

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Növényteni Tanszék



***Leucojum vernum*, *Leucojum aestivum* és *Sternbergia lutea* szövettenyészetek
előállítása és antioxidáns kapacitásuk jellemzése**

Készítette:

Kalydi Fruzsina

III. éves Biológia BSc – GNB szakirány

Témavezetők:

Máthé Csaba egyetemi docens

Resetár Anna PhD hallgató

Debrecen

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés.....	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A növényi in vitro tenyészetek és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban. 4	
2.2. Természetvédelmi vonatkozások	6
2.3 Vetővirág és tűzike fajok szövettenyésztése és ezek fontossága a konzervációbiológiában, biotechnológiában	6
2.4 Az antioxidánsok	8
2.5 Hatóanyag tartalom.....	9
3. Anyag és módszer.....	9
3.1 A szövettenyészetek indukciója	9
3.2 Antioxidáns mérés módszerei	10
3.2.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	10
3.2.2. A natív gélek kiértékelése	11
3.2.3. Összes polifenol- tartalom mérése	13
3.2.3. ABTS* kation inhibíciójának vizsgálata.....	14
3.2.4. DPPH* inhibíciójának vizsgálata.....	14
4. Eredmények és megbeszélésük	15
4.1 Stabil kalluszvonal és hajtástenyészet előállítása	15
4.2 Növényregenerálási kísérletek	18
4.3 Antioxidáns vizsgálatok eredményei	19
5. Összefoglalás	26
6. Köszönetnyilvánítás.....	28
7. Irodalomjegyzék	29

Rövidítések: 2,4-D – 2,4 –diklór-fenoxiecetsav, BA – benzil-amino-purin, IBA – indolvajsav, NAA – α -naftilecetsav; MS* –0,8% agarral, Gamborg vitaminnal (Gamborg és mtsai, 1968) és 2% szacharózzal kiegészített Murashige és Skoog alaptáptalaj (1962), ABA- abszcizinsav; AA-aszkorbinsav; ABTS -2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav; DPPH -1,1-difenil-2-pikrilhidrazil; PVP-polivinil-pirrolidon; PMSF-phenylmethylsulfonyl fluorid; PEG - polietilén-glikollal , F-C - Folin- Ciocalteu elegy

1. Bevezetés és célkitűzés

Az őszi vetővirág (*Sternbergia lutea*), a tavaszi tözike (*Leucojum vernalis*) és a nyári tözike (*Leucojum aestivum*) a zárvatermők (Angiospermatophyta) törzsébe, azon belül az egyszikűek (Liliopsida) osztályába és az *Amaryllidaceae* családba tartozik. Az *Amaryllidaceae* négy nagy nemzetségét ismerjük közelebbről. Ezek a *Galanthus* (hóvirág), a *Leucojum* (tözike), *Narcissus* (nácisz), *Sternbergia* (vetővirág) genusok melyek között számos védett fajt találunk (Király, 2009, Tuba és mtsai., 2007). A *Sternbergia lutea*, októberben virágzik. A virágok közvetlenül a földből hajtanak ki, kedvező időjárási körülmények mellett. Kedvezőtlen időjárási feltételek mellett a föld alatt nyílik, ott is meg tud termékenyülni. Virágnyláskor még nincs levele, mivel később hajt ki. A *Sternbergia* nemzetség legtöbb faja Törökországban él. Magyarországon egy fajuk honos, az apró vetővirág (*Strenbergia colchiciflora*), melynek felfedezője, Winter Jakab (a budai egyetem első növénytan professzora), mint "*Colchicum novum*" (= új kikerics) közölte (1788). Mivel azonban a kikericssekkel rokonságban nem áll, Kitaibel Pál-tól (1803-ban) megkapta máig is használatos tudományos nevét. Magyar neve arra utal, hogy virágai az őszi vetések idején jelennek meg. A tavaszi tözike (*Leucojum vernalis*) egyes lombdők, ligetek, nyirkos, de nem túl nedves rétek lakója. Virágzási ideje március-április. Hagymás, évelő növény, levelei töállásúak (Schönfelder, 2001). A nyári tözike (*Leucojum aestivum*) virágában a hat szabad lepellevél egyenlő hosszúságú (10–18 mm), harang alakban összehajló. A tőkocsány hosszabb, mint a lomblevél. Rovarmegporzású növény, melynek termései húsos toktermések (Godet, 1993). Magyarországon a puhafaligetek (fűz, nyár, éger) védett faja. Április-június között virágzik. A tavaszi tözikéhez hasonlóan szintén tartalmaz galantamint, ami mérgező (Simon, 1997).

Célunk olyan *in vitro* növényi szövettenyésztési eljárások kidolgozása, amely *Sternbergia lutea*, *Leucojum vernum* és *Leucojum aestivum* szövetbank létrehozását teszi lehetővé. Differenciálatlan sejtömegeket (kalluszokat) hozunk létre megsebzett növényi szervek eltérő hormon-összetételű táptalajra való ültetése és továbbtenyésztése során. Stabil kallusz vonal előállítását követően szomatikus embriókat illetve organogenezist kívánunk indukálni, melyeket növényregeneráláshoz és antioxidáns kapacitás meghatározására használunk fel. Vizsgálataink kiterjedtek az antioxidáns kapacitás meghatározására. Antioxidáns jelentése: olyan vegyület, amely az anyagcserefolyamatok vagy stresszreakciók során keletkező szabad oxigényököket vagy erős oxidáló molekulákat semlegesíti (Láng, 2002). A szabadgyökök nagy reakcióképességű, rövid életű molekulák, amelyek képesek a szervezet bármely vegyületét oxidálni, szerkezetét károsítani. Az élő sejtekben az energia felszabadító folyamatok során, természetes módon keletkeznek peroxid- és szuperoxid gyökök. Ezeket a sejtek a saját antioxidánsaikkal hatástalanítják. Bizonyos helyzetekben (például stressz, betegség) a szabad gyökök száma megnő, és a szervezet igyekszik elegendő antioxidáns termeléssel ezeket kivédeni (Miller és mtsai., 1993).

Munkánk jelentőségét, újszerűségét az adja, hogy az Amaryllidaceae szövettenyészetek antioxidáns kapacitását kevéssé ismerjük. Ráadásul, a *Sternbergia lutea* esetében olyan korábbi tanulmányról, amelyben stabil, növényregenerálásra képes embriogén kallusztenyészetek előállításáról számolnak be, nincs tudomásunk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A növényi *in vitro* tenyészetek és jelentőségük az alap- és az alkalmazott kutatásokban

A növényi szövettenyésztési eljárások magukba foglalják a kallusz, a sejtszuspenziós és a protoplaszt tenyészeteket, illetve az *in vitro* növényregenerálási és mikropropagációs eljárásokat is. Amikor a növényből sejttenyészetet létesítünk, osztódó, még nem differenciálódott (proembriókból, kambális és merisztéma) szöveteket tartalmazó izolátumokat célszerű táptalajra helyezni. A szövettenyésztési eljárás azon az elven alapul, hogy megfelelő körülmények között minden növényi sejt képes dedifferenciálódás során totipotenssé válni, és differenciálatlan sejtömeget, kalluszt létrehozni (Dudits és Heszky, 2003). A kalluszosodás természetes és szintetikus hormonokkal, citokininekkel, auxinokkal indukálható. A szilárd táptalajra izolált inokulumokból (explantátumokból) a növény olyan része, amely merisztéma-,

kambiális, parenchima-szövetet tartalmaz) fejlődő kallusz többszöri átoltással folyamatosan fenntartható és szaporítható. A sejtek differenciálódásának indukciója szintén lehetséges *in vitro*, ezt nevezzük redifferenciálódásnak, mely folyamat eredménye lesz a növényregeneráció (Dudits és Heszky, 2003).

A növényi szövettenyésztési eljárások költsége viszonylag alacsony. Ivaros úton nehezen szaporítható növények tömegesen állíthatók elő a mikroszaporítás segítségével. A növényi szövettenyészetek alkalmasak pollen-inkompatibilitás megkerülésére, transzgénikus növények előállítására, genetikai variabilitás indukciójára (szomaklonális variabilitás), fajok, fajták konzerválására (mélyfagyasztott sejtenyészetek és embriókultúrák), másodlagos anyagcseretermékek (pl. gyógyszerek, gyógyhatású anyagok) termelésére (sejtszuspenziós tenyészetekben), illetve merisztématenyészetek segítségével vírusmentes növények előállítására (Dudits és Heszky, 2003).

A *Sternbergia lutea* fajt nem csak védett növényként, hanem gyógynövényként is számon tartják. Olyan anyagokat tartalmaz, amiket a modern orvostudomány is felhasznál a gyógyításban, például az Alzheimer-kór, csontritkulás, immunrendszeri betegségek kezelésében (Orhan és mtsai, 2011). A *Sternbergia* nemzetségben domináns a likorin alkaloid, emellett tartalmaz galantamint és más azonos kémiai vázú anyagokat, amik az *Amaryllidaceae* család alkaloidjaira jellemzőek, *hemantamin*, *nartazin* (Orhan és mtsai, 2011). Az *Amaryllidaceae* családba tartozik a tavaszi (*Leucojum vernum*) és a nyári tűzike (*Leucojum aestivum*), melyek szintén tartalmazzák ezeket az alkaloidokat. A *L. vernum in vitro* tenyésztése során különböző növényi növekedést szabályozó hormonokkal vizsgálták, hogy melyik alkalmasabb stabil szövettenyészet létrehozására. Az embriók fejlődését leginkább benzil-amino-purin (BA) és α -naftil-ecetsav (NAA) jelenlétében figyelhették meg (Ptak, 2009). A nyári tűzike morfogenezise szomatikus embriogenezis útján mehet végbe és az alkaloid felhalmozódását auxinok segítségével befolyásolták, így lehetőség nyílt a galantamin nevű anyag alternatív előállítására, amelyet az Alzheimer-kór tüneti kezelésére használnak fel az orvostudományban. A galantamint az *in vitro* tenyésztés által létrehozott kalluszokból mutattak ki, melynek a táptalaja 2,4-D (25, 50 μ M), picloram (25 μ M), és dicamba (50 μ M) hormonokat tartalmazott (Ptak és mtsai, 2013).

2.2. Természetvédelmi vonatkozások

A természetvédelem célja a bioszféra állapotának, működőképességének, biodiverzitásának (biológiai sokféleségének), valamint ezzel összefüggésben az élőhelyeknek és a természeti tájnak a megőrzése, károsodásainak megelőzése, mérséklése vagy elhárítása. A tudomány és a közvélemény felismerte, hogy ma a kihalások korát éljük: a kipusztulás mértéke példa nélküli. Az emberi tevékenység hatására olyan élőlénytársulások szűnnek meg, amelyek kialakulásához évmilliókra volt szükség. Magyarország az élőhelyek sokféleségének megőrzése szempontjából középúton halad. Az őszi vetővirág (*Sternbergia lutea*) leginkább sziklás lejtőkön, mezsgyéken, valamint az ún. *garrigue* növényzetben, másnéven a mediterrán mészkőfennsíkok nem összefüggő, másodlagos cserjéseiben fordul elő. A napos élőhelyet, a jó vízgazdálkodású, nem túl agyagos talajt kedveli. A vetővirág nemzetség magyarországi képviselője az apró vetővirág (*Sternbergia colchiciflora*), ami védett növénynek számít. Természetvédelmi értéke 10.000 forint. Hazánkban a Dunántúli-középhegységben és a Tiszántúl déli részén fordul elő, a legnagyobb mennyiségben a Csanádi-pusztákon található meg. Régen az Alföldön is előfordult, de ezek a termőhelyek gyakorlatilag teljesen megszűntek. A tavaszi tözike (*Leucojum vernalis*) eredeti elterjedési területe a Pireneusoktól Belgiumig, keletre pedig, egészen Ukrajnáig tart. Közép-Európában is őshonos, a Magas-Alpok kivételével. Más kontinensekre is betelepítették. Természetvédelmi értéke: 2000 forint. A nyári tözike (*Leucojum aestivum*) elterjedési területe Dél- és Délkelet-Európában nedves réteken, de Közép-Európában csak meghonosodva él. Magyarországon főleg a Dunántúlon illetve az Alföld egyes részein fordul elő (Schönfelder, 2001).

2.3 Vetővirág és tözike fajok szövettenyésztése és ezek fontossága a konzervációbiológiában, biotechnológiában

A konzervációbiológiában kiemelt figyelemben részesítik a veszélyeztetett, esetleg gazdaságilag jelentős fajok, fajták, genotípusok védelmét. Fokozottan tanulmányozzák a morfológiájukat, ökológiai igényüket, begyűjtik a szaporító képleteiket, mesterséges körülmények között tanulmányozzák a magok fertilitását, és mikroszaporítási eljárásokat

dolgoznak ki, hogy ritka fajok egyedszámát, és az általuk termelt főként gyógyászatban alkalmazott hatóanyagok hozamát növeljék.

Az amarilliszfélék (*Amaryllidaceae*) a spárgavirágúak (*Asparagales*) rendjébe tartozó növénycsalád. Gyakran mutatós virágú, évelő, lágyszárú, hagymás növények tartoznak ide. Számos nemzetséget kerti növényként termesztene, köztük: *Amaryllis*, amarillisz; *Galanthus*, hóvirág; *Leucojum*, tözike; *Sternbergia*, vetővirág; *Narcissus*, nárcisz. A legtöbb 20. századi rendszerezésben már előfordultak az amarilliszfélék (*Amaryllidaceae*). A 2003-as APG II-rendszer az *Amaryllidaceae*-t a monocots kládon belül a spárgavirágúakhoz, a hagymafélékhez (*Alliaceae*) sorolja (Fay 1996; Podani, 2003). A családon belül számos védett, ritka fajt tartanak számon, emiatt is fontos a szövettenyészetekben történő szaporításuk.

Az *Amaryllidaceae* család alkaloidjait gyógyászati célokra használják föl, melyeket a hagymából vagy a föld feletti hajtásból nyernek ki. Az amarilliszfélék alkaloidjai: galantamin, likorin, hemantamin, nartazin. Az eddigi vizsgálatok *Leucojum* és *Sternbergia* nemzetségek hagymáiból stabil szövettenyészet létrehozására terjedtek ki. A *S. fischeriana* hagymájából létrehozott kezdeti kallusz tenyészetet 4 mg l^{-1} BA és $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ NAA és 2 mg l^{-1} (2,4-D) hormonokkal kiegészített MS táptalajon nevelték a tenyészet indításakor. Ezen nagy számban regeneráltak hagymákat (több mint 80 hagyma/explantátum) (Mirici, 2005). A vetővirág genus esetében folytak elsődleges vizsgálatok antioxidáns tartalom tekintetében. Ezek a vizsgálatok csak natív (természetes környezetben előforduló) növényeken történtek meg, szövettenyészetekben nem. Az első mérési eredmények a *Sternbergia fischeriana* faj vizsgálatából származnak. A *S. lutea*, *S. fischeriana* esetében alacsony antioxidáns aktivitás figyelhető meg, amelyről feltételezhető, hogy kapcsolatban áll a teljes fenol és flavonoid alacsony tartalmával. Az antioxidáns tartalmú gyógynövényeket általában kapcsolatba hozzák a fenol tartalommal (Ilkay, 2011). A növényregenerálási kísérletek során *L. aestivum in vitro* kultúrában a hagymából MS* táptalajon figyelték meg a növényi növekedés szabályozását különböző auxin/citokinin arány változtatásával. A legjobb eredmény $10 \text{ NAA mg l}^{-1} + 0,5 \text{ BA mg l}^{-1}$ hormonos MS* táptalajon érték el, amin kifejlődött hagymákat és gyökereket hoztak létre (Diop, 2007). A *L. aestivum* fiatal terméséből létrehozott kezdeti kallusz tenyészetet 4 mg l^{-1} 2,4-D és 2 mg l^{-1} BA hormonokkal kiegészített MS táptalajon nevelték, majd 1.15 mg l^{-1} NAA és 2.0 mg l^{-1} BA hormon összetételű MS táptalajra helyezték. Az így kapott hajtáskezdeményekből igyekeztek kinyerni a felhalmozódott galantamint, amely az acetilkolinészteráz gátló hatás mellett, hatékony antioxidáns. Körülbelül nyolcvan hajtástenyészetből voltak képesek kinyerni 2.5 mg l^{-1} . A kísérlet bizonyította, hogy a

mesterséges körülmények között nevelt tenyészetekből is lehetséges a gyógyászatban használatos alkaloidot kinyerni (Pavlov és mtsai, 2004.).

A *L. vernum* esetében a növényi növekedés sebességének a szabályozását figyelték meg az citokinin-auxin hormonok arányának változtatásával. Ha ezekhez abszcizinsavat (ABA) adtak kombinálva polietilén-glikollal (PEG), akkor a szomatikus embrió érését stimulálták. ABA és NAA jelenlétében a növényből torpedó-állapotú embriók fejlődtek (Ptak, 2009).

A fentiekben említett vadon élő, többnyire veszélyeztetett *Sternbergia* és *Leucojum* fajok szövettenyésztése kettős jelentőségű: (i) a genotípusok konzerválását szolgálja, *in vitro* szövetbankok létrehozásával; (ii) Amaryllidaceae alkaloidok és potenciálisan, egyéb gyógyhatású metabolitok termelésére alkalmasak lehetnek.

2.4 Az antioxidánsok

Az antioxidánsok az élő szervezetben, táplálékban előforduló természetes vagy szintetikus vegyületek. A sejtekben természetes körülmények között lejátszódó biokémiai folyamatok, jellemzően az oxidációs folyamatok során keletkeznek szabadgyökök, amelyek egy bizonyos részének fontos szerepe van a szervezet normális működésének fenntartásában, többek között a sejtciklus szabályozásában, a sejt metabolizmusában, illetve a szervezet védekező mechanizmusában (Davies, 2000). A szabadgyökök olyan reaktív oxigén-, nitrogén-, kén- vagy szénközpontú molekulák, illetve molekularészletek, amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ezért rendkívül agresszívak és rövid életidejűek, hiszen nagyon gyorsan kémiai reakcióba lépnek más vegyületekkel elektronszerzés céljából (Cadenas, 1989). Jelen munkában, a szövettenyészetek vizsgálatai során különböző módszerekkel határoztuk meg az antioxidáns kapacitást. Az enzimatisz antioxidáns kapacitást a katalázok és a peroxidázok natív poliakrilamid gélelektroforézisével, a szabadgyököket semlegesítő kapacitást az ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyökök gátlásának meghatározásával mértük, valamint a teljes polifenol tartalmat is meghatároztuk.

2.5 Hatóanyag tartalom

Az amarilliszfélék hagymáiból nyert alkaloidok: galantamin, likorin, hemantamin, nartazin. Ezen hatóanyagok felhasználása: a galantamin alkaloid acetilkolineszteráz gátló hatással rendelkezik. Használják például kóros izomgyengeség kezelésére, a curare-vegyület hatása következtében fellépő izomernyedség megszüntetésére, gyomor, bél, hólyagrenyheség ellen, valamint műtéteknél. Manapság kedvező hatását tapasztalják az Alzheimer-kór gyógyítása terén (Heinrich és Teoh, 2004). Az *Amarillydaceae* család fajaiból kinyerhető hatóanyagok számos gyógyászati területen használatosak. Ezeknek a többségükben védett fajoknak a tenyésztése *in vitro* körülmények között ezért elengedhetetlenül fontos a tudomány és az emberiség számára.

3. Anyag és módszer

3.1 A szövettenyésztetek indukciója

A növények explantátumait felületi sterilizálásnak vetettük alá. Ezeket csapvízzel történő átöblítést követően 30 percig Domestos háztartási fertőtlenítőszer 10%-os oldatába áztattuk, majd három alkalommal tíz percig steril desztillált vízzel átmostuk. Ezt követően a hagymáról levágtuk a levelet és a gyökeret, majd a szövetdarabkák különböző arányban és koncentrációban alkalmazott, növényi hormon tartalmú táptalajra tettük.

1. Táblázat Szövettenyésztéshez felhasznált növényeink

	Őszi vetővirág (<i>Sternbergia lutea</i>)	Nyári tűzike (<i>Leucojum aestivum</i>)	Tavaszi tűzike (<i>Leucojum vernalis</i>)
Származás	Albánia	Bereg síkság, Márokpapi határnál	Magosliget/ DE Botanikus kert
Szövettenyésztet indítása	2013. 10. 10.	2012	2013. 03. 04. / 2014.03.06.
Növényi rész	hagyma	hagyma	hagyma
Táptalaj típusok	10NAA mg l ⁻¹ 2NAA mg l ⁻¹ 2NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹ 5NAA mg l ⁻¹ MS*	10NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹ 2NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹	2NAA mg l ⁻¹ MS* 5NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹ 2NAA mg l ⁻¹ + 2IBA mg l ⁻¹

A tenyészeteket 14/10 óra fény/sötét és 22+–20°C/18+–20°C fény- és hőmérséklet-perióduson neveltük hőlég-sterilizett petricsészékben.

3.2 Antioxidáns mérés módszerei

3.2.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A natív PAGE fehérjék elválasztására szolgáló eljárás. Ennek során igyekszünk olyan körülmények közepette elválasztani a fehérjét, hogy azok megtartsák natív térszerkezetüket.

Minta előkészítés:

1. Lemérem a kallusz/növény/minta nedves tömegét egy tiszta eppendorfcsőbe
2. Analitikai mérlegen kimérem a PVP-t és hozzáadom.(a polivinil-pirrolidon: mesterségesen előállított anyag, amelyet a szervezet nem vesz fel. Vízen és alkoholban oldódik. A vegyület kémiai szerkezetéből adódóan a polivinil-pirrolidon más molekulákat szorosan magához köt; ezért elsősorban aromák és vitaminok hordozó anyagként alkalmazzák. Esetünkben a fenolokat köti meg).
3. Hozzáadtuk a proteáz kivonó puffert, benne a PMSF-el. (Phenylmethylsulfonyl fluoride : szerin proteáz inhibitor, a szerin proteázok fehérje hasító képességgel rendelkeznek)
4. Jégben tartott eppendorfcövet használtunk a továbbiakban
5. Dörzsölés kvarchomokkal és üvegbottal
6. Vortex 1min.(rázatás, sejtek felnyíljanak)
7. Folyékony nitrogénben fagyasztás
8. Lecentrifugálás 12.000 rpm 10 min.
9. Lepipettáztuk egy tiszta eppendorfba a felülúszót
- 10.-20 °C- on 1 hétig eláll és újrahasználható

A növényi minta elkészítése után összeállítottuk a futtató gél, amire felvittük a növényi mintáinkat. A mintákból 10-10 µl-t vettünk ki, amikhez 10-10 µl mintapuffert adtunk.

3. Táblázat Gélöntés

	Szeparáló/alsó gél	Gyűjtő/felső gél
H ₂ O	5,92 ml	2,736 ml
Tris-HCl puffer	3 ml (1,5 M; pH 8,8)	1, 25 ml (0,5 M; pH 6,8)
Akrilamid (30%-os)	3 ml	0, 95 ml
TEMED	12 µl	12,5 µl
	Vákuum (5 perc)	
APS (10%-os)	60 µl	22 µl

Gélmosás:

4. Táblázat Peroxidáz gél mosása és festés folyamata:

	Guaiacol festés	Pirogallol fetés
1.lépés	Bidesztillált víz (15 min.)	50 mM-os K ₂ HPO ₄ /K ₂ HPO ₄ puffer; pH 7,5 (1h)
2.lépés	50 ml 0,1 M Na-acetát puffer pH 5,1 (15 min.)	50 mM-os 50 mM-os K ₂ HPO ₄ /K ₂ HPO ₄ puffer; pH 7,5; 49 ml (15 min.)
3.lépés	50 µl + H ₂ O ₂ 30%	25 µl + H ₂ O ₂ 30%
4.lépés	+ 10 µl guaiacol oldat	+ 1 ml vízben feloldva 0, 126g pirogallol

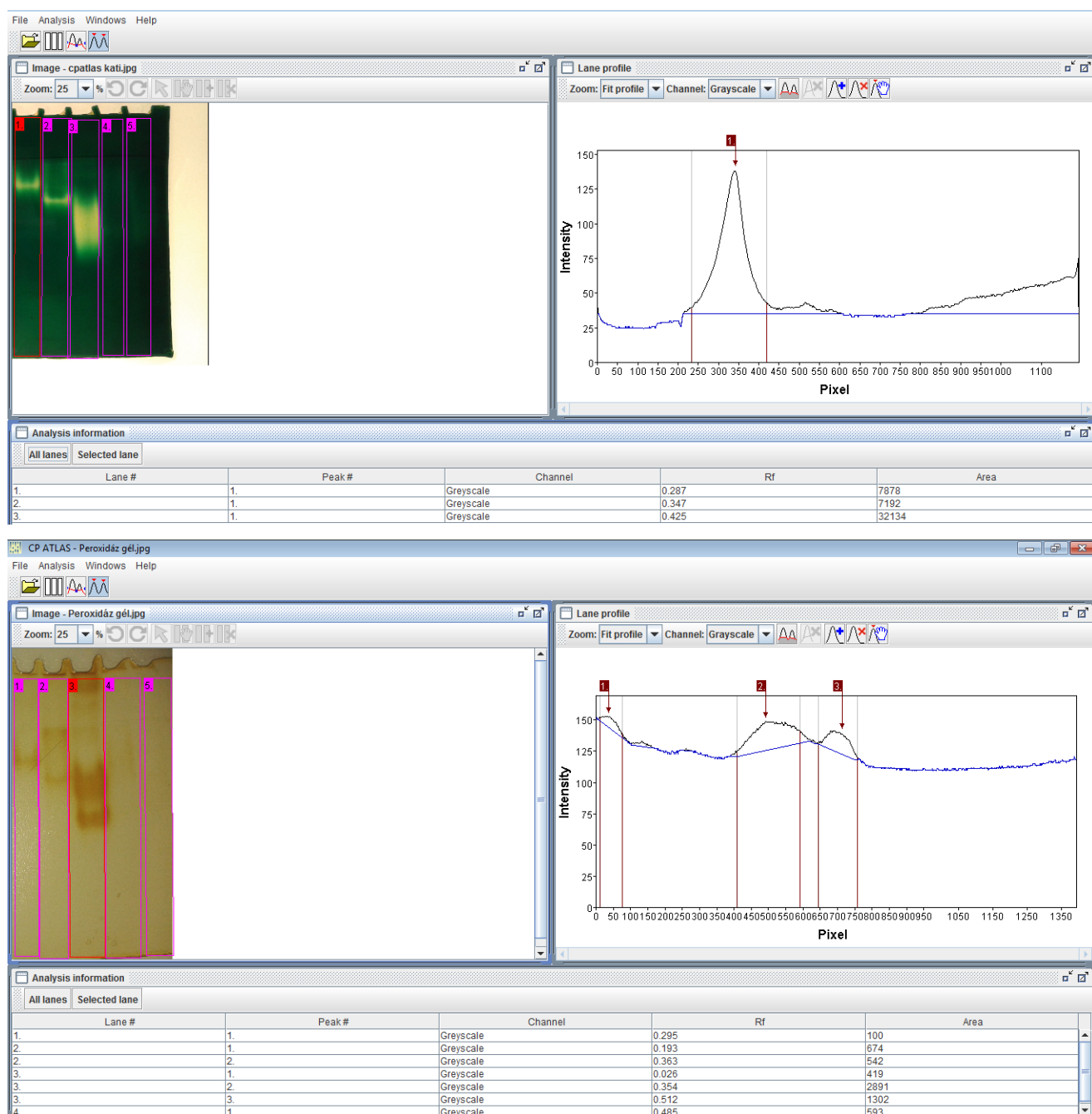
5. Táblázat Kataláz gél mosás és festés folyamata

1. lépés	50 ml bidesztillált víz + 50 µl H ₂ O ₂ 30%	15 min. ;mosás
2. lépés	0, 25g K ₃ FeCN ₆ + 25 ml víz (ráönteni)	lepipettázni
3. lépés	0,4165g FeCl ₃ +H ₂ O ₂ + 25 ml víz (ráönteni)	kb 15 min. kevergetés

3.2.2. A natív gélek kiértékelése

A kapott zimogramok kiértékeléséhez CPAtlas gél elemző szoftvert, az adatok ábrázolásához Microsoft Office Excel 2007 és Systat Sigma Plot 10.0 programokat használtunk

(4.,5.,6.,7.,8. ábra). A CPAtlas programot a zimogramokon megjelent sávok (izoenzimek) területének meghatározására, így azok aktivitásának jellemzésére használtuk (1.ábra).



1.ábra Poliakrilamid gélelektroforézis kiértékelése CP Atlas program segítségével

3.2.3.Összes polifenol- tartalom mérése

Mintaelőkészítés:

- 25mg száraz (liofilizált) kallusz, növényi rész porítása dörzsmozsárban
- extrahálás: 1ml 30%-os metanolban 70°C-on 15 min. melegítés
- sejtfeltáró 1min.
- hűtés, szobahőmérsékletre (23 °C)
- centrifugálás 13.000 rpm 3min.
- felülúszó lepipettázása tiszta eppendorfba (700µl)
- ebből mérem ki a szükséges mennyiséget a további kísérletekhez
- a minta fagyasztoóban 1-2 hétig tárolható

Reagensek

- 30%-os metanol (metanol+bidesztillált víz)
- Folin- Ciocalteu elegy (8x-ára hígítva)
- Na₂CO₃ oldat (7,42g 100ml ioncserélt vízben való feloldása)
- galluszsav oldat (5,1 mg 10ml-es 30%-os metanolban hígítva, majd ezt 10x-ére hígítani 30%-os metanollal)
- ezeket a reagenseket frissen állítom össze, de szükség esetén egy hétig hűtőben lehet tárolni

6. Táblázat összes polifenol- tartalom meghatározásához szükséges reagens sor

Sorozat	F-C elegy (µl)	MeOH (µl)	Galluszsav (µl)	Na ₂ CO ₃ oldat (µl)
1.	312,5	62,5	-	250
2.	312,5	50	12,5	250
3.	312,5	37,5	25	250
4.	312,5	25	37,5	250
5.	312,5	12,5	50	250
6.	312,5	-	62,5	250
7.	312,5	50	12,5 µl növényi minta	250

Mérés fotométerrel (SHIMADZU UV-1601 típusú spektrofotométerrel), 720nm-en, a vak az a reagens, amelyikben nem található galluszsav.

3.2.3. ABTS* kation inhibíciójának vizsgálata

A kísérlet során 25 mg növényi mintát porítottunk, majd extraháltuk (1 ml 30%-os metanolban 70 °C-on) 15 percig. Utána sejtfeltárával 1 percig rázattuk, lehűtöttük és 13000 rpm-en 3percig centrifugáltuk. A felülúszót tiszta eppendorfba lepipettáztuk (700 µl), ebből kimértük a szükséges mennyiséget a további kísérletekhez. A mintákat 1-2 hétig lehet fagyasztoóban tárolni (Singleton, 1965; Grube 2005).

Aszkorbinsav (AA) oldatot állítottunk össze. 3,2 mM AA oldatot készítettünk 30%-os metanollal. Kimértünk 11,2mg AA-t és 20ml 30% metanolban oldottunk.

2,6 ml bidesztillált vízben feloldottunk 10 mg ABTS-t ehhez 1,72 mg K-perszulfátot adtunk. Tiszta MeOH-val hígítjuk, hogy az abszorbancia 0,7 körül legyen. 734 nm-en detektálunk metanollal szemben. 6 perces méréseket végeztünk. Annyi mintát adagoltunk a 2,5 ml ABTS oldathoz, hogy a gátlási % értéke 20-80 % között alakuljon.

A vak oldat a tiszta metanol, majd az első minta 1 ml hígított ABTS (aminek az abszorbanciája 0,7 körüli). Utána lemérjük az összeállított AA standart sort.

-40 µM 50 µl AA+50 µl 30%MEOH

-20 µM 25µl AA+75 µl 30%MEOH

-10 µM 12,5µl AA+88 µl 30%MEOH

-5 µM 6 µl AA+94 µl 30%MEOH

Ezekből 25-25 µl-t adtunk az 1 ml hígított ABTS-hez és 6 perces méréseket végeztünk (6 percig inkubáltuk a növényi mintákat ABTS-ben, ezt követően fotometráltuk). Az előre elkészített növényi mintáinkból is 25-25 µl-t adunk az 1 ml hígított ABTS-hez és szintén 6 perces méréseket végeztünk.

3.2.4. DPPH* inhibíciójának vizsgálata

A minták előkészítése és tárolása, valamint az AA standard oldatok előállítása ugyanúgy történt, mint az ABTS* kation inhibíció vizsgálata során.

0,01 g DPPH-t oldottunk 25 ml spektroszkópiás (HPLC) MeOH-ban (tiszta metanol), ebből hígítottunk, hogy az abszorbancia $0,900 \pm 0,015$ legyen. 515 nm-en detektálnuk MeOH-lal szemben.

6 perces méréseket végeztünk. Annyi mintát adagolunk a 2,5 ml DPPH oldathoz, hogy a gátlási % értéke 20-80 % között alakuljon.

A vak oldat a tiszta metanol, majd az első minta 1 ml hígított DPPH (aminek az abszorbanciája 0,9 körüli). Utána lemérjük az összeállított AA standart sort.

-40 μM 50 μl AA+50 μl 30%MEOH

-20 μM 25 μl AA+75 μl 30%MEOH

-10 μM 12,5 μl AA+88 μl 30%MEOH

-5 μM 6 μl AA+94 μl 30%MEOH

Ezekből 25-25 μl -t adtunk az 1 ml hígított DPPH-hoz és 6 perces méréseket végeztünk. Az előre elkészített növényi mintáinkból is 25-25 μl -t adunk az 1 ml hígított DPPH-hoz és szintén 6 perces méréseket végeztünk.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1 Stabil kalluszcsonal és hajtásfenyészeti előállítás

Stabil kalluszcsonalakat tudtunk előállítani *S. lutea*, illetve *L. aestivum*ból.

Az őszi vetővirág (*Sternbergia lutea*) hagymából 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA, 5 mg l⁻¹ NAA, 10 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA és 2 mg l⁻¹ NAA hormon összetételű MS* táptalajon indítottunk el szövetfenyészeti. 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajokon a kalluszc megjelenése volt megfigyelhető és ezen értük el a kalluszc gyors növekedését (1. ábra g). Gyökér- és levél kezdemények létrehozását is megkíséreltük, ami sikeresen létrejött 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA típusú hormonos táptalajon (1. ábra g és h). Ha a hagyma explantátumokat MS* típusú táptalajra tettük, ami nem tartalmaz növekedést serkentő hormonokat, akkor a szövetfenyészeti bulbusain gyökérképződést figyeltünk meg. A *S. lutea* szövetfenyészteséről gyakorlatilag nem találtunk korábbi irodalmi adatokat. Kijelenthetjük, hogy ebben a fajban elsők között sikerült növényregenerálásra képes embriogén kalluszcfenyészeti előállítanunk.

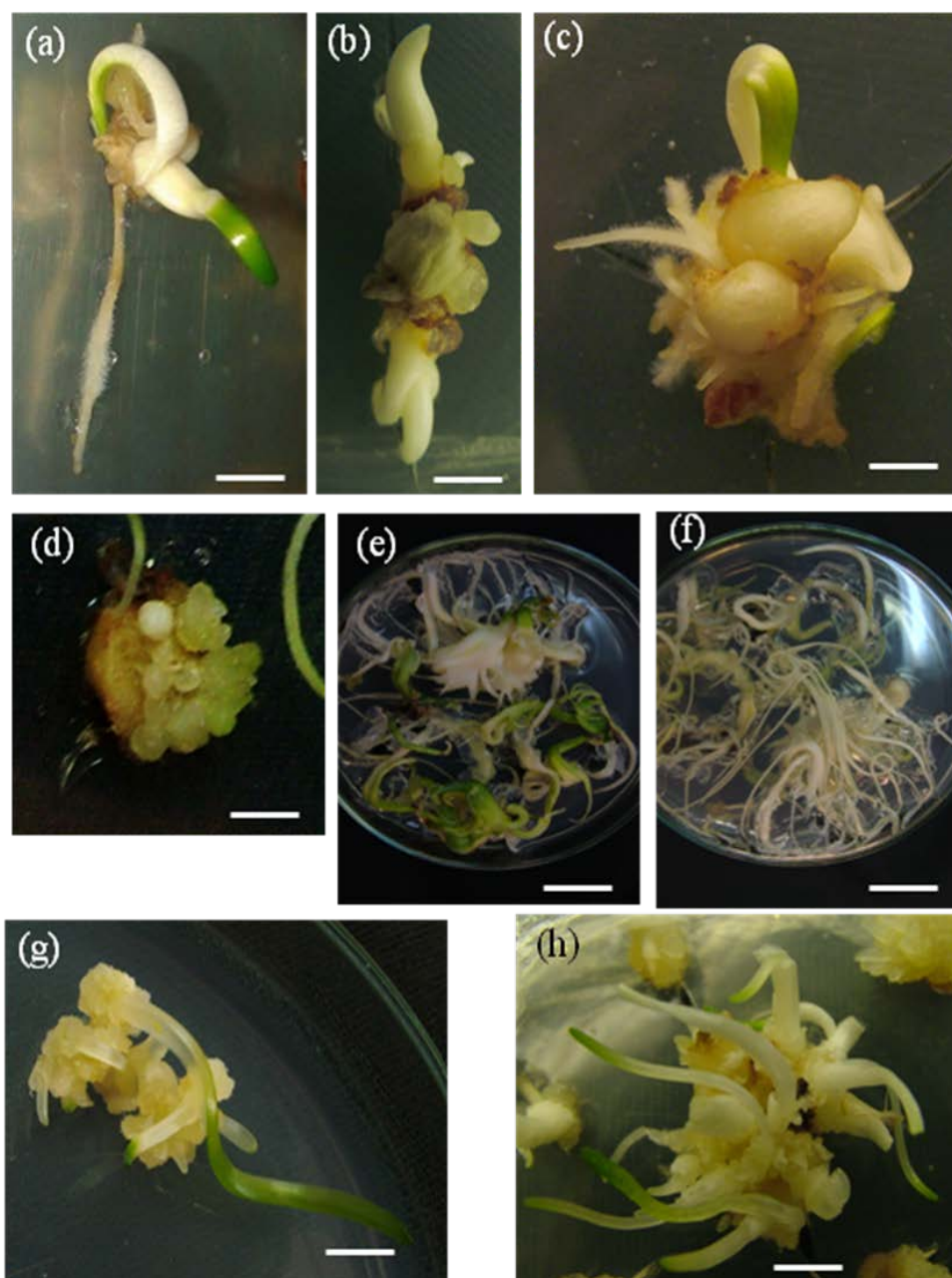
A *L. vernum* esetében az *in vitro* fenyészeti létrehozását 10 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA és 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA típusú táptalajon indítottuk el szintén a növény hagymájából. 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajokon a hajtások, azokon hagymák megjelenését figyeltük meg. A fiatal hajtásokat áthelyeztük 2 mg l⁻¹ NAA 2 mg l⁻¹ IBA növekedést serkentő hormon összetételű táptalajra, amelyen a hagymák tovább növekedtek és gyökerek differenciálódtak (1. ábra a és c). Ptak a tavaszi tözike növény növekedés szabályozási kísérletében a legjobb

eredményt úgy érte el, ha a kalluszokat abszcizinsavval és polietilén-glikollal befolyásolta, így torpedó-állapotú embriókat hozott létre (Ptak, 2009).

A nyári tűzike (*L. aestivum*) hagymájából 2 mg l⁻¹ NAA, 5 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA és 10 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA hormon összetételű MS* táptalajokon indítottunk el növényregenerálási kísérletet. A kallusz mellett a gyökérzet kialakulását is meg lehetett figyelni 2 mg l⁻¹ NAA tartalmú táptalajon. (1. ábra d, e, f). Sok szövetenyésztési kísérletet indítottak *L. aestivum*mal, ahol az auxin/ citokinin arány változtatásával befolyásolták a tenyészetek morfogenezisét. MS* táptalajon indították el a szövetenyésztést, majd 10 µM pikloram és 0,5 µM BA segítségével kalluszokat fejlesztettek. 10 µM NAA és 0,5 µM BA arány mellett hagymákat és gyökereket is produkáltak a kalluszok (Diop, 2007). Az ő esetükben is a legjobb eredményeket magas NAA koncentráció jelenlétében figyelték meg, az *in vitro* tenyészetben a növény növekedését leginkább az α-naftilecetsav befolyásolta.

7. Táblázat Stabil kallusz vonal kialakítása és növényi szervek regenerálása

Növény	Stabil kallusz vonal kialakulása	Hajtás	Hajtás + gyökér
<i>Sternbergia lutea</i> (őszvi vetővirág)	2NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹	2NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹	2NAA mg l ⁻¹ + 1BA mg l ⁻¹ , MS*
<i>Leucojum vernum</i> (tavaszi tűzike)	-	2NAA mg l ⁻¹ + 2IBA mg l ⁻¹	2 NAA mg l ⁻¹ + 2 IBA mg l ⁻¹
<i>Leucojum aestivum</i> (nyári tűzike)	2NAA mg l ⁻¹	2NAA mg l ⁻¹	2NAA mg l ⁻¹



2. ábra

2. ábra. Néhány jellegzetes *Leucojum* és *Sternbergia lutea* tenyészet. (a) *L. vernum* regenerált növény 2 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA tartalmú táptalajon; (b) *L. vernum*, hajtásmultiplikáció 1 mg l^{-1} NAA mellett; (c) *L. vernum*, növényregenerálás 2 mg l^{-1} NAA + 2 mg l^{-1} IBA tartalmú táptalajon; (d) *L. aestivum*, embriogén kallusz fejlődése 2 mg l^{-1} NAA mellett; (e) *L. aestivum*, növényregenerálás embriogén kalluszokból (2 mg l^{-1} NAA) és (f) a regenerált növények gyökérzete; *Sternbergia lutea* embriogén kalluszon regeneráló hajtások 2 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA (g) és 5 mg l^{-1} NAA + 1 mg l^{-1} BA (h) tartalmú táptalajokon. Skálák: $500 \text{ }\mu\text{m}$ (a-d, g, h) és 2 mm (e, f)

4.2 Növényregenerálási kísérletek

A növényregenerálási kísérleteink során *in vitro* hagymát tudtunk létrehozni (2. ábra a,b, c, e, g, h) és gyökérképzést indukálni a már meglévő kalluszainkon növekvő hajtásainkból. A kalluszokat továbbtenyésztve azt tapasztaltuk, hogy amennyiben az auxin (NAA) mellett a táptalaj citokinint (BA) is tartalmazott, hajtáskezdemények fejlődtek. Ez a jelenség akkor is megfigyelhető volt, ha egyébként az auxin/citokinin arány magas volt (2. ábra). A magas auxin/citokinin arány általában a gyökérképződésnek kedvez (Dudits és Heszky, 2003). A *L. aestivum* esetében az auxin önmagában is elegendő volt a hajtásképzéshez (2. e ábra). Ennek valószínű oka, hogy a tenyésztett szövet magas endogén citokinin tartalommal rendelkezett. Az őszi vetővirág (*Sternbergia lutea*) növényregenerálási kísérleténél megfigyelhető volt a 2 mg l^{-1} NAA 1 mg l^{-1} BA hormon összetételű MS* táptalajon a kalluszok további növekedése. A kalluszokon intakt, zöld hajtások jelentek meg (2. ábra g), amit stabilan fent lehetett tartani ezzel a hormonkombinációval, illetve azok növekedése és multiplikációja is stabilizálódott. A *S. lutea* esetében ez a táptalaj típus volt a legkedvezőbb a *bulbusok* kifejlődéséhez, illetve azok későbbi növekedéséhez és fejlődéséhez. Tapasztalataink alapján, ha az auxin hormon arányát megemeljük 5 mg l^{-1} NAA 1 mg l^{-1} BA, akkor még több hagyma képződik a kalluszokból, illetve azokon hajtás is megjelenik. (2. ábra h). A tavaszi tözike (*L. vernum*) esetén azt tapasztaltuk, hogy miután biztonsággal tudtunk hajtásindukciót létrehozni, más hormonkombinációkat alkalmazva, 2 mg l^{-1} NAA 2 mg l^{-1} IBA tartalmú táptalajon megindult a hagymaképzés. (2. a, b, c ábra). Ezen a hormonösszetételű táptalajon tudtuk a legtöbb hagymát reprodukálni. Ezen a táptalajon figyelhettük meg a gyökér kialakulását is a szövettenyésztésünkben. (2. ábra a)

A nyári tözike növényregenerálási kísérletet több típusú hormonos táptalajon indítottuk el, amiken végül stabil kallusz-vonalakat tudtunk előállítani. Azt tapasztaltuk, hogy ha megnöveljük az auxin arányt 2 mg l^{-1} NAA és citokinint nem alkalmazunk mellé, akkor tömeges gyökérképződés alakul ki a kalluszok mellett (2. ábra e, f).

Tehát elmondhatjuk, hogy kísérletünk sikeres volt. Biztonsággal kijelenthetjük, hogy a növényregenerálási kísérletünk során sikeresen tudtunk kallusz-vonalat fenntartani, illetve egész növényeket, hajtásokat és hagymákat regenerálni.

4.3 Antioxidáns vizsgálatok eredményei

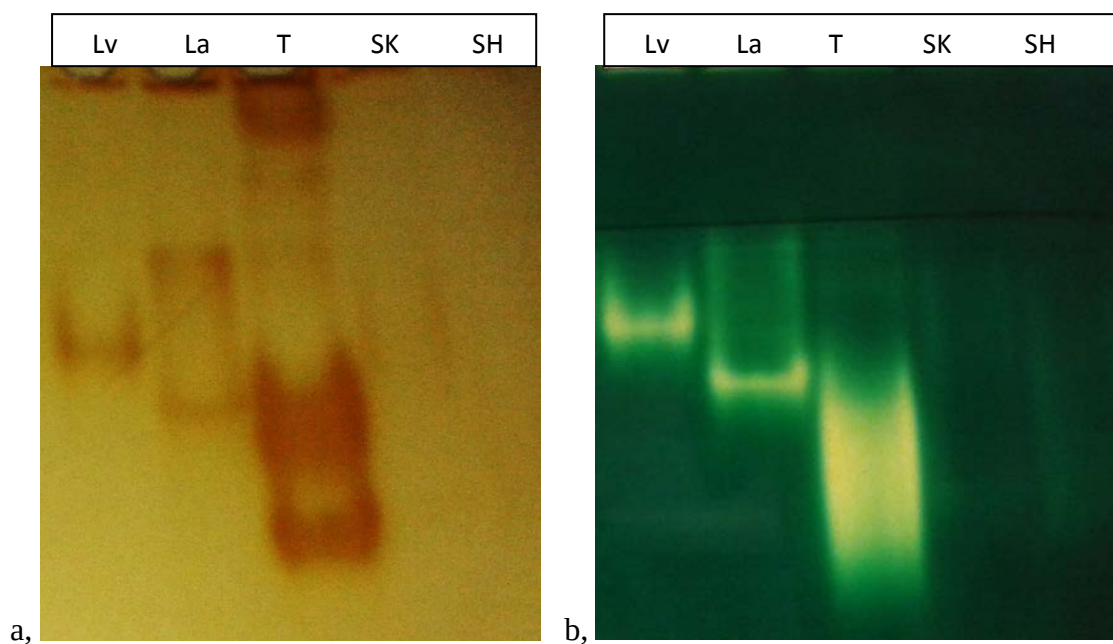
Enzimatis (poliakrilamid gélelektroforézis, kataláz, peroxidáz aktivitás gélek) antioxidáns meghatározást és szabadgyök semlegesítő kapacitás (ABTS*, DPPH* gátlás), valamint polifenol tartalom meghatározást alkalmaztunk a vizsgálataink során. A kataláz rendkívül elterjedt Fe-porfirin tartalmú enzim a növényi szövetekben. A sejtek kataláz tartalma elsősorban a peroxiszómákban és glioxiszómákban lokalizált, a kloroplasztisz nem tartalmaz katalázt. A kataláz funkciója a mérgező hidrogénperoxid bontása. A peroxidázok különböző H-donorokat (RH₂) képesek eloxidálni H₂O₂ vagy szerves peroxidok (ROOH) jelenlétében, közöttük különböző fenolokat is. A peroxidázoknak nagy szerepe van a ligninszintézisben (Láng, 2002). Az enzim meghatározása azon alapul, hogy a szubsztátumként használt pirogallol hatására narancsszínű purpurogallinná oxidálódik és a keletkezett festék mennyisége arányos az enzim aktivitásával. A polifenolok és általában a növényi fenolos vegyületek napjaink egyik legnépszerűbb, élelmiszerekkel és táplálkozás-élettannal kapcsolatos kutatási területét jelentik. A polifenolok ugyanakkor analitikai szempontból egy meglehetősen inhomogén, több ezer vegyületet magába foglaló csoportot jelentenek, melyek egyik fő tulajdonsága, hogy antioxidáns hatással rendelkeznek. Kimutatásukra szolgáló módszer, mely a gyakorlatban is elterjedt, a Singleton és Rossi módszerére épül (Singleton és Rossi 1965). A reakció a Folin-Ciocalteu elegy alkalmazására épít: az ebben lévő foszfowolframsav (H₃PW₁₂O₄₀) és foszfomolibdénsav (H₃PMo₁₂O₄₀) oxidálja a fenolos komponenseket, és a keletkezett kék elszíneződés arányos a fenolos vegyületek mennyiségével. Mintáink gyökfogó kapacitását az aszkorbinsavra vonatkoztatott ABTS és DPPH gyökfogó módszerekkel mértük meg. A stabil DPPH gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés Blois (1958) nevéhez fűződik. Az ABTS módszer Miller és munkatársai nevéhez fűzhető (1993). A reakció oxidáción alapszik, ha a mintában antioxidánsok vannak jelen, akkor a szabadgyökökkel reagálva a színintenzitás csökkenni fog, és a minta elszíntelenedik (Stratil és mtsai., 2007).

8. Táblázat Nem enzimatisz antiozidáns vizsgálati eredmények

Minta	összes polifenol (GAE, mg g ⁻¹ száraztömeg)	gátlási % ABTS	AA egyenérték mg ml ⁻¹	AA egyenérték μM	gátlási % DPPH	AA egyenérték mg ml ⁻¹	AA egyenérték μM
<i>Leucojum vernum</i> , mikroszaporított növény, 2 NAA mg l ⁻¹	6.5 ± 1.91	32.76 ± 1.61	1.05 ± 0.08	6 ± 0.5	5.82 ± 1.18	0.43 ± 0.09	2.47 ± 0.55
<i>Leucojum aestivum</i> , embriogén kalluszból származtatott hajtás 2 NAA mg l ⁻¹	12.67 ± 2.06	51.73 ± 7.89	1.82 ± 0.34	10.35 ± 1.96	8.03 ± 1.91	0.61 ± 0.16	3.51 ± 0.91
<i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2 NAA mg l ⁻¹ + 1 BA mg l ⁻¹	15.13 ± 1.7	80.1 ± 10.04	4.97 ± 0.59	28.03 ± 3.26	17.94 ± 3.9	1.6 ± 0.26	9.1 ± 1.5
<i>Sternbergia lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2 NAA mg l ⁻¹ + 1 BA mg l ⁻¹	16.65 ± 3.1	93.85 ± 1.54	5.5 ± 0.6	31.23 ± 0.34	35.33 ± 8.64	3.15 ± 0.73	17.93 ± 4.15

Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a *Sternbergia lutea* 2 mg l⁻¹ NAA+1 mg l⁻¹ BA-on regenerált hajtások bírnak a legmagasabb polifenol tartalommal. A vetővirág minták a *Leucojum* fajokhoz képest magasabb gyökfogó kapacitással bírnak, melyet mind az ABTS és DPPH módszer alátámasztott (4. táblázat). Az enzimaktivitás vizsgálataink azonban nem összehasonlíthatóak a mintáink gyökfogó kapacitásával, mert a peroxidáz és kataláz vizsgálatok során kevés aktivitás volt jellemző a *Sternbergia* fajok esetében a közönséges torma (*Armoracia rusticana*) illetve az apró békalencséből (*Lemna minor*) készített mintáinkkal

szemben. A tűzike fajok magasabb enzimaktivitást mutattak a *Sternbergia lutea* kallusz és regenerált hajtás mintától is (3. ábra).

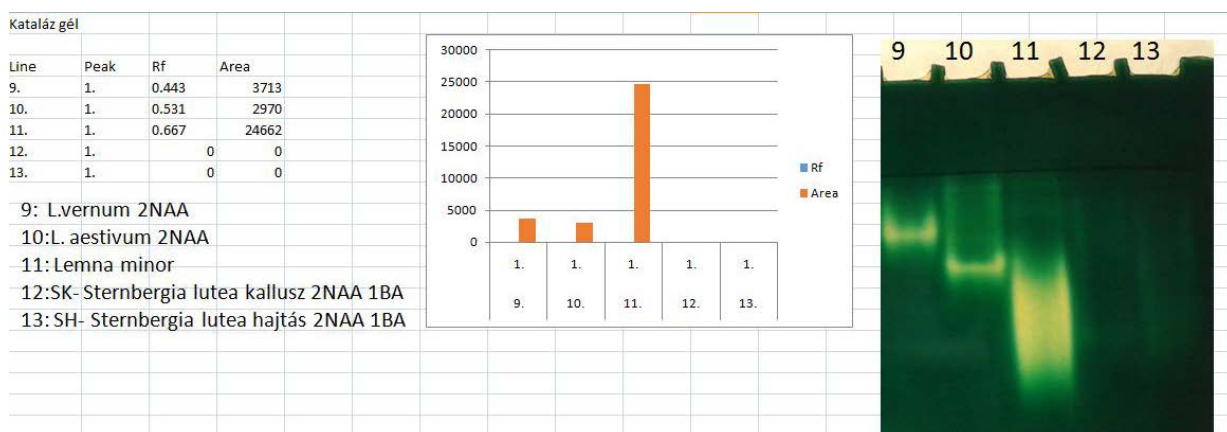


3.ábra Natív gélek, peroxidáz gél pirogallolfestés (a), kataláz gél (b)

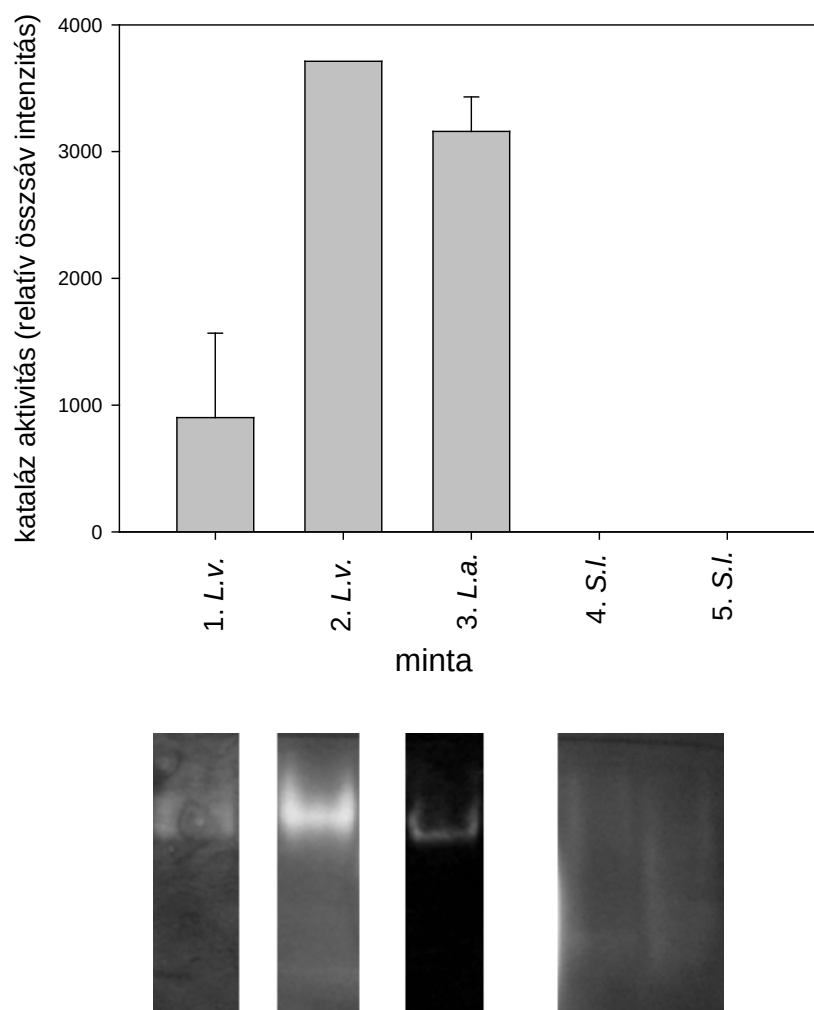
Lv: <i>Leucojum vernum</i> , mikroszaporított növény, 2 NAA mg l ⁻¹
La: <i>Leucojum aestivum</i> , embryogenic kalluszból származtatott hajtás, 2 NAA mg l ⁻¹
SK: <i>Sternbergia lutea</i> , embriogén kallusz, 2 NAA mg l ⁻¹ + 1 BA mg l ⁻¹
SH: <i>Sternbergia lutea</i> , szomatikus embrió eredetű regenerálódott hajtások, 2 NAA mg l ⁻¹ + 1 BA mg l ⁻¹



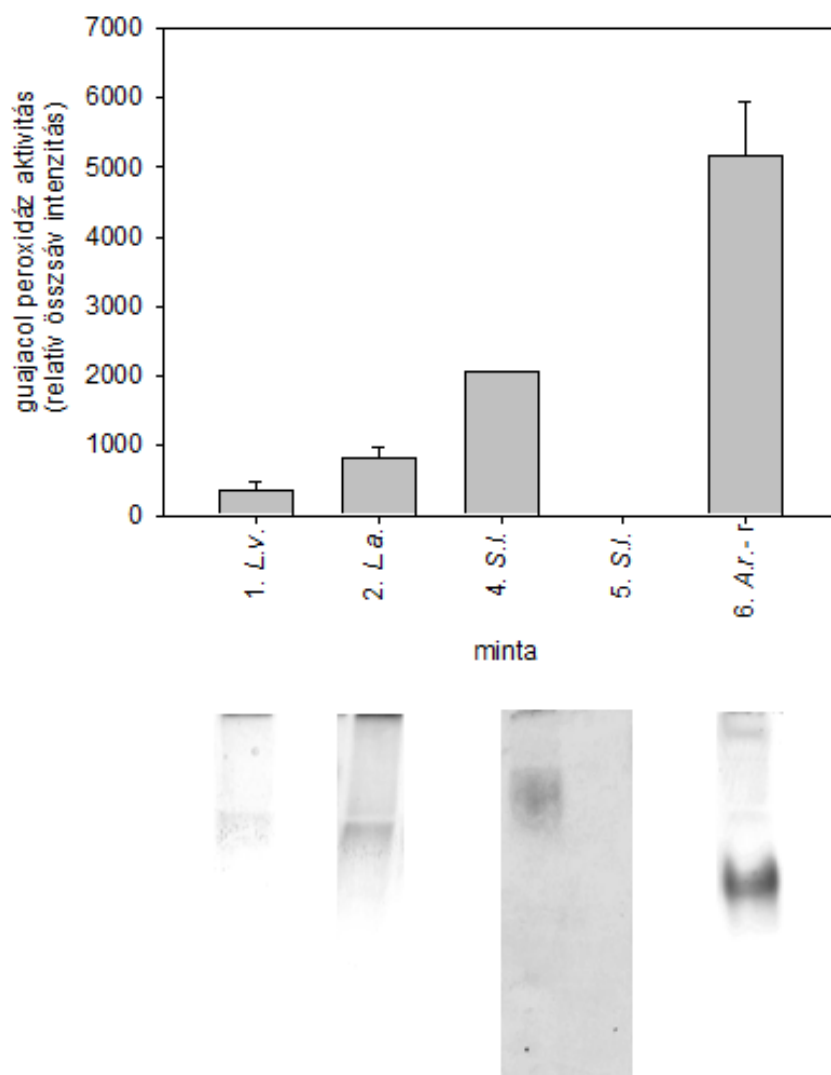
4. ábra. Peroxidáz gél pirogallol festés kiértékelése CPAtlas program segítségével és Microsoft Office Excel 2007 programmal



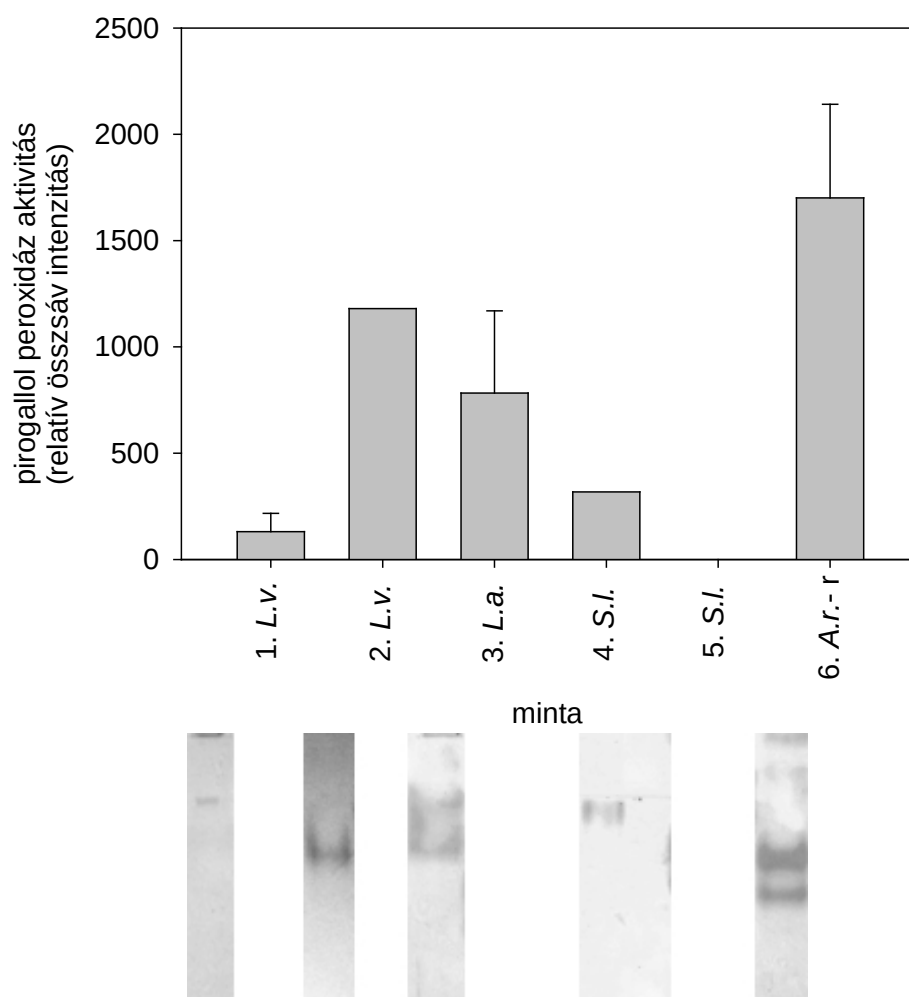
5. ábra. Kataláz gél kiértékelése CPAtlas program segítségével és Microsoft Office Excel 2007 programmal



6. ábra. *Sternbergia lutea*, *Leucojum aestivum* és *Leucojum vernum* szövettenyészetből készített minták kataláz aktivitásának relatív összcsáv intenzitása (a) és zimogramja (b)



7.ábra. *Sternbergia lutea*, *Leucojum aestivum* és *Leucojum vernum* szövettényészetből készített minták guajacol peroxidáz aktivitásának relatív össz-sáv intenzitása (a) és zimogramja (b)



8.ábra. *Sternbergia lutea*, *Leucojum aestivum* és *Leucojum vernum* szövettényészetből készített minták pirogallol peroxidáz aktivitásának relatív összcsáv intenzitása (a) és zimogramja (b)

5. Összefoglalás

A növényi szövettenyésztés alkalmas konzervációbiológia szempontból jelentős fajok előállítására *in vitro* körülmények között. Számos szakirodalom számol be az *Amaryllidaceae* családba tartozó védett fajokból kidolgozott szövettenyésztési eljárásokról. Például a *L. verum* *in vitro* tenyésztése során különböző növényi növekedést szabályozó hormonokkal vizsgálták, hogy melyik alkalmasabb stabil szövettenyészet létrehozására. Az embriók fejlődését leginkább benzil-amino-purin (BA) és α -naftil-ecetsav (NAA) jelenlétében figyelhették meg (Agata Ptak, 2009).

Célkitűzésünk volt *in vitro* növényi szövettenyésztési eljárások kidolgozása, amely *Sternbergia lutea*, *Leucojum verum* és *Leucojum aestivum* kallusztenyészetek létrehozását teszi lehetővé. Stabil kallusz-vonalakat tudtunk előállítani *S. lutea*, illetve *L. aestivum*-ból. Az őszi vetővirág (*Sternbergia lutea*) hagymából 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA, 5 mg l⁻¹ NAA, 10 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA és 2 mg l⁻¹ NAA hormon összetételű MS* táptalajon indítottunk el szövettenyészetet. 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajokon a kallusz megjelenése volt megfigyelhető és ezen értük el a kalluszok gyors növekedését. Gyökér- és levél kezdemények létrehozását is megkíséreltük, ami sikeresen létrejött 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajon. Ha a hagyma explantátumokat MS* táptalajra tettük, ami nem tartalmaz növekedést serkentő hormonokat, akkor a szövettenyészet bulbusain gyökérképződést figyeltünk meg. A *S. lutea* szövettenyésztéséről gyakorlatilag nem találtunk korábbi irodalmi adatokat. Kijelenthetjük, hogy ebben a fajban elsők között sikerült növényregenerálásra képes embriogén kallusztenyészetet előállítanunk. A *Leucojum verum* esetében kallusz képződést nem tapasztaltunk, de hajtás multiplikáció következett be 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajokon, majd 2 mg l⁻¹ NAA 2 mg l⁻¹ IBA növekedést serkentő hormon összetételű táptalajon nevelve megfigyelhető volt a gyökerek megjelenése mellett a hagyma növekedése is. A nyári tűzike (*Leucojum aestivum*) hagyma explantátumokból sikeresen állítottunk elő stabil kallusz tenyészeteket 2 mg l⁻¹ NAA hormonösszetételű táptalajon.

További kutatási célként a szövettenyészteink antioxidáns kapacitásának vizsgálatát tűztük ki. Méréseink enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokra vonatkoztak. Elmondhatjuk, hogy sikeresen alkalmaztuk a PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis) (kataláz és peroxidáz enzimaktivitás mérése), ABTS, DPPH gyökfogó kapacitást mérő módszereket.

Mintáinkat kiértékelve elmondható, hogy a *Sternbergia lutea* 2 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BA tartalmú táptalajon nevelt szövettenyészetből készített minták szabadgyök semlegesítő kapacitása a legmagasabb, ezzel szemben az enzimaktivitásuk mind a kataláz, mind a peroxidáz vizsgálataink során kevéssé vagy alig detektálhatónak bizonyultak (6.ábra). Az enzimaktivitás vizsgálataink azonban nem összehasonlíthatóak a mintáink szabadgyök semlegesítő kapacitásával. Mind az *L. aestivum*, mind a *L. vernum* esetében jól detektálható kataláz és peroxidáz enzimaktivitást mértünk, ugyanakkor a *Sternbergia lutea* mintáknál alacsonyabb ABTS* és DPPH* gátlást tapasztaltunk (6.,7.,8. ábra, 7.táblázat) Összességében elmondhatjuk, hogy munkánk újszerű volt a *Sternbergia lutea* szövettenyészetek létrehozását illetően. A szakirodalomban nem található adat az *Amaryllidaceae* fajok ilyen jellegű antioxidáns kapacitásának jellemzésére. Kutatási munkánk előrevetíti egy *Sternbergia* és *Leucojum in vitro* szövetbank létrehozását, és további méréseket tervezünk a szövettenyészetek és az eredeti növények antioxidáns kapacitásának összehasonlítására.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. **Máthé Csabának**, és **Resetár Annának**, akik elindítottak a szövettenyésztési eljárások kutatásának útján, és akiknek az útmutatásai, tanácsai a kísérleti munkánk, a szakdolgozatom megírása során nélkülözhetetlenek voltak.

Köszönöm **Dr. Vasas Gábornak**, **Dr. Mikóné Hamvas Mártának**, **Dr. Surányi Gyulának**, **Dr. Molnár V. Attilának**, **Ajtay Kittinek**, **Fülöpné Barabás Évának** és **Garda Tamásnak** a munkám során nyújtott segítséget, a szakdolgozatomhoz fűzött építő jellegű megjegyzéseiket és a baráti légkört, amit kialakítottak, és ami ugyanolyan fontos volt számomra, mint maga a kísérleti munka. Köszönöm a DE TEK TTK Növényteni Tanszék minden munkatársának, hogy a kutatómunkámat lehetővé tették.

Szeretném megköszönni **szüleimnek**, **testvéreimnek**, **páromnak** és **szeretteimnek**, hogy mindenben megbíztak, szeretettel vettek körül, és minden, a biológusi szakmával kapcsolatos elképzeléseimet támogatták, és megvalósulását lehetővé tették.

Köszönettel tartozom általános és középiskolai tanárainknak, akik az élővilág szeretetére tanítottak és megerősítettek a természettudományos tárgyak iránt való elhivatottságomban, illetve segítettek és támogattak a felkészüléseimet a tovább tanuláshoz, ami által elkezdhettem az egyetemen a kutatómunkámat.

7. Irodalomjegyzék

1. Anbari S. , Tohidfar M, Hosseini R, Haddad R (2007) Somatic embriogenesis in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi Biotechnology. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 6(4): 527-533.
2. Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A. (2004) Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry and Toxicology* 42: 45-49.
3. Blois M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radicals. *Nature* 4617:1198-1200.
4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 28: 25-30.
5. Cadenas E. (1989): Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, (58):79-110.
6. Davies K. J. A. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. (50):279-289.
7. Diop MF, Hehn A, Ptak A, Chre´tien F, Doerper S, Gontier E, Bourgaud F, Henry M, Chapleur Y, Laurain-Mattar D (2007) Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L.—relationships to galanthamine content. *Phytochem Rev* 6:137–141
8. Dudits D, Heszky, L (2003) *Növényi biotechnológia és géntechnológia*. Agroinform Kiadó, Budapest. ISBN: 963-502-697-8
9. . G. Miliauskas et. al. (2004): Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85 (2004) 231–237
10. Godet Jean-Denis (1993) *Európa virágai*, Officina Nova, ISBN 963 8185 317 30
11. Láng F. (2002): *Növényélettan: a növényi anyagcsere* ELTE Eötvös kiadó, Budapest ISBN 978-963-9129-87-0

12. Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M. és Rice-Evans C. A. (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Febs Letters*, (384):240-242.
13. Pavlov A, Berkov S, Courrot E, Gocheva T, Tuneva D, Pandova B, Georgiev M, Georgiev V, Yanev S, Burrus M, Ilieva M (2007) Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems. *Process Biochemistry*, 42: 734-739.
14. Pellegrini R., N., Proteggente A., Pannala A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
15. Ptak A (2010) Somatic embryogenesis in in vitro culture of *Leucojum vernum* L. In: Jain SM, Ochatt SJ (Eds.) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Methods in Molecular Biology*, Vol. 589. Humana Press, NY, pp 223-233
16. Ptak A, Tahchy El A., Wyzgolik G., Henry M., Laurain-Mattar D. (2010) Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures. *Plant Cell Tiss. Org.* 102:61-67.
17. R. Jurišić és Grubešić et al. (2005) Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39: 837–842
18. Sangwan R. S., Gorenflot R (1975) *In vitro* culture of *Phragmites* tissues. Callus formation, organ differentiation and cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 75: 256-269.
19. Schönfelder Ingrid –Schönfelder Peter (2001) *Gyógynövényhatározó*, Holló és társa Kft. ISBN 9789636841249
20. Simon Tibor (1997) *Magyarországi edényes flóra határozója*, Nemzeti Tankönyvkiadó Rt. ISBN 96318 8270 5, 199731
21. Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16. 144-158., 1965
22. V. Katalinic, M. Milos *, T. Kulisic, M. Jukic (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94 (2006) 550–557