009) Analysis of ecology of a little known white oak *Quercus polycarpa* Schur, using geobiocoenological typology. J Landscape Ecology 2:29–40
42. Mátyás V. (1970): Genus Quercus. In: SOÓ R.: Synopsis florae vegetationsisque Hungariae (A magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve) IV.- Akadémiai kiadó, Budapest, pp.: 507-540
43. Nixon KC (1993) Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. ANNALS OF FOREST SCIENCE 50: 25-34
44. Noctor G, Foyer C (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annula reviev of PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECURAL BYOLOGY 49: 249-279
45. 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

46. 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
47. 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
48. 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
49. 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
50. Roldán-Arjona T, Ariza RR (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. MUTATION RESEARCH 681: 169–179
51. Romano A, Martins-Loucao MA (1992) Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus suber* l.): Establishment problems. SCIENTIA GENMDENSIS 18: 17-27
52. 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
53. Samardakiewicz S, Woźny A (2005) Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. AQUATIC BOTANY 83: 289-295
54. 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

55. Schwarz O. Monographie der Eichen Europas und des Mittelmeergebietes. Dahlem-Berlin: Feddes Repetorium; 1936a
56. Seckinger GR, McCown, BH, Struckmeyer BE (1979) Production of anomalous structures in *Quercus rubra* L. callus cultures. AMERICAN JOURNAL OF BOTANY 66: 993-996
57. 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
58. 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: 92-97
59. Šunderlíková V, Salaj J, Kopecky, Salaj T, Wilhem E, Matusˇíková I (2009) Dehydrin genes and their expression in recalcitrant oak (*Quercus robur*) embryos. PLANT CELL REPORTS 28:1011-1021
60. Tanaka N, Shimomura K, Ishimaru K (1995) Tannin production in callus cultures of *Quercus acutissima*. PHYTOCHEMISTRY 40: 1151-1154
61. Tauber H (1953) Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 205: 395-400
62. Theodoropoulos K, Reif A, Athanasiadis N. (1995) *Quercus dalechampii* forests in Central Macedonia, Greece. BOTANICA HELVETICA 105:37–54
63. 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
64. Toribio M, Ferna´ndez C, Celestino C, Martı´nez MT, San-Jose´ MC, Vieitez AM (2004) Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. PLANT CELL TISSUE ORGAN CULTURE 76: 283-287
65. Tóth K, Haapala T, Hohtola A (1994) Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments BIOLOGIA PLANTARUM 36: 511-517

66. Vieitez AM, Corredoira E, Martinez MT, San-José MC, Sanchez C, Valladares S, Vidal N, Ballester A (2012) Review: Application of biotechnological tools to Quercus improvement. EUROPEAN JOURNAL OF FOREST RESEARCH 131:519–539
67. Yurukov S, Zhelev P (2001) The woody flora of Bulgaria: A review. SCHWEIZERISCHE ZEITSCHRIFT FUR FORSTWESEN 152: 52-60

A jelölt tudományos tevékenységének a 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 (2010) 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, Szőllősi 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, Szőllősi 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. **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, Szőllősi 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**, Szőllősi 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**, Szőllősi 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,** Szőllősi 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, Bátori 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