

Debreceni Egyetem  
Tudományegyetemi Karok  
Természettudományi és Technológiai Kar  
Növényteni Tanszék



## Laboratóriumi modellkísérletekre alkalmas *Quercus* sp. és *Vicia faba* szövettenyészetek előállítása

OTDK pályamunka

Készítette:

**Kiss Zoltán**

III. éves MSc Biológus hallgató

Témavezetők:

**Dr. habil. Máthé Csaba**  
**Demeter Zita**

Debrecen  
2012

# Tartalom

|                                                                                                                    |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Tartalom .....</b>                                                                                              | <b>1</b>      |
| <b>Rövidítések.....</b>                                                                                            | <b>2</b>      |
| <b>Bevezetés és célkitűzés .....</b>                                                                               | <b>4</b>      |
| A növényi <i>in vitro</i> szövettenyészetek története és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban..... | 4             |
| Biotechnológiai és mezőgazdasági jelentőség .....                                                                  | 7             |
| <i>Quercus</i> fajok szövettenyésztése .....                                                                       | 8             |
| <i>Vicia faba</i> szövettenyésztése .....                                                                          | 9             |
| <br><b>Anyag és módszer .....</b>                                                                                  | <br><b>10</b> |
| <i>Quercus</i> sp.szövettenyésztése .....                                                                          | 10            |
| Hisztológiai vizsgálatok.....                                                                                      | 12            |
| <i>Vicia faba</i> szövettenyésztése .....                                                                          | 13            |
| <br><b>Eredmények és diszkusszió.....</b>                                                                          | <br><b>14</b> |
| <i>Quercus</i> szövettenyészetek .....                                                                             | 14            |
| <i>Vicia faba</i> szövettenyésztése .....                                                                          | 21            |
| Potenciális felhasználási lehetőségek .....                                                                        | 22            |
| Diszkusszió.....                                                                                                   | 22            |
| <br><b>Összefoglalás .....</b>                                                                                     | <br><b>26</b> |
| <br><b>Köszönetnyilvánítás.....</b>                                                                                | <br><b>27</b> |
| <br><b>Hivatkozások.....</b>                                                                                       | <br><b>28</b> |

## **Rövidítések:**

**ABA** – abszcizinsav; **BA** – benzil-amino-purin; **2,4-D** – 2,4 –diklór-fenoxiecetsav; **GA3** – gibberellinsav; **IAA** – indolecetsav; **IBA** – indolvajsav, **MS\*** –0,8% agarral, Gamborg vitaminnal (Gamborg et.al 1968) és 2% szacharózzal kiegészített Murashige és Skoog alaptáptalaj; **NAA** –  $\alpha$ -naftilecetsav; **WPM** - Woody Plant Medium (Woody Plant Medium, Lloyd és McCown, 1980)

## **Bevezetés és célkitűzés**

A növényi szövettenyésztés a növényi sejtek totipotens tulajdonságának elméleti lefektetése óta (Haberlandt 1902) rendkívül intenzív fejlődésen ment keresztül, módszerei teret hódítottak a mezőgazdasági, biotechnológiai és a növénybiológiai alap- és alkalmazott kutatásokban (Thorpe 2007).

A Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékén is sikerrel alkalmazták őket cianotoxin-növény interakciók vizsgálatában (Beyer, Surányi et al. 2009; Jambrik, Mathe et al. 2011).

Jelen dolgozat két, a közelmúltban előállított szövettenyészetet mutat be (*Quercus* fajok, illetve *Vicia faba* tenyészeteit). Alapvető célkitűzésünk az volt, hogy a fajspecifikus szövettenyésztési eljárásokat kidolgozzuk, a kísérletbe vont genotípusokra optimalizáljuk. A módszerek kidolgozása és maga a tenyésztés önálló kutatási témaként is megállja a helyét, de mindkét esetben célunk volt a kutatás nagyobb léptékű projektekbe integrálása.

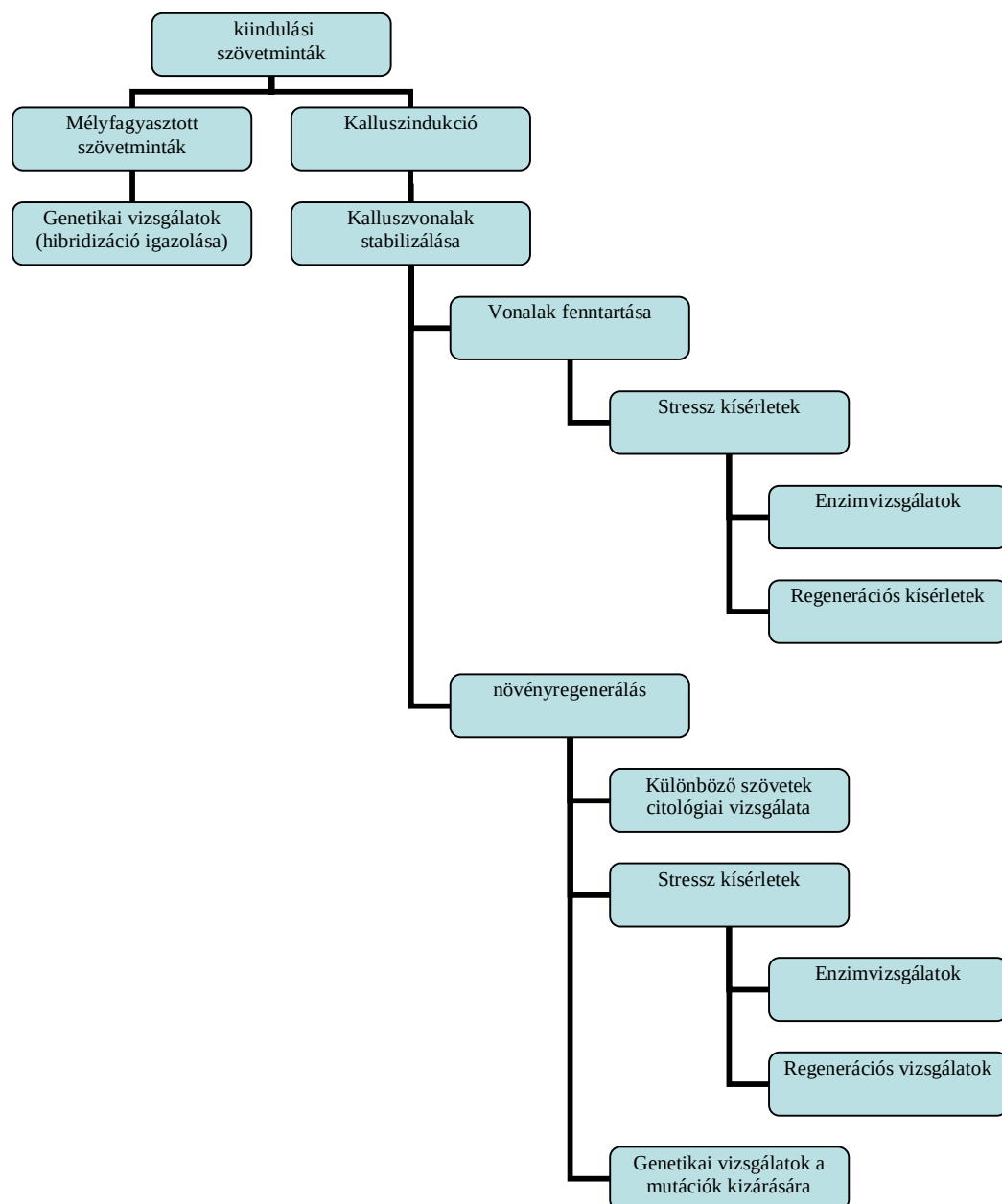
A *Vicia faba* tenyészetek esetében célunk stabilizált szövetbank előállítása volt. Ennek a szövetbanknak a segítségével a sejtciklus szabályozás cianotoxin interakcióban elszenvedett eltéréseit szeretnénk megvizsgálni. Ezek a kísérletek szervesen beilleszthetőek a tanszéken folytatott cianotoxin-növény interakció vizsgálatára folytatott szélesebb kutatási projektbe.

A *Quercus* tenyészeteket fiziológiai vizsgálatokba kívántuk vonni, ezek a vizsgálatok az azonos termőterületről származó fajok és hibridek szárazságstresszre adott egyes válaszait laboratóriumi körülmények között határozzák meg.

Ezen kutatásokat indokolja, hogy a globális klímaváltozás erősen befolyásolja az erdőtársulások dinamikáját világszerte. Számos kutatás irányul ezen folyamatok feltérképezésére, hiszen a fás társulások jelentős gazdasági és ökológiai szereppel bírnak. A mérsékelt övben, így hazánk területén is a bükkfafélék, ezen belül is a különböző tölgy (*Quercus*) fajok e társulások egyik legmeghatározóbb növényei, így az általuk elszenvedett

környezeti hatások vizsgálata segíthet megérteni a társulások összetételének recens és jövőbeli változásait.

Az 1. ábra ennek a kutatásnak az átnézeti képén keresztül bemutatja, milyen szakaszokból áll össze egy fiziológiai kutatás, amelyben szövettényészeteket használunk laboratóriumi modellrendszerekként.



**1.ábra: a *Quercus* fajok tenyésztésével folytatott kutatás vázlata jó példája a szövettényészetekkel, mint laboratóriumi modellrendszerekkel végrehajtott fiziológiai kutatások struktúrájának**

## ***Irodalmi áttekintés***

### **A növényi *in vitro* szövettenyésztetek története és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban**

A többsejtű élőlények körében egyedülálló jelenség, hogy a növényi sejt totipotens, a megfelelő stimulusra az összes növényi sejt képes az anyanövény teljes genetikai potenciálját kifejezni (Dudits és Heszky, 2003). Erre a jelenségre az egyik legmeggyőzőbb gyakorlati bizonyítékot a növényi szövettenyésztés eljárásai és kísérletei - a kallusz, a sejtszuszpenziós és a protoplaszt tenyészetek, és *in vitro* növényregenerálási és mikropropagációs eljárások - szolgáltatják. Gyakorlati értelemben véve azon tenyésztési körülmények és stimulusok meghatározása, amelyek ezen totipotencia kifejeződéséhez szükségesek, bizonyos esetekben igen komplikált feladat lehet, és a mai napig is leginkább empirikus úton kivitelezhető (Slater 2008).

A szövettenyésztési eljárások három kritikus komponense a tenyésztési körülmények (hőmérséklet, páratartalom, fotoperiódus...), a tenyésző alapközeg (táptalaj), és a növekedésszabályzó vegyületek (növényi hormonok).

A tenyésző közeg három alapvető komponensből tevődik össze (Dudits és Heszky, 2003):

- Esszenciális elemek, ionok (makroelemek, mikroelemek )
- Organikus összetevők: vitaminok és aminosavak
- Egy stabil szénforrás, általában szacharóz

A növekedésszabályzó vegyületek 5 legfontosabb csoportja:

- Auxinok
- Citokininek
- Gibberellinek
- Abszizinsav
- Etilén

A szövettenyésztés általában a növény kis sterilizált szövetdarabkáiból (explantátumok) indítható. Speciális szövetek/sejtek, pl endospermium, pollen is alkalmasak lehetnek. A fiatal, gyorsan növekedő, sok osztódó sejtet tartalmazó szövetek a legmegfelelőbbek a szövettenyésztésre.

A legfontosabb tenyésztet típusok a kallusz tenyésztet, sejtszuszpenzió, protoplaszt tenyészetek, gyökér kultúrák, hajtáscsúcs és merisztéma kultúrák, embrió- és mikrospóra kultúrák (Dudits és Heszky, 2003). Növényregenerálás folyamán a kalluszokból *in vitro*

ontogenezis következtében növények, hajtások vagy gyökerek keletkeznek. Az ontogenezis egyik kiváltható és fenntartható módja az embriogenezis, az így keletkező szomatikus embrió növénné fejlődik. Az ontogenezis másik bevált módja az organogenezis, ahol a kezdetben megjelenő hajtás és gyökérmerisztéma hajtássá és gyökérré fejlődik (Dudits és Heszky, 2003). A szövettenyésztés alap kutatásbeli jelentőségéhez nagyban hozzájárul az eljárások alacsony költség- és erőforrás igénye, azonban a tevékenység szakértelmet, és nagy mennyiségű előmunkát igényel.

Modellkísérletekben nagy előny, hogy a tenyésztés a vegetációs időszaktól teljesen független, és igen gyors növekedési rátával jellemezhető. Éppen ez a magas ráta adja a módszerek egyik limitációját is. A gyorsan fejlődő sejtvonalakban a mutációs ráta is eltérő lehet a természetes körülmények között tapasztalható mértéktől, és ezt egyes növekedésszabályzó vegyületek is tovább fokozhatják. Ezért a kísérletekben elengedhetetlen a kiindulási anyag és az előrehaladott sejtvonalak genetikai identitásának ellenőrzése (Smýkal, Valledor et al. 2007).

Akárcsak a laboratóriumban nevelt növények esetében (pl. hidroponikus kultúrák), a tenyésztési körülmények szabadon változtathatók és nagy pontossággal figyelemmel követhetőek, így a szövettenyészetek kiválóan alkalmasak fiziológiai vizsgálatokra. A szuszpenziós technika és a protoplasztálási módszerek alkalmassá teszik a tenyészeteket a variabilitás indukálására, genetikai, és génsebészeti kutatásokba vonásra is (Larkin és Scowcroft 1981; Bates 1985; Stephens, Nickell et al. 1991).

A szövettenyésztés elmélete a 20. század elején született, egy német tudós, Gottlieb Haberlandt nevéhez fűződik. Izolált sejtekkel végzett kísérletei kudarcnak bizonyultak, azonban munkáiban lefekteti a totipotencia elméletét (Haberlandt 1902). Az első sikeres tenyészetek gyökércsúcs kultúrák voltak (Kotte 1922).

Említésre méltó, hogy már ezek a korai eredmények is felhasználásra kerültek, évtizedekkel később, fiziológiai vizsgálatokban (Street 1969). Az első valódi növényi szövettenyészetet Gautheret állította elő és tartotta fent, *Acer pseudoplatanus* kambális szövetéből (Gautheret 1934).

Ezt követően, a 40-es és 80-as évek közötti kutatások hívták életre a növényi szövettenyésztés alkalmazásának 5 klasszikus területét; sejttan (citológia, tápanyag gazdálkodás, metabolizmus, morfogenezis, és sejtpatológia), növénymódosítás és fejlesztés, patogénmentes növényanyag előállítás, klonális szaporítás és bioproduktum (főleg szekunder metabolitok) előállítás. Ebben az időszakban fektették le a legtöbb ma is használt tenyésztési módszer alapjait. Skoog és munkatársai nagy szerepet vállaltak ebben azzal, hogy felismerték az

exogén auxin és citokinin arány alapvető szerepét a tenyészetekben növekedő sejtek sorsának alakulásában (Miller és Skoog 1955).

Szintén Skoog nevéhez fűződik , és ebben az időszakban került kidolgozásra az első széles körben elterjedt médium az MS, mely már lényegesen eltért a teljes növények kísérleti neveléséhez használt keverékektől (Murashige és Skoog 1962).

A kilencvenes évektől kezdődően újabb fellendülés mutatkozott a módszerek és felhasznált fajok tekintetében, és ez lehetővé tette a szövettenyésztés térhódítását a molekuláris biológiában és a mezőgazdasági biotechnológiában is.

Egyetemünk Növényteni Tanszéke is számos alapkutatási feladatba vonta már be a szövettenyésztési módszereket. Sikereket ért el a nád (*Phragmites australis*) esetében, és a szilícium növekedési és fejlődési hatásait vizsgálta (Máthé, Mosolygó et al. 2012). Ezeken a tenyészeteken a Cylindrospermopsin cianotoxin mikrotubulus organizációra és ezáltal a gyökérmorfogenezisre kifejtett hatásait is sikeresen vizsgálták (Beyer, Surányi et al. 2009). A mikrocisztin-LR cianotoxin kromatin szerkezetre, illetve DNáz enzim aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálatához is megfelelőnek bizonyultak a nád szövettenyészetek (Jámbrik, Mathe et al. 2011). Hasonló vizsgálatokat sikerült kivitelezni az érdes tócsagaz (*Ceratophyllum demersum*) tenyészetein is (Szigeti, Jámbrik et al. 2010).

Különböző sáfrány fajok (pl. *Crocus heuffelianus*) fajspecifikus szövettenyésztési módszereit is sikerrel dolgozták ki a tanszék kutatói (Demeter, Surányi et al. 2010). A tanszék azóta számos egyéb *Crocus* fajt vont szövettenyésztésbe, az így kialakított szövetbank pedig főleg konzervációbiológiai jelentőséggel bír, de jellemző szekunder metabolitok termelésére és kivonására is alkalmasak lehetnek. Hasonló célokkal folyik több hóvirág (*Galanthus*) faj szövettenyésztése is.

A jelen dolgozatban szereplő *Quercus* tenyészeteket sikeres stresszfiziológiai vizsgálatokban használtuk fel, az ezzel kapcsolatos nemzetközi publikáció már előkészítési fázisban van.

## **Biotechnológiai és mezőgazdasági jelentőség**

Az elmúlt két évtizedben a szövettenyésztés a biotechnológia számos területén vált használatossá. Egyes növények ilyen módszerekkel történő vegetatív szaporítása már rutineljárásnak számít a biotechnológiában. Egyaránt használatos vírusmentes szaporítóanyag előállítására (merisztématenyészetek), generatíván nehezen szaporítható, illetve termőre nehezen forduló fajok szaporítására is (Dudits és Heszky 2003). Fejlettebb alkalmazási terület a bioreaktor léptékű szekunder metabolit, és egyéb terápiás anyag termeltetés (napjainkban akár már heterológ kultúrákban is) (Fischer, Emans et al. 1999).

Igen fontos mezőgazdasági jelentőséggel bír a termelékenység fokozásában, nemesítési célokra egyaránt felhasználják akár a genetikai variabilitás indukálására (Mohan Jain 2001), vagy kifejezetten genetikai módosításra, transzgénikus növények fejlesztésére (Smith és Drew 1990; Brown és Thorpe 1995).

Talán a legnemesebb célok és eredmények ezen módszerekkel kapcsolatban olyan heterológ gének bejuttatása, melyek értékes tápanyagokat, vitaminokat kódolnak. Ez lehetőséget adhat a fejlődő világban élő, alultáplált vagy éhínséggel sújtott lakosságának étrendjének megerősítésében (Khalafalla és Hattori 2000). Hasonlóan úttörő, és hatalmas társadalmi értéket képviselő kutatási irányvonal az ehetséges vakcina fejlesztés, mely a vakcinálás költségeit jelentősen csökkentheti, és a gyógyszer eljuttatása is könnyebbé válik a lakosság számára (Mason, Warzecha et al. 2002).

Az erdőalkotó fafajok sem jelentenek kivételt a biotechnológiai érdeklődés alól. Egyre növekvő az igény a megújuló energiaforrásként felhasználható biomassza termelésre, illetve a faanyagra és faipari termékekre. Ez a biotechnológiai kutatások egyre fontosabb tárgyává teszi ezeket a fafajokat. Az esetlegesen genetikailag is módosított, de mindenképpen klonálisan szaporított, jól használható faanyag tömegtermelése azonban természetvédelmi szempontokkal is ellentétes. Így a szaporítás egyetlen hatékony és biztonságos módja a laboratóriumi mikroszaporítás, illetve szövettenyésztési módszerek (Karnosky 1981). Az 1. táblázat a biotechnológiai illetve alapkutatási célokkal sikeresen szövettenyésztésbe vont fás szárú fajokból sorol fel néhányat.

**1.táblázat: példák a biotechnológiai illetve alapkutatói célokkal sikeresen szövettenyésztésbe vont fás szárú fajokra (Karnosky 1981)**

| Fajnév                         | Explantátum           | Hivatkozás                     |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| <i>Acacia koa</i>              | hajtáscsúcs           | (Skolmen 1976)                 |
| <i>Aesculus hippocastanum</i>  | portok (haploid)      | (Radojevic 1978)               |
| <i>Betula pendula</i>          | hajtás                | (Huhtinen 1974)                |
| <i>Corylus aveliana</i>        | embrió                | (Jarvis, Wilson et al. 1978)   |
| <i>Eucalyptus alba</i>         | hipokotil             | (Kitahara és Caldas 1975)      |
| <i>E. citriodora</i>           | Fás gumó (lignotuber) | (Aneja 1969)                   |
| <i>Uiquidambar styraciflua</i> | hipokotil             | (Sommer és Brown 1980)         |
| <i>Paulownia tomentosa</i>     | embrió                | (Radojevic 1979)               |
| <i>Populus X canadensis</i>    | hajtáscsúcs           | ( Berbee F. és Berbee J. 1972) |
| <i>Populus canescens</i>       | hajtáscsúcs           | (Chalupa 1974)                 |
| <i>Santalum album</i>          | hipokotil             | (Rao és Bapat 1978)            |

## Quercus fajok szövettenyésztése

Célkitűzéseinknek megfelelő szövettenyésztési eredményekről a szakirodalmak nem számolnak be. Rokon fajokra, illetve a kísérletbe vont hibridek anyanövény fajaira vonatkozó eredmények alapján kerültek megtervezésre a kísérleteinkben szerepelt hormonkombinációk és tenyésztési körülmények. A feldolgozott irodalmak főbb eredményeit foglalja össze a 2. táblázat.

**2. táblázat: A feldolgozott irodalmakban szereplő tenyésztési körülmények és növekedés szabályzó vegyületek Quercus fajok szövettenyésztésében**

| Faj                  | Hivatkozás                      | Táptalaj         | Növekedés szabályzó anyagok               |
|----------------------|---------------------------------|------------------|-------------------------------------------|
| <i>Q. acutissima</i> | (Kim, Youn et al. 1977)         | MS               | IBA + BA négy héten át, majd hormonmentes |
| <i>Q. alba</i>       | (Gingas és Lineberger 1989)     | MS               | 2,4-D + BA                                |
| <i>Q. canadensis</i> | (Bueno és Gomez et al. 1996)    | WPM (módosított) | 2,4-D                                     |
| <i>Q. cerris</i>     | (Ostrolucka és Petrova 1991)    | WPM              | BA, kinetin + IBA                         |
| <i>Q. leban</i>      | (Srivastava és Steinhauer 1982) | MS               | 2iP + IAA                                 |
| <i>Q. pubescens</i>  | (Feraudkeller és Espagnac 1989) | MS               | IBA + BA                                  |
| <i>Q. petraea</i>    | (Jorgensen 1993)                | WPM (módosított) | 2,4-D + BA                                |
| <i>Q. petraea</i>    | (Chalupa 1990)                  | MS, SH           | GA <sub>3</sub> + BA vagy BA + IBA        |
| <i>Q. robur</i>      | (Manzanera és Pardos 1996)      | WPM              | 2,4-D, BA vagy hormonmentes               |
| <i>Q. robur</i>      | (Hubner és Müller 1995)         | WPM (módosított) | 2,4-D + BA                                |
| <i>Q. robur</i>      | (Endemann és Wilhelm 1999)      | P24              | 2,4-D + BA vagy hormonmentes              |
| <i>Q. rubra</i>      | (Gingas és Lineberger 1989)     | MS               | 2,4-D + BA vagy hormonmentes              |
| <i>Q. suber</i>      | (Bueno és Astroga 1992)         | Sommer           | Folyékony vagy szilárd                    |

## ***Vicia faba* szövettenyésztése**

A *Vicia faba* az egyik legrégebben termesztésbe vont kultúrnövényünk (Tanno és Willcox 2006). Ennek ellenére nem tartozik a meghatározó mezőgazdasági jelentőségű fajok közzé, így a vele kapcsolatos élettani és genetikai tudásanyag elmarad a fontosabb gazdasági növényekétől (Molnár, 2002).

A *Fabaceae* fajok szövettenyésztése rekalitráns. A *Vicia faba* esetén a legtöbb sejt és szövettenyésztési módszer kipróbálásra került már, azonban ezek a kezdeti eredmények a gyakorlatban biztonsággal nem alkalmazhatóak (Molnár 2002).

A *Vicia faba* a citológiai kutatások kedvelt alanya, mert kromoszómaszáma kevés ( $n=6$ ), és a kromoszómái nagyok. A Növényteni Tanszéken a faj folyékony táptalajon nevelt csíranövényeit jelenleg is alkalmazzák a növény-cianotoxin interakciók citológiai vizsgálatában. Ezen kutatások folyamányaként jelentkezett az igény szövettenyészetek, és ezeken keresztül sejtszuspenziós tenyészetek kialakításra. A kísérletes munkában előnyt jelent egy ilyen rendszer kontrollálhatósága és hosszútávú fenntarthatósága.

A tenyészetek kialakításának legnagyobb nehézségeként említi az irodalom, hogy a kalluszk nagy mennyiségben termelnek és juttatnak a táptalajba fenolos vegyületeket. A termelés csökkentésére az egyik lehetőség az alacsonyabb hőmérsékleten (16-18 °C) történő tenyésztés (Selva, Stouffs et al. 1989). Egy másik hatásosnak bizonyult lehetőség a fiatal csíranövények alleveleinek felhasználása explantátumként (Molnár 2002).

A feldolgozott irodalmakban leírt kísérletek leggyakrabban MS\* táptalajt BA, NAA, IBA, 2-4 D növényi hormonok kombinációit használták a tenyésztésben (Mitchell és Gildow 1975; Fakhrai et al. 1989; Selva és Benedicte 1989).

## **Anyag és módszer**

### **Quercus sp.szövettenyésztése**

A *Quercus* genus rendszertani besorolása a következő: *Regnum: Plantae, Subregnum: Viridiplantae*, Zárwatermők kládja, Valódi kétszikűek kládja, *Eurosoid* klád, *Fagales* rend, *Fagaceae* család (Podani 2003). A csoportot szélbeporzású fajok alkotják. A genuson belül számos erdészeti jelentőségű fajt találunk.

#### *Quercus petraea* (kocsánytalan tölgy)

Elsőrendű fa, akár 35 m magasra is megnőhet. A talajvízzel szemben igénytelen, elviseli a szárazabb talajokat. Domb- és hegyvidékek lejtős oldalain tenyészik. Hazai domb - és hegyvidékeink egyik legfontosabb faja. Optimuma az évi középhőmérsékletet illetően 9 °C fölötti, csapadék tekintetében 700 mm. 500 mm alatti csapadékmennyiségű termőhelyeken nem fordul elő.

#### *Quercus pubescens* (molyhos tölgy)

Másod vagy harmadrendű fa. Szélsőségesen száraz területeken (évi csapadék mennyiség 350-450 mm), kopárokon, és meszes talajon is megél. Mediterrán vidékek, illetve Közép- és Dél-Európa elterjedt hegyvidéki faja. A leglassúbb növekedésű tölgy. Fája jó minőségű, de görbesége miatt kevésbé hasznosítható.

#### *Quercus polycarpa* (Erdélyi kocsánytalan tölgy)

Dombvidékek illetve alacsonyabb hegyvidékek elsőrendű fafaja.

#### *Quercus virgiliana* (Olasz molyhos tölgy)

Erdély és a Kárpátok külső peremének erdős sztyeppes és napsütéses oldalain, dombvidékein tenyésző első vagy másodrendű faj.

#### *Quercus dalechampii* (dárdáskarjú kocsánytalan tölgy)

Dombvidéki előfordulású elsőrendű fafaj.

(Mátyás 1967)

A genus fajai természetes körülmények között is gyakran hibridizálódnak. (Rushton 1993)

**3. táblázat: A kísérletekben szerepelt tölgy fajok/ taxonok kódja**

| Kód       | Morfológiai alapú besorolás                |
|-----------|--------------------------------------------|
| A149, A71 | <i>Q. petraea</i>                          |
| D137      | <i>Q. petraea</i> x <i>Q. dalechampii</i>  |
| D89       | <i>Q. petraea</i> x <i>Q. pubescens</i>    |
| A211      | <i>Q. virgiliana</i> x <i>Q. polycarpa</i> |
| B50       | <i>Q. virgiliana</i>                       |
| K28, C102 | <i>Q. petraea</i> x <i>Q. polycarpa</i>    |
| A75       | <i>Q. pubescens</i>                        |

*Kísérleti anyag:* . A növényanyag azonos időben, a következő fajok egyedeiről, illetve azok hibridjeiről került begyűjtésre: *Quercus petraea*, *Quercus polycarpa*, *Quercus virgiliana*, *Quercus dalechampii* (3. táblázat).

A tenyészetek elindításához hajtáscsúcsok, rügyszövetek, és levélszövetek kerültek felhasználásra. Az explantátumok kifejlett egyedek fiatal (2-4 éves) hajtásairól származtak. A begyűjtött hajtásokat laboratóriumi körülmények ( $22 \pm 2$  °C, 14/10 h fotóperiódus) között tartottuk amíg  $12 \pm 4$  mm méretű leveleket fejlesztettek. A levelek eltávolítása után a hajtástengelyek csúcsi részét levágtuk, illetve nodális szegmensekre daraboltuk a hajtástengelyt. A levelekből 1 cm x 1 cm szeleteket használtunk fel. Felületi sterilizálás után az explantátumok agar tartalmú szilárd táptalajra kerültek.

*Táptalaj és tenyésztési feltételek:* A tenyésztéshez aszkorbinsavval kiegészített ViaLab WPM-ot (Woody Plant Medium, Lloyd és McCown, 1980) használtunk. Az alaptáptalajt a következő hormonokkal (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) kezeltük:

*Citokinin típusú hormonok:*

0.1 - 4 mg l<sup>-1</sup> (0.44-17.7 µM) BA (Benzilamino-purin),

*Auxin típusú hormonok:*

0.05 – 4 mg l<sup>-1</sup> (0.53-21.5 µM) NAA (α-naftil-ecetsav),

0.05 - 1 mg l<sup>-1</sup> (0.25-0.5 µM) IBA (Indolvajsav),,

Egyéb hormonok: ABA, (Abszcizinsav), GA3 (Gibberellinsav) , 2,4- D (diklórfenoxiecetsav)

A hormonkoncentrációkat Seckinger et al. (1979), Tanaka et al. (1995), Cuenca et al. (1999) and Toribio et al. (2004) munkáira alapozva terveztük meg.

A táptalajt 0.8 % (w/v) agarral (Difco, Lawrence, KS, USA) szilárdítottuk, szénforrásként szacharózt használtunk. A talaj kémhatását 5,8 pH értékre állítottuk, majd 121 °C -n 40 percig autoklávoztuk. A tenyészetek 22 °C-on, 14 órás fotóperióduson nőttek. A tenyészetek 4 hetes időközönként kerültek passzálásra.

## **Hisztológiai vizsgálatok**

A szövetmintákat 16-24 órára mikrotiter lemezbe helyeztük, és PBS (NaCl tartalmú foszfát puffer) + 4%-os formaldehid oldatban vagy PBS +3,6%-os PFA (paraformaldehid) oldatban fixáltuk. Másnap a mintákat kétszer 5 percig PBS-ben mostuk, majd hozzáadtunk 40 %-os szacharóz tartalmú PBS-t és vákuuminfiltráltuk 20 percig.

Négyórás inkubálást követően, fagyasztva metszést végeztünk Leica Histoslide 2000 mikrotómmal. A metszeteket háromszor 5 percig PBS-sel mostuk és vagy festetlenül helyeztük tárgylemezre, vagy ráhelyeztük a DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, Fluka) festéket. 150 µg/ml DAPI törzsoldatot használtunk, és azt hígítottuk fel PBS-sel (a végkoncentráció 3 µg/ml volt). A festés időtartama 1 óra, sötétben. A megfestett metszeteket kétszer 5 percig PBS-sel mostuk, majd áthelyezzük egy másik tárgylemezre és antifading puffert cseppentettünk rá (összetétele: 0.1% p-feniléndiamin + 90% glicerín egyszeres PBS pufferben pH 0.8-ra beállítva 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- 5 M NaHCO<sub>3</sub> puffer segítségével).

A preparátumokat Olympus Provis AX-70 konvencionális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A gerjesztési hullámhossz DAPI festéssel készült minták vizsgálatánál 320-360 nm volt.

## ***Vicia faba* szövettenyésztése**

Explantátumként *Vicia faba* 5-7 napos steril körülmények között, hormonmentes MS\* táptalajon nevelt csíranövények megsebzett allevél, levél, hajtástengely és gyökér explantátumait használtuk fel.

A tenyészetek 0.8 % (w/v) agarral (Difco, Lawrence, KS, USA) szilárdított, 100 mg L<sup>-1</sup> aszkorbinsavval kiegészített MS\* táptalajon, 22 °C-on, 14/10 órás fotóperióduson nőttek. A tenyészetek 3 hetes időközönként kerültek passzálásra.

Az alaptáptalajt a következő hormonokkal (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) kezeltük:

*Auxin típusú hormonok:*

1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D

1,5 mg l<sup>-1</sup> IBA

*Citokinin típusú hormonok:*

0.2 illetve 1 mg l<sup>-1</sup> BA

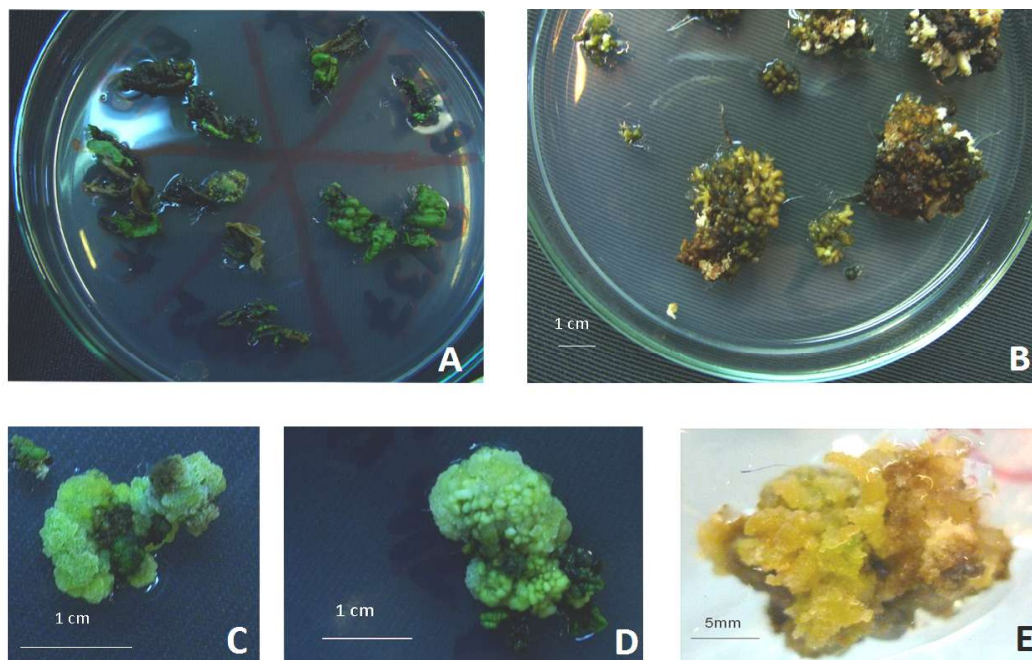
## Eredmények és diszkusszió

### *Quercus* szövettenyészetek

#### A dedifferenciálódás indukciója és fenntartása

A szakirodalmak (Cuenca, San-José et al. 1999; Wilhelm 2000; Pinto, Valentim et al. 2002) alapján kísérletbe vont hormonkoncentrációk közül a kallusz stádium kiváltásához és fenntartásához a  $2\text{--}4\text{ mg l}^{-1}$  NAA és  $0.5\text{--}1\text{ mg l}^{-1}$  BA kombináció bizonyult a legalkalmasabbnak. 2,4-diklórfenoxiecetsavat alkalmazva auxin típusú hormonnként a kalluszok nem maradtak életképesek. Magasabb ( $10\text{ mg l}^{-1}$ ) NAA koncentráció alkalmazása sem volt eredményes, a kalluszok elfeketedését, elhalását okozta.

A viabilis, jól fenntartható és embrio- és organogenezisre hajlamos tenyészetek általában kompaktak, rigidek, és zöldesbarna színűek voltak. *Quercus petraea* barka explantátumaiból egy ettől eltérő, képlékeny, halványsárga szövet megjelenését is sikerült indukálni. Ez utóbbi bár stabilan fenntartható, embrio- és organogenezis kiváltására alkalmatlan. A felhasznált hormonkoncentrációkat, a kallusz megjelenéséig eltelt átlagos időtartamot a 4. táblázat részletezi. A jellemző tenyészetek képeit mutatja a 2. ábra.



2. ábra: kallusz indukció és fenntartás  $100\text{ mg l}^{-1}$  aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétében:

A.) Kiindulási explantátumok kallusz indukáló  $4\text{ mg l}^{-1}$  NAA  $1\text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú táptalajon, B.) A149 vonal nodális stádiumú kallusz  $0.5\text{ mg l}^{-1}$  BA  $0.1\text{ mg l}^{-1}$  NAA tartalmú táptalajon, C.) D89 vonal  $4\text{ mg l}^{-1}$  NAA  $0.5\text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú fenntartó táptalajon, D.) A149 vonal  $4\text{ mg l}^{-1}$  NAA  $0.5\text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú fenntartó táptalajon E.) A85 vonal  $4\text{ mg l}^{-1}$  NAA  $2.5\text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú fenntartó táptalajon

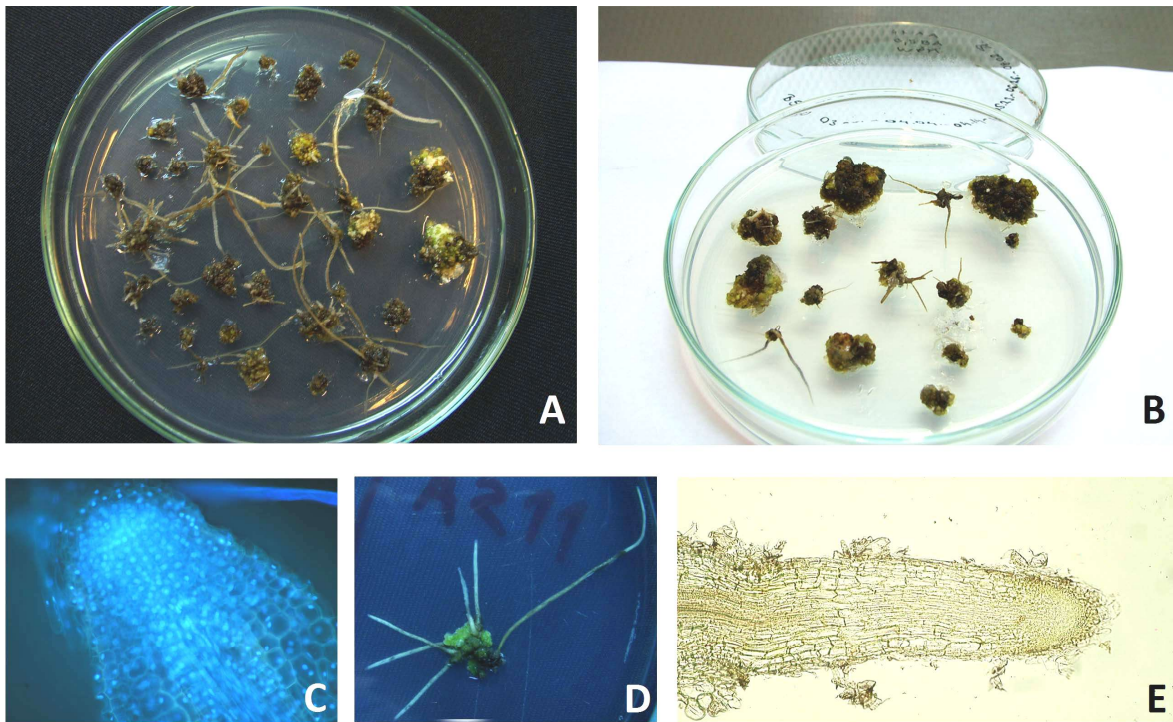
**4. táblázat: A tölgy kallusz előállításához szükséges explantátumok, növekedés szabályozó anyagok, átlagos időtartam és a szövettenyészet fenntartására alkalmas hormonkombinációk a 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajban.**

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

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

### Gyökerek regenerálása

Hat vonal kalluszait huzamosabb ideig nevelve a kalluszindukáló és fenntartó táptalajon, gyökerek képződését tapasztaltuk. A vonalakat, a gyökerek megjelenésének átlagos időpontját és a megfelelő hormonösszetételt az 5. táblázat foglalja össze. A jellemző tenyészetek képeit mutatja az 3. ábra.



**3. ábra: Gyökérregenerálás 100mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétében: A, B.) B50 vonal sikeres gyökérregenerációja 2NAA 0,5BA illetve 4NAA 0,5 BA tartalmú táptalajokon, C.) D89 vonalról származó regenerált gyökér szövettani metszete fluoreszcens mikroszkóp alatt, DAPI festéssel, D.) A211 vonal sikeres gyökérregenerációja 4NAA 0,1BA tartalmú táptalajon, E.) D89 vonalról származó regenerált gyökér szövettani metszete fénymikroszkóp alatt**

**5. táblázat: A gyökérregenerálásra hajlamos vonalak, a felhasznált növekedés szabályozó anyagok és a szükséges átlagos idő.**

| Taxon kódja | Explantátum | Gyökérképződést indukáló táptalaj (mg l <sup>-1</sup> )                                                     | A gyökér megjelenés átlagos időpontja (hónap) |
|-------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| A75         | levél       | 4NAA 0,5BA<br>4NAA 0,5BA → 2NAA 0,5BA<br>4NAA 2,5BA → 4NAA 1BA                                              | 8                                             |
| D89         | levél       | 4NAA 2,5BA<br>4NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA<br>4NAA 0,1BA<br>2NAA 0,5BA                                            | 7                                             |
| B50         | levél       | 4NAA 0,5BA → 2NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA → 2NAA 0,5BA<br>4NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA                                  | 5                                             |
| A211        | levél       | 4NAA 1BA → 4NAA 0,5BA<br>4NAA 0,1BA<br>4NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA                                               | 7                                             |
| D137        | levél       | 4NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA                                                                                      | 11                                            |
| K28         | levél       | 4NAA 1BA → 4NAA 2,5BA → 1NAA 1BA<br>4NAA 0,1BA → 4NAA 0,5BA → 1NAA 1BA<br>4NAA 1BA → 4NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA | 11                                            |

## Hajtás morfogenezis

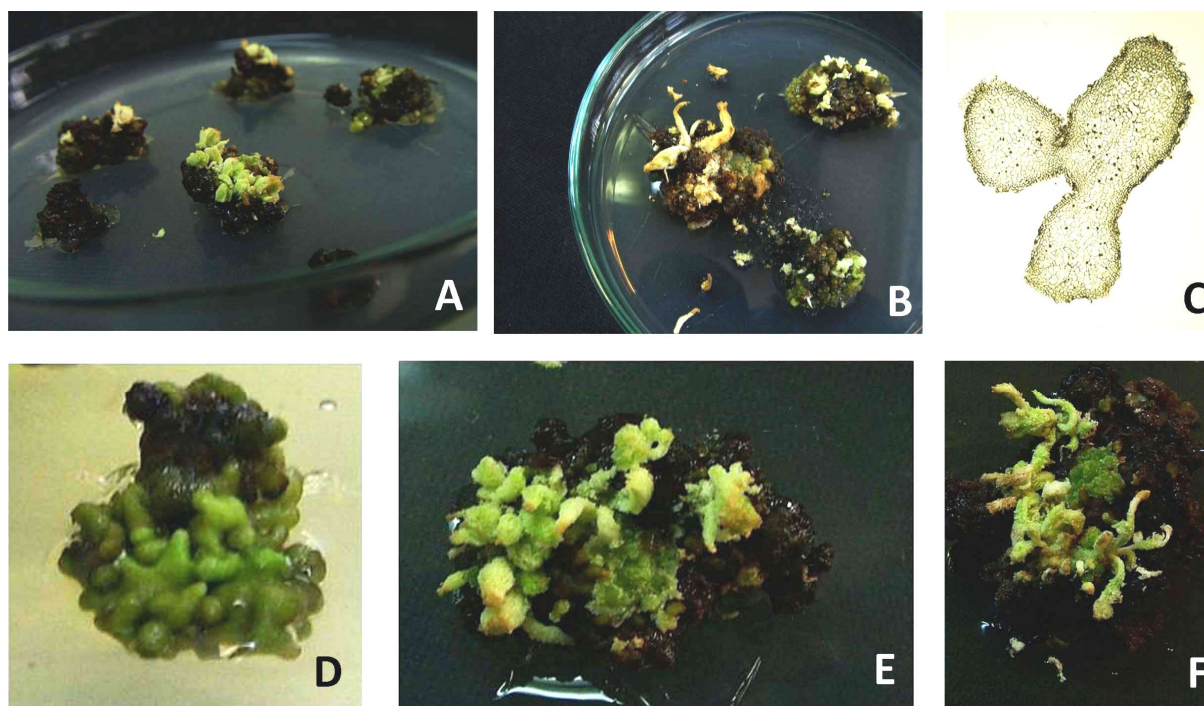
A149, B50, A211, és D137 kalluszvonalak esetében a hajtásregenerálási kísérletek sikeresek voltak. A szomatikus embriók mindhárom fejlődési stádiumot (szív, gömb, torpedó) elérték, majd csökkentett hormontartalmú táptalajokon tovább nevelve hajtásdifferenciálódásba kezdtek. Kivételt a fentiek alól a B50 vonal képezett, esetében a fenntartó táptalajon történő huzamosabb nevelés is kiváltotta a hajtásdifferenciálódást.

A hajtáskezdemények fejlődése korai stádiumban akadt el minden esetben. A növényregeneráció sikerességét a tenyésztési körülményeken és az alkalmazott növekedés szabályzó vegyületeken kívül a minták genotípusa is erősen befolyásolhatta. A hajtásregenerálásra hajlamos vonalakat, a hajtáskezdemények megjelenésének átlagos időpontját és a megfelelő hormonösszetételt a 6. táblázat foglalja össze. A jellemző tenyészetek képeit mutatja a 4. ábra.

**6. táblázat: A hajtás regenerálásra hajlamos vonalak, a felhasznált növekedés szabályzó anyagok és a szükséges átlagos idő.**

| Taxon kódja | Explantátum | Hajtáskezdeményt indukáló táptalaj (mg l <sup>-1</sup> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Hajtás-kezdemény megjelenés átlagos időpontja (hónap) |
|-------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| A149        | levél       | 4NAA 0,5BA → 1NAA 1BA → 0,1NAA 0,5BA<br>4NAA 0,5BA → 1NAA 1BA → 0,1NAA 0,5BA → 0,1IBA 0,4BA<br>4NAA 0,5BA → 0,05NAA 2BA<br>4NAA 0,5BA → 4NAA 2,5BA → 0,5NAA 0,5BA → 0,05IBA 0,1BA → 0,1IBA 0,2BA<br>4NAA 0,5BA → 0,5NAA 0,5BA<br>4NAA 0,5BA → 1NAA 1BA → 0,05NAA 0,5BA<br>4NAA 0,5BA → 0,5NAA 0,5BA → 0,1NAA 0,5BA<br>4NAA 0,5BA → 0,5NAA 0,5BA → 0,1IBA 0,1BA | 18                                                    |
| A149        | barka/2     | 0,5NAA 4BA → 1NAA 1BA → 0,1NAA 0,1BA → 0,1IBA 0,1BA<br>0,5NAA 4BA → 1NAA 1BA → 0,5NAA 0,5BA<br>0,5NAA 4BA → 1NAA 1BA → 0,5NAA 0,5BA → 0,1NAA 0,5BA<br>0,5NAA 4BA → 1NAA 1BA → 0,5NAA 0,5BA → 0,1IBA 0,1BA → 0,1IBA 0,4BA<br>0,5NAA 4BA → 4NAA 0,5BA → 2NAA 0,5BA → 2NAA 1BA                                                                                    | 20                                                    |

| Taxon kódja | Explantátum | Hajtáskezdeményt indukáló táptalaj (mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )                    | Hajtás-kezdemény megjelenés átlagos időpontja (hónap) |
|-------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| B50         | levél       | 4NAA 1BA<br>4NAA 0,5BA                                                                 | 13                                                    |
| A211        | levél       | 4NAA 0,5BA → 4NAA 1BA → 2NAA 0,5BA                                                     | 25                                                    |
| D137        | levél       | 4NAA 1BA → 4NAA 0,5BA → 2NAA 0,5BA<br>4NAA 1BA → 1NAA 1BA → 0,5NAA 0,5BA<br>2NAA 0,5BA | 19                                                    |



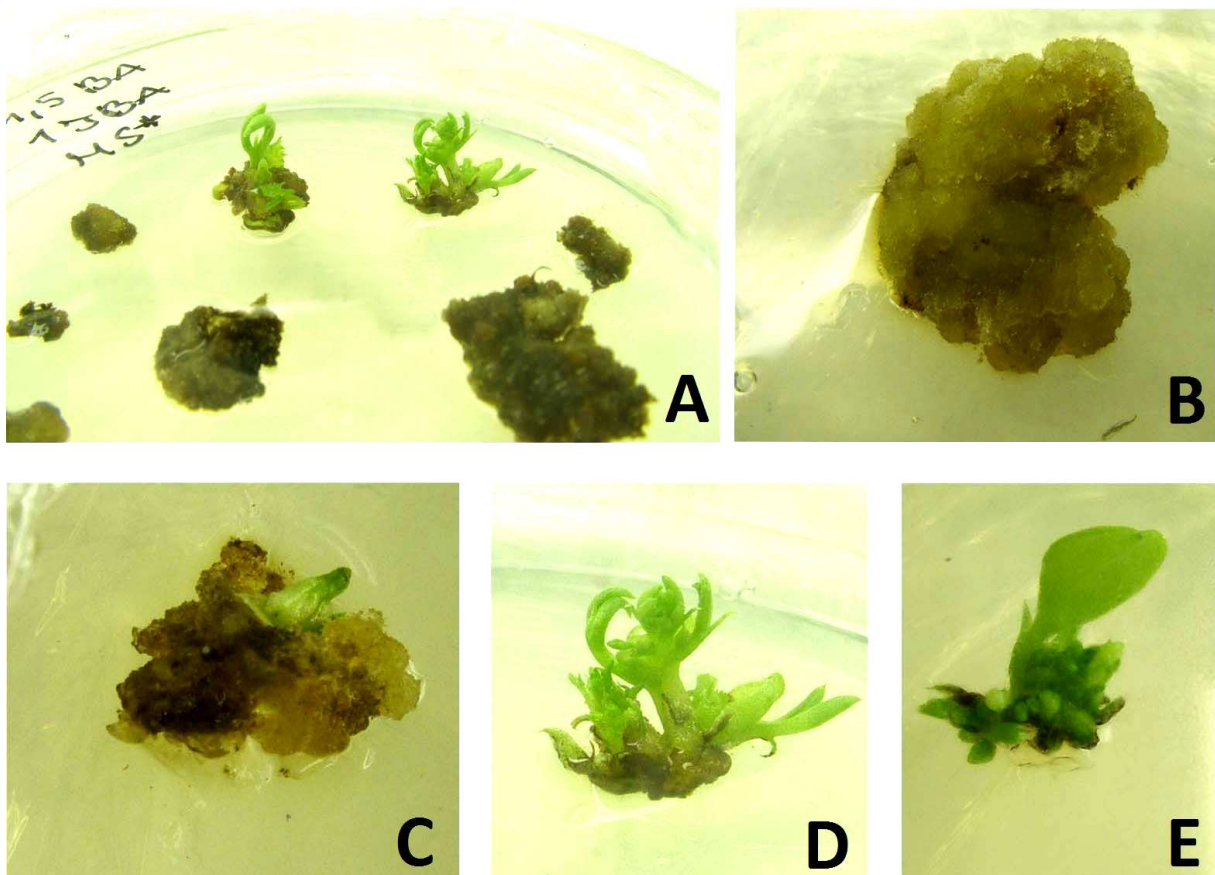
4. ábra: A stabilizált *Quercus* kalluszvonalak morfogenezise 100mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> aszkorbinsavat tartalmazó WPM alaptáptalajon auxin és citokinin hatású hormonok jelenlétében: A.) A149 barka eredetű vonalon megjelent hajtáskezdemények 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon. (B-D, F) levél eredetű kultúrák. B.) A149 vonalon megjelent előrehaladottabb hajtáskezdemények 0,5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> NAA 0,5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon C.) Kései szív- korai torpedó stádiumú embrió sziklevelekkel, hajtás és gyökér primórdiummal 28 napos A149 –es kultúrából 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA és 0,2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon, D.) A149 embriókat tartalmazó kalluszai 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA és 0,2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon E.) Hajtások megjelenése A149 barkaeredetű kalluszain 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA és 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon, F.) -Hajtás regeneráció A149 vonalon , 0,4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA és 0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA tartalmú táptalajon

### ***Vicia faba* szövettenyésztése**

A feldolgozott irodalmak (Mitchell and Gildow 1975; Fakhrai, Fakhrai et al. 1989) alapján kipróbált hormonkoncentrációk közül a kalluszindukáláshoz és fenntartáshoz a  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D,  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  BA kombináció bizonyult a legalkalmasabbnak. Az explantátumok rendkívül gyorsan (1-2 hét alatt) kalluszosodni kezdek és igen gyors növekedési ütemet mutatnak. A viabilis kalluszok kompaktak halvány sárgásbarna színűek.

A gyökércsúcs explantátumokból, illetve levélkezdeményekből származó kalluszok kevésbé életképesek, huzamosabb ideig tenyésztve a fenolos vegyületek túltermelődése miatt elfeketednek és elpusztulnak. Ennek kiküszöbölése még az irodalmakban említett alacsonyabb hőmérsékleten sem sikerült (Selva, Stouffs et al. 1989). Az allevél explantátumok ezzel szemben világos tónusúak és egészségesek maradtak hosszabb távon is.

$1,5 \text{ mg l}^{-1}$  IBA,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA tartalmú MS\* táptalajon mikroszaporítás eredményeket értünk el. Az explantátumok a kallusz stádium megkerülésével szomatikus hajtásregenerálást mutattak.



5. ábra: *Vicia faba* szövettenyésztetek és mikroszaporítás  $100 \text{ mg l}^{-1}$  aszkorbinsavval kiegészített MS\* táptalajon. A.) Hajtásregeneráció: hajtáscsúcs indukciója a kallusz stádium megkerülésével  $1,5 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA hormontartalmú táptalajon. Ez a hormonkoncentráció az egyéb explantátumból kialakuló kalluszoknak hosszabb távon kedvezőtlennek bizonyult. B.) viabilis kallusz hajtásexplantátumból  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormontartalmú táptalajon huzamosabb tenyésztési idő (3 hónap) után. C.) Allevél explantátumból származó kallusz  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  BA hormontartalmú táptalajon. D.) Kezdeti hajtásregeneráció a kallusz stádium megkerülésével  $1,5 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA hormontartalmú táptalajon. E.) Előrehaladott levél regeneráció  $1,5 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA hormontartalmú táptalajon.

## Potenciális felhasználási lehetőségek

A stabilizált kalluszvonalakat fiziológiai kísérletekben, mint modellszervezetek, sikeresen használtuk fel. Laboratóriumi körülmények között szárazság stressz folyamatok kerültek modellezésre. A kezelt kalluszokon azután viabilitást, nedvestömeg változást nyomon követő kísérletek folytak. A kezelt minták enzimvizsgálatok céljára is felhasználhatóak voltak PAGE módszerrel. Szárazságérzékeny, illetve szárazságtűrő taxonok kalluszai kerültek vizsgálatba. Az ozmotikummal szimulált szárazságra adott válaszaik alapján elmondható, hogy megfelelően sikerült modellezni velük az eredeti növények szárazságtűrő potenciálját. A vizsgálatok szignifikáns kapcsolatot mutattak ki a vizsgált vonalak szárazságtűrő képessége és a kísérletben vizsgált markerenzimek között. Ezek az eredmények egybevágtak az előzetes hipotézissel, mely az eredeti fajok ökofiziológiai tulajdonságai alapján került felállításra.

A továbbiakban, amennyiben a *Vicia faba* szövetbankot sikerül a megfelelő méretűre kiterjeszteni, sejtciklus szabályozás vizsgálatában történő felhasználásukat tervezzük a jövőben.

## Diszkusszió

Hazai termőterületről származó *Quercus* fajok explantátumaiból kívántunk fenntartható szövetbankot kialakítani, majd ezeken, mint laboratóriumi modellszervezeteken vizsgálni a szülőfajok, és különböző hibridek szárazságtűrési tulajdonságait.

Az *in vitro* modellrendszer legfőbb limitáltsága, hogy populáció szintű vizsgálatokra nem alkalmas. A modellrendszerek vonalanként egy adott egyed genotípusát reprezentálják szomaklonális formában. A tenyésztés és a kísérletek során a mutagenesis esélyét növelő ágensek nem kerültek felhasználásra (pl, 2,4-D, vagy kinetin hormon) (Dudits és Heszky, 2003), illetve a kísérletbe vont kalluszanyag genotípusos identitását genetikai vizsgálatokkal is ellenőriztük. A modell gyakorlati hasznát az támasztja alá, hogy laboratóriumi körülmények között mind a tenyésztési körülmények, mind a növekedésszabályzó anyagok jelenléte jól kontrollálható a rendszerben – ezért élettani, biokémiai, sejtbiológiai kísérletekben kiválóan használható.

A kialakított módszer a dedifferenciáció rutinszerű indukálásához megfelelőnek bizonyult. Az ehhez használatos, de mutagenesis veszélyét fokozottan hordozó hormonok elkerülése, a

folyamatot az irodalomban szereplő korábbi kísérletekhez képest hosszadalmassá tette (Wilhelm 2000).

A kísérleteket 14 különböző kalluszvonalon végeztük el. Változó hormonkoncentrációk mellett minden vonalon sikerült a kalluszindukciót elérni, és a noduláris stádiumban lévő viabilis kalluszokat hosszútávon is fenntartani. Magas auxin/ citokinin arány mellett hat vonal esetében organogenezis volt indukálható, gyökerek fejlődtek. Szomatikus embriogenezis 5 vonal estében volt kiváltható.

A gyökérregenerációra hajlamos tenyészeteken a gyökeresedés a fenntartó táptalajokon huzamosabb ideig tovább nevelve jelentkezett (5.ábra). Erre a jelenségre lehetséges magyarázat, hogy a hosszabb tenyésztési idő alatt a tenyészet sejtjeinek endogén citokinin koncentrációja lecsökkent, így a tenyészetek változatlan exogén hormonszintek mellett is az auxin: citokinin arány szignifikáns növekedését élték meg.

A hajtásregenerálás tekintetében B50 kalluszvonalon tapasztaltunk hasonló jelenséget (6.táblázat). Változatlan hormonkoncentrációk mellett huzamosabb ideig tenyésztve hajtáskezdemények jelentek meg. Ez az eredmény endogén változásokon keresztül lezajlott auxin:citokinin arány csökkenésre enged következtetni. Ezt továbbá az is alátámasztja, hogy a többi hajtásregenerációt mutató vonal esetében csökkentett auxin koncentráció, és általánosan alacsonyabb hormontartalom bizonyult eredményesnek (6. táblázat).

A felhasznált hormonkoncentrációk tekintetében az embriogenezis kiváltásában és a hajtásregenerációban tapasztalataink egybevágnak a feldolgozott irodalom *Q. robur* tenyészetekre vonatkozó adataival (Cuenca, San-José et al. 1999). A hajtáskezdemények azonban az ott leírtaktól eltérően igen alacsony gyakorisággal jelentkeztek, sem alacsony hormontartalmú, sem pedig hormonmentes táptalajon nem voltak hosszú távon fenntarthatóak, kezdetleges állapotban elpusztultak.

Az eredmények értelmezésekor figyelembe kell venni, hogy a regenerációs képesség nagyban függhet az explantátumok típusától, az egyedek genotípusától, és a táptalajon és a hormonösszetételen túl egyéb tenyésztési körülményektől (Duncan 1985; Dodds 1986; Máthé, Mosolygó et al. 2012).

Kísérleti jelleggel alkalmazott hormonok, mint az IAA, IBA, GA3, ABA, szignifikáns változásokat nem eredményeztek a kezelt minták utóéletében.

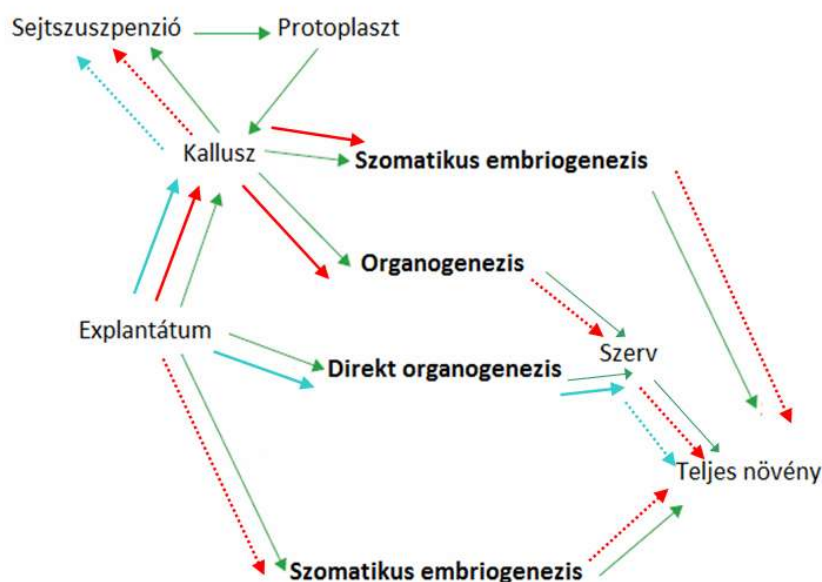
A domináns hazai előfordulású *Quercus* fajok esetében stabil kalluszfenntartási módszereket dolgoztunk ki, azzal a céllal, hogy laboratóriumi modellszervezetekként tenyészetek kerülhessenek felhasználásra *in vitro* stresszfiziológiai vizsgálatokban. A szövettenyésztés

útján előállított növényanyag a fenti célra alkalmasnak bizonyult. Igen jól kontrollálható, a vegetációs időszaktól, időjárástól, és az egyedek élettartamától, fejlődési ütemétől független módszer. Olyan hibridek is vizsgálatra kerültek, melyek stabilitása természetes körülmények között kétséges, illetve szaporodásuk gátolt lehet.

A *Vicia faba* estében a kipróbált módszerek közül az allevél explantátumok használata bizonyult megfelelő módszernek a fenolos vegyületek túltermelésének kiküszöbölésére. A 2,4-D hormont tartalmazó táptalajokon a kalluszosodás igen rövid időn belül (1-2 hét) megindult, a tenyészetek növekedése gyors ütemű. 2,4 –D hormont nem tartalmazó talajokon a tenyészetek hosszabb távon nem életképesek, azonban hajtáscsúcs explantátumokkal mikroszaporítási eredményeket értünk el. Az explantátumok a kallusz stádium megkerülésével szomatikus hajtásregenerálást mutattak. Erre a jelenségre a magasabb endogén citokinin koncentráció az explantátumokban meglévő merisztémaszövetre kifejtett indukáló hatása adhat magyarázatot.

A *Vicia faba* szövettényészeteket sikerült stabilizálni, amennyiben a szövetbank megfelelő méretűre növelhető, sejtciklus szabályozás vizsgálatában történő felhasználását tervezzük a jövőben.

Elért eredményeinket a szövettényésztési kísérletek potenciális lehetőségeivel összevetve az 5. ábra foglalja össze.



6.ábra: zöld színnel jelennek meg a bejárható szövettényésztési lehetőségek. Piros színnel a *Quercus*, kék színnel a *Vicia* tenyészetekkel kivitelezett kísérletek vannak fetüntetve. Pontozott vonalakkal a *Quercus* esetében a sikertelen, a *Vicia* esetében a még folyamatban lévő kísérleteket jelöltük

A szövettenyésztési eljárások jól használhatóak alapkutatásokban és biotechnológiai fejlesztésekben egyetemünkön. A szövettenyésztési eljárások évről évre számos hallgatónak biztosítanak kutatási lehetőséget, az elsajátított ismeretek pedig keresettek a szakterületen belül. A Kutatók Éjszakája rendezvény keretein belül a tanszék előszeretettel népszerűsíti a tudományterületet a szövettenyésztés módszereinek bemutatásával. Kutatási, oktatási témaként, valamint ismeretterjesztő szerepkörben a tevékenység a kutató egyetem célkitűzéseire is hozzájárulhat.

## Összefoglalás

A globális klímaváltozás erősen befolyásolja az erdőtársulások dinamikáját világszerte. Számos kutatás irányul ezen folyamatok feltérképezésére, hiszen a fás társulások jelentős gazdasági és ökológiai szereppel bírnak. A mérsékelt övben, így hazánk területén is a bükkfafélék, ezen belül is a különböző tölgy (*Quercus*) fajok e társulások egyik legmeghatározóbb növényei, így az általuk elszenvedett környezeti hatások vizsgálata segíthet megérteni a társulások összetételének recens és jövőbeli változásait.

A Debreceni Egyetem TEK Növényteni Tanszékén folyamatban lévő kutatásaink hatékony módszernek bizonyultak, hogy laboratóriumi körülmények között vizsgálhassuk a különböző *Quercus* fajok szárazságtűrési tulajdonságait. A növényi szövettenyésztés módszereit alkalmazva a fás szárú növények stresszfiziológiai vizsgálatával alapkutatási kérdéseket tisztázhatunk. A kutatás gazdasági jelentősége pedig abban áll, hogy a modern erdőgazdaság számára segíthet a megfelelő tulajdonságú fajokat kiválasztani. A szövettenyészetek kiváló laboratóriumi modellrendszernek bizonyultak, egyedi módon az évszaktól és időjárástól függetlenek, hatékonyak és alacsony költségűek.

Síkfőkúti mintaterületről származó tölgy szövetminták *in vitro* szövettenyésztése már jelenleg is folyik, és a stabilizált masszív klonális szövetbank anyag szolgál kutatási anyagként fiziológiai és molekuláris biológiai vizsgálatainkhoz.

A *Vicia faba* szövettenyészeteket is sikerült stabilizálni, amennyiben a szövetbank megfelelő méretűre növelhető, sejtciklus szabályozás vizsgálatában történő felhasználását tervezzük a jövőben.

Egyetemünk a fenntartott szövetbankot és a kialakított módszereket oktatási, kutatási és ismeretterjesztő célokra egyaránt felhasználhatja, így azok messzemenően szolgálják a kutató egyetem célkitűzéseit.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Máthé Csabának** és **Demeter Zitának** akik szakmai bizalmukba fogadtak és elindítottak a szövettenyésztési eljárások kutatásának útján, és akiknek az útmutatásai, tanácsai a kísérleti munkám, és a TDK dolgozat megírása során nélkülözhetetlenek voltak.

**Dr. Mészáros Ilonának** a Növénytani Tanszék vezetőjének, aki lehetővé tette ,hogy bekapcsolódjak a tanszék kutatási tevékenységébe.

Köszönet **Dr. Molnár Zoltánnak** a Nyugat-Magyarországi Egyetem docensének a *Vicia faba* szövettenyésztéshez adott tanácsaiért.

Köszönet **Garda Tamásnak** és **Riba Milánnak** akik a *Vicia faba* csíranövényekért és a szövettenyésztésben nyújtott segítségért.

Köszönet **Kanalas Péternek** a *Quercus* explantátumok terepi begyűjtésért.

A munkát a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 "A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása" c. projekt támogatta.

Köszönöm középiskolai biológia tanáromnak **Dr. Budayné dr. Kálóczi Ildikónak**, akit személyes mentoromnak tekintek. A tőle elsajátított szakmai alapok nagy segítségemre voltak, a hatására kialakult szemléletem pedig több mint elengedhetetlen tanulmányaimban és kutatásaimban.

Köszönöm a közelmúltban elhunyt **Édesanyámnak Fráter Violának**. A kutatás hosszú ideje alatt ő volt az egyetlen, aki képes volt bennem tartani a lelket. Általános iskolai biológia tanárom is ő volt, érdeklődésemet már kisgyermek koromban a biológia felé fordította. Úgy tartotta, egyik legnagyobb vágya teljesült azzal, hogy a biológus pályát választottam.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm a tanszékünk összes kutató hallgatójának, és dolgozójának, aki munkámban segítséget nyújtott, és lehetővé tette, hogy a tanszéken töltött idő élvezetes és emlékezetes legyen.

## Hivatkozások

1. Aneja S. (1969). "Plantlet formation in tissue cultures from ligno-tubers of *Eucalyptus citriodora* Hook." *Current Science* **38**: 69.
2. Bates G. (1985). "Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*." *Planta* **165**(2): 217-224.
3. Berbee F. M., Berbee J.G. et al. (1972). "Induction of callus and trees from stem tip cultures of a hybrid poplar." *In Vitro* **7**: 269.
4. Beyer D., Surányi G. et al. (2009). "Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro." *Toxicon* **54**(4): 440-449.
5. Brown, D. C. W., Thrope. A. (1995). "Crop improvement through tissue culture." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**(4): 409-415.
6. Bueno M. A. Astorga R. et al. (1992). "Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*." *Plant Physiology* **85**: 30-34.
7. Bueno, M. A., Manzanera, J. A. (1993). "Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L." *Silvae Genetica* **2-342**:90-93.
8. Bueno M. A. Gomez A. et al. (1996). "Stability in ploidy level during somatic embryogenesis in *Quercus canariensis*." *Somatic cell genetics and molecular genetics of trees*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;.
9. Chalupa A. V. (1990). "Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.)." *Plant Cell Reports* **9**: 398-401.
10. Chalupa A. V. (1974). "Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus." *Journal of Plant Biology* **16**: 316-320.
11. Cuenca B., San-José M. C. et al. (1999). "Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L." *Plant Cell Reports* **18**(7-8): 538-543.
12. Demeter Z., Surányi Gy. et al. (2010). "Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **100**: 349-353.
13. Dodds, R. (1986). "Experiments in plant tissue culture." Cambridge University Press

14. Dudits D., Heszky. L. (2003). Növényi biotechnológia és géntechnológia. Budapest, Agroinform Kiadó.
15. Duncan , W. M., Zehr BE, Widholm JM (1985). ". The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes." *Planta* **165**: 322-332.
16. Endemann M., Wilhelm E. (1999). " Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L." *Journal of Plant Biology* **42**: 499-504.
17. Feraudkeller C., Espagnac H., (1989). "Conditions for Appearance of a Somatic Embryogenesis on Calluses from Foliar Tissue-Culture of *Quercus-Ilex*." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **67**(4): 1066-1070.
18. Fischer, R., N. Emans, et al. (1999). "Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors." *Biotechnology and Applied Biochemistry* **30**(2): 109-112.
19. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima K. (1968)" Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells." *Experimental Cell Research* **50**: 151-158.
20. Gautheret, R. J. (1934). "Culture du tissu cambial." *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* **189**: 2195–2196.
21. Gingas, V. M., Lineberger R. D. (1989). "Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **17**:191-203.
22. Haberlandt G. (1902). "Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen." *Akademie der Wissenschaften. Wien, Math-Naturwiss Kl* **111**., 69–92.
23. Hubner, E. Müller K. et al. (1995). "Somatische Embryogenese und Sproûentwicklung in Abhängigkeit von 2,4-D und BAPKonzentrationen an zygotischen Embryonen der spataustreibenden Stieleiche (*Quercus robur* L.)." *Silvae Genetica* **44**:225-229.
24. Huhtinen D. (1974). "Das fruhe Blihen von aus Kalluskuskulturen herangezogenen Pflanzchen bei der Birke (*Betula pendula* Roth.)." *Silvae Genetica* **23**:(32-34).
25. Jambrik, K., Mathe Cs., et al. (2011). "Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-preferring nuclease activity in *Phragmites australis*." *Journal of Plant Physiology* **168**(7): 678-686.
26. Jarvis, B. C., Wilson D. A. et al. (1978). "Growth of isolated embryonic axes from dormant seeds of hazel (*Corylus avellana* L.)" *New Phytologist* **80**: 117-123.
27. Jorgensen J. (1993). "Embryogenesis in *Quercus petraea*." *Annales des sciences forestières* **50**:344-350.

28. Karnosky, D. F. (1981). "Potential for Forest Tree Improvement via Tissue Culture." *BioScience* **31**(2): 114-120.
29. Khalafalla, M., Hattori K. (2000). "Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron." *Plant Growth Regulation* **32**(1): 59-63.
30. Kim Y. W., Youn Y. et al. (1977). "Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*." *Plant Cell Reports* **16**:869-873.
31. Kitahara, E. H., Caldas L. S. (1975). "Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*." *Forensic Science International* **21**: 242-243.
32. Kotte W. (1922). "Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen." *Beitrage Allgemeine Botanik*(2): 413–434.
33. Larkin P. J., Scowcroft W. R. (1981). "Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement." *Theoretical and Applied Genetics* **60**(4): 197-214.
34. Manzanera, J. A. B., M. A.; Pardos, J. A. (1996). "*Quercus robur* L., (pedunculate oak)." *Biotechnology in agriculture and forestry*, **35**.
35. Mason H. S., H. Warzecha H. et al. (2002). "Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine." *Trends in Molecular Medicine* **8**(7): 324-329.
36. Máthé Cs., Mosolygó Á. et al. (2012). "Genotype and explant-type dependent morphogenesis and silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures." *Aquatic Botany* **97**(1): 57-63.
37. Miller C., Skoog F. et al. (1955). "Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid." *Journal of the American Chemical Society* **77**: 1392.
38. Mátyás V. (1967). A tölgyek dendrológiai ismertetése. (In Keresztesi B.: A tölgyek.) Budapest, Akadémiai kiadó.
39. Miller C., Skoog F., et al.(1955). "Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid." *Journal of the American Chemical Society*(77): 1392.
40. Mohan Jain S. (2001). "Tissue culture-derived variation in crop improvement." *Euphytica* **118**(2): 153-166.
41. Murashige T., Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
42. Ostrolucka M. G. Petrova A. (1991). "The occurrence of somatic embryogenesis in the species *Quercus cerris* L." *Biologia* **46**:9-14.

43. Pinto G., Valentim H. et al. (2002). "Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. Tree." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **38**(6): 569-572.
44. Podani J. (2003). *A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana*. Budapest, ELTE, Eötvös kiadó.
45. Radojevic L. (1978). "In vitro induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*." *Protoplasma* **96**: 369-374.
46. Radojevic L. (1979). "Somatic embryos and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* Steud" *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **9**: 57-62.
47. Rao, P. S., Bapat V. A. (1978). "Vegetative propagation of sandalwood plants through tissue culture." *Canadian Journal of Botany* **56**: 1153-1156.
48. Rushton, B. (1993). Natural hybridization within the genus *Quercus* L. *Annales des sciences forestières* **50**: 73-90
49. Skolmen, R. G. (1976). "*Acacia koa* Gray plantlets from somatic callus tissue." *Journal of Heredity* **67**.
50. Slater A., Scott N. et al. (2008). *Plant Biotechnology The genetic manipulation of plants* Oxford University Press.
51. Smith M., Drew R. (1990). "Current Applications of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement." *Functional Plant Biology* **17**(3): 267-289.
52. Smýkal, P., Valledor L. et al. (2007). "Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.)." *Plant Cell Reports* **26**(11): 1985-1998.
53. Sommer H. E., Brown C. L. (1980). "Embryogenesis in tissue cultures of sweetgum." *Forensic Science International* **26**(257-260).
54. Srivastava P. S., Steinhauer A. (1982). "In vitro culture of embryo segments of *Quercus leban*: organogenesis and callus growth as a differential response to experimental conditions." *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **106**:93-96.
55. Stephens, P. A., Nickell C. D. et al. (1991). "Agronomic evaluation of tissue-culture-derived soybean plants." *Theoretical and Applied Genetics* **82**(5): 633-635.
56. Street H. E. (1969). "Growth in organized and unorganized systems." *Plant physiology* **5**: 3-224.
57. Szigeti, Zs. M., Jámbrik K. et al. (2010). "Cytoskeletal and developmental alterations in *Ceratophyllum demersum* induced by microcystin-LR, a cyanobacterial toxin." *Aquatic Botany* **92**(3): 179-184.

58. Thorpe, T. (2007). "History of plant tissue culture." *Molecular Biotechnology* **37**(2): 169-180.
59. Wilhelm, E. (2000). "Somatic embryogenesis in oak." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **36**(5): 349-357.

## **Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez**

Alulírott Kiss Zoltán kijelentem hogy a pályamunka saját kísérleti munkám eredményeit tartalmazza, a leírt munkafolyamatok közül, témavezetőimmal együttműködve, minden munkafolyamatban aktívan részt vettem :

Szövettenyésztési kísérletek:

Táptalajkészítés

Explantátum sterilizálás, tenyészet indítás

Átoltás

Natív és DAPI festéssel készült mikroszkópi preparátumok készítése

  
.....  
aláírás

Debrecen, 2013 január 09.