SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Nehézfémkezelés által kiváltott oxidatív stressz vizsgálata csírázó
indiai mustár (*Brassica juncea* L.) magvakban

Ph. D. értekezés

Szőllősi Réka

Témavezető:

Dr. Mihalik Erzsébet

egyetemi docens

SZTE TTIK Környezettudományi Doktori Iskola

Készült a SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszékén

Szeged

2012

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
1. BEVEZETÉS.....	5
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2. 1. Nehézfémek és növényi stresszfolyamatok.....	9
2. 2. Növényi válaszok a nehézfémek okozta oxidatív stresszre.....	11
2. 2. 1. Enzimes védelmi rendszer.....	12
2. 2. 2. Nem enzimes védelmi rendszer.....	14
2. 3. Esszenciális (Cu, Zn) és nem esszenciális (Cd) nehézfémek által kiváltott oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei növényekben.....	15
2. 3. 1. A Cu és a Zn okozta oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei...15	
A Cu által kiváltott oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei.....	15
A Zn által kiváltott oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei.....	17
2. 3. 2. A Cd okozta oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei.....	18
2. 4. Esszenciális (Cu, Zn) és nem esszenciális (Cd) nehézfémek által kiváltott oxidatív stressz jelei a csírázás során.....	19
2. 4. 1. A Cu és a Zn okozta oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán.....	19
A Cu által kiváltott oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán.....	19
A Zn által kiváltott oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán.....	20
2. 4. 2. A Cd okozta oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán.....	20
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	22
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
4. 1. A csíráztatás körülményei.....	24
4. 2. Alkalmazott nehézfém-kezelések.....	24
4. 3. A mintavétel körülményei.....	25

4. 4. Alkalmazott módszerek.....	26
4. 4. 1. A magvak nehézfém-tartalmának meghatározása.....	26
4. 4. 2. Az oxidatív stressz paramétereinek vizsgálata.....	26
4. 4. 2. 1. A ferri-ion redukálóképesség meghatározása (FRAP).....	26
4. 4. 2. 2. A redukált glutation (GSH) mennyiségének meghatározása.....	27
4. 4. 2. 3. A lipid peroxidáció (LP) mértékének meghatározása.....	27
4. 4. 2. 4. Az össz fehérje-tartalom meghatározása.....	27
4. 4. 2. 5. Glutathion- S- transzferáz (GST, EC 2.5.1.18) aktivitásának mérése.....	28
4. 4. 2. 6. Szuperoxid dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitásának meghatározása	28
4. 4. 2. 7. Kataláz (CAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitásának meghatározása.....	29
4. 4. 2. 8. Gvajacol peroxidáz (GPOX, EC 1.11.1.7) aktivitásának meghatározása	29
4. 4. 2. 9. Glutathion reduktáz (GR, EC 1.6.4.2) aktivitásának meghatározása.....	29
4. 5. Az oxidatív stressz hisztokémiai kimutatása.....	30
4. 5. 1. Schiff-festés.....	30
4. 5. 2. Anilinkék-festés.....	30
4. 5. 3. Trypan kék-festés.....	31
4. 5. 4. Sósavas floroglucinos festés.....	31
4. 6. A nehézfém-kezelés okozta szövettani változások vizsgálata a gyökércsúcsban.....	31
4. 7. Az adatok statisztikai feldolgozása.....	32
5. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ.....	33
5. 1. Az Cu és a Zn okozta oxidatív stressz vizsgálatának eredményei.....	33
5. 1. 1. A csírázó magvak Cu- és Zn-felvétele.....	33
5. 1. 2. A Cu és a Zn által indukált oxidatív stressz paraméterei.....	39
5. 1. 2. 1. A Cu által kiváltott oxidatív stressz jelei.....	39
A ferri-ion redukálóképesség vizsgálatának eredményei.....	39
A redukált glutathion (GSH) mennyiségi változása.....	40
A Cu által kiváltott lipid peroxidáció (LP) vizsgálata.....	42
Az össz fehérje-tartalom vizsgálatának eredményei.....	43
A glutathion –S- transzferáz enzim aktivitása.....	44
A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitása	45

Kataláz (CAT) aktivitás.....	46
A gvajakol–peroxidáz aktivitás (GPOX).....	47
A glutation reduktáz (GR) aktivitása.....	48
5. 1. 2. 2. A Zn által kiváltott oxidatív stressz jelei.....	49
A ferri-ion redukálóképesség vizsgálatának eredményei.....	49
A redukált glutation (GSH) mennyiségi változása.....	50
A Zn által kiváltott lipid peroxidáció vizsgálatának eredményei.....	51
Az össz fehérje-tartalom vizsgálatának eredményei.....	52
A glutation –S- transzferáz enzim aktivitása.....	53
A Zn hatása szuperoxid dizmutáz aktivitására	54
A kataláz (CAT) aktivitása Zn-kezelés hatására.....	55
A gvajakol– peroxidáz aktivitás (GPOX).....	56
A Zn hatása a glutation reduktáz működésére.....	57
5. 1. 3. A Cu és a Zn által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai detektálása.....	59
A Cu által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai kimutatása.....	59
A Zn által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai kimutatása.....	61
5. 1. 4. A Cu és a Zn által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban.....	63
A Cu által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban.....	63
A Zn által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban.....	64
5. 2. A Cd okozta oxidatív stressz vizsgálata.....	66
5. 2. 1. A csírázó magvak Cd-felvétele.....	66
5. 2. 2. A Cd által indukált oxidatív stressz paramétereinek vizsgálata.....	68
A ferri-ion redukálóképesség vizsgálatának eredményei.....	68
A redukált glutation (GSH) mennyiségi változása.....	69
A Cd által kiváltott lipid peroxidáció (LP) vizsgálata.....	71
Az össz fehérje-tartalom vizsgálatának eredményei.....	72
A glutation –S- transzferáz enzim aktivitása.....	73
A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitása	74
Kataláz (CAT) aktivitás.....	75
A gvajakol–peroxidáz aktivitás (GPOX).....	76
A glutation reduktáz (GR) aktivitása.....	77
5. 2. 3. A Cd által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai detektálása.....	78
5. 2. 4. A Cd által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban.....	80

6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	82
7. SUMMARY.....	85
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	88
9. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	89
10. PUBLIKÁCIÓS LISTA	99
11. MELLÉKLETEK	103

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a bányászatnak, ipari tevékenységnek, lakossági szennyvíz-kibocsátásnak, valamint a mezőgazdaságban elterjedt fokozott mértékű peszticid-, herbicid- és műtrágya-felhasználásának köszönhetően környezetünkben megnövekedett a különböző nehézfémek (pl. ólom, kadmium, réz, cink, nikkel) mennyisége (Michaud és mtsai, 2008; Janas és mtsai, 2010; Yadav, 2010). A nehézfémek sokszor antropogén eredetű szennyező anyagok, melyek a talajból kerülnek a növényekbe, majd ezen növények elfogyasztása által a táplálékláncba, végül az emberi szervezetbe is, ahol számos megbetegedést, kóros elváltozást válthatnak ki (Baker és mtsai, 1979; Qadir és mtsai, 2000; Yruela, 2005).

A nehézfémek természetes, művelésbe nem vont talajokban is megtalálhatók (pl. réz: 2-40 mg kg⁻¹, cink: 10-80 mg kg⁻¹, kadmium: 0,1-0,5 mg kg⁻¹ száraz tömeg (sz.t.); Hirt és Shinozaki, 2003), de szennyezett talajokban a különböző ipari, mezőgazdasági, bányászati eljárások következtében a normál koncentrációnak akár 10-15-szerese is előfordulhat, bőven meghaladva a hazánkban hivatalos szennyezettségi határértékeket (réz: 30 mg kg⁻¹, cink: 100 mg kg⁻¹, illetve kadmium: 0,5 mg kg⁻¹ sz.t.; Degenhardt és Gimmler, 2000; KVVM, Kármentesítési Kézikönyv 2. 2002).

Az élettani szempontból esszenciális nehézfémek közé tartozó réz (Cu) és cink (Zn), valamint a nem esszenciális, toxikus kadmium (Cd) általában a növények gyengébb fejlettségét okozza, valamint klorotikus és nekrotikus tüneteket eredményez, ugyanakkor az öregedés jelei is előtűnnek. Ezek nemcsak a hajtáson fedezhetők fel, hanem a gyökérrendszer is jelentős fiziológiai-morfológiai átalakuláson mehet keresztül, mely makroszkópiusan és mikroszkópi módon is nyomon követhető (Degenhardt és Gimmler, 2000). Ezek háttérében legtöbbször a fotoszintetikus apparátus valamilyen sérülése, illetve az ún. reaktív oxigénformák (reactive oxygen species, ROS) túltermelődése, vagyis az oxidatív stressz kialakulása, a nehézfémeknek a redox homeosztázis fenntartásáért felelős antioxidánsokkal való interakciója, továbbá más esszenciális elemek metabolizmusában keletkezett zavarok állnak (Arora és mtsai, 2002; Yadav, 2010).

A nehézfémekkel szennyezett vizek és talajok növények bevonásával történő megtisztítására évtizedek óta folynak kísérletek. Ezeknek az ún. fitoremediációs eljárásoknak az a célja, hogy minél rövidebb idő alatt minél több szennyező ágenst tudjanak eltávolítani a környezetből a lehető legkevésbé invazív módon. Ideális esetben az ehhez használt növények, melyek tolerálják a nehézfémeket, és nagyobb mennyiségben fel is veszik azokat (hiperakkumulálók),

nagy mennyiségű biomasszát produkálnak rövid idő alatt, a gyökérből a hajtásba transzportálják a nehézfém-ionokat, és raktározzák anélkül, hogy ez a növény komolyabb károsodását okozná (Salt és mtsai, 1998).

A hiperakkumuláló fajok toleranciája egy a nehézfémek okozta oxidatív stressz regulációját magában foglaló, jól összehangolt detoxifikációs rendszer működését, valamint sejt, szövet illetve szerv szinten bekövetkező változásokat feltételez, mely utóbbi már egészen korai fejlettségi stádiumban jól megfigyelhető.

Jelen kutatás célja az volt, hogy a nehézfémek élettani, anatómiai hatását vizsgáljuk a fitoremediációban közismert faj, az indiai mustár (*Brassica juncea* L.) egészen fiatal, még csírázó egyedein.

Rövidítések jegyzéke

AAS	„atomic absorption spectrophotometry”, atomabszorpciós spektrofotometria
AB	„aniline blue”, anilinkék
Cd	kadmium
CAT	kataláz (EC 1.11.1.6)
Cu	réz
EDTA	„ethylene diamine tetraacetic acid”, etilén-diamin-tetraecetsav
FRAP	„ferric reducing ability of plasma”, a plazma ferri-ion redukáló képessége
f.t.	friss tömeg
GPOX	gvajakol peroxidáz (EC 1.11.1.7)
GR	glutation reduktáz (EC 1.6.4.2)
GSH	glutation (γ -glutamil-ciszteinil-glicin), redukált forma
GSSG	glutation, oxidált forma
GST	glutation S-transzferáz (EC 2.5.1.18)
•OH	hidroxil gyök
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
LP	lipid peroxidáció
MDA	malondialdehid
MG	„malachit green”, malachitzöld
PhI	„phloroglucinol- HCl”, sósavas floroglucin
ROS	„reactive oxygen species”, reaktív oxigénformák
SOD	szuperoxid dizmutáz (EC 1.15.1.1)
¹ O ₂	szinglet oxigén
•O ₂ ⁻	szuperoxid gyök anion

Sch	Schiff-reagens
sz.t.	száraz tömeg
TryB	„Trypan blue”, Trypan- kék
TB	„Toluidine blue”, toluidinkék
TPTZ	2,4,6-tripyridil-s-triazin
Zn	cink

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. Nehézfémek és növényi stresszfolyamatok

Jól ismert tény, hogy a szárazföldi növényeket érő abiotikus stresszorok közül egyre nagyobb hatása és jelentősége van az ipari tevékenység vagy a mezőgazdaságban használt kemikáliák, esetleg a lakossági szennyvízkibocsátás következtében környezetbe jutó nehézfémeknek (Baker és mtsai, 1979; Qadir és mtsai, 2000). A talajban sokszor toxikus mennyiségben jelenlevő nehézfémek a növényekben élettani, illetve morfológiai változásokat idéznek elő, hatással vannak az egyedfejlődésre, növekedésre, öregedésre, de az adott növény energia-háztartására is (Chaoui és mtsai, 1997; Sanità di Toppi és Gabbrielli, 1999; Mithöfer és mtsai, 2004; Maksymiec, 2007). Erre vonatkozólag Maksymiec (2007) tanulmányában található egy általános modell arról, hogy ha valamilyen stresszfaktor (abiotikus vagy biotikus) éri a növényt, milyen sejt vagy szerv szintű (lokális), illetve szervezet szintű (szisztémás) jelátviteli folyamatok indulnak be (**1. ábra**). A biotikus stresszorok (pl. patogének) rendszerint lokális válaszreakcióit váltanak ki, amely a sejtmembránban található receptorok stimulálásával kezdődik, majd a citoplazmában- az állati sejtekhez hasonlóan- a Ca^{2+} -koncentráció megemelkedésével, a Ca-kalmodulin rendszer és kinázok aktiválódásával folytatódik. A válaszreakció valamilyen anyagcsere-folyamat változását illetve stressz indukált fehérjék szintézisét eredményezi. Az abiotikus stresszfaktorok (pl. szárazság, nehézfém- vagy sóstressz) által kiváltott válasz annyiban több, hogy a szignalizáció folytán az egész növényi szervezet szintjén jelentkeznek változások. Mindkét válaszreakcióban kulcsfontosságúak a reaktív oxigénformák (ROS, reactive oxygen species), melyek normál körülmények közt is termelődnek a sejtekben, és szigorú szabályozás alatt állnak, de a biotikus vagy abiotikus faktoroknak köszönhetően mennyiségük megnövekedhet oxidatív stresszt idézve elő (Arora és mtsai, 2002; Maksymiec, 2007; Sharma és Dietz, 2008). Számos kutatási eredmény alátámasztja azt az elméletet, miszerint a nehézfémek által direkt módon előidézett elváltozások hátterében az oxidatív stressz áll. A normál, egyensúlyi állapotban is keletkező reaktív oxigénformák túlsúlyba kerülnek, ezáltal a membránlipidek peroxidációját (lipid peroxidáció, LP) idézik elő.

1. ábra: Abiotikus sztrezorok által kiváltott növényi válaszok típusai (Maksymiec, 2007)

A folyamat megbontja a plazmamembrán integritását, további irreverzibilis szövet- és szervkárosodást, növekedésgátlást vagy éppen az öregedési folyamatok felgyorsulását okozva akár a talajban levő, akár a talaj feletti szervekben (Gallego és mtsai, 1996; Arora és mtsai, 2002; Devi és Prasad, 2004; Smeets és mtsai, 2005; Maksymiec, 2007; Zhang és mtsai, 2009; Yadav, 2010). A LP során számos citotoxikus termék keletkezhet, aldehidek, dialdehidek, hidroxi-aldehidek (pl. malondialdehid), melyek károsítják a DNS-t, ami mutációkhoz és a sejtműködés károsításához vezet (Arora és mtsai, 2002). A membránok mellett a nehézfémek gyakori célpontjai a fehérjék, amelyekhez kötődve konformáció-, majd működésbeli változást, enzimeknél gyakran aktivitás-csökkenést idéznek elő.

A nehézfém-stressz hatása indirekt módon is kifejeződhet, gyakran az ásványi anyagcserében keletkeznek zavarok, amely a növény visszamaradott fejlődését eredményezi. A többnyire elég jól látható szervi-szöveti elváltozások (pl. sejtmegegyülés csökkenése), növekedésgátlás (a levél vagy a gyökér esetében) és a szénescencia összefüggésbe hozható a membránok, illetve a fotoszintetikus pigmentek károsodása mellett a sejtek mitotikus aktivitásának csökkenésével, valamint különböző kromoszóma-aberrációk előfordulásával (Arora és mtsai, 2002; Maksymiec, 2007; Zhang és mtsai, 2009).

A növényi sejtekben – normál, egyensúlyi körülmények között is- számos ROS-képző folyamat zajlik, melyek jelentős része a kloroplasztiszhhoz, mitokondriumhoz, valamint a

peroxiszmához köthető (Corpas és mtsai, 2001). A fotoszintetikus elektron-transzport során keletkezik többek között szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$), szuperoxid gyök anion ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hidroxil gyök ($\bullet\text{OH}$). A szinglet oxigén és a hidroxil gyök rendkívül reaktívak és számos biomolekulát oxidálnak (Inzé és Van Montagu, 1995; Mithöfer és mtsai, 2004).

A hidrogén-peroxid bár kevésbé reaktív, a növényekben bizonyos nehézfémeknek köszönhetően felhalmozódhat, megbontva ezzel az egyensúlyi állapotot (Arora és mtsai, 2002; Blokhina és mtsai, 2003; Mithöfer és mtsai, 2004). A hidrogén-peroxid tovább alakulhat – átmeneti fémionok (pl. Cu^+ ; Fenton-reakció) vagy szuperoxid gyök anion (Haber-Weiss-reakció) jelenlétében- hidroxil gyökké, fehérjék, lipidek és a DNS gyors regradációját idézheti elő (**2. ábra**).

Fenton-reakció:

Haber-Weiss-reakció:

2. ábra: A hidroxil gyök ($\bullet\text{OH}$) keletkezésének útjai (vö. Mithöfer és mtsai, 2004)

2. 2. Növényi válaszok a nehézfémek okozta oxidatív stresszre

A különböző külső stresszoroknak – köztük esszenciális és toxikus nehézfémeknek – köszönhető ROS- felhalmozódás és annak káros következményei ellen, valamint az egyensúlyi állapot visszaállítása végett a növényi szervezetben jól összehangolt, bonyolult védelmi rendszer alakult ki, melynek számos enzim és nem enzim jellegű komponense ismert (Inzé és Van Montagu, 1995; Arora és mtsai, 2002; Blokhina és mtsai, 2003; Ranieri és mtsai, 2005; Smeets és mtsai, 2005; Mishra és mtsai, 2006). A nehézfém ionok redox jellege meghatározza, hogy direkt vagy indirekt módon eredményezi-e a fokozott ROS-produkciót (**3. ábra**).

3. ábra: A nehézfém ionok által indukált stressz főbb mechanizmusai növényekben (Sharma és Dietz, 2008 alapján)

A redox aktív Cu vagy Fe a Haber-Weiss- és a Fenton- reakcióban vesznek részt, mely során a H_2O_2 -ből a lipideket károsító $\bullet\text{OH}$ keletkezik, míg a redox inaktív Cd nagy affinitással az antioxidáns védelmi rendszerben fontos szerepet játszó glutationhoz (GSH) vagy a glutationból építkező fitokelationokhoz (PC) kötődik Cd-PC-komplexekeket képezve, majd a vakuólumba kerül. Mindkét lehetőség végső soron a GSH-szint csökkenését és a ROS-felhalmozódást eredményezi, mely a különböző biomolekulák, organellumok károsodásához és esetleges sejthalálhoz vezethet (Noctor és mtsai, 1998; Cho és Seo, 2005; Pilon és mtsai, 2006; Sharma és Dietz, 2008; Yadav, 2010).

2. 2. 1. Enzimes védelmi rendszer

A legfontosabb antioxidáns enzimek között kell említendő a szuperoxid dizmutáz (SOD), mely a szuperoxid gyök anion hidrogén-peroxiddá és molekuláris oxigénné való átalakulását (dizmutáció) biztosítja. A SOD leggyakoribb típusai a következők: a kloroplasztiszbán található Fe-SOD, a citoszolban és a plasztiszbán egyaránt megtalálható Cu/Zn-SOD,

valamint a mitokondriális Mn-SOD, melyek közül a Fe- és a Cu/Zn-SOD hidrogén-peroxidra érzékeny (Arora és mtsai, 2002; Blokhina és mtsai, 2003; Asada, 2008; Sharma és Dietz, 2008; Ozdener és Aydin, 2010).

A keletkezett H_2O_2 -t a különböző peroxidázok (pl. guajakol-peroxidáz, aszkorbát peroxidáz glutation peroxidáz), valamint a kataláz (CAT) alakítják tovább vízzé és oxigénné (Blokhina és mtsai, 2003; Sharma és Dietz, 2008). Ezek közül az aszkorbát peroxidáz (APX) az aszkorbinsav (AA) monodehidro-aszkorbáttá (MDHA) való eloxidálása közben semlegesíti a hidrogén-peroxidot. Majd a MDHA az aszkorbát-glutation-ciklusban (Halliwell-Asada-ciklus) vagy visszaredukálódik aszkorbáttá a monodehidro-aszkorbát reduktáz segítségével, vagy dehidro- aszkorbáttá (DHA) alakul, és a dehidro-aszkorbát reduktáz (DHAR) által katalizált folyamatban regenerálódik az aszkorbát. A DHAR redukált glutationt használ, amely a NADPH-függő reakcióban a glutation reduktáz (GR) működése révén termelődik újra (4. ábra, Inzé és Montagu, 1995; Arora és mtsai, 2002).

4. ábra: A aszkorbát-glutation-ciklus (Halliwell-Asada-ciklus). A kék nyilak a nem enzimatis úton is végmenő reakciókat jelzik. A rövidítések jelentése: AA- aszkorbát, MDHA- monodehidro-aszkorbát, DHA- dehidro-aszkorbát, GSH- redukált glutation, GSSG- oxidált glutation, APX- aszkorbát peroxidáz, MDHAR- monodehidro-aszkorbát reduktáz, DHAR- dehidro-aszkorbát reduktáz, GR- glutation reduktáz, SOD- szuperoxid dizmutáz (Inzé és Montagu, 1995; Noctor és mtsai, 1998; Arora és mtsai, 2002 alapján)

Az abiotikus stresszorok által kiváltott oxidatív stresszel szembeni enzimes védelem kapcsán, nem utolsósorban, meg kell említeni a glutation-S-transzferázokat (GST), melyek elsősorban a különböző szubsztrátokból (pl. xenobiotikumok, nehézfémek) a GSH-val konjugátumokat

képeznek, és ezen szubsztrátoknak a vakuólumban való elkülönítését biztosítják, ugyanakkor peroxidáz aktivitással is rendelkeznek (Dixit és mtsai, 2001; Arora és mtsai, 2002; Mohanpuria és mtsai, 2007).

2. 2. 2. Nem enzimes védelmi rendszer

A nem enzim jellegű antioxidánsok általában alacsony molekulasúlyú anyagok, melyek az enzimes rendszer működését hatékonyan egészítik ki. Ide tartozik a zsírdékony E-vitamin (α -tokoferol), mely a szinglet oxigén, a $\bullet\text{O}_2^-$, a $\bullet\text{OH}$ és a lipidperoxidok kiiktatásában vesz részt, de kulcsfontosságú a vízdékony redukált glutation (GSH) és az aszkorbinsav (C-vitamin) mint a Halliwell-Asada-ciklus fontos szereplői (4. ábra), valamint a flavonoidok, karotinoidok (pl. β -karotin, A-vitamin) is (Hassig és mtsai, 1999; Arora és mtsai, 2002; Blokhina és mtsai, 2003; Sharma és Dietz, 2008).

Az aszkorbinsav több növényi sejtalkotóban is jelen van, a kloroplasztisban, citoplazmában, a vakuólumban és az apoplasztban egyaránt előfordul. A szinglet oxigén, a $\bullet\text{O}_2^-$, a $\bullet\text{OH}$ és a H_2O_2 eliminálásában van nagy jelentősége; különösen a plasztisban, citoszolban és a peroxiszómában fellelhető aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimnek szubsztrátja. Ugyanakkor ismert a sejtsztódás és sejtciklus, valamint a sejtmeinyulás regulációjában betöltött funkciója is (Noctor és mtsai, 1998; Gupta és mtsai, 1999; Corpas és mtsai, 2001; Arora és mtsai, 2002; Blokhina és mtsai, 2003).

A glutation, egy 3 aminosavból álló peptid (γ -glutamil-ciszteiril-glicin), amely normál állapotban elsősorban a redukált formában fordul elő (GSH), és csak kis része van jelen oxidált formában (GSSG, Noctor és mtsai, 1998). A GSH a növényekben többféle funkcióval rendelkezik, többek között reagál a szinglet oxigénnel, a szuperoxiddal és a hidroxil gyökkel, így az egyik legfontosabb nem enzimatisz antioxidánsnak tekinthető (Corpas és mtsai, 2001; Arora és mtsai, 2002; Blokhina és mtsai, 2003). Az aszkorbát újra redukálása révén közvetetten részt vesz a H_2O_2 -koncentráció szabályozásában (Halliwell-Asada-ciklus). A GSSG visszaredukálását a glutation reduktáz (GR) végzi (Noctor és mtsai, 1998; Arora és mtsai, 2002). A nehézfémek által okozott oxidatív stresszben kettős szerepe van a GSH-nak: egyrészt a fitokelatinok prekuzora, másrészt eliminálja a nehézfém stressz által generált reaktív oxigénformákat (Dixit és mtsai, 2001; Noctor és mtsai, 2002; Yadav, 2010). A glutation-S-transzferázok szubsztrátjaként részt vesz a detoxifikációs folyamatokban, vagy a glutation peroxidázzal (GPX) közreműködve a H_2O_2 semlegesítésében (Noctor és mtsai,

1998; Sies, 1999; Arora és mtsai, 2002; Yadav, 2010). Számos korábbi kutatásból kiderült, hogy a különböző abiotikus stresszorok jelentősen módosíthatják a GSH/GSSG arányt, ennél fogva a sejtek redox egyensúlyának jó indikátorának tekinthetjük (Yadav, 2010).

A flavonoidok csak a növényekben előforduló, polifenol jellegű másodlagos anyagcseretermékek, amelyek fenolos OH- csoportjaiknak köszönhetően gyökfogó funkcióval is bírnak, és sokszor hatékonyabbnak bizonyulnak *in vitro*, mint a tokoferol vagy az aszkorbát. Régóta ismert ezeknek az antioxidáns hatása, mely abból adódik, hogy lehetnek H^+ - és e^- -donorok egyaránt, a H_2O_2 -t semlegesítő kaszkád mechanizmusban, de kelát-komplexeket is képezhetnek az átmeneti fémionokkal (Hassig és mtsai, 1999; Blokhina és mtsai, 2003).

2. 3. Esszenciális (Cu, Zn) és nem esszenciális (Cd) nehézfémek által kiváltott oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei növényekben

2. 3. 1. A Cu és a Zn okozta oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei

A Cu okozta oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei

A réz esszenciális mikroelem és számos enzim kofaktora (pl. Cu/Zn SOD, citokróm-c oxidáz, polifenol oxidáz). Kétféle oxidációs állapotának (Cu^+ illetve Cu^{2+}) köszönhetően elektrontranszfer-folyamatokban vesz részt, reaktív oxigénformák, lipidperoxidok képződését indukálhatja. A Cu tehát a növényekben oxidatív stresszt idézhet elő, ami maga után vonja az antioxidáns rendszer aktivizálódását, főleg a glutation-aszkorbát-ciklusban érintett enzimek aktivitásának fokozódását (Devi és Prasad, 2005; Xiong és Wang, 2005; Yruela, 2005; Pilon és mtsai, 2006).

A művelés alatt nem álló talajban $2-40\text{ mg kg}^{-1}$ sz.t. között változik a mennyisége, viszont –pl. a mezőgazdaságban használt fungicideknek köszönhetően- ennél magasabb, akár 10-15-ször nagyobb koncentráció esetén már toxikus lehet (Mocquot és mtsai, 1996; Salt és mtsai, 1998; Hirt és Shinozaki, 2003; Bouazizi és mtsai, 2007; Michaud és mtsai, 2008). Irodalmi adatok szerint a talajoldatban mikromoláris koncentrációban jelenlevő Cu már fitotoxikusnak számít, leginkább a gyökérzetben halmozódik fel (rizotoxicitás), így elsősorban ott jelentkeznek a tünetek.

Bár a magasabb rendű növények Cu-szükséglete igen alacsony, a talajoldatban található 10^{-9} - 10^{-4} M-os koncentráció optimális, de Cu hiányában hiánytünetek figyelhetők meg elsősorban a fiatal leveleken és a reproduktív szervekben (Li és mtsai, 2003; Yruela, 2005). A normál értéknél nagyobb, de még nem toxikus mennyiségben alkalmazva kis mértékben serkenti a fotoszintézist, de nagyon magas koncentráció esetén gátolja a vas felvételét és szállítását; valamint erősen reaktív $\bullet\text{OH}$ keletkezését indukálja, ami magával vonja a DNS, a lipidek, fehérjék és más biomolekulák károsodását. Sejt szinten a toxikus mennyiségű Cu a fehérjék szulfhidril-csoportjaihoz kötődik, ezáltal megváltoztatja a fehérjék funkcióját, illetve gátolja az enzimaktivitást, károsítja a sejt transzportmechanizmusait, más esszenciális ionok felvételét gátolja, és valamilyen oxidatív károsodást idéz elő (Yruela, 2005; Michaud és mtsai, 2008).

A toxikus mennyiségben előforduló Cu által okozott oxidatív stressz egyik legszembetűnőbb jele – a klorotikus és nekrotikus tünetek mellett- az egész növény gyenge fejlettsége, különösen a gyökér hosszanti növekedésének, elongációjának visszaesése, a gyökér epidermisz sejtjeinek sérülése (Arora és mtsai, 2002; Lin és mtsai, 2003; Shaw és mtsai, 2004). 10^{-3} M-os koncentrációban csírázásgátló hatású, ami nem a vízfelvétel hiányából fakad, hanem a Cu-t akkumuláló sziklevelek elégtelen működéséből. A raktározott tápanyagok nem mobilizálódnak, a keményítőbontásért felelős enzimek gátoltak, a gyököcske megnyúlásos növekedése lassul (Mihoub és mtsai, 2005).

Számos további kísérlet alátámasztja azt a tényt, hogy a Cu bizonyos mennyiségben már növekedésgátlást eredményez, főleg a gyökérben. Ennek hátterében a bőrszöveti sejtek károsodása és pusztulása mellett az is áll, hogy csökken a sejtek osztódási képessége (Jiang és mtsai, 2001; Barceló és Poschenrieder, 2004).

Ismeretes az is, hogy a Cu-stressznek kitett növényekben sejt szintű válaszreakcióként nemcsak a membránok integritása csökken lipidperoxidációnak köszönhetően, hanem a sejtfalaknál fokozott kallózképződés is megfigyelhető. A sejtfal szerkezetének ilyen módosítása az egyik lehetőség arra, hogy a növény a további nehézfém-felvételt megakadályozza, vagyis az elsődleges sejtfalra egy gyorsan szintetizálódó poliszacharid védőréteget, bevonatot szintetizál (Jiang és mtsai, 2001; Kartusch, 2003; Devi és Prasad, 2005; Qin és mtsai, 2007; Chen és Kim, 2009).

A Zn okozta oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei

A cink (Zn) az átmeneti fémek közé tartozó mikroelem, a kadmiummal együtt redox inaktív nehézfémnek tekinthető. A növények a cinket Zn^{2+} -ionként vagy komplex vegyületek formájában veszik fel. Fontos szerepet játszik a nitrogén anyagcserében, sejtsztódás szabályozásában, egyes növényi hormonok (pl. auxin) szintézisében (Rout és Das, 2003). Számos enzim specifikus fémkomponense, ezáltal az enzimreakciókat serkentheti vagy gátolhatja. Szabályozó fehérjék strukturális eleme, a fotoszintetikus elektrontranszportban fontos szerepet játszik, szerepe van a mitokondriális légzésben, a sejtfal-metabolizmusban és a hormon jelátvitelben, számos enzim (pl. oxidoreduktázok, transzferázok, ligázok) kofaktoraként ismert (Broadley és mtsai, 2007). A rézhez hasonlóan a növények számára elengedhetetlen a normál fejlődéshez, viszont csak alacsony koncentrációban szükséges a növények környezetében. A mezőgazdasági talajokban a mennyisége 10-80 mg kg⁻¹ (sz.t.), más felmérések szerint 10-300 mg kg⁻¹ (sz.t.), de a bányászatnak, műtrágyáknak, szennyvízkibocsátásnak köszönhetően ez napjainkra sokszorosára emelkedett, ami már toxikus a növényekre nézve (Hirt és Shinozaki, 2004; Broadley és mtsai, 2007).

Míg Zn hiányában klorózis, rozettaképzés, a gyökércsúcs nekrozisa jelentkezik, addig a Zn nagyobb (10^{-5} M<) koncentrációjánál a toxicitás tünetei fedezhetők fel a növényeken: általános növekedésgátlás, a fiatalabb illetve az idősebb levelek klorózisa, hajtásnövekedés lassulása (Shaw és mtsai, 2004). A kutatások szerint ez azzal magyarázható, hogy a Zn más nyomelemek (Fe, Mg, P, K, Ca) felvételét akadályozza, ezáltal az ásványi anyagcsere egyensúlya felborul. A Zn-toxicitás a gyökér esetében leginkább a vastagodásban, a sejtsztódás és a sejtmegnyúlás rendellenességeiben nyilvánul meg (Prasad és mtsai, 1999; Rout és Das, 2003; Broadley és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2009; Solanki és Dhankhar, 2011).

Bár – a rézhez hasonlóan- esszenciális nehézfém, redox inaktivitása és bivalens kation jellegénél fogva másként viselkedik. Toxikus mennyiségű Zn is fokozott ROS- produkciót, vagyis oxidatív stresszt vált ki, de indirekt úton (Cuypers és mtsai, 2002). Ez a folyamat legjobban a lipidperoxidáció fokozódásában, a ROS eliminálásában érintett enzimek (pl. SOD, glutation-aszorbát-ciklus enzimek) aktivitásbeli és a nem enzim jellegű komponensek (pl. aszorbát, GSH) mennyiségi változásaival igazolható (Prasad és mtsai, 1999).

Számos anatómiai változás is bekövetkezhet a Zn-akkumuláció illetve -toxicitás következtében. Gyakoriak a sejtfalvastagodások a gyökérben, amihez a fokozott peroxidáz-aktivitás társul, hiszen ez az enzimescsoport fontos szerepet játszik – különösen

nehézfémstressz esetén- a ligninszintézisben (Probst és mtsai, 2009). A $\text{Zn } 10^{-3} \text{ M}$ -os koncentrációja kiváltja a gyökér kéregparenchima-sejtjeinek sérülését, és a gyökércsúcs-sejtek osztódásakor a kromoszóma-aberrációk valószínűsége fokozódik (Rout és Das, 2003; Barceló és Poschenrieder, 2004). A szállítóyalábokat alkotó sejtek falánál kristály jellegű precipitátumok rakódnak le, amelyek egyszerűbb összetételű Zn-sók vagy a Zn-nek fehérjékkel, szénhidrátokkal alkotott komplexei lehetnek (Sridhar és mtsai, 2005).

2. 3. 2. A Cd okozta oxidatív stressz fiziológiai, morfológiai és szövettani jelei

A kadmium nem esszenciális, toxikus nehézfém, természetes talajokban $0,06\text{-}0,50 \text{ mg kg}^{-1}$ (sz.t.) közt változik a mennyisége, de az ipari, bányászati, mezőgazdasági eljárások következtében az emissziója növekedett. Például egyes foszfát műtrágyák Cd-tartalma $0,1\text{-}200 \text{ mg kg}^{-1}$ lehet, de a szennyvizekkel öntözött, művelés alatt álló talajokból mértek már 640 mg kg^{-1} Cd-koncentrációt is. Ugyanakkor szennyvizekben előfordulhat akár 800 mg kg^{-1} (sz.t.) is. A Cd toxikus hatásai nemcsak a növények, de a táplálékhálózaton keresztül az állatok és az emberek anyagcseréjében is megnyilvánulnak. Az emberi egészségre ártalmas kadmium a forrásai lehetnek még a dohányfüst vagy a levegőszennyezés (Baker és mtsai, 1979; Qadir és mtsai, 2000; Farooqi és mtsai, 2009; Szöllősi és mtsai, 2009).

A Cd gyökéren keresztül rendkívül gyorsan felvételre kerül, és részben a gyökérsejtek vakuólumaiban kompartmentalizálódik, részben a xilémen keresztül transzportálódik más szervekbe, pl. a levelekbe; ugyanakkor a vegetatív szervekből a floém-transzport révén a generatív szervekbe (pl. a fejlődő magba) is eljuthat (Salt és mtsai, 1998; Rodríguez-Serrano és mtsai, 2009; Kranner és Colville, 2011). Számos kutatásból kiderült már, hogy a Cd a növényekben morfológiai, élettani elváltozásokat okozhat. A Cd-toxicitás legáltalánosabb tünetei közé tartozik a gyökér- és hajtásnövekedés lassulása, a levelek klorózisa, valamint a csírázásgátlás (Chaoui és mtsai, 1997; Sanità di Toppi és Gabbrielli, 1999; Chandary és Sharma, 2009; Farooqi és mtsai, 2009; Kranner és Colville, 2011).

Bár a nem redox aktív fémről van szó, a Cd-toxicitás szoros kapcsolatban áll egy fokozott ROS-produkcióval, a lipidek és fehérjék peroxidatív károsodásával, vagyis oxidatív stresszel leírható általános tünetegyüttessel (Tamás és mtsai, 2010).

A Cd detoxifikálásában fontos szerepet játszanak a glutationból polimerizációval keletkező fitokelatinok, ezért nem meglepő, ha a Cd vagy más nehézfém okozta stressz-válaszok között

a redukált glutation- (GSH)-szint csökkenését tapasztaljuk (Rodríguez-Serrano és mtsai, 2009).

Toxikusnak számító Cd-koncentráció (10 mM) hatására a gyökér rizodermisz és az elsődleges kéreg parenchima sejtjeiben megnő a vakuólumok száma, valamint a sejtfalak mentén kristálylerakódások figyelhetők meg (Sridhar és mtsai, 2005).

2. 4. Esszenciális (Cu, Zn) és nem esszenciális (Cd) nehézfémek által kiváltott oxidatív stressz jelei a csírázás során

A különböző nehézfémeknek a magba történő bejutása több tényezőtől függ. A koncentráció mellett a fémion vegyértéke, a fémion transzportjának módja ugyanúgy meghatározó, mint az, hogy milyen növényfajt vizsgálunk, illetve az adott növény magjának milyen anatómiai sajátosságai vannak, milyen a maghéj áteresztőképessége, milyen jellegű a táplálósövet, mennyire érintkezik az adott nehézfémrel közvetlenül az embrió (Seregin és Ivanov, 2001; Kranner és Colville, 2011). A korábbi tanulmányok arra is rámutatnak, hogy számos fajnál – koncentráció-függő módon – magát a csírázás folyamatát, illetve a csíranövények további fejlődését is befolyásolják a növény környezetében jelenlevő nehézfémek. A csírázást vagy eleve gátolják az általános toxikus hatásuknak köszönhetően, vagy a magok vízfelvételét blokkolják (Li és mtsai, 2005; Kranner és Colville, 2011). Li és mtsai (2005) *Arabidopsis thaliana* magjaival végzett csíráztatási kísérlet során azt tapasztalták, hogy az izolált embriók illetve a fejlődő csíranövények sokkal érzékenyebbek, mint a maghéj által védett csírázó magvak. Mindezek mellett a mag endospermiumában található tápanyagok mobilizálásért, hidrolíziséért felelős enzimek (pl. α - és β -amiláz) aktivitása csökken, így a csíranövény fejlődése lelassul (Solanki és Dhankhar, 2011).

2. 4. 1. A Cu és a Zn okozta oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán

A Cu által kiváltott oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán

A Cu koncentráció-függő csírázásgátló hatását számos faj esetében vizsgálták már, és növények rendszertani hovatartozása mellett döntő volt az alkalmazott koncentráció nagysága. Toleráns fajok általában magasabb koncentráció mellett is képesek csírázni, amihez

hozzájárul a maghéj jelenléte is, ami fontos akadály a magduzzadás során felvételre kerülő fémionok számára (Seregin és Ivanov, 2001; Kranner és Colville, 2011). Kisebb mennyiségű (pl. 4-200 μM) Cu jelentléte ugyanakkor serkentő hatással lehet a csírázásra és a csíranövények növekedésére, ami azzal magyarázható, hogy bizonyos mennyiségű ROS jelenléte szükséges a sejtciklus szabályozását végző szignalizációs folyamatokban, míg a nagyobb koncentrációk már ROS-túltermelődést, oxidatív stresszt (lipidperoxidáció, proteinek karbonilációja és degradációja) idéznek elő, ami végül csírázásgátláshoz vezet (Zhang és mtsai, 2008; Kranner és Colville, 2011).

A Zn által kiváltott oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán

Bár irodalmi adatok szerint a Zn toxikus mennyiségben általánosan lassítja a növekedést, csírázásgátló hatása csak néhány faj esetében ismert, kisebb koncentrációban kifejezetten kedvez a gyököcske és a rügyecske fejlődésének, differenciálódásának (Ozneder és Aydin, 2010; Kanner és Colville, 2011). Későbbiekben a gyököcskéből kialakuló elsődleges gyökér elongációját már gátolja a sejtosztódás és a sejtmegnyúlás blokkolása révén, valamint barnás elszíneződés jelentkezi a gyökércsúcson (Rout és Das, 2003; Qin és mtsai, 2007).

A Zn esszenciális mikroelem ugyan, de nem redox aktív, így nagyobb koncentrációi indirekt módon, a ROS-produkció erősítésével váltanak ki oxidatív stresszt, és annak részeként a lipid peroxidáció fokozódását, illetve az antioxidáns enzimek (SOD, CAT, GR, peroxidázok) aktivitásának növekedését (Ozneder és Aydin, 2010).

2. 4. 2. A Cd okozta oxidatív stressz jelei a csírázás folyamán

A korábbi kutatások szerint a kadmium koncentráció-függő módon toxikus hatású lehet a csírázásra, különösen a magduzzadás alatti első néhány órában (Farooqi és mtsai, 2009; Li és mtsai, 2005; Kranner és Colville, 2011). A Cd csírázásgátló hatása abban is megnyilvánul, hogy nemcsak a raktározott szénhidrátokat, fehérjéket lebontó enzimeket blokkolja, de gátolt az oldott állapotú cukrok és aminosavak transzlokációja is a fejlődő csíranövény irányába. Gyakori jelenség az is, hogy a Cd, mely a Zn-hez hasonlóan nem redox aktív nehézfém, a Fenton- és a Haber-Weiss-reakciókat kikerülve vált ki oxidatív stresszt. Az oxidatív stressz egyik legfőbb markerének tartott lipidperoxidáció mértéke emelkedik, és a membránok

peroxidatív sérülése miatt a sejtekből jelentős tápanyag-kiürülés történik (Kranner és Colville, 2011; Solanki és Dhankhar, 2011).

Meglepő azonban, hogy a Cd alacsony koncentrációban való jelenléte pozitívan is hozzájárul a sejtciklus szabályozásában érintett reaktív oxigénformák keletkezéséhez mintegy stimulust adva a csírázáshoz (Kranner és Colville, 2011).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban egyre nagyobb igény mutatkozik arra, hogy energia-, idő-, költség- és környezetkímélőbb megoldásokat találjanak a vizek, talajok nehézfém-szennyezettségének csökkentésére. Az utóbbi évtizedekben népszerűvé váló fitoremediációs kutatások keretében vált ismertté, hogy számos növény családban találhatók olyan fajok, melyek nemcsak túlélni képesek a nehézfémekkel terhelt közegben, de képesek azokat felvenni és felhalmozni (akkumulálni) anélkül, hogy elpusztulnának. Az *Asteraceae*, a *Caryophyllaceae*, *Poaceae*, *Salicaceae*, *Fabaceae* mellett az egyik legtöbb nehézfém-toleráns, sőt extrém mennyiségű nehézfémet felhalmozó, ún. hiperakkumuláló faj a *Brassicaceae* családban fordul elő, főleg az *Alyssum*, *Arabidopsis*, *Thlaspi* és a *Brassica* genusból. Ez utóbbi nemzetségbe tartozó *Brassica juncea* L. (indiai mustár vagy barna mustár) elsősorban Cd-hiperakkumulálóként vált ismertté (Salt és mtsai, 1998; Sanità di Toppi és Gabbrielli, 1999; Quartacci és mtsai, 2006; Szöllősi, 2011).

A szakirodalomból jól ismert tény, hogy a nehézfém-stressz hatására a morfológiai elváltozásokon túl a növények oxidatív károsodást is szenvednek. Az eddigi kutatásokat általában felnőtt növényeken végezték és többnyire csak előnevelés után alkalmaztak nehézfém-kezelést. Így viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre arról, hogy mi történik a növényi egyedfejlődés kezdeti szakaszában, vagyis a csírázás ideje alatt alkalmazott nehézfém-stressz hatására, tekintve, hogy ez az ontogenezis legérzékenyebb stádiuma (Singh és Tewari, 2003; Kranner és Colville, 2011).

Ezért kísérleteinkben a Cu illetve a Zn mint esszenciális, és a Cd mint nem esszenciális, toxikus nehézfémeknek a csírázás menetére gyakorolt hatását vizsgáltuk, továbbá az egyes stressz-paraméterek idő- és koncentráció-függő változásait követtük nyomon indiai mustár (*Brassica juncea* L.) csírázó magjaiban mint teszt növényekben. Arra is kerestük a választ, hogy az esszenciális nehézfémek is kiválthatnak-e a kadmiumhoz (Cd) hasonló mértékű oxidatív stresszt (Szöllősi és mtsai, 2009), illetve milyen morfológiai, anatómiai változások kísérik ezt.

Kérdéseink tehát a következők voltak:

- Kiválthat-e a Cd-, illetve a Cu- és Zn- kezelés oxidatív stresszt a csírázás során?

- Ez az oxidatív stressz milyen paraméterekkel jellemezhető? Milyen kvantitatív és szemikvantitatív módszerekkel lehet nyomon követni az oxidatív stressz változásait?
- Befolyásolja-e az alkalmazott koncentráció és a kezelés idő hossza a vizsgált stressz-paraméterek alakulását?
- Hogyan változnak ezek a paraméterek az idő, illetve koncentráció függvényében?
- Hisztokémiai eljárásokkal is kimutatható-e az oxidatív stressz a gyökércsúcsban?
- A csírázás során elsőként megjelenő gyökércsúcs fejlődésében mutatkoznak-e morfológiai, szövettani elváltozások? Ezek összevethetők-e az oxidatív stressz paramétereinek vizsgálata során kapott eredményekkel?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4. 1. A csíráztatás körülményei

Kísérleteinkben indiai mustár (*Brassica juncea* L. Czern. cv. Negro Caballo) magvakat csíráztattuk steril Petri-csészékben, 8 független ismétléssel. A Petri-csészékben 4 rétegű papírvattát és 1 rétegű szűrőpapírt megnedvesítettük 10-10 ml különböző nehézfém-tartalmú és koncentrációjú oldatokkal, s erre kerültek a magok, minden esetben 0,5-0,5 g mennyiségben, majd lefedve, szobahőmérsékleten ($24\pm 1^\circ\text{C}$), sötétben tartottuk őket 12, 24, 48 és 96 órán át (rövidítve 12h, 24h, 48h és 96h). Ezután kerültek feldolgozásra az eltérő csírázási stádiumban levő magok. A kísérleti növény magjait a budakalászi Gyógynövénykutató Intézetből szereztük be.

4. 2. Alkalmazott nehézfém-kezelések

A csíráztatáshoz használt oldatok desztillált víz és a nehézfémek különböző sóinak ($\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , illetve ZnCl_2) felhasználásával készítettük, a nehézfémekre számítva 50, 100 és 200 mg L^{-1} koncentrációkban. A kontroll magvak desztillált vizes közegben csíráztak. A továbbiakban a különböző fémekre és koncentrációkra a Cd50, Cd100 és Cd200, illetve a Cu50, Cu100 és Cu200, valamint a Zn50, Zn100 és Zn200 rövidítéseket használok. Az általunk kadmiumra számított koncentrációk 0,44, 0,89 és 1,78 mM-nak felelnek meg, míg a réz esetében ezek 0,78, 1,57 és 3,15 mM, a cinkre nézve pedig 0,76, 1,53 és 3,06 mM értékekkel ekvivalensek. Az oldatok készítéséhez használt vízmentes illetve kristályvizes sókat az irodalomban leírtak szerint választottuk ki (Sridhar és mtsai, 2005; Qin és mtsai, 2007; Bouazizi és mtsai, 2010). Noha a klorid-ionoknak lehetnek kedvezőtlen hatásai, esetünkben a bekövetkezett fejlődésbeli rendellenességek valószínűleg inkább a nehézfémionoknak volt köszönhető (White és Broadley, 2001). Az oldatok kezdeti pH-ja a koncentráció növelésével egyre savasabb irányba tolódott el mindhárom nehézfém esetében. Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az általunk alkalmazott oldatok pH-ja kedvezett a nehézfémionok felvételének (Wang és mtsai, 2006). A kísérlet folyamán a nevelési körülmények nem tették lehetővé a pH időbeli változásának nyomon követését. A csíráztató oldatok fontosabb jellemzőit az **1. táblázatban** foglaltam össze.

Nehézfém neve	Az alkalmazott nehézfém só	Koncentráció (mg L ⁻¹)	Moláris koncentráció (mM)	A csíráztató oldat kezdeti pH-ja
Cu	CuSO ₄	0	0,00	7,07
		50	0,78	4,93
		100	1,57	4,72
		200	3,15	4,57
Zn	ZnCl ₂	0	0,00	7,07
		50	0,76	5,66
		100	1,53	5,62
		200	3,06	5,55
Cd	CdCl ₂ x H ₂ O	0	0,00	7,07
		50	0,44	4,16
		100	0,89	3,77
		200	1,78	3,50

1. táblázat: A csíráztatáshoz használt nehézfém-oldatok fontosabb jellemzői (a nehézfém sók összetétele, a nehézfémionra számított koncentráció és moláris koncentráció, valamint az oldatok pH-ja)

4. 3. A mintavétel körülményei

A különböző időtartamú és koncentrációjú kezeléseknél minden esetben kétszeri desztillált vizes lemosást követően a csírázó magvakból 8 ismétléssel 0,3-0,3 g friss anyagot mértünk ki, majd ezeket homogenizáltuk hideg dörzsmozsárban 1,2 ml foszfát pufferrel (0,1 M K₂HPO₄, pH 7,6 + 0,1 mM EDTA) és kvarchomokkal, majd lecentrifugáltuk (10 min., 12.000g), és a felülúszóból (továbbiakban: kivonat) mértük a különböző stressz-paramétereket Thermo Spectronic Biomate 5 típusú spektrofotométer segítségével.

A növények által felvett nehézfém kvantitatív meghatározásához kezelésenként a kétszeri desztillált vizes lemosás után 8 ismétléssel 3-3 g friss anyagot tettünk el szárításra.

4. 4. Alkalmazott módszerek

4. 4. 1. A magvak nehézfém-tartalmának meghatározása

A csírázás során a magvak által felvett Cd, Cu és Zn mennyiségének meghatározása atomabszorpciós spektroszkópiás módszerrel (AAS), Hitachi Z-8200 típusú spektrofotométerrel történt. Az előzőleg 4 napig, 30°C-on szárított növényi anyagból 100-100 mg-ot mértünk (8 párhuzamos) a roncsolócsövekbe, amelyekre előbb 6-6 ml tömény salétromsavat (69,2%-os HNO_3) mértünk, 2 óra múlva 2-2 ml hidrogén-peroxidot (37%-os H_2O_2), és 3 órán keresztül 160°C-on roncsoltuk MARSXpress típusú mikrohullámú roncsoló berendezésben. Lehűlés után a mintákat 20 ml végtérfogatra kihígítottuk, s ezekből mértük a fémtartalmat. A minták Cd-, Cu- és Zn-tartalmát $\mu\text{mol g}^{-1}$ száraz tömeg (sz.t.) formában adjuk meg.

4. 4. 2. Az oxidatív stressz paramétereinek vizsgálata

4. 4. 2. 1. A ferri-ion redukálóképesség meghatározása (FRAP)

A növényi minták össz antioxidáns kapacitásának kifejezésére használtuk a Benzie és Strain (1996) által kifejlesztett FRAP-módszert (ferric reducing ability of plasma), kisebb módosításokkal (Varga és mtsai, 2000; Szöllősi és mtsai, 2009). Bár ezt a módszert eredetileg humán plazmára dolgozták ki, növényi mintákból (homogenizátum, vizes vagy alkoholos kivonat) is alkalmas a teljes antioxidáns kapacitás szemikvantitatív meghatározására (Szöllősi és Varga, 2002). Lényege, hogy a FRAP-reagensben a 2,4,6-tripiridil-s-triazinnal (TPTZ) komplexet alkotó ferri- (Fe^{3+})- ionok ferro- (Fe^{2+})- ionokká redukálódnak a növényi mintában található enzimes és nem enzimes antioxidánsok jelenlétében. A keletkező ferro-2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) kék színű, ami fotometriásan mérhető 593 nm-en.

A FRAP-reagenst frissen készítettük 10 mM 2,4,6-tripiridil-triazin (TPTZ), 20 mM ferri-klorid (FeCl_3) és 300 mM Na-acetát puffer (pH 3.6) 1:1:10 arányú elegyeként. A mérés során 1,5 ml reagenshez adtunk 50 μl növényi kivonatot, és az 5 perc alatt bekövetkező abszorbancia-változást. A mintáink FRAP-értékeit friss tömegre átszámítva $\mu\text{mol g}^{-1}$ friss tömeg (f.t.) formában adtuk meg.

4. 4. 2. 2. A redukált glutation (GSH) mennyiségének meghatározása

A redukált glutation (GSH)-tartalom meghatározásához a Sedlak és Lindsay (1968) által kifejlesztett módszert használtuk, melynek során triklór-ecetsavval kicsapjuk a fehérjét, majd az Ellman-reagenssel a mintában maradt nem fehérjéhez kötött SH-csoportokat határozzuk meg kvantitatíve.

125 µl növényi mintához 0,5 ml 5%-os (w/v) TCA-t (triklór-ecetsav) adtunk, és 10 percig 10000g-n centrifugáltuk a mintákat. Centrifugálás után 0,5 ml felülúszóhoz 1 ml 0,4 M TRIS puffert (pH 8,9) és 50 µl DTNB-t (Ellman-reagens, 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzoecsav) adtunk. A mintában levő GSH által redukált, sárga színű DTNB abszorbanciáját 412 nm-en spektrofotométerrel mértük. Az eredményeket µmol GSH g⁻¹ friss tömeg (f.t.) alakban tüntettük fel.

4. 4. 2. 3. A lipid peroxidáció (LP) mértékének meghatározása

A lipid peroxidáció kimutatását a malondialdehid (MDA)- tartalom meghatározásán keresztül végeztük (Placer és mtsai, 1966 módosított módszere). Mivel a MDA a lipid peroxidáció egyik végterméke, így ennek kvantitatív meghatározásával következtetni tudunk a nehézfém-stressz által kiváltott membránkárosítás mértékére (Yadav, 2010). 250 µl növényi homogenizátumhoz adtunk 2,25 ml reagenst, amely 15%-os (w/v) TCA-t, 0,375 %-os (w/v) TBA-t (tiobarbitursav) és 25 N sósavat (HCl) tartalmazott. A keveréket 15 percig forraltuk, majd 15 percig jeges vízfürdőben hűtöttük, 5 percig 12000g-n centrifugáltuk. A MDA és a TBA által létrehozott színes komplex abszorbanciáját a felülúszóból mértük 532 nm-en. A MDA-tartalmat nmol g⁻¹ friss tömeg (f.t.) formában adtuk meg.

4. 4. 2. 4. Az össz fehérje-tartalom meghatározása

A homogenizátumokat desztillált vízzel először 400-szorosára hígítottuk, majd 400 µl mintához adtunk 2 ml „C” oldatot. A „C” oldat 20g L⁻¹ Na₂CO₃, 0,2 g L⁻¹ K-Na-tartarát és 0,1 M NaOH összetételű „A” oldat és 5 g L⁻¹ koncentrációjú CuSO₄ x 5 H₂O („B”) oldat 50:1 arányú elegye. 10 perc elteltével a reakcióelegyhez 200 µl 2-szeresére hígított Folin-

Ciocalteu-reagenst adtunk. Újabb 30 perc elteltével a meghatározás spektrofotometriásan 750 nm-en történt Lowry és mtsai (1951) által kidolgozott protokoll szerint. A minták összfehérje-tartalmát mg ml^{-1} kivonat formában számítottuk ki az aktuális kalibrációs görbe segítségével, és használtuk fel az enzimaktivitások kiszámításához, a diagramokon pedig mg g^{-1} friss tömeg (f.t.) formában adtuk meg.

4. 4. 2. 5. Glutation- S- transzferáz (GST, EC 2.5.1.18) aktivitásának mérése

A különböző xenobiotikumoknak GSH-val való konjugálását végző glutation- S- transzferáz enzim (GST, Edwards és mtsai, 2000) aktivitásának meghatározását Mannervik és Guthenberg (1981) módszere szerint végeztük. A reakcióelegyet 0,2 M foszfát puffer (KH_2PO_4 , pH 7,5 + 1 mM EDTA), 20 mM GSH- oldat, 20 mM CDNB (1-klór-2,4-dinitrobenzol) és a növényi kivonat keverékeként állítottuk elő.

Az enzimaktivitást spektrofotometriásan detektáltuk 3 percen keresztül, 37°C –on, 340 nm-en. Az enzim egységet (U) úgy definiáltuk, mint az az enzimmennyiség, amely 1 μmol GSH-CDNB konjugátum keletkezését eredményezi 1 perc alatt. Majd ezt vonatkoztattuk az össz-fehérjetartalomra, és az eredményeket egység U mg^{-1} fehérje (protein) formában adtuk meg.

4. 4. 2. 6. Szuperoxid dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitásának meghatározása

Az össz SOD aktivitásának mérését Misra és Fridovich (1972) módszere alapján végeztük. A mérőelegy 0,05 M-os (pH 10,2) puffer (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , EDTA, 37 °C-os vízfürdőben), a nyers növényi kivonat, valamint adrenalin elegyítésével készült, melyet 480 nm-en fotometriásan mértünk 4 percig. A kapott extinkció-változások segítségével számoltuk az adrenalin-adrenokróom spontán átalakulás gátlásának mértékét (gátlás %), és 1 enzim egységet (U) az adrenokróomképzés 50%-os gátlásaként értelmeztük. Ezt az össz fehérje-tartalomra vonatkoztattuk, és az enzimaktivitás eredményeit U mg^{-1} fehérje formában adtuk meg.

4. 4. 2. 7. Kataláz (CAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitásának meghatározása

A kataláz a növényekben is elsősorban a hidrogén peroxid (H_2O_2) semlegesítésében játszik szerepet (Blokhina és mtsai, 2003). Beers és Sizer (1952) módszere alapján 0,05 M foszfát puffer (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7.0) és 30 mM H_2O_2 , valamint a kivonat felhasználásával a kataláz hatására végbemenő hidrogén-peroxid bomlást, 25 °C-on, spektrofotometriásan 240 nm-en követtük nyomon. Egy enzimegységként (U) definiáltuk a CAT enzim azon mennyiséget, amely 25°C –on 1 perc alatt 1 μmol H_2O_2 –t képes elbontani. Az eredményeket egység U mg^{-1} fehérje alakban adtuk meg.

4. 4. 2. 8. Gvajakol peroxidáz (GPOX, EC 1.11.1.7) aktivitásának meghatározása

A növényi peroxidázok az oxidoreduktázok csoportjába tartozó enzimek. A GPOX enzim a hidrogén-peroxid redukálásához a gvajakolt használja elektrondonorként, melynek oxidációjakor vörösesbarna tetragvajakol keletkezik, és ez 440 nm-en mért abszorbancia-változással jól követhető. A meghatározást Singh és mtsai (2006) módosított módszere alapján végeztük, 0.1 M KH_2PO_4 puffer (pH 6,0), 20 mM gvajakol, 15 mM H_2O_2 és a növényi kivonat felhasználásával. Egy enzimegység (U) azt a GPOX enzim azon mennyiséget fejezi ki, amely 25°C –on 1 perc alatt 1 mol oxidált gvajakol (tetragvajakol) keletkezését katalizálja. Az eredményeket egység U mg^{-1} fehérje formában adtuk meg.

4. 4. 2. 9. Glutation reduktáz (GR, EC 1.6.4.2) aktivitásának meghatározása

A GR aktivitásának mérését Pinto és Bartley (1969) módszere alapján végeztük, kisebb módosításokkal. Az aktivitásmérő elegy összetétele a következő volt: 0,25 M foszfát puffer (KH_2PO_4 , pH 7,4), 25 mM EDTA, 7,5 mM NADPH, 25 mM oxidált glutation-oldatot (GSSG), illetve a növényi kivonat. A vak (kontroll) minta összetétele hasonló volt, de a GSSG helyett puffert alkalmaztunk. Az abszorpcióváltozást 3 percig 340 nm-en mértük, 37°C-on. Az aktivitást a két mérés (kontroll és a kivonatot tartalmazó minták) különbségéből számoltuk; 1 egységnek (U) tekintettük azt az enzim mennyiséget, amely 1 perc alatt 1 μmol GSSG-t redukál. Továbbiakban a teljes fehérjetartalomra vonatkoztattuk, és az aktivitás-értékeket U mg^{-1} fehérje formában adtuk meg.

4. 5. Az oxidatív stressz hisztokémiai kimutatása

Az alábbi festésekhez mindig friss anyagot használtunk. A csírázó magvakat minden esetben előbb desztillált vízzel mostuk át. Négyféle *in vivo* festési eljárást alkalmaztunk az oxidatív stressz sejt és szövet szintű kimutatására: Schiff-festést (Sch), anilinkékkel (AB), Trypan-kékkel (TB), valamint sósavas floroglucinnal (PhI) való festést. A hisztokémiai eljárások pozitív illetve negatív eredményeit a továbbiakban kizárólagosan a gyökércsúcsokon vizsgáltuk, mivel ez jelenik meg legelőször a csírázás során, tehát fiatal gyökér ezen része találkozik legelőször a nehézfémekkel. A festett gyökércsúcsokat sztereo-binokuláris mikroszkóp alatt 50-szeres nagyítással vizsgáltuk, és digitális fotókat készítettünk.

4. 5. 1. Schiff-festés

A lipidperoxidáció kimutatására szolgáló *in vivo* festési módszer. Minthogy az oxidatív stressz rendszerint a membránlipidek peroxidatív degradációjával jár együtt, ez a teszt alkalmas a lipidperoxidáció során keletkezett aldehidek kimutatására (Yamamoto és mtsai, 2001; Wang és mtsai, 2009). A növényi mintákat az irodalomban leírtak alapján 0,5 mM CaCl_2 (pH 4,5)-oldatban átmostuk, aztán 20 percig kezeltük Schiff-reagenssel. Majd szulfit-oldatba helyeztük (0,5% w/v $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, kálium biszulfit 0,05 M-os HCl-ban) oldva, amíg elő nem tűnt a világos vörös szín, amely a membránok peroxidatív károsodását jelzi.

4. 5. 2. Anilinkék-festés

Ismeretes, hogy abiotikus stresszre a növényi sejtek –többek között- azzal válaszolnak, hogy *de novo* kallózt szintetizálnak és építenek be a sejtfalba (Kartusch, 2003; Chen és Kim, 2009). A kallóz-produkció kimutatására szolgál az anilinkékkel (aniline blue, AB; való festés (Yamamoto és mtsai, 2001; Hirano és mtsai, 2006). A gyökércsúcsokat az anilinkék 0,5%-os (w/v) oldatával festettük 5 percig, majd vizes átmosás után sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk.

4. 5. 3. Trypan kék-festés

A sejtleletképeség (membránintegritás) vizsgálatára szolgáló módszer (Gahan, 1984; Arduini és mtsai, 1995). Holt sejtek, illetve szövetek megfestésére alkalmas. Az élő sejtet nem festi, mert itt ép a sejtmembrán, ugyanakkor az elhalt sejtet kékre festi. A festéshez Trypan kék 0,5%-os oldatát használtuk, a mintákat 5 percig inkubáltuk, majd sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk a gyökércsúcsokat.

4. 5. 4. Sósavas floroglucinos festés

Mivel a Schiff-reagens nemcsak a lipidperoxidáció során keletkező aldehideket, hanem a sejtalba másodlagosan, pl. stressz hatására beépülő és annak rigiditását növelő lignint is festi (Gahan, 1984; Maksymiec, 2007), ezért mintegy a Schiff-festés kontrolljaként ligninre specifikus festéket, a sósavas floroglucint is alkalmaztuk (Mihalik és mtsai, 1999; Lequeux és mtsai, 2010). A mintákon megjelenő meggypiros elszíneződés utalt a lignin jelenlétére.

4. 6. A nehézfém-kezelés okozta szövettani változások vizsgálata a gyökércsúcsban

Az *in vivo* hisztokémiai festések eredményein túl kíváncsiak voltunk arra is, hogy a különböző nehézfém-kezelések okoznak-e a fejlődő elsődleges gyökérben szövettani elváltozásokat. Ehhez fénymikroszkópos metszeteket készítettünk, majd 100-szoros nagyítással digitális fotókat készítettünk. Vizsgáltuk a metszeti képeken azt is, hogy a nehézfém-stressz hatására bekövetkezik-e valamilyen anatómiai változás a főbb szövettájakon, vagyis a rizodermisz, az elsődleges kéreg parenchimatikus állománya és a központi henger (sztéle) egymáshoz viszonyított mennyiségi aránya vizuálisan változik-e.

A metszetkészítéshez a mintákat frissen tettük el. A desztillált vizes atmoszféra után a csírázó magvakat ún. Strassburger-Flemming-féle fixálóban (glicerín-víz-abszolút alkohol 1:1:1 arányú elegye) konzerváltuk (Mihalik és mtsai, 1999).

A paraffinos beágyazás előtt a mintákat víztelenítettük, majd fokozatosan paraffinnal itattuk át a szakirodalomban leírt módszer szerint (Mihalik és mtsai, 1999). A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a paraffinba ágyazott minták gyökércsúcsi részéről 15 µm-es vastagságú

keresztmetszeteket készítettünk szánkamikrotómmal. A metszeteket zselatinos tárgylemezeken rögzítettük, és egy napig szárítottuk. A festést megelőzően a metszetekből speciális oldószerrel (Histosolve, xilol-szubsztituens) eltávolítottuk a paraffint, majd az oldószert kimosása történt.

Végül négyféle vízben oldódó festékkoldattal festettük meg a metszeteket: anilinkékkel, toluidinkékkel, malachitzölddel és sósavas floroglucinnal Mihalik és mtsai (1999) által leírt módon.

Az **anilinkék** 0,5%-os (w/v) vizes oldatát alkalmaztuk, mely a stressz hatására gyorsan szintetizálódó kallóz kimutatására szolgál (Yamamoto és mtsai, 2001; Kartusch, 2003; Hirano és mtsai, 2006; Bouazizi és mtsai, 2010). Szakirodalomból ismert, hogy a növényi sejtfalat alkotó polimerek közé tartozó lignin mennyiségi-minőségi változásokon mehet keresztül biotikus és abiotikus stresszhatásokra egyaránt (Bouazizi és mtsai, 2010; Moura és mtsai, 2010).

A **toluidinkék** 0,2%-os (w/v) oldata alkalmas arra, hogy a fásodott sejtfalakat világoskékre vagy kékeszöldre színezve a nehézfém-stressz hatására beinduló lignifikálódási folyamatok eredményét láthatóvá tegye (Mihalik és mtsai, 1999).

A **malachitzöld** 1%-os (w/v) 70 %-os etanollal készített oldatát ugyancsak a fásodott sejtfalak festésére használtuk.

Bár a **sósavas floroglucin** in vivo hisztokémiai festékként ismert elsősorban, a lignin detektálására alkalmaztuk metszeteinken. A festékkoldat készítésekor először 0,1 g floroglucint oldottunk fel 96 %-os etanolban, majd ezen oldat és 25 %-os HCl 1:1 arányú elegyével kezeltük a preparátumokat. A festék az esetleges lignifikálódást élénk piros színnel jelzi (Mihalik és mtsai, 1999).

4. 7. Az adatok statisztikai feldolgozása

A statisztikai analízist STATISTICA 9.0 programmal végeztük. Kétfaktoros variancia analízist (ANOVA) használtunk annak eldöntésére, hogy a különböző paraméterek változását befolyásolja-e az alkalmazott nehézfém-koncentráció és/vagy a kezelés időtartama. Mivel az adatok általában nem mutattak normál eloszlást, ezért a továbbiakban nem-parametrikus tesztet (Kruskal- Wallis-féle ANOVA) alkalmaztunk a szignifikancia vizsgálatához. A kontroll és a kezelt növények közötti eltérések vizsgálatakor páronkénti összehasonlítást

végeztünk Mann-Whitney-féle páros U- teszt segítségével. A növények által felvett fémtartalom és a vizsgált paraméterek közötti, illetve a különböző biokémiai mutatók egymás közötti összefüggéseinek feltárására Spearman-féle rangkorrelációt használtunk. A 6-8 ismétlés során kapott adatokból átlagot számoltunk, amelyet szórással (standard deviancia, SD) együtt adtunk meg. A szignifikancia- szinteket a következő módon jelöltük: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

5. EREDMÉNYEK és DISZKUSSZIÓ

A mérési eredmények ismertetése és azok értékelése során először a két esszenciális nehézfém (Cu és Zn) felvételéről, majd általuk kiváltott oxidatív stressz jellemzésére szolgáló markerek bemutatásáról lesz szó, ezeket próbálom alátámasztani a hisztokémiai festések, illetve a szövettani metszetek eredményeivel. Ezután kerül sor a Cd-kezelés eredményeinek bemutatására ugyanezt a sorrendet követve.

5. 1. Az Cu és a Zn okozta oxidatív stressz vizsgálatának eredményei

5. 1. 1. A csírázó magvak Cu- és Zn-felvétele

A varianciaanalízis (ANOVA) során kiderült, hogy általában minden paraméter alakulását jelentősen befolyásolja mind az alkalmazott nehézfém-koncentráció, mind a kezelés időtartama. Kiderült az is, hogy az adott koncentráción belül a különböző időtartamú kezelések között, illetve ugyanazon időtartamon belül a kontroll és a kezelt növények paraméterei között is szignifikáns eltérések vannak (**2.A., B., C. és 3.A., B., C. táblázatok**).

Hatás	Paraméterek			
	AAS	FRAP	GSH	LP
Cu konc.	$F_{3,89} = 109,44^{***}$	$F_{3,110} = 92,96^{***}$	$F_{3,111} = 616,51^{***}$	$F_{3,88} = 115,97^{***}$
Időtart.	$F_{3,89} = 297,97^{***}$	$F_{3,110} = 13,63^{***}$	$F_{3,111} = 270,67^{***}$	$F_{3,88} = 17,32^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,89} = 28,14^{***}$	$F_{9,110} = 11,17^{***}$	$F_{9,111} = 42,37^{**}$	$F_{9,88} = 26,95^{***}$

2.A táblázat: A Cu-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (AAS-atomabszorpciós spektrofotometriával meghatározott nehézfém-tartalom, FRAP-össz antioxidáns kapacitás, GSH-redukált glutation mennyisége, LP-lipid peroxidáció).

A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Hatás	Paraméterek		
	Fehérje	GST	GPOX
Cu konc.	$F_{3,102} = 200,74^{***}$	$F_{3,93} = 66,37^{***}$	$F_{3,90} = 124,40^{***}$
Időtartam	$F_{3,102} = 19,09^{***}$	$F_{3,93} = 27,57^{***}$	$F_{3,90} = 10,63^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,102} = 40,72^{***}$	$F_{9,93} = 27,91^{***}$	$F_{9,90} = 13,74^{***}$

2.B táblázat: A Cu-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (Fehérje- össz fehérjetartalom, GST- glutation S-transzferáz, GPOX- gvajakol peroxidáz). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Hatás	Paraméterek		
	CAT	SOD	GR
Cu konc.	$F_{3,88} = 127,85^{***}$	$F_{3,76} = 242,80^{***}$	$F_{3,80} = 104,89^{***}$
Időtartam	$F_{3,88} = 15,25^{***}$	$F_{3,76} = 19,73^{***}$	$F_{3,80} = 71,45^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,88} = 10,91^{***}$	$F_{9,76} = 24,60^{***}$	$F_{9,80} = 26,46^{***}$

2.C táblázat: A Cu-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (CAT- kataláz, SOD- szuperoxid dizmutáz, GR- glutation reduktáz). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Hatás	Paraméterek		
	AAS	FRAP	GSH
Zn konc.	$F_{3,96} = 640,56^{***}$	$F_{3,112} = 0,76$ ns	$F_{3,110} = 48,92^{***}$
Időtartam	$F_{3,96} = 85,32^{***}$	$F_{3,112} = 240,39^{***}$	$F_{3,110} = 840,02^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,96} = 26,12^{***}$	$F_{9,112} = 7,48^{***}$	$F_{9,110} = 16,09^{***}$

3.A táblázat: A Zn-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (AAS- atomabszorpciós spektrofotometriával meghatározott nehézfém-tartalom, FRAP- össz antioxidáns kapacitás, GSH- redukált glutation mennyisége). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Hatás	Paraméterek			
	LP	Fehérje	GST	GPOX
Zn konc.	$F_{3,103} = 15,75^{***}$	$F_{3,101} = 118,16^{***}$	$F_{3,97} = 115,89^{***}$	$F_{3,91} = 65,61^{***}$
Időtartam	$F_{3,103} = 232,85^{***}$	$F_{3,101} = 356,04^{***}$	$F_{3,97} = 233,16^{***}$	$F_{3,91} = 217,50^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,103} = 44,47^{***}$	$F_{9,101} = 60,59^{***}$	$F_{9,97} = 69,22^{***}$	$F_{9,91} = 57,78^{***}$

3.B táblázat: A Zn-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (LP- lipid peroxidáció, Fehérje- össz fehérjetartalom, GST- glutation S-transzferáz, GPOX- gvajakol peroxidáz). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Hatás	Paraméterek		
	CAT	SOD	GR
Zn konc.	$F_{3,69} = 111,51^{***}$	$F_{3,60} = 22,49^{***}$	$F_{3,47} = 400,52^{***}$
Időtartam	$F_{3,69} = 373,21^{***}$	$F_{3,60} = 136,14^{***}$	$F_{3,47} = 1798,59^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,69} = 167,77^{***}$	$F_{9,60} = 16,02^{***}$	$F_{9,47} = 330,92^{***}$

3.C táblázat: A Zn-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (CAT- kataláz, SOD- szuperoxid dizmutáz, GR- glutation reduktáz). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Mivel mindkét fém esetében a koncentráció-függés bizonyult erősebbnek, annak kiderítésére, hogy a kezelés hossza miként befolyásolja ezt, a különböző hosszúságú kezeléseken belül kapott adatokon is elvégeztük a korreláció-analízist. Mind a Cu, mind a Zn akkumulációja igen erős, szignifikánsan pozitív összefüggést mutatott a rövid és a hosszú távú kezeléseknél egyaránt (lásd később **5. és 7. táblázat**). A kezelés időtartamának emelésével növekedett a felvett nehézfém mennyisége a növényekben, de az is megfigyelhető volt, hogy minél magasabb volt az alkalmazott nehézfém oldatbeli koncentrációja, annál több halmozódott fel a magvakban is. A rövid- és a hosszú távú Cu-kezeléseknél egyaránt a 100 és a 200 mg L⁻¹ töménységű oldatokban csíráztatott növényekben szignifikánsan több Cu akkumulálódott a kontrollhoz képest; ez időfüggően közel 200-szoros is lehetett (**4. táblázat**). Az idő- és koncentrációfüggést a Spearman-féle rangkorreláció is megerősítette: $r = 0,30$, $p < 0,01$ (idő) és $r = 0,82$, $p < 0,001$ (koncentráció). Ha a különböző időtartamok szerint is megvizsgáltuk,

ugyancsak erős pozitív kapcsolatot fedeztünk fel az alkalmazott dózis és a felvett Cu mennyisége között (**5. táblázat**). A 200 mg L⁻¹ koncentrációnál 96 h csíráztatott növények által felvett közel 17 µmol g⁻¹ sz.t. Cu mintegy 1087 mg kg⁻¹ sz.t.-nek felel meg. Mihoub és mtsai (2005) hasonló nagyságrendű Cu-akkumulációt mértek 5 mM Cu- oldatban csíráztatott borsó szikleveleiben.

Cu konc. (mg L ⁻¹)	12h	24h	48h	96h
0	0,00 ± 0,00 a	0,03 ± 0,00 a	0,06 ± 0,02 a	0,19 ± 0,03 a
50	1,29 ± 0,21 ac	4,16 ± 0,80 ab	4,02 ± 0,84 ab	4,19 ± 1,03 ab
100	4,67 ± 0,83 b	4,96 ± 0,69 bc	11,53 ± 2,11 b	13,75 ± 1,16 b
200	3,91 ± 1,15 bc	6,71 ± 0,99 c	11,18 ± 3,65 b	16,99 ± 2,23 b

4. táblázat: A különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok réztartalma (µmol g⁻¹ sz.t.). A kisbetűk a szignifikáns különbségeket jelzik p<0,05 esetén (Kruskal-Wallis-féle post-hoc teszt alapján).

Paraméterek	12h	24h	48h	96h
AAS	0,81***	0,93***	0,92***	0,96***
FRAP	-0,42*	0,44*	0,56***	0,68***
GSH	0,93***	0,91***	0,40*	0,66**
LP	0,40*	-0,21	-0,27	0,80**
Fehérje	-0,49**	0,83***	0,75***	0,45*
GST	0,76***	-0,74***	-0,56**	0,15
GPOX	0,55**	-0,74***	-0,02	0,01
CAT	0,74***	-0,79***	0,06	0,64**
SOD	0,32	0,36	-0,35	0,25
GR	0,75***	0,33	-0,64***	0,43

5. táblázat: A Cu- koncentráció és az egyes paraméterek közti összefüggést kifejező korrelációs együtthatók (Spearman-féle) a különböző hosszúságú kezelések szerint. A szignifikancia-szintek jelölése: * p<0,05, ** p<0,01 és *** p<0,001 esetén.

A Zn esetében jelentősebb akkumulációt a 100 és a 200 mg L⁻¹ koncentrációnál figyeltünk meg, a kontrollnál 13-18-szor illetve 24-50-szer több Zn-t vettek fel a csírázó növények (**6.**

táblázat). A Cu-hez hasonlóan a korreláció-analízis szignifikáns idő- és koncentráció-függést tárt fel: $r = 0,30$, $p < 0,01$ (idő) és $r = 0,93$, $p < 0,001$ (koncentráció). A kezelés időtartamának növelésével és az egyre növekvő nehézfém-koncentrációk alkalmazása által növekedett a felvett nehézfémek mennyisége a kezelt növényekben. Az egyes időtartamok szerint is megvizsgálva erősen szignifikáns pozitív összefüggést állapítottunk meg az alkalmazott koncentrációk és az akkumulált Zn mennyisége között (**7. táblázat**). Hasonlóan Wang és mtsai (2009) előnevelt, majd 7 napig 0,07-1,12 mM-os Zn-oldattal kezelt repce (*Brassica napus*) növények gyökérben a koncentráció növelésével párhuzamosan markáns Zn-akkumulációt (akár 14,67 mg g⁻¹ sz.t. is) mértek, amely már a toxicitást eredményezett. Kisebb, 10-40 mg L⁻¹ Zn-tartalmú tápoldatban 14 napig nevelt lucerna növények gyökerében ugyancsak a kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb (22,6-24,3 mg g⁻¹ sz.t.) Zn-tartalmat detektáltak (Peralta és mtsai, 2001).

Zn konc. (mg L ⁻¹)	12h	24h	48h	96h
0	0,31 ± 0,03 a	0,29 ± 0,05 a	0,32 ± 0,06 a	0,41 ± 0,05 a
50	2,19 ± 0,28 ab	3,09 ± 0,38 ab	3,81 ± 0,51 ab	5,41 ± 0,60 ab
100	4,00 ± 0,28 bc	6,32 ± 1,23 bc	7,01 ± 0,97 bc	7,48 ± 0,85 bc
200	7,38 ± 0,98 c	12,27 ± 1,99 c	16,27 ± 3,09 c	19,99 ± 2,83 c

6. táblázat: A különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok cinktartalma (μmol g⁻¹ sz.t.). A kisbetűk a szignifikáns eltéréseket jelzik $p < 0,05$ esetén.

Paraméterek	12h	24h	48h	96h
AAS	0,97***	0,97***	0,97***	0,97***
FRAP	0,07	-0,28	0,24	0,36*
GSH	0,45*	0,65***	0,72***	0,06
LP	0,07	0,51***	-0,44*	0,39*
Fehérje	0,17	-0,58***	-0,33	-0,68***
GST	-0,55**	0,48**	0,75***	0,84***
GPOX	0,004	-0,07	-0,09	0,97***
CAT	-0,27	0,07	-0,69***	0,23
SOD	0,55***	0,01	0,16	0,76*
GR	-0,41	0,40	-0,85***	0,63

7. táblázat: A Zn- koncentráció és az egyes paraméterek közti összefüggést kifejező korrelációs együtthatók (Spearman-féle) a különböző hosszúságú kezelések szerint. A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

5. 1. 2. A Cu és a Zn által indukált oxidatív stressz paraméterei

5. 1. 2. 1. A Cu által kiváltott oxidatív stressz jelei

A ferri-ion redukálóképesség vizsgálatának eredményei

A Cu-kezelés hatására időbeni csökkenés mutatkozott a teljes antioxidáns kapacitást kifejező FRAP-értékekben a kontroll és a kezelt növényekben egyaránt. A Cu-koncentrációk emelkedésével az Cu50 és Cu100 növényekben 24-96h után szignifikáns növekedést tapasztaltunk (**5. ábra**). Ezt a tendenciát a korrelációs együtthatók is alátámasztják (**5. táblázat**, 37. oldal). A Cu200 csíranövényekben kontroll növényekhez viszonyítva a rövid távú kezelés után szignifikánsan kisebb követően, míg a hosszabb távú kezeléseket követően nagyobb FRAP-értékeket kaptunk.

5. ábra: A különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok összantioxidáns kapacitása (FRAP). A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Bár a FRAP módszer szemikvantitatív meghatározásra alkalmas, a FRAP-értékek időbeni koncentrációfüggő változása az antioxidáns védelmi rendszer, főleg a fenolos jellegű komponensek aktivizálódását jelzi (Blokhina és mtsai, 2003; Prior és mtsai, 2005; Maksymiec, 2007;).

A redukált glutation (GSH) mennyiségi változása

A 12-24h kezeléseknél koncentráció-függően markánsan növekedett a GSH-szint ($r = 0,93$ és $r = 0,91$, $p < 0,001$; lásd **5. táblázat**, 37. oldal), ami a stressz okozta gyors indukcióra utal; 48h után azonban ez a pozitív összefüggés mérséklődött. A GSH-tartalom változásában az össz antioxidáns-kapacitáshoz hasonlóan időbeni csökkenést kaptunk a kontroll és a kezelt növényekben egyaránt (**6. ábra**).

6. ábra: A különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok redukált glutation-tartalma (GSH). A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Devi és Prasad (2005) 8 napos előnevelt, 2 napig Cu-kezelt (50-200 μM) indiai mustár növények gyökereiben a koncentráció emelkedésével párhuzamosan a GSH-szint jelentős csökkenését tapasztalták. De Vos és mtsai (1992) növekvő Cu-mennyiség (0,01-1000 μM) jelenlétében ugyancsak az oxidált glutation (GSSG) arányának növekedését tapasztalták mind a Cu-szenzitív, mind a toleráns *Silene cucubalus* (hólyagos szegfű) növények gyökerében.

A GSH mennyiségének idő- és koncentráció-függésére már Wang és mtsai (2004) is felfigyeltek, amikor Cu-kezelt (8 μM) *Brassica juncea* növények gyökerében a kezelés 4. napjáig a kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb, a 6. naptól kezdve azonban alacsonyabb redukált glutation-tartalmat mértek.

A vizsgálataink során tapasztalt koncentráció-függően növekedő GSH-szint, illetve az tény, hogy mennyisége időben mégis csökkent, arra utal, hogy az indukált GSH-termelődés mellett jelentős GSH-fogyasztás történik részben az aszkorbát-glutation-ciklusban, részben a nehézfémek komplexálást végző fitokelatinok szintézisének köszönhetően (Devi és Prasad, 2005; Yruela, 2005).

A Cu által kiváltott lipid peroxidáció (LP) vizsgálata

A kezelt növényeknél egyaránt a LP kismértékű növekedését tapasztaltuk, szignifikáns emelkedést azonban csak a hosszabb távon (96h) figyeltünk meg (**7. ábra**). Koncentrációfüggést is csak a 96h kezelésnél sikerült kimutatni ($r = 0,80$, $p < 0,01$; lásd **5. táblázat**, 37. oldal). Hozzánk hasonlóan a LP és a koncentráció között pozitív összefüggésre mutattak rá Singh és mtsai (2010), akik előnevelt, 3-14 napos Cu-kezelésnek kitett indiai mustár növények gyökerében a LP idő- és koncentráció-függő növekedését detektálták. Janas és mtsai (2010) ugyancsak a LP fokozódását figyelték meg 0,05-0,5 mM Cu-oldatban 3 és 5 napig csíráztatott lencse elsődleges gyökereiben.

7. ábra: A lipid peroxidáció alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Számos irodalmi adat van arra vonatkozólag, hogy a nehézfém okozta oxidatív stressz jeleként a LP fokozódik (Chaoui és mtsai, 1997; Chaoui és mtsai, 2005; Devi és Prasad, 2005). Például Wang és mtsai (2004) kísérletében a 10 napos előnevelt, majd 2-16 μM Cu-zel kezelt indiai mustár növények gyökerében a koncentrációval együtt emelkedett a lipidperoxidok mennyisége, ugyanakkor csak hosszabb idő (6-8 nap) elteltével kaptak szignifikánsan magasabb értékeket.

Ennél jóval nagyobb (mM-os) Cu-koncentráció csírázó bab növények embriójában is időben növekvő LP-t váltott ki (Sfaxi-Boushieb és mtsai, 2010).

A kísérletünk során kapott eredmények és az irodalomban olvasható tendenciák közti ellentmondás feloldására alkalmaztuk az *in vivo* hisztokémiai eljárások közül a Schiff-festést (lásd később).

Az össz fehérje-tartalom vizsgálatának eredményei

Noha a csírázó magvak össz fehérje-tartalmát az enzimaktivitások meghatározásához mértük meg, ezen paraméter változásai is informálnak a nehézfém kezelés okozta oxidatív stresszről. A kontroll, a Cu50 és a Cu100 növényeknél időben csökkenő tendencia volt megfigyelhető, míg a Cu200 esetében a csírázás korai szakaszában (12-24h) az erős növekedést, a fehérje-tartalom csökkenése követte (**8. ábra**). Ha a koncentráció-függést vizsgáltuk, a 24-48h kezeléseknél kaptunk szignifikánsan pozitív korrelációt (lásd **5. táblázat**, 37. oldal), vagyis az erősebb Cu-kezelés fehérje-szintézist indukált.

A 48-96h kezeléseknél kapott csökkenés oka valószínűleg az lehet, hogy a Cu-ionok nagy affinitással kapcsolódnak a fehérjék tiol-csoportjaihoz, ezzel a fehérje-metabolizmusban zavar keletkezik, és megkezdődik a funkcióvesztett proteinek degradációja (Arduini és mtsai, 1995; Jouili és El Ferjani, 2003). Feltűnő, hogy az össz fehérje-tartalom és a vizsgált enzimek aktivitása között szignifikáns negatív korrelációt mutatott ki a statisztikai analízis is (lásd **5. táblázat**, 37. oldal).

Magyarázatként szolgálhat erre az, hogy Ahsan és mtsai (2007) jelentős proteomikai változásokról számoltak be Cu-kezelt csírázó rizs növényekben, vagyis a fehérje-profil átrendeződik, más arányban jelentkeznek a csírázással kapcsolatos fehérjék (pl. globulinok, amilázok), mint a stressz-kapcsoltak, például a GST.

8. ábra: Az össz fehérje-tartalom alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A glutation –S- transzferáz enzim aktivitása

A GST-aktivitás változása a 12-48h kezeltéknél jelentős koncentráció-függést mutatott ($r = 0,76$, $r = -0,74$, $p < 0,001$; illetve $r = -0,56$, $p < 0,01$), ami arra utalhat, hogy az enzim aktivitása és indukciója több tényezőtől is függ (Szöllősi és mtsai, 2009).

A rövid távú (12h) kezelés csak a Cu200 növényekben eredményezett GST-indukciót, míg a 24-48h esetében a Cu-kezelt növényekben a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns csökkenés mutatkozott a GST aktivitásában (**9. ábra**). Legnagyobb aktivitást a Cu200 növényeknél mértünk 96h kezelést követően.

A GST-aktivitás viszonylagos növekedését a GSH-szint csökkenése kísérte, a két paraméter között szignifikáns negatív kapcsolatot tártunk fel ($r = -0,48$, $p < 0,001$, lásd **5. táblázat**, 37. oldal), ami nem meglepő, hiszen a GST szubsztrátja a GSH.

Halušková és mtsai (2009) szoros összefüggést állapítottak meg a GST-aktivitás és a Cu-kezelés által kiváltott gyökérnövekedés-gátlás között árpa növények gyökércsúcsaiban, továbbá a Cu GST-t indukáló hatására mutattak rá.

9. ábra: A GST aktivitásának alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitása

A Cu által kiváltott oxidatív stressz során keletkezett $\bullet\text{O}_2^-$ -k H_2O_2 -dá való alakítását katalizáló SOD aktivitása a csírázás korai szakaszában (12-24h) változatlan volt, 48h után azonban a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabbnak, 96h-t követően pedig szignifikánsan magasabbnak bizonyult, főleg a Cu50 és a Cu100 növényekben (**10. ábra**). Koncentrációfüggést ugyan nem sikerült kimutatnunk, de azt tapasztaltuk, hogy a SOD-aktivitás időben fokozódik, miként azt Wang és mtsai (2004), valamint Singh és mtsai (2010) is már leírták az indiai mustár esetében.

A 48h kezelésnél kapott kontrollnál kisebb aktivitás, majd az azt követő hirtelen növekedés átmeneti enzimgátlásra utal, s arra, hogy a CAT-hoz és a GPOX-hoz képest SOD-nak kisebb a jelentősége a Cu által kiváltott oxidatív stressz elleni védekezésben (Jouili és El Ferjani, 2003).

10. ábra: A SOD aktivitásának alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Kataláz (CAT) aktivitás

A kontroll és a kezelt növényekben kezelés időtartamának növelésével emelkedő tendenciát mutatott a kataláz- aktivitás, eltérően Devi és Prasad (2005) eredményeitől, akiknek Cu-kezelt indiai mustár növényeinek gyökerében nem következett be jelentős változás a CAT működésében. Emellett Wang és mtsai (2004) is a kezelési idő előrehaladtával a CAT fokozatos kimerülését detektálták, illetve a tápoldat Cu-tartalmát növelve szignifikánsan kisebb enzimaktivitást kaptak indiai mustár gyökerében.

A 12h kezelték közül csak a Cu200 váltotta ki enzimaktivitás szignifikáns emelkedését a kontrollhoz viszonyítva, amit a korreláció-analízis is alátámasztott ($r = 0,74$, $p < 0,001$; lásd **5. táblázat**, 37. oldal). A 24h és 48h elteltével a kezelt növényekben csökkenést tapasztaltunk a kontrollhoz képest, míg 96h után ismét magasabb CAT-aktivitásokat kaptunk (**11. ábra**). Hozzánk hasonlóan számos tanulmány szól a réz CAT-aktivitást fokozó hatásáról, és egyet értenek abban, hogy ennek oka Cu okozta fokozott H_2O_2 -productió (Jouili és El Ferjani, 2003; Singh és mtsai, 2007; Singh és mtsai, 2010).

11. ábra: A CAT aktivitásának alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Eredményeink azt jelzik, hogy az alkalmazott koncentrációk még nem okoztak az enzimfehérje szerkezetében és funkciójában károsodást, hanem magasabb aktivitást indukáltak, amely hatékonyan hozzájárulhatott a ROS-k detoxifikálásához (Singh és mtsai, 2010; Szöllősi és mtsai, 2011).

A gvajakol–peroxidáz aktivitás (GPOX)

A kezelt növényekben a GPOX enzim aktivitása a csírázás kezdetén a Cu-koncentrációnak megfelelően emelkedett, majd a 12 órás periódust követően kissé visszaesett, később már nem volt ilyen egyértelmű a tendencia (**12. ábra**). Jelentős koncentráció-függést csak a 12h és a 24 h növényeknél mutatott ki a korreláció-analízis, az előbbi esetben növekedést, utóbbi esetben szignifikáns csökkenést ($r = 0,55$, $p < 0,01$ és $r = -0,74$, $p < 0,001$, lásd **5. táblázat**, 37. oldal). A 4. napot követően a kontroll növényekben mért aktivitást a Cu200 növények érték el, a Cu50 és a Cu100 csíranövényekben szignifikánsan kisebb volt a GPOX-aktivitás. A GPOX feltehetően gyorsan (12h) indukálódik, koncentráció-függő aktivitás-növekedése pedig arra enged következtetni, hogy nehézfém a csírázás kezdetén egy hirtelen ROS-felszaporodást eredményezett, de rövidesen (24h) a reaktív oxigénformák enzimgátlást okoztak. Később az enzimműködés regenerálódott, és az idősebb növényekre jellemző módon időben növekvő

aktivitást kaptunk. A kontroll és a kezelt növényeknél elmondható, hogy a GPOX általában időben növekvő aktivitást mutat a szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan (Yruela, 2005). Eredményeink azt sejtetik, hogy a GPOX működését mind az alkalmazott Cu-koncentráció, mind a kezelés időtartama meghatározza hasonlóan Cuypers és mtsai (2002) illetve Wang és mtsai (2004) által kapott eredményekhez.

10. ábra: A GPOX aktivitásának alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ és *** $p < 0.001$ esetén.

A hosszú távú (96h) kezelésnél tapasztalt magas aktivitás oka lehet az is, hogy a Cu-toxicitás okozta ROS-k (főleg H_2O_2) eliminálásában érintett peroxidázok, mint amilyen a GPOX, aktív szerepet játszanak a sejtfalak lignifikálásában is (Cuypers és mtsai, 2002; Jouili és El Ferjani, 2003; Maksymiec, 2007; Bouazizi és mtsai, 2010; Singh és mtsai, 2010; Jouili és mtsai, 2011). Bár méréseink a felülúszóból történtek, nincs kizárva, hogy a szolubilis peroxidázok mellett a homogenizálás során sejtfalkötött peroxidázok is kerültek a mintába. Ennél fogva a gyökércsúcsok növekedésének leállása, vastagodása, öregedése, barnás elszíneződése (lásd később) kapcsolatba hozható többek között a fokozott GPOX-aktivitással.

A glutation reduktáz (GR) aktivitása

Az aszkorbát-glutation-ciklusban a GSSG GSH-vá történő visszaredukálását végző GR már a csírázás elején (12h) indukálódott, a Cu-kezelés hatására szignifikánsan nagyobb értékeket

kaptunk. Később ez csillapodott, bár a kontrollhoz képest még mindig jóval nagyobb aktivitásokat mértünk, de 48-96h idejére ismét aktivitás-növekedés jelentkezett (**13. ábra**). A szakirodalom egy része a toxikus mennyiségű Cu általában GR-aktivitást fokozó hatásáról számol be (Yruela, 2005), de vannak ellentétes irányú változásokról is adatok (Chaoui és El Ferjani, 2003). Gupta és mtsai (1999) a miénkhez hasonló tendenciáról számoltak be Cu-kezelt bab növények gyökereiben mért GR-aktivitást illetően.

13. ábra: A GR aktivitásának alakulása különböző Cu- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Esetünkben a fokozódó GR-aktivitást nem kísérte emelkedő GSH-szint ($r = -0,08$, $p > 0,05$; lásd **5. táblázat**, 37. oldal), ami valószínűleg annak köszönhető, hogy a GR által regenerált GSH továbbra is felhasználásra került részben az aszkorbát redukálásához, részben a Cu^{2+} -ionok redukálásához, valamint a fitokelatin-szintézishez (Gupta és mtsai, 1999; Yadav, 2010).

5. 1. 2. 2. A Zn által kiváltott oxidatív stressz jelei

A ferri-ion redukálóképesség vizsgálatának eredményei

A Zn-kezelt növényekben is megfigyelhettük az antioxidáns-tartalom csökkenését az idő előrehaladtával, azonban itt csak 12h után az Zn50 és Zn100 növényekben mértünk a

kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb értékeket (**14. ábra**), koncentráció-függést azonban nem lehetett kimutatni (lásd **7. táblázat**, 39. oldal).

A Cu-kezeléshez hasonlóan mind a kontroll, mind a Zn-kel stresszelt növényeknél tapasztalható FRAP-csökkenés az antioxidáns védelmi rendszer fokozatos kimerülésére utal, mely a toxikus mennyiségű Zn-nek kitett csírázó magvakban felboruló redox egyensúly visszaállítását célozza meg (Prasad és mtsai, 1999; Oznedder és Aydin, 2010; Szöllősi és mtsai, 2011).

14. ábra: A különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok össz antioxidáns kapacitása (FRAP). A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: ** $p < 0,01$ esetén.

A redukált glutation (GSH) mennyiségi változása

A 12-48h kezelések esetén leginkább a Zn200 növényekben mértünk a kontrollnál szignifikánsan magasabb redukált glutation-szintet (**15. ábra**), amit a korreláció-analízis is alátámasztott ($r = 0,45$, $p < 0,05$; $r = 0,65$ illetve $r = 0,72$, $p < 0,001$; lásd **7. táblázat**, 39. oldal). Bár a csírázás elején (12h) a kisebb Zn-tartalmú oldatokban csíráztatott magvakban is nagyobb volt a GSH mennyisége, később ezek a különbség eltűntek, sőt 96h után alacsonyabb értékek adódtak.

Az időbeli változásokat vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a kontroll, a Zn50 és a Zn100 növények GSH-szintje 48h-ig csökken, majd a kezelés végéig (96h) ismét emelkedik, míg a Zn200 növényekben fokozatosan csökken a GSH-tartalom. Hasonló változást tapasztaltak Cuypers és mtsai (2001), akik viszonylag alacsony, de már toxikus koncentrációjú ($50 \mu\text{M}$)

Zn-oldatban nevelt bab növények gyökerében az idő múlásával a GSH mennyiségének csökkenését és a GSSG-szint emelkedését detektálták, ami részben az aszkorbát-glutation-ciklusban való fokozott GSH-felhasználásnak, részben a GR gátlásának köszönhető.

15. ábra: A különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok redukált glutation-tartalma (GSH). A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A GSH-szint nemcsak idő-, hanem koncentráció-függő változásaira is vannak irodalmi adatok, melyek alapján feltételezhető, hogy a növekvő Zn-koncentráció által gyökérben kiváltott GSH-csökkenés oka a Zn-kel való direkt vagy fitokelatinok révén megvalósuló kelátképzés (Wang és mtsai, 2009).

A redukált glutation mennyiségének változásában időbeni csökkenő tendenciát tapasztaltunk ($r = 0,81$, $p < 0,001$), ami megerősíti a GSH-nak a Zn-toxicitással járó oxidatív stressz-folyamatok kivédésében betöltött szerepét (Cuypers és mtsai, 2001).

A Zn által kiváltott lipid peroxidáció vizsgálatának eredményei

Meglehetősen nagyfokú LP-val lehetett számolni már a csírázás elején (12h), a kontroll és a kezelt csírázó magvakban egyaránt (**16. ábra**). 24h idejére - a Zn200 kivételével - ez visszaesett, majd ismét növekedett. A csírázás 24-96h szakaszában a Zn50 és Zn100 növények LP-értékei a kontrolléhoz hasonlóak voltak, a Zn200 kezelés azonban kezdetben

(12-24h) magas, később (48-96h) alacsonyabb LP-t váltott ki, ami azt sejteti, hogy nemcsak a kezelés hossza, de a koncentráció is meghatározó (lásd **3.B táblázat**, 36. oldal).

Eredményeinkhez hasonlóan Chaoui és mtsai (1997) arra derítették fényt, hogy toxikus mennyiségű (100 μM) Zn jelenléte indukálja a lipid peroxidációt, habár a Cu-tól eltérően a Zn nem redox nehézfém. Wang és mtsai (2009) már a 0.07 mM-os Zn-koncentrációval kezelt repce növények gyökérben is a kontrollhoz képest jóval magasabb LP-t mértek, ami hisztokémiai vizsgálatokkal (Schiff-festés) is igazoltak. Más fémekkel (Cu, Cd) végzett vizsgálatokban is hasonló eredményeket kaptak (Chaoui és mtsai, 1997; Prasad és mtsai, 1999).

16. ábra: A lipidperoxidáció alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Az össz fehérje-tartalom vizsgálatának eredményei

A Cu-kezeléshez képest kissé más tendenciát kaptunk a kontroll és a Zn-nek kitett magvakban az össz fehérje-tartalomra vonatkozólag. A csírázás elején (12h) kapott magas értékekhez képest 24h-ra növekedés történt, de csak a kontroll, a Zn50 és Zn100 növényeknél, melyet az ontogenezis későbbi szakaszaiban (48-96h) erőteljes csökkenés követett (**17. ábra**). A Zn200 növényeknél 24h táján bekövetkező szignifikáns nagyfokú fehérje-degradációra utal, ami a Zn-toxicitás egyik jele lehet, hiszen a nagy mennyiségben jelenlevő Zn gátolhatja más

létfenntartású elem (pl. Fe, P, Mg, K, Ca) felvételét, ezáltal számos fehérje működése sérül (Rout és Das, 2003). A Zn-stressznek a proteinek mennyiségére gyakorolt negatív hatásáról számoltak be Chaoui és mtsai (1997) is. Úgy tűnik, hogy ezt a gátló hatást esetünkben a kisebb Zn-koncentrációk csak hosszabb távon tudták elérni.

17. ábra: Az össz fehérje-tartalom alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

A glutation –S- transzferáz enzim aktivitása

A GST-aktivitás változása a 12h kezeléstől eltekintve pozitív koncentráció-függést mutatott (lásd **7. táblázat**, 39. oldal). Azt is megfigyeltük, hogy az enzimaktivitás leginkább a csírázás végére (96h) emelkedett meg jelentősen, ami arra utalhat, hogy az enzim működését, indukcióját több tényező is befolyásolja (Szöllősi és mtsai, 2009). Csak a magasabb koncentrációk (Zn100 és Zn200) váltottak ki jelentősebb aktivitásbeli növekedést 24h után, ami aztán időben csillapodott, de 96h-ra felerősödött (**18. ábra**).

Eredményeinkhez hasonlóan Wang és mtsai (2009) is GST-indukciót figyeltek meg 0,07-0,28 mM Zn-vel kezelt repce növények gyökerében, ugyanakkor magasabb Zn-koncentrációk az aktivitás mérséklődését váltották ki. Az indukciót az oxidatív stressz folyamatos meglétével magyarázták, míg a csökkenést a GSH-deplécióval hozták kapcsolatba. Ez utóbbi feltételezést esetünkben sajnos nem támasztotta alá a GST-aktivitás és a GSH-tartalom közti igen gyenge pozitív korreláció ($r = 0,14$, $p > 0,05$).

18. ábra: A GST aktivitásának alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

A Zn GST-aktivitást fokozó hatását figyelték meg Halušková és mtsai (2009) is árpa növények gyökércsúcsait vizsgálva.

A Zn hatása szuperoxid dizmutáz aktivitására

A Zn a SOD-aktivitást - a Cu-kezelésnél kapott eredményekhez hasonlóan – időben egyenletesen növelte, de legerősebb indukciót csak 96h után tapasztaltunk, mind a kontroll, mind a kezelt növényekben (**19. ábra**). A SOD-aktivitás és az oldatbeli Zn-koncentráció között pozitív összefüggést csupán a csírázás elején (12h) és végén (96h) tudtunk kimutatni ($r = 0,55$, $p < 0,001$ illetve $r = 0,76$, $p < 0,05$), Madhava Rao és Sresty (2000) eredményeihez hasonlóan. Az, hogy a SOD csak a kísérletünk végén (96h) mutatott markánsabb aktivitást, Ozneder és Aydin (2010) szerint annak köszönhető, hogy a Zn nincs direkt hatással a SOD működésére, ugyanakkor más mikroelemek (pl. Cu, Mn, Fe) felvételének gátlásán keresztül hatással van a SOD izoenzimeire. Erre a közvetett hatásra utalhat az is, hogy kísérleteink során a SOD és az általa generált H_2O_2 -t elimináló CAT illetve GPOX aktivitása között közepesen erős, de szignifikáns pozitív korrelációt kaptunk ($r = 0,46$ és $r = 0,48$, $p < 0,001$, lásd **7. táblázat**, 39. oldal).

19. ábra: A SOD aktivitásának alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

Bár a szakirodalomban a toxikus mennyiségű Zn SOD –ra gyakorolt indukáló vagy éppen gátló hatásáról megoszlanak a vélemények, úgy véljük, vizsgálatainkban a SOD által termelt ROS semlegesítésében a CAT és GPOX mellett fontos szerepe lehetett GSH-nak is, mivel a SOD-aktivitás növekedése jelentős GSH-deplációval járt együtt ($r = -0,47$, $p < 0,001$). A keletkező GSSG visszaredukálása végett pedig a GR aktivitása emelkedett meg ($r = 0,47$, $p < 0,001$, lásd **7. táblázat**, 39. oldal).

A kataláz (CAT) aktivitása Zn-kezelés hatására

A CAT aktivitása a nem kezelt, a Zn50 és Zn100 növényekben emelkedett 48h-ig, majd mérséklődött. Egyedül a 24h kezelés esetében kaptunk a Zn50 és Zn100 növényekben szignifikánsan nagyobb aktivitást a kontrollhoz képest (**20. ábra**). A 200 mg L⁻¹ koncentráció alkalmazásakor a CAT aktivitása időben előre haladva növekedett.

Bár Prasad és mtsai (1999) nem vizsgáltak időfüggést, de ők is azt tapasztalták, hogy a CAT-aktivitás a tápoldat Zn- koncentrációjának növelésével emelkedik. Sharma és mtsai (2010) ugyancsak ezt tapasztalták bagolyborsó (*Cicer arietinum*) vizsgálatokor. Ezzel ellentétben Chaoui és mtsai (1997) a hosszú távú Zn-kezelés CAT-gátló hatásáról számoltak be bab növények gyökerében. Wang és mtsai (2009) pedig a CAT-aktivitás koncentráció-függő csökkenéséről számoltak be.

20. ábra: A CAT aktivitásának alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

A statisztikai feldolgozás során arra is fény derült, hogy a CAT és a SOD aktivitása között közepesen erős, de szignifikáns pozitív összefüggés van ($r = 0,48$, $p < 0,001$), ami nem meglepő, hisz a Zn-terhelés következtében a SOD több H_2O_2 -t produkál, amelynek semlegesítése végett a CAT-nak, akárcsak a GPOX-nak, erőteljesebben kell működnie (Wang és mtsai, 2009).

Mérési eredményeink és a korábbi tanulmányokban közölt adatok összevetése után úgy tűnik, hogy a CAT működésében fontos szerepet játszik a vizsgált faj rendszertani helye, a vizsgált szerv jellege, az alkalmazott koncentráció és a nehézfém-stressz időtartama.

A gvajakol- peroxidáz aktivitás (GPOX)

A GPOX esetében 96h után tapasztaltunk a kontrollhoz képest jelentősebb aktivitásbeli növekedést a Zn50, Zn100 és Zn200 csíráztatott magvakban ($r = 0,97$, $p < 0,001$), a csírázás korábbi stádiumaiban kontrollhoz közeli, alacsony aktivitás volt mérhető (**21. ábra**). Emellett – főleg a kezeltéknél - időbeli növekedést is fel lehetett fedezni, ami a GST-hez hasonlóan az enzim többtényezős indukcióját sejteti.

A szakirodalomban a GPOX Zn-stressz által befolyásolt működéséről eltérő vélemények vannak, ami valószínűleg az eltérő hosszúságú és erősségű kezeléseknek tudható be. Chaoui és mtsai (1997) 100 μM Zn-kel kezelt bab növények gyökerében a GPOX aktivitásában nem tapasztaltak változást, míg Cuypers és mtsai (2002) ugyanezen növények 50 μM Zn-kel gyökerében 96h után az aktivitás markáns csökkenését, majd fokozatos, de a kontroll értékeket el nem érő növekedését írták le. Utóbbi szerzők a jelenséget azzal magyarázták, hogy a Zn – a Cu-tól eltérően - más védekezési mechanizmusokat indít be.

21. ábra: A GPOX aktivitásának alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

Eredményeinkkel összhangban Wang és mtsai (2009) a Zn-kezelt repce gyökerében pedig a koncentráció emelkedésével erősödő GPOX-aktivitást mértek, aminek hátterében az áll, hogy a fokozottabb ROS-képződés (elsősorban H_2O_2) által indukált enzim a sejtfalakban másodlagos vastagodást hoz létre, mely gátolja a sejt számára toxikus mennyiségű Zn felvételét. Ezt a feltevést támasztja alá a GPOX és a SOD aktivitása közt kimutatható pozitív korreláció is ($r = 0,48$, $p < 0,001$; lásd **7. táblázat**, 39. oldal).

A Zn hatása glutation reduktáz működésére

A ROS-k semlegítésére az aszkorbát-glutation-ciklusban felhasznált GSH regenerálását végző GR a Zn-kezelés elején és közepén meglehetősen alacsony aktivitást mutatott, csupán a 24h-

nál váltott ki indukciót a 100 mg L⁻¹ koncentráció, 48h-nál pedig enzimgátlást (**22. ábra**). Az emelkedő Zn-koncentráció gátló hatását mindössze a 48h kezelésnél tapasztaltuk, 96h után azonban jelentős aktivitás-növekedést lehetett megfigyelni.

22. ábra: A GR aktivitásának alakulása különböző Zn- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

A Zn GR-blokkoló hatását támasztja alá Cuypers és mtsai (2001) tanulmánya, míg az utóbbi eredmény összhangban van Madhava Rao és Sresty (2000) által leírtakkal, akik 2,5-7,0 mM-os koncentráció alkalmazása során detektáltak 2-3-szorosára nőtt GR-aktivitást 6 napos galambborsó csíranövények gyökerében. Mindezek ellenére inkább úgy tűnt, hogy mind a kontroll, mind a stresszelt növényekben a GR-aktivitás időben növekszik. Ez a tendencia a Zn200 növényekben volt a legmarkánsabb.

A korreláció-analízis során egyértelmű negatív összefüggést sikerült kimutatni a GSH-szint és a GR-aktivitás közt ($r = -0,74$, $p < 0,001$), ami jelzi, hogy a Zn-toxicitással járó oxidatív stressz kivédésében meghatározóak a Halliwell-Asada-ciklus enzimek is.

Összegzés:

A szemikvantitatív FRAP-módszer alkalmasnak bizonyult annak igazolására, hogy a Cu és a Zn okozta oxidatív stresszt az antioxidáns védelmi rendszer idő- és koncentrációfüggő gyors aktivizálódása kíséri. Ugyanezt erősítette meg a GSH-szint alakulása is. Eredményeink – az irodalmi adatokhoz hasonlóan – arra utalnak, hogy a GSH-depléciónak háttérben a Halliwell-

Asada-ciklus fokozott működése, valamint a fitokelatin-szintézis állhat, ami mellett *de novo* szintézis is bekövetkezhetett.

A két nehézfém a SOD aktivitását az idő és a koncentráció függvényében növelte, ami annak is köszönhető, hogy a mindkét fém kofaktora a citoplazmában is megtalálható Cu/Zn SOD-nak.

A H₂O₂ semlegesítésében érintett enzimek közül vizsgált CAT és GPOX esetében inkább a hosszú távú kezelések (48-96h) váltottak ki jelentősebb enzimaktivitást, de a Zn esetében ez lassabban következett be a Cu-hez képest.

5. 1. 3. A Cu és a Zn által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai detektálása

A Cu által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai kimutatása

Schiff- festés

Ezzel az *in vivo* festési eljárással a csírázó növények gyökércsúcsaiban a nehézfém-kezelések hatására bekövetkező oxidatív stressz egyik fontos indikátorát, a lipid peroxidációt igyekeztünk igazolni. A Cu- kezelés már 12h kezelési időtartam után peroxidatív membránkárosodást a gyökércsúcs osztódási és megnyúlási zónájában, és ez pozitív festődési reakció 24 és 48h elteltével egyre több gyökérszónában volt jellemző; az idősebb, differenciáltabb régiókban is jelentkeztek a LP tünetei (**Mellékletek I., 1. képsor, A-C**).

Nemcsak a kezelési időtartam növekedésével tapasztaltunk egyre erőteljesebb festődést, hanem a Cu-koncentráció függvényében is intenzívebb Schiff-reakciót kaptunk (jelölése a képeken: Sch). Bár a 48h kezelés után alacsonyabb LP-szinteket mértünk, a Cu50 és Cu100 gyökércsúcsokban mégis markánsabb volt a festődés. A kísérlet végére (96h) a gyökércsúcsok általában a mért LP-értékeknek megfelelően mutatták a pozitív Schiff-reakciót.

Az erőteljesebb Cu-kezelés a szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan a magvak lassabb csírázását eredményezte (Sfaxi-Bousbih és mtsai, 2010). A gyökércsúcsnál nagy mértékű deformálódást okozott, amely szabad szemmel is látható volt a csírázó növényeken (**Mellékletek II., 1. képsor, B-D**, piros nyilakkal jelölve), egyes kutatók az Al-toxicitás tüneteire hasonlítják (Kopittke és mtsai, 2008).

Az oxidatív stressz okozta sejtpusztulást és az eltérő sejtosztódásbeli aktivitás következményeként mutatkozó gyökércsúcs-görbülést lehetett megfigyelni a 48 és a 96h

elteltével. Már a Cu50 gyökércsúcsoknál markáns elváltozásokat láttunk, a rizodermisz felszakadozott, a gyökérszőrök képződése elmaradt, barnás elszíneződés jelent meg, és rendellenes oldalgyökér-képződés is bekövetkezett (**Mellékletek I., 1. képsor, C-D**), az irodalomban leírtakhoz hasonlóan (Barceló és Poschenrieder, 2004). Lequeux és mtsai (2010) ugyancsak az elsődleges gyökér növekedésének lassulását és az oldalgyökér-képzés fokozódását figyelték meg a 25-75 μM Cu-zel kezelt *Arabidopsis* növények gyökérzetének vizsgálatakor.

Anilinkék- festés

Az abiotikus stresszorok által indukált kallóz-képződés kimutatására alkalmaztuk az anilinkék- festést (jelölése a fotókon: AB; Yamamoto és mtsai, 2001). A festődések alapján úgy tűnik, hogy csak a hosszabb távú (48-96 h) Cu-kezelések váltottak ki kallóz-képződést és annak sejtfalakba történő inkrusztálódását a gyökér megnyúlási zónájában (**Mellékletek I., 2. képsor, C-D**). A gyökércsúcsok visszagörbülése, barnás elszíneződése, valamint a gyökerek vastagodása is a Cu gyökér-elongációt gátló hatására utalnak (Mihoub és mtsai, 2005; Potters és mtsai, 2007; Bouazizi és mtsai, 2010). A nehézfém mint stresszor által indukált kallóz-termelődést mutattak ki Hirano és mtsai (2006) alumíniummal kezelt szelídgesztenye gyökércsúcsaiban, valamint Qin és mtsai (2007) Cu-kezelt nyárfa-dugványok gyökér apexeiben.

Ugyanakkor vöröshagyma (*Allium cepa*) allelevelének epidermisz sejtjeinek falában is sikerült *de novo* kallóz-produkciót kimutatni már az 1-3 μM Cu-kezelést követően, és a 8 μM -os koncentráció már 24 óra elteltével toxikusnak bizonyult (Kartusch, 2003).

Trypan kék- festés

A Trypan kékkel a nehézfém-stressz következtében fellépő membránkárosodás és sejtpusztulás mértékét próbáltuk kimutatni (jelölése a fotókon: TryB). A 12h kezelés után még nem volt jelentősebb sejtpusztulás, de a kezelési idő növelésével egyre nagyobb mértékű sejtelhalást tapasztaltunk (**Melléklet I., 3. képsor, A-D**). 96h elteltével mindegyik kezelt növényenél jelentős szöveti szakadozást figyeltünk meg főleg a gyökércsúcsi megnyúlási régiójának epidermiszében, aminek hátterében a rizodermisz sejtek membránjának sérülése, valamint a rizodermisz és a közvetlenül alatta levő kéregparenchima-sejtek falának nagyobb

rigiditása állhat (Kopittke és mtsai, 2008; Bouazizi és mtsai, 2010). Lequeux és mtsai (2010) az 50-75 μM Cu-kezelt *Arabidopsis* növények gyökércsúcsán figyelték meg a sejtéletképesség csökkenését.

Sósavas floroglucinos festés

Mivel a Schiff-reagens a LP termékei mellett a lignint is festi, ezért a Schiff-festés kontrolljaként a ligninre specifikus sósavas floroglucint is alkalmaztuk (jelölése a fotókon: PhI), amely a sejtfalakba épülő lignint meggypirosra festi. Eredményeink alapján elmondható, hogy kifejezetten a hosszú távú (96h) Cu-kezelések váltottak ki lignifikációt a gyökércsúcs megnyúlási zónájában (**Mellékletek I., 4. képsor, C-D**), miként Lequeux és mtsai (2010) leírták *Arabidopsis*-ban. A fokozott lignifikációt azzal magyarázhatjuk, hogy olyan lignin-szintézisben érintett enzimek (pl. peroxidázok, lakkázok) aktivizálódnak, melyek kofaktora éppen a Cu, tehát a gyökérsejtek apoplasztjában akkumulálódott Cu a sejtfalhoz kötött peroxidázokat stimulálja, amelyek a lignin és/vagy a szuberin szintézise révén a sejtfal rigiditását növelik és ezzel az adaptációját segítik (Degenhardt és Gimmler, 2000; Maksymiec, 2007; Kováčik és Klejdus, 2008; Bouazizi és mtsai, 2010; Lequeux és mtsai, 2010; Moura és mtsai, 2010).

A mind makroszkópiusan, mind sztereomikroszkóppal látható barnás elszíneződés jellegéről, összetételéről az általunk alkalmazott hisztokémiai eljárások nem adtak egyértelmű információt. Azonban szakirodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a rizodermisz és a közvetlenül alatta levő parenchima sejtek vakuólumában és apoplasztjában található flavonoidok a peroxidázok (pl. a GPOX) számára e^- -donorként szolgálnak, majd barnás-feketés fenol-polimereket képeznek (Yamasaki és mtsai, 1997; Michalak 2006).

A Zn által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai kimutatása

Schiff-festés

A 12h után már, ha csak kis mértékben is, de láthatóak voltak a LP jelei a gyökércsúcs megnyúlási régiójában. Általában a koncentráció illetve a kezelési időtartam növekedésének megfelelően egyre intenzívebb elszíneződést kaptunk (**Mellékletek I., 5. képsor, A-D**). Ugyanakkor még 96h elteltével sem jelentkezett a kezelt növények gyökércsúcsaiban a Cu-

kezelt növényekre jellemző gyökércsúcs-görbülés, sem a rizodermisz felszakadozása, és nem tapasztaltunk a rendellenes oldalgyökér-képződést sem (**Mellékletek II., 2. képsor, D**). Szabad szemmel nézve is a gyököcskéből képződő elsődleges gyökerek a normális fejlődés jeleit mutatták (**Mellékletek II., 2. képsor, A-D**), holott a szakirodalom a magas (mM-os) Zn-koncentráció csírázásgátló és gyökér fejlődését akadályozó hatásáról számol be (Cuypers és mtsai, 2001; Rout és Das, 2003; Halušková és mtsai, 2009).

Hozzánk hasonlóan, Ozneder és Aydin (2010) 250- 2000 mg kg⁻¹ Zn-tartalmú talajban nevelt borsmustár (*Eruca sativa*) növények gyökerének normális fejlődését figyelték meg, ami valószínűleg az adott faj Zn-toleranciájával magyarázható. Wang és mtsai (2009) pedig a Zn által generált oxidatív stressz és a LP létét igazolták hisztokémiai úton a Schiff-reagens segítségével repce (*Brassica napus*) fiatal gyökerében.

Anilinkék-festés

A Cu-kezelés során kapott barnás elszíneződést nem tapasztaltuk a Zn-kezelt növényeknél (**Melléklet, 6. képsor, A-D**), miként a gyökércsúcsok kampószerű visszagörbülését sem. Kisebb mértékű festődést inkább a hosszabb távú (48- 96 h) Zn-kezeléseket követően lehetett detektálni, ami arra utal, hogy a fejlődő gyökér számára a Zn kevésbé toxikus stresszor, mint a Cu. Még a legnagyobb koncentráció esetén is normál oldalgyökér-képződést láthattunk, a megnyúlási zóna felett a gyökérszőrök is kifejlődtek. Ugyanakkor a 96 h kezeltéknél a felszívási zóna hamarabb, a csúchoz közelebb alakult ki, ami arra enged következtetni, hogy a Zn is gátolhatja a gyökér hosszanti növekedését (Potters és mtsai, 2007).

Trypan kék-festés

A Cu-kezeléshez hasonlóan a Zn-stressz is erős festődést eredményezett minden koncentrációnál (48-96h), azonban felületi szöveti sérüléseket még a legmagasabb koncentráció alkalmazása sem váltott ki (**Melléklet, 7. képsor, A-D**). A 48-96h kezelt Zn100 és Zn200 növényeknél a megnyúlási zóna kis mértékű rövidülése azzal hozható kapcsolatba, hogy a stressz okozta nagyobb GPOX-aktivitás következtében a sejtek fala rigidebbé vált, az elongációjuk csökkent. Ennek ellenére ezeknél a csíranövényeknél is megjelentek a gyökérszőrök a megnyúlási zóna fölött. A 48-96 órán át Zn-kezelt növények gyökércsúcsainak megnyúlási és felszívási zónájában kapott markáns festődés valószínűleg a magasabb LP-nak és annak következtében fellépő membránsérülésnek köszönhető.

Sósavas floroglucinos festés

A Zn-kezelések nem váltottak ki hisztokémiai kimutatható lignin-szintézist még a hosszú távon, nagy koncentrációk alkalmazása mellett sem (**Melléklet, 8. képsor, A-D**). Ez azért meglepő, mert az ugyancsak Brassicaceae családba tartozó *Arabidopsis thaliana* és *Thlaspi caerulescens* esetében a magas Zn-koncentráció a lignin-bioszintézisben érintett gének megnövekedett expresszióját váltotta ki (Moura és mtsai, 2010).

Összegzés:

A két esszenciális nehézfém közül a Cu okozott komolyabb elváltozásokat a fiatal gyökér morfogenezisében, miként az irodalomban is olvashatjuk. Noha fejlődésbeli rendellenesség jelei nem mutatkoztak, a Zn-kezelt növények gyökércsúcsaiban a Schiff-festés segítségével is detektálható volt az oxidatív stressz egyik tipikus jele, a lipid peroxidáció, akárcsak a Cu-kezelés esetében. A Cu-stresszre adott növényi válaszreakciók közül a lignifikációt, illetve a kallóz-produkciót is sikerült láthatóvá tenni, az előbbit a sósavas floroglucin, az utóbbit az anilinkék segítségével.

5. 1. 4. A Cu és a Zn által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban

A Cu által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban

A nehézfémstressz okozta szövettani változások nyomon követésére csírázó magvak gyököcskéjéből, illetve az ebből fejlődő elsődleges gyökér apikális részének megnyúlási és felszívási zónájából transzverzális metszeteket készítettünk. A sejtfalakra rakódó kallóz kimutatására anilinkékkel festettük a metszeteket, a lignifikáció detektálására pedig toluidin kéket, sósavas floroglucint és malachitzöldet alkalmaztunk (Mihalik és mtsai, 1999; Hirano és mtsai, 2006). Kíváncsiak voltunk ugyanis, hogy az általában *in vivo* hisztokémiai festésre használt floroglucin alkalmazható-e beágyazott metszeteknél is. Azt is szeretnénk volna letesztelni, hogy a szintén gyakran használt toluidin kék és malachitzöld is használható-e a sejtfalak lignifikációjának kimutatására. A megfestett metszeteket fénymikroszkóp segítségével, 100-szoros nagyításon megvizsgáltuk és kiértékeljük.

A keresztmetszeti képek alapján elmondható, hogy a csírázás során alkalmazott rövid távú (12-24h) Cu-kezelés az indiai mustár gyökereiben nem okozott feltűnő szövettani változásokat (**Mellékletek III., 1. képsor, A-B**). Az anilinkék a rizodermisz, a néhány sejtsor széles kéregparenchima és a központi henger sejtjeinek elsősorban a plazmáját és sejtmagját festette meg, mind a kontroll, mind a kezelt növényeknél (Mihalik és mtsai, 1999). A 48-96h kezeléseknél a Cu-koncentráció emelkedésével a rizodermisz sejtek külső tangenciális falának vastagodását lehetett felfedezni, ami anilinkékkel festődött, amiből kallóz-produkcióra következtethetünk, bár ennek igazolására fotometriás mérések szükségesek (**Mellékletek III., 1. képsor, C-D**, Kartusch, 2003; Qin és mtsai, 2007). Az idő előrehaladtával és koncentráció növekedésével a kéregparenchima sejtek eddigi nagyjából egyforma mérete, izodiametrikus alakja szabálytalanná vált, ami Cu okozta rendellenes sejtosztódással és elongációval magyarázható (Barceló és Poschenrieder, 2004; Kranner és Colville, 2011). Különösen szembetűnő a 96h Cu200 növényeknél a bőrszövetnek és az elsődleges kéregnek a torzulása a visszagörbülés síkjából vett metszeten (**Mellékletek III., 1. képsor, D**).

Az irodalomban leírtakhoz hasonlóan az elsődleges kéreg szövetállományában gyarapodás inkább csak a hosszabb távon kezelt növényeknél következett be, míg a központi henger átmérője változatlan maradt (Degenhardt és Gimmler, 2000). Korábban Arduini és mtsai (1995) a *Pinus pinea* és a *Pinus pinaster* gyökerének fejlődésében, valamint morfológiájában tapasztalták a Cu gátló hatását, a gyökerek barnás elszíneződését. Már 1 μM Cu-kezelést követően a gyökerek vastagabbak lettek az apexhez közeli régióban, a keresztmetszeti képeken mind a központi henger, mind a kéregállomány gyarapodása volt megfigyelhető, különösen a *P. pinaster* esetében.

A lignin detektálására alkalmazott festékek általában a 48-96h kezeléseknél mutattak pozitív reakciót, de nem az egész gyökérben, hanem ott, ahol a visszagörbülés bekövetkezett (**Mellékletek III., 2. képsor, C-D; 3. képsor C-D; 4. képsor, C-D**). Főleg a Cu100 és Cu200 gyökerek metszeti képeken lehetett a rizodermisz sejtek radiális és külső tangenciális falán ligninbeépülés jeleit felfedezni, ami esetenként a hipodermális sejtekre is áttért, továbbá az endodermiszen kívüli ún. peri-endodermális régióban is megfigyelhető volt (Schreiber és mtsai, 1999; Zelko és mtsai, 2008).

A szakirodalom a lignin stressz által indukált szintézisét egyértelműen a sejtek adaptív válaszként említi, vagyis a nehézfém okozta oxidatív stressz során felszaporodó H_2O_2 mint szignál molekula stimulálja a lignifikációban résztvevő peroxidázokat, és a lignin inkusztálódása következtében csökken a sejtfalak plaszticitása, növekedése, a másodlagosan

vastagodott sejtfalak révén próbálja a növény kizárni a nehézfém-ionokat (Chaoui és El Ferjani, 2005; Maksymiec, 2007; Jouili és mtsai, 2011) .

A Zn által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban

A Zn-kezelés – a Cu-zel ellentétben- nem eredményezett különösebb morfológiai-szövettani elváltozásokat az indiai mustár gyökércsúcsaiban. Az elsődleges kéreg sem gyarapodott, általában 3-4 sejtsor széles volt mind a kontroll, mind a kezelt növényekben, a sejtek radiális elrendeződést mutattak, az ugyancsak hiperakkumulálóként ismert *Thlaspi caerulescens* gyökereihez hasonlóan (Zelko és mtsai, 2008). A rövidtávon (12-24h) kezeltéknél az anilinkék túlnyomórészt a gyökérsejtek citoplazmáját és sejtmagját festette meg (**Mellékletek III., 5. képsor, A-B**). A kallóz *de novo* szintézisére utaló jelek inkább a csírázás későbbi szakaszában jelentek meg a rizodermisz sejtek külső tangenciális sejtfalában, illetve egy helyen a cortex sejtejénél, illetve a peri-endodermális régióban is (**Mellékletek III., 5. képsor, C-D**). Érdekes, hogy a 48-96h kezelést követően nem csak a kéregparenchima sejtek gömbölyded alakja változott meg, de a rizodermisz sejtek addigi szabályos, gyöngysorszerű elrendeződése is szabálytalanná vált, miként azt a Cu-stressznél is tapasztaltuk.

A magas Zn-koncentráció okozta lignin-szintézisből eredő másodlagos sejtfalvastagodást csupán néhány esetben lehetett felfedezni, főleg a csírázás második felében (48-96h), ami összhangban van a GPOX-aktivitás eredményeivel (**Mellékletek III., 6. képsor, C-D; Mellékletek III., 7. képsor, C-D; Mellékletek III., 8. képsor, C-D; lásd 19.ábra, .oldal**)). A Zn-stressznek közvetlenül kitett rizodermisz, illetve az alapszövet sejtejének helyenkénti festődése sejteti, hogy a toxikus nehézfémekkel szembeni sejtfal szintű adaptációs folyamatok beindultak (Sridhar és mtsai, 2005; Probst és mtsai, 2009).

Összegzés:

A gyökércsúcsok megnyúlási és felszívási zónájából készült keresztmetszeti képeken a nehézfém-stressz okozta szöveti elváltozások nyomait inkább a hosszú távú (48-96h) kezeléseknél lehetett felfedezni, elsősorban a Cu-kezelt növényekben. Az anilinkék alkamasnak tűnik a kallóz-képződés kimutatására, bár ennek teljes igazolásához további fotometriás mérések szükségesek. A lignifikáció detektálására a sósavas floroglucin mellett

használhatónak mutatkozott a malachitzöld és a toluidinkék is, de inkább a Cu-zel stresszelt növények esetében.

5. 2. A Cd okozta oxidatív stressz vizsgálata

5. 2. 1. A csírázó magvak Cd-felvétele

A 2 faktoros ANOVA a Cd-stressz vizsgált paraméterei esetében is kimutatta a kezelés hosszának és az alkalmazott nehézfém oldatbeli mennyiségének együttes hatását (**8.A., B. és C. táblázat**).

Hatás	Paraméterek			
	AAS	FRAP	GSH	LP
Cd konc.	$F_{3,112} = 545,92^{***}$	$F_{3,94} = 52,39^{***}$	$F_{3,83} = 451,07^{***}$	$F_{3,93} = 166,22^{***}$
Időtartam	$F_{3,112} = 16,09^{***}$	$F_{3,94} = 6,70^{***}$	$F_{3,83} = 224,59^{***}$	$F_{3,93} = 106,71^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,112} = 27,03^{***}$	$F_{9,94} = 27,22^{***}$	$F_{9,83} = 92,38^{**}$	$F_{9,93} = 19,25^{***}$

8.A táblázat: A Cd-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (AAS- atomabszorpciós spektrofotometriával meghatározott nehézfém tartalom, FRAP- össz antioxidáns kapacitás, GSH- redukált glutation mennyisége, LP- lipid peroxidáció). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Hatás	Paraméterek		
	Fehérje	GST	GPOX
Cd konc.	$F_{3,93} = 1,51$ ns	$F_{3,82} = 20,49^{***}$	$F_{3,83} = 193,65^{***}$
Időtartam	$F_{3,93} = 161,03^{***}$	$F_{3,82} = 12,46^{***}$	$F_{3,83} = 428,22^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,93} = 8,15^{***}$	$F_{9,82} = 5,01^{***}$	$F_{9,83} = 306,61^{***}$

8.B táblázat: A Cd-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (Fehérje- össz fehérjetartalom, GST- glutation S-transzferáz, GPOX- gvajakol peroxidáz). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A csíranövények Cd-tartalma általában az alkalmazott koncentrációval párhuzamosan növekedett. A kontrollhoz viszonyítva a Cd100 és Cd200 növényekben mértünk szignifikánsan magasabb Cd-akkumulációt (**9. táblázat**, lásd 68. oldal).

Hatás	Paraméterek		
	CAT	SOD	GR
Cd konc.	$F_{3,71} = 30,74^{***}$	$F_{3,71} = 31,87^{***}$	$F_{3,71} = 123,77^{***}$
Időtartam	$F_{3,71} = 55,79^{***}$	$F_{3,71} = 145,52^{***}$	$F_{3,71} = 88,58^{***}$
Konc. x időtart.	$F_{9,71} = 71,18^{***}$	$F_{9,71} = 83,12^{***}$	$F_{9,71} = 96,53^{***}$

8.C táblázat: A Cd-koncentráció és a kezelés időtartamának hatását vizsgáló 2 faktoros varianciaanalízis (ANOVA) eredményei a különböző paraméterek esetében (CAT- kataláz, SOD- szuperoxid dizmutáz, GR- glutation reduktáz). A szignifikancia-szintek jelölése: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A Cd100 növények átlagosan $3,6-7,4 \mu\text{mol g}^{-1}$ sz.t. ($0,4-0,8 \text{ mg g}^{-1}$) Cd-ot vettek fel, míg a Cd200 növényekben $4,5-9,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ sz.t. ($0,5-1,08 \text{ mg g}^{-1}$) volt mérhető a kezelés időtartamától függően. A 2 faktoros ANOVA ($F_{9,112} = 27,03$, $p < 0,001$; **8.A táblázat**, lásd 66. oldal) eredményéből azt lehet megállapítani, hogy a koncentráció és az időtartam együttesen van hatással a Cd-akkumuláció mértékére (Szöllősi és mtsai, 2009).

Cd konc. (mg L^{-1})	12h	24h	48h	96h
0	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
50	$2,66 \pm 0,10$ ab	$3,47 \pm 0,21$ ac	$2,49 \pm 0,67$ ab	$1,87 \pm 0,20$ ab
100	$6,67 \pm 0,56$ bc	$7,41 \pm 1,47$ b	$3,61 \pm 0,58$ bc	$5,88 \pm 0,67$ bc
200	$9,58 \pm 1,64$ c	$4,46 \pm 0,51$ bc	$7,31 \pm 1,08$ c	$7,82 \pm 1,36$ c

9. táblázat: A különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok cinktartalma ($\mu\text{mol g}^{-1}$ sz.t.). A kisbetűk a szignifikáns eltéréseket jelzik $p < 0,05$ esetén.

A korreláció-analízis során az akkumuláció inkább koncentráció-függést mutatott, és az eltérő hosszúságú kezelések szerint lebontva erős, szignifikánsan pozitív összefüggést kaptunk ($r=0,98$, $r=0,79$, $r=0,95$ és $r=0,94$, $p<0,001$; lásd **10. táblázat**, 68. oldal).

Az általunk alkalmazott, meglehetősen toxikusnak számító Cd-koncentrációk ellenére az indiai mustár magjai kicsíráztak, és viszonylag nagy mennyiségű ($1,8-9,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ sz.t.) nehézfémeket tudtak akkumulálni. Egyes kutatók már kisebb mennyiségű Cd csírázás-gátló hatásáról is beszámolnak (Peralta és mtsai, 2001; Farooqi és mtsai, 2009), míg más tanulmányok jóval nagyobb (5 mM-os) koncentrációknak a csírázás sikerességét csökkentő hatását igazolták borsó növények esetében (Mihoub és mtsai, 2005; Smiri és mtsai, 2010 és 2011).

Paraméterek	12h	24h	48h	96h
AAS	0,98***	0,79***	0,95***	0,95***
FRAP	0,77***	0,58**	0,37*	-0,06
GSH	-0,002	0,61**	0,75***	0,91***
LP	-0,26	-0,53**	-0,51**	0,29
Fehérje	-0,18	-0,40*	-0,29	0,68**
GST	-0,06	0,25	0,62***	-0,06
GPOX	0,92***	0,35	-0,35	-0,48*
CAT	0,66*	0,23	-0,69***	-0,40
SOD	0,93***	-0,26	-0,22	-0,74***
GR	0,79***	0,61**	-0,66***	-0,21

10. táblázat: A Cd- koncentráció és az egyes paraméterek közti összefüggést kifejező korrelációs együtthatók (Spearman-féle) a különböző hosszúságú kezelések szerint. A szignifikancia-szintek jelölése: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ és *** $p<0,001$ esetén.

5. 2. 2. A Cd által indukált oxidatív stressz paramétereinek vizsgálata

A ferri-ion redukálóképesség vizsgálatának eredményei

A csírázó magvak össz antioxidáns kapacitásának alakulását mind a Cd-koncentráció, mind az időtartam befolyásolta (lásd **8.A táblázat**, 66. oldal). A 12-48h kezeltéknél a FRAP-értékek és a Cd oldatbeli mennyisége között szignifikáns pozitív kapcsolatot fedeztünk fel ($r=0,77$, $p<0,001$; $r=0,58$, $p<0,01$ és $r=0,37$, $p<0,05$; lásd **10. táblázat**, 68. oldal). A Cd50 növényekben a kontrollhoz képest alacsonyabb 48h-ig, a Cd100 növényekben kezdetben (12-

24h) szignifikánsan magasabb, később (48-96h) kisebb FRAP-ot mértünk. A Cd200 kezelt növényekben is időben csökkenő tendenciát mutatott az össz antioxidáns kapacitás alakulása, de mindig a kontroll értékek felett volt (**23. ábra**). A csírázás kezdeti szakaszában (12-24h) megfigyelt koncentráció-függő FRAP-növekedés a Cd által kiváltott oxidatív stresszt kompenzáló az antioxidáns védelmi rendszer indukcióját sejteti.

23. ábra: A különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok össz antioxidáns kapacitása (FRAP). A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A redukált glutation (GSH) mennyiségi változása

Az antioxidáns védelmi rendszerben és a növényi sejtek redox homeosztázisának fenntartásában központi szerepet játszó GSH mennyiségének markáns növekedését figyelhettük meg a 24-96h kezelések során a Cd-koncentráció emelkedésével párhuzamosan ($r = 0,61$, $r = 0,75$ és $r = 0,91$, $p < 0,001$; **24. ábra**). A Cd50 növényekben kezdetben a kontrollnál alacsonyabb, később magasabb GSH-tartalmat kaptunk. A Cd100 és Cd200 növényekben a GSH mennyisége 24h elteltével érte el a kontroll értékek mintegy 5-szörösét, majd a felére csökkent (Szöllősi és mtsai, 2009).

Az irodalomból jól ismert, hogy a ROS-k semlegesítése, a fitokelatin-szintézis jelentős GSH-fogyást eredményez, vizsgálataink során mégis a GSH-szint emelkedését tapasztaltuk a Cd-stressz esetén. A GSH- tartalom koncentráció-függő növekedését már Mishra és mtsai (2006) is leírták Cd-kezelt *Bacopa monnieri* (L.) (víziizsóp) levelében és gyökerében. A Cd GSH-képződést stimuláló hatását, illetve annak koncentráció-, idő- és szövetfüggő jellegét Sun és

mtsai (2005), valamint Smeets és mtsai (2005) cikke is megerősíti. Esetünkben feltételezhető, hogy a Cd a GSH-szintézisben érintett enzimeket aktiválta (Mishra és mtsai, 2006; Seth és mtsai, 2008).

24. ábra: A különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magok redukált glutation-tartalma (GSH). A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

A csírázás második szakaszában (48-96h) kapott markáns GSH-depléció mögött a GSH-fogyasztó fitokelatin-szintézis, a ROS-k hatástalanítása, illetve a Cd-mal való konjugátumok képzése állhat (Blokhina és mtsai, 2003; Rodríguez-Serrano és mtsai, 2006; Smiri és mtsai, 2010; Kranner és Colville, 2011). Ezek alapján a GSH-szint és a GST-aktivitás között negatív korrelációnak kellene lennie, de mi szignifikáns pozitív összefüggést kaptunk ($r = 0,40$, $p < 0,001$), a GR-aktivitással pedig nem volt kimutatható összefüggés. Így elképzelhető, hogy a GSH utánpótlása *de novo* szintézis útján történt.

Eredményeinkkel eltérően, Dixit és mtsai (2001) számottevő GSH-depléciót mutattak ki 4 és 40 μM Cd-mal kezelt borsó növények gyökerében, Anjum és mtsai (2011) 25-100 mg kg^{-1} (sz.t.) Cd-tartalmú talajban nevelt mungóbab növényekben szintén. Gallego és mtsai (1999) 96h-t követően napraforgó szikleveleiben mutatták ki a GSH-szint csökkenését, de fitokelatin-szintézisre utaló jeleket nem találtak.

Vizsgálataink és a szakirodalomban található ellentmondásos adatok alapján úgy tűnik, hogy a GSH-szint változásainak vizsgálatakor nemcsak a nehézfém sajátosságait, mennyiségét,

hanem a kezelés időtartamát, a növényfaj és a felhasznált szerv jellegét is figyelembe kell venni (Seregin és Ivanov, 2001).

A Cd által kiváltott lipid peroxidáció (LP) vizsgálata

A LP mint stresszmarker változásait a csírázás középső szakaszában (24-48h) a koncentráció nagysága befolyásolta ($r = -0,53$ és $r = -0,51$, $p < 0,01$; lásd **10. táblázat**, 68. oldal), ugyanakkor mind a kontrollban, mind a kezeltékben időben csökkent a MDA-tartalom (**25. ábra**). Meglepő, hogy – a 96h kezelést nem tekintve – a kontroll növényekben szignifikánsan nagyobb a LP mértéke, mint a Cd-mal stresszeltékben. Egyedül a Cd200 növényekben haladta meg a kontroll értékeket 96h után (Szöllősi és mtsai, 2009).

Az irodalomban legtöbbször a Cd-kezelés LP-fokozó hatásáról lehet adatokat találni (Dixit és mtsai, 2001; Hegedüs és mtsai, 2001; Hasan és mtsai, 2009; Solanki és Dhankhar, 2011), mi a LP csökkenését tapasztaltuk, ami feltehetőleg a stressz által indukált GSH-akkumulációnak köszönhető, noha ezt számottevő negatív korrelációval nem tudtuk alátámasztani ($r = -0,07$, $p > 0,05$). Hozzánk hasonlóan Conçalves és mtsai (2007) Cd-kezelt uborka csíranövényekben a MDA-szint markáns csökkenését detektálták, Dong és mtsai (2006) pedig 7-33 napos paradicsom növényeknél kaptak LP-csökkenést.

25. ábra: A lipid peroxidáció alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

Ezek ismeretében azt mondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott magas Cd-koncentrációk LP-t indítottak be már a csírázás elején, de ez a később mérséklődött az antioxidáns védelmi rendszert aktiválódásának köszönhetően. Természetesen azt sem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a csírázás kezdetén a Cd-felvétel szempontjából komoly akadályt jelenhet az embrió védő maghéj (Seregin és Ivanov, 2001).

Az össz fehérje-tartalom vizsgálatának eredményei

Az össz fehérje-tartalom a csírázás előrehaladtával általában csökkenést mutatott. A Cd-stressz a csírázó magvakban nem váltott ki jelentősebb eltérést a kontrollhoz képest, kivéve a 24h és a 96h kezelés után. Az előbbinél a Cd100, az utóbbinál a Cd50 és Cd200 növényekben kaptunk szignifikánsan magasabb értékeket (26. ábra). Ezen paraméter és a Cd-koncentráció között számottevő összefüggést csak a 96h kezelésnél sikerült kimutatni ($r=0,68$, $p<0,001$; lásd 10. táblázat, 68. oldal).

26. ábra: Az össz fehérje-tartalom alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ és *** $p<0,001$ esetén.

A csírázás kezdeti időszakában (12h) kapott magas értékek valószínűleg a tartaléktápanyagként szolgáló fehérjék túlsúlyának tudható be, illetve annak, hogy a maghéj általi védettség késleltette a Cd fehérje-károsító működését (Seregin és Ivanov, 2001; Kranner és Colville, 2011). A későbbi csökkenést részben azzal magyarázhatjuk, hogy a Cd nagy

affinitással kötődik a fehérjék tiol-csoportjaihoz, megváltoztatva vagy gátolva azok működését (Solanki és Dhankhar, 2011). Másrészt a Cd által kiváltott oxidatív stresszt kísérő fehérje-karboniláció és a fokozott proteolitikus aktivitás is negatívan befolyásolja a proteinek mennyiségét (Palma és mtsai, 2002; Romero-Puertas és mtsai, 2002; Conçalves és mtsai, 2007).

A glutation –S- transferáz enzim aktivitása

A GST-aktivitás a Cd50 növényekben rendszerint a kontroll szintje alatt maradt. Ez a gátlás a csírázás korai szakaszában (12-24h) volt jellemző. A Cd100 növényekben 48h után, míg a Cd200 egyedek esetében korábban, már 24h-t követően a kontroll fölé emelkedett az aktivitás (27. ábra), hasonlóan a Halušková és mtsai (2009) által árpa növényekből kapott eredményekhez.

27. ábra: A GST aktivitásának alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

Közismert, hogy a GST-k számos szubsztrát (pl. nehézfémek) GSH-val való konjugációját katalizálják (Dixit és mtsai, 2001). Jelen esetben úgy tűnik, hogy működésükre nem csak a növekvő Cd-koncentráció, de a GSH-szint emelkedése is serkentőleg hat ($r = 0,40$, $p < 0,001$; Szöllősi és mtsai, 2009; Kranner és Colville, 2011).

A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitása

A H_2O_2 -t termelő SOD izoenzimek együttes aktivitása a GPOX-hoz hasonlóan alakult, vagyis a csírázás kezdetén (12h) szignifikánsan pozitív, míg a végén (96h) negatív koncentrációfüggést tapasztaltunk ($r=0,93$ és $r=-0,74$, $p<0,001$; lásd **10. táblázat**, 68. oldal). A Cd50 és Cd100 csírázó magvakban 24h-ig nőtt, később erősen lecsökkent a SOD működése. A Cd200 kezelés esetében rögtön az elején egy erőteljes indukció volt megfigyelhető, amely a kontroll értékek alá csökkent (**28. ábra**).

28. ábra: A SOD aktivitásának alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p<0,05$ és ** $p<0,01$ esetén.

A rövid távú kezelések SOD-működést koncentráció-függő módon serkentő hatásáról találhatunk adatokat Anjum és mtsai (2011) cikkében, idő-függő aktiválódásáról pedig Tamás és mtsai (2010) tanulmányában.

A hosszabb távú kezelések SOD aktivitásának csökkenését eredményezték, ami Cd gátló hatásának köszönhető (Arora és mtsai, 2002; Dixit és mtsai, 2001; Benavides és mtsai, 2005; Chaoui és mtsai, 2005).

Kataláz (CAT) aktivitás

Érdekes módon a CAT aktivitását kezelések hossza nem befolyásolta, ellenben a 12h kezelésnél pozitív, azonban 48h után negatív koncentráció-függést mutattunk ki ($r=0,66$, $p<0,05$ és $r=-0,69$, $p<0,001$; lásd **10. táblázat**, 68. oldal). Elvárásainktól eltérően, nem a legnagyobb koncentráció váltotta ki a kontrollhoz képest legnagyobb aktivitást, hanem a Cd50 és Cd100 kezelések (**29. ábra**). Az irodalomban ellentmondásos módon találunk utalást a Cd által indukált CAT-aktivitásra, de az adatok többsége inkább annak gátló hatásáról szól (Chaoui és mtsai, 1997; Chaoui és El Ferjani, 2005; Kranner és Colville, 2011).

29. ábra: A CAT aktivitásának alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p<0,05$ és ** $p<0,01$ esetén.

A csírázás második felében (48-96h) már az enzimgátlás jelei mutatkoztak, a SOD aktivitáscsökkenését követve ($r=0,64$, $p<0,001$).

A miénkhez hasonló változásokat, vagyis az aktivitás kezdeti, koncentrációval együtt növekvő, majd később, azzal párhuzamosan csökkenő alakulása Gallego és mtsai (1999) és Dixit és mtsai (2001) eredményeihez hasonló volt, ami a hosszabb távú Cd-kezelések CAT-inhibitor jellegét támasztja alá (Arora és mtsai, 2002).

A gvajakol–peroxidáz aktivitás (GPOX)

A GPOX csak a 12h kezelésnél növekedett a koncentráció emelésével ($r = 0,92$, $p < 0,001$), a nem kezelt magvakhoz képest 5-14-szer nagyobb aktivitás volt mérhető a Cd-kezeltekben (**30. ábra**). Később ez a pozitív összefüggés gyengült, 48h idejére a Cd-stresszelt növényekben a GPOX gátlása következett be, és 96h után már szignifikáns negatív korrelációt kaptunk ($r = -0,48$, $p < 0,05$; lásd **10. táblázat**, 68. oldal).

A kezdeti aktivitásbeli gyors indukció összhangban van más szerzők kísérleti eredményeivel, amelyek a Cd-stressz miatt felszaporodó H_2O_2 eltávolítását végző szolubilis és sejtfalhoz kötött peroxidázok (pl. a GPOX) gyors aktiválódásáról számolnak be (Chaoui és mtsai, 1997; Smeets és mtsai, 2005; Verma és mtsai, 2008; Halušková és mtsai, 2010).

30. ábra: A GPOX aktivitásának alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ esetén.

Ezért nem meglepő, hogy a GPOX működése a SOD- és a CAT- aktivitással is szoros összefüggésben változott ($r = 0,63$ és $r = 0,62$, $p < 0,001$). Ugyanakkor ismeretesek olyan tanulmányok is, amelyek GPOX Cd-mal szembeni indifferens viselkedéséről tesznek említést (Hegedüs és mtsai, 2001).

A csírázás későbbi részében bekövetkező csökkenés hátterében az enzim Cd általi gátlása és degradációja állhat, vagy az, hogy a ROS-k semlegesítésében az aszkorbát-glutation-ciklus veszi át a vezető szerepet (Gallego és mtsai, 1999; Smeets és mtsai, 2005).

A glutation reduktáz (GR) aktivitása

A GR aktivitása a 12-24h időszakban a koncentrációval együtt emelkedett ($r = 0,79$, $p < 0,001$ és $r = 0,61$, $p < 0,01$), a csírázási periódus második felében pedig csökkent. A Cd50 növényekben 48h-ig emelkedett, majd a kezdeti szintre esett vissza, a Cd100 növényekben a GR-aktivitás hamarabb, már 24h után elérte a maximumot, majd jelentősen lecsökkent. Meglepő módon nem a legnagyobb koncentráció indukált legnagyobb enzimaktivitást, éppen ellenkezőleg, inkább gátlást eredményezett (**31. ábra**).

31. ábra: A GR aktivitásának alakulása különböző Cd- koncentrációk mellett csíráztatott *Brassica juncea* magokban. A csillagok szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll és a kezelt növények között: * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ esetén.

A Cd által kiváltott, idővel növekvő GR-aktivitást más szerzők is leírták már rövid távú kezeléseknél, esetenként a koncentrációval pozitív összefüggésben is (Dixit és mtsai, 2001; Smeets és mtsai, 2005; Seth és mtsai, 2008; Anjum és mtsai, 2011). Mindazonáltal a növekvő koncentráció következtében fellépő GR-gátlásra is számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre (Gallego és mtsai, 1999; Chaoui és mtsai, 2005; Seth és mtsai, 2008; Kranner és Colville, 2011).

Eredményeink és az ellentmondásos irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a GR működése erősen koncentráció- és idő-függő, hiszen a kisebb nehézfém-stressz késleltetve eredményez olyan mértékű enzimindukciót, mint a nagyobb stressz. A CAT és a GPOX aktivitásának a GR-zal pozitív korrelációban történő emelkedése pedig annak jele lehet, hogy

bár a Halliwell-Asada-ciklus központi szerepet játszik a ROS-k eliminálásában, a többi enzim jellegű scavangert sem lehet figyelmen kívül hagyni.

Összegzés:

A FRAP- értékek alakulásában a Cd esetében is idő- és koncentrációfüggést lehetett megfigyelni, a Cu- és Zn-lezeléshez képest ugyanakkor időben kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk. A GSH-szint viszonylag gyors (24h) növekedését annak szintén gyors visszaesése követte, aminek oka lehet egyrészt a Cd-komplexálást végző fitokelatinok szintézise, másrészt egyéb ROS-k eliminálása. A SOD, a CAT, a GPOX és a GR aktivitásában hosszú távon (48-96h) gátlás következett be a Cd-kezelést követően, miként számos korábbi tanulmányban is kimutatták. Ez is alátámasztja azon feltevést, hogy a Cd indirekt úton idézi elő az oxidatív stresszt a növényi sejtekben.

5. 2. 3. A Cd által kiváltott oxidatív stressz hisztokémiai detektálása

Schiff- festés

A Schiff-reakció alapján a Cd- kezelés már 12h kezelési időtartam után peroxidatív membránkárosodást okozott elsősorban a gyökércsúcs osztódási zónájában. A pozitív festődés – a Cu-kezeléshez hasonlóan- 24-48h után egyre több gyökérszónában volt jellemző, bár a színintenzitás nem tükrözte a koncentráció nagyságának hatását. Az elsődleges gyökerek fejlődése során az idősebb, differenciáltabb régiókban (pl. a felszívási zónában) is jelentkeztek a LP tünetei (**Mellékletek I., 9. képsor, A-D**). Ugyanakkor a hosszú távon (96h) kezelt csíranövényeknél az eddigieknél gyengébb volt a festődés a LP mérséklődésének megfelelően (lásd **25. ábra**, 70. oldal).

Az erőteljesebb Cd-kezelés a szakirodalomban leírtaktól eltérően nem eredményezte a magvak lassabb csírázását (**Mellékletek II., 3. képsor, A-D**; Li és mtsai, 2005; Siddiqui és mtsai, 2009). Ez részben a maghéj védelmének köszönhető, részben annak, hogy az általunk alkalmazott 0,44-1,78 mM-os koncentrációk –a csíráztatáshoz használt szűrőpapír nagy kation-kötő affinitása miatt- valójában csak μM -os mennyiségként érhetők el a növények számára, valamint az indiai mustár Cd-toleráns fajként ismert (Seregin és Ivanov, 2001; Tamás és mtsai, 2010; Kranner és Colville, 2011).

Anilinkék- festés

A festődések alapján úgy tűnik, hogy csak a hosszabb távú (48-96 h) Cd-kezelések váltottak ki enyhe kallóz-produkciót, főleg a gyökér osztódási és megnyúlási zónájában (**Mellékletek I., 10. képsor, C-D**). A gyökerek normálisan fejlődtek, a Cu-kezelt növények gyökércsúcsain látható visszagörbülés, vagy a Cd-kezelt kukorica apexeknél leírt barnás elszíneződés itt nem fordult elő (Wójcik és Tukiendorf, 2005). A hosszú távon (96h) kezeltéknél mutatkozott némi gyökérrövidülés, de ez nem volt feltűnő, bár az irodalomban több adat is található a Cd gyökér-elongációt gátló hatását illetően (Potters és mtsai, 2007).

Trypan kék- festés

A csírázás kezdeti szakaszában (12h) még nem volt jelentősebb sejtpusztulás, de a kezelési idő és a koncentráció növelésével egyre nagyobb mértékű festődést tapasztaltunk (**Mellékletek I., 11. képsor, A-D**). A 24-48h kezelések során a megnyúlási és a differenciáltabb felszívási zónában kaptunk pozitív reakciót, elsősorban a rizodermisz sejtek pusztulása következett be. A csírázás végén (96h) mindegyik kezelt növényenél jelentős festődést figyeltünk meg, de már nem csak a gyökércsúcsi megnyúlási régiójában, hanem a merisztematikus zónára is áterjedt. Ennek hátterében feltehetően a rizodermisz sejtek membránjának peroxidatív károsodása áll (Zhang és mtsai, 2009; Solanki és Dhankhar, 2011). A hosszú távon Cd-kezelt csíranövények gyökércsúcsainál kis mértékű vastagodást és enyhe görbülést lehetett megfigyelni, ami feltehetően a merisztéma sejtek abnormális osztódásának, illetve a megnyúlási zónában differenciálódó sejtek gátolt elongációjának köszönhető (Siddiqui és mtsai, 2009; Zhang és mtsai, 2009; Tamás és mtsai, 2010).

Sósavas floroglucinos festés

Bár a sósavas floroglucinos festéssel próbáltuk feloldani a Schiff-reakció és a LP-mérés során kapott ellenmondásokat, a Cd-kezelés számottevő lignifikációt nem indukált egyik gyökércsúcsi zónában sem (**Mellékletek I., 12. képsor, C-D**). Számos cikk említi, hogy a gyökérsejtek egyik tipikus adaptációs válasza a Cd-stresszre az, hogy lignin inkrusztálásával növelik a sejtfaalak rigiditását, ezzel csökkentik a Cd számára a szimplasztba való bejutást, de ez a folyamat a gyökérnövekedés lassulásával vagy leállásával jár (Degenhardt és Gimmler, 200; Chaoui és El Ferjani, 2005; Halušková és mtsai, 2010; Lux és mtsai, 2011). Esetünkben

a lignin-festődés hiányára magyarázatot adhat, hogy a lignin-bioszintézisben érintett GPOX aktivitásában a csírázás második felében erőteljes gátlás következett be (lásd **28. ábra**, 73. oldal), ugyanakkor gyökérnövekedés-gátlás jelei is felfedezhetők a Cd100 és Cd200 gyökércsúcsok megnyúlási zónájában 96h után (**Mellékletek I., 12. képsor, D**).

Összegzés:

A Cd-kezelés meglehetősen hamar (12h) kimutatható volt a LP, amely kezdetben az osztódási zónában, majd az ontogenezis során a differenciáltabb gyökércsúcsi régiókban is jelentkezett. A hosszú távon kezeltéknél fellépő gyengébb Schiff-reakcióból a mérsékelt LP-ra, tehát a lipid peroxidoknak az antioxidáns védelmi rendszer által történő hatástalanítására következtethetünk. Kallóz-szintézist és a nehézfém-stressz okozta sejtpusztulást sikerült kimutatni, ugyanakkor lignifikáció nem következett be.

5. 2. 4. A Cd által okozott szövettani változások a gyökércsúcsban

A Cd-toleráns és hiperakkumuláló fajként ismert indiai mustár gyökerein jelentősebb morfológiai-szövettani elváltozások nem jelentkeztek, legfeljebb az idősebb növények gyökereinél fordul elő némi vastagodás (**Mellékletek III., 9. képsor, A-D**). Arduini és mtsai (1994) viszonylag alacsony Cd koncentráción (0,1, 1 és 5 μM) neveltek *Pinus pinea* L. és *Pinus pinaster* Ait. fenyőcsemetéket, s azt a főgyökér megnyúlásának erőteljes csökkenését és a gyökér kéregállományának vastagodását figyelték meg. A Cu- és a Zn-kezelés eredményeihez hasonlóan a 12-24 óráig kezelt csíranövények gyökércsúcsaiban az anilinkék a citoplazmát és a sejtmagokat festette meg. A metszeti képeken a rizodermisz sejtszomszoros illeszkednek egymáshoz, a cortex sejtszomszoros illeszkednek egymáshoz, a cortex sejtszomszoros illeszkednek egymáshoz. Ugyanakkor a 24h Cd200 növényeknél már kezdtek a parenchima sejtek szabálytalan alakúvá válni, és a rizodermiszben a külső tangenciális falakon kallóz-képződés indult meg (**Mellékletek III., 9. képsor, B**).

A további három festék közül a toluidinkékkel sikerült legjobban láthatóvá tenni a rizodermiszben és a hipodermiszben a sejtfalak másodlagos vastagodását okozó lignint a 48-96h kezeltéknél (**Mellékletek III., 10. képsor, A-D**). Bár a festődés nem volt markáns, valószínűsíthető, hogy az irodalomból ismert ún. ϕ -típusú vastagodásról van szó (Schreiber és mtsai, 1999; Degenhardt és Gimmler, 2000; Zelko és mtsai, 2008).

A vizsgálati növényünkkel azonos családba tartozó Cd/Zn hiperakkumulálásra képes *Thlaspi caerulescens* elsődleges gyökerének felépítését és fejlődését tanulmányozva Zelko és mtsai (2008) azt figyelték meg, hogy a gyökércsúcstól mintegy 0,5 mm-re a gyökér átmérője jelentősen kisebb, mint a közel rokon, de nem hiperakkumuláló *Thlaspi arvense* esetében. Továbbá az elsődleges kéreg legbelső sejtsora, az endodermisz közvetlen szomszédságában található peri-endodermális réteg sejtjeiben egyenlőtlen másodlagos sejtfalvastagodás jelent meg, lignin-beépülésnek köszönhetően, a sejtek belső tangenciális falrészében és a radiális falakon, mintegy hüvelyszerűen körbehatárolva a központi hengert és az endodermiszt. Ez a jelenség ugyanakkor nem fordult elő az utóbbi fajnál.

A Brassicaceae családon belül még a Cd/Ni-hiperakkumuláló *Thlaspi goesingense* esetében is fellelhető hasonló gyökéranatómia (Lombi és mtsai, 2000; Küpper és mtsai, 2001; Zelko és mtsai, 2008). Bár ennek funkciója nem igazán ismert, de Zelko és mtsai (2008) feltételezése szerint azáltal, hogy a peri-endodermális rétegben a felvett Cd raktározásra kerül, késlelteti a Cd további transzportját, valamint védelmet nyújt a fiatal gyökér szubapikális zónáiban levő endodermisz sejteknek.

A metszeti képeken látottaknak ugyan ellene mondanak a GPOX-aktivitás mérési eredményei (lásd **30. ábra**, 77. oldal), nincs kizárva, hogy más, ugyancsak a lignin-szintézisben résztvevő enzimek aktivitása fokozódott, illetve a lignin mellett szuberin (paraanyag) is beépült a sejtfalakba (Schreiber és mtsai, 1999; Halušková és mtsai, 2010; Lux és mtsai, 2011).

Összegzés:

A szövettani metszeteken jelentősebb változásokat nem lehetett megfigyelni, legfeljebb a hosszabb távú (48-96h) kezeléseket követően. A rizodermiszben mutatkoztak a kallóz-produkció jelei, továbbá a rizodermisz mellett a hipodermális régióban is kisebb mértékű lignifikációra utaló festődést kaptunk, ami korai adaptációs válaszként fogható fel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink célja két esszenciális nehézfémnek (Cu, Zn) és a nem esszenciális Cd-nak a csírázás menetére gyakorolt hatásának vizsgálata volt egy Cd- hiperakkumulálóként ismert faj, az indiai mustár (*Brassica juncea* L.) esetében. A szakirodalomból számos adat áll rendelkezésünkre az előnevelés után alkalmazott nehézfém-kezelés hatásait illetően, de arról viszonylag keveset tudunk, hogy milyen biokémiai, morfológiai, esetleg szövettani változások mennek végbe a csírázás korai szakaszában alkalmazott nehézfémkezelés hatására.

Közismert, hogy az abiotikus stresszorok közé tartozó nehézfémek –koncentrációtól és kémiai jellegüktől függően- a növényekben direkt vagy indirekt úton a ROS-k felszaporodását, vagyis oxidatív stressz idéznek elő, melyet gyakran jól látható morfológiai, szöveti változások kísérnek. Mivel az eddigi kutatások nagy része olyan növényekre vonatkozott, amelyeknél csak előnevelés után alkalmaztak nehézfém-kezelést, mi a növényi egyedfejlődés korai szakaszát, vagyis a csírázás idejét választottuk, mivel ez az ontogenezis legérzékenyebb időszaka.

Kerestük a választ arra, hogy az eleve toxikusnak számító Cd hatására hogyan jelentkeznek az oxidatív stressz jelei ezen Cd-toleráns faj csírázó magjaiban, illetve a két esszenciális nehézfém a Cd-hoz hasonló mértékű oxidatív stresszt indukál-e. A stressz-paraméterek idő- és koncentráció-függésének vizsgálatán túl hisztokémiai eljárásokkal is próbáltuk igazolni az oxidatív stressz korai megjelenését. Az esetleges szöveti elváltozások nyomon követéséhez pedig a csírázás során a nehézfémekkel leghamarabb érintkezésbe lépő szervből, a gyököcskéből, illetve a belőle kialakuló elsődleges gyökérből készítettük keresztmetszeteket.

Fontosabb eredményeink a következők voltak:

1. A vizsgált antioxidáns paraméterek mindhárom nehézfém-kezelés esetében idő- és koncentrációfüggően változtak. Az AAS segítségével kimutattuk, hogy a kezelések időtartamának növelésével és az emelkedő koncentrációk alkalmazása nyomán növekedett a felvett nehézfémek mennyisége a *Brassica juncea* csírázó magjaiban.

2. A szemikvantitatív FRAP-módszer alkalmasnak bizonyult annak igazolására, hogy a Cu és a Zn okozta oxidatív stresszt az antioxidáns védelmi rendszer idő- és koncentrációfüggő gyors aktivizálódása kíséri. Ugyanezt erősítette meg a GSH-szint alakulása is. Eredményeink – az

irodalmi adatokhoz hasonlóan- arra utalnak, hogy a GSH-depléciónak háttérében a Halliwell-Asada-ciklus fokozott működése, valamint a fitokelatin-szintézis állhat, ami mellett *de novo* szintézis is bekövetkezhetett.

A FRAP- értékek alakulásában a Cd esetében is idő- és koncentrációfüggést lehetett megfigyelni, a Cu- és Zn-lezeléshez képest ugyanakkor időben kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk. A GSH-szint viszonylag gyors (24h) növekedését annak szintén gyors visszaesése követte, aminek oka lehet egyrészt a Cd-komplexálást végző fitokelatinok szintézise, másrészt egyéb ROS-k eliminálása.

3. A lipid peroxidáció eltérően alakult a három nehézfémnél. A legnagyobb mértékű LP-t a Cd váltott ki a csírázó magvakban, melyet hisztokémiaiilag (Schiff-festés) is sikerült igazolni. Általában jellemző volt, hogy az adott nehézfém koncentrációval párhuzamosan nagyobb MDA-szintet mértünk, ugyanakkor az idő előrehaladtával mérséklődött, ami az enzim és nem enzim antioxidáns védelmi rendszer aktivizálódásának és a káros lipid peroxidok eliminálásának volt köszönhető.

4. A két esszenciális nehézfém (Cu és Zn) a SOD aktivitását az idő és a koncentráció függvényében növelte, ami annak is köszönhető, hogy a mindkét fém kofaktora a citoplazmában is megtalálható Cu/Zn SOD-nak.

5. A H₂O₂ semlegesítésében érintett enzimek közül vizsgált CAT és GPOX esetében inkább a hosszú távú kezelések (48-96h) váltottak ki jelentősebb enzimaktivitást, de a Zn esetében ez lassabban következett be a Cu-hez képest. A SOD, a CAT, a GPOX és a GR aktivitásában hosszú távon (48-96h) gátlás következett be a Cd-kezelést követően, miként számos korábbi tanulmányban is kimutatták. Ez is alátámasztja azon feltevést, hogy a Cd indirekt úton idézi elő az oxidatív stresszt a növényi sejtekben.

6. A két esszenciális nehézfém közül a Cu okozott komolyabb elváltozásokat a fiatal gyökér morfogenezisében, miként az irodalomban is olvashatjuk. Noha fejlődésbeli rendellenesség jelei nem mutatkoztak, a Zn-kezelt növények gyökércsúcsaiban a Schiff-festés segítségével is detektálható volt az oxidatív stressz egyik tipikus jele, a lipid peroxidáció, akárcsak a Cu-kezelés esetében. A Cu-stresszre adott növényi válaszreakciók közül a lignifikációt, illetve a kallóz-produkciót is sikerült láthatóvá tenni, az előbbi a sósavas floroglucin, az utóbbit az anilinkék segítségével.

A Cd-kezelés meglehetősen hamar (12h) kimutatható volt a LP, amely kezdetben az osztódási zónában, majd az ontogenezis során a differenciáltabb gyökércsúcsi régiókban is jelentkezett. A hosszú távon kezeltéknél fellépő gyengébb Schiff-reakcióból a mérsékeltebb LP-ra, tehát a lipid peroxidoknak az antioxidáns védelmi rendszer által történő hatástalanítására következtethetünk. Kallóz-szintézist és a nehézfém-stressz okozta sejtpusztulást sikerült kimutatni, ugyanakkor lignifikáció nem következett be.

7. A gyökércsúcsok megnyúlási és felszívási zónájából készült keresztmetszeti képeken a nehézfém-stressz okozta szöveti elváltozások nyomait inkább a hosszú távú (48-96h) kezeléseknél lehetett felfedezni, elsősorban a Cu-kezelt növényekben. Az anilinkék alkamasnak tűnik a kallóz-képződés kimutatására, bár ennek teljes igazolásához további fotometriás mérések szükségesek. A lignifikáció detektálására a sósavas floroglucin mellett használhatónak mutatkozott a malachitzöld és a toluidinkék is, de inkább a Cu-zel stresszelt növények esetében.

A Cd-stressz esetében a szövettani metszeteken jelentősebb változásokat nem lehetett megfigyelni, legfeljebb a hosszabb távú (48-96h) kezeléseket követően. A rizodermiszben mutatkoztak a kallóz-produkció jelei, továbbá a rizodermisz mellett a hipodermális régióban is kisebb mértékű lignifikációra utaló festődést kaptunk, ami korai adaptációs válaszként fogható fel.

7. SUMMARY

The aims of our study were to investigate potential oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in germinating seeds of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) exposed to copper (Cu), zinc (Zn) and cadmium (Cd) excess. Though many experiments were carried out to evaluate how heavy metal toxicity influences plant growth, morphology, uptake of other nutrients or ROS (reactive oxygen species) generation almost in adult plants, relatively a few data are available about the effects occurring at the early developmental stages of ontogenesis, namely across germination. Since, germination is very sensitive period of development, effects of heavy metal stress are more expressed and visual than later.

Although, this species is generally known to be cadmium-tolerant and hyperaccumulator, we wanted know whether copper or zinc as essential heavy metals can cause similar changes like cadmium which is basically toxic for the plants.

Seeds of Indian mustard were germinated at 0, 50, 100, 200 mg L⁻¹ Cu, Zn and Cd concentrations, in dark for 12, 24, 48 and 96 h, at 24±1°C. The real metal content in seeds was determined by AAS. For biochemical measurements 8 replicas of fresh material were homogenised and the supernatant was used for all assays. The following parameters were evaluated: FRAP (ferric reducing ability of plasma), lipid peroxidation (LP), reduced glutathione content (GSH), total protein content and the activity of glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOX) and glutathione reductase (GR). Moreover, we assessed the loss of plasma membrane integrity in the root tips *in vivo* using Trypan blue, Aniline blue was applied for callose staining, Schiff's reagent was used for the detection of lipid peroxidation, and phloroglucinol-HCl for visualization of the lignification of cell walls. We also made cross sections of the root tips to investigate the potential alterations of the tissues caused by heavy metal stress.

Our study provides the following results in this topic:

1. Oxidative stress occurred in the seeds due to heavy metal treatments, and all parameters were significantly affected by duration and metal concentration used. Increase of duration and/or metal concentration resulted in higher metal uptake in germinating seeds of *Brassica juncea* L.

2. FRAP showed to be a good and quick semi-quantitative parameter to prove that oxidative stress caused by heavy metals is followed by the quick activation of antioxidant defence system including e.g. ascorbic acid and phenolic components. Similarly, both essential heavy metals (Cu and Zn) and toxic Cd treatments were followed by GSH-depletion which was probably due to the increased activity of Halliwell-Asada cycle and the elevated synthesis of phytochelatins (PC).

3. The level of lipid peroxidation (LP) determined as malondialdehyde (MDA) content showed time- and dose-dependence. Generally, lipid peroxidation was higher at the beginning of germination at all concentrations, and then attenuated. Significant differences were observed between the control and the treated seeds after each period. We could detect LP histochemically using Schiff's reagent and LP seemed to be the highest in Cd-treated root tips. The reduction of LP in the second period of the germination was probably due to the activation of antioxidants and the elimination of lipid peroxides.

4. The application of Cu and Zn increased the activity of SOD in time and dose-dependent manner since both metals are cofactors of cytoplasmatic Cu/Zn SOD. Adversely, Cd inhibited SOD activity after 48-96h treatment.

5. The activity of CAT and GPOX increased after 48-96h Cu and Zn excess while the activity of CAT, GPOX and GR decreased as a consequence of Cd exposure supporting that Cd induces oxidative stress indirectly in plant cells.

6. LP as one the markers of oxidative stress was detected after staining with Schiff's reagent in root tips treated by both essential heavy metals though morphological symptoms of metal toxicity occurred only in Cu-stressed plants (stunted, hooked-formed and brownish root tips). In the plants exposed to Cd LP occurred already after 12h in the meristematic zone and later in older differentiated regions but the intensity of Schiff-staining reduced due to probable scavenging of lipid peroxides. Production of callose could be visualized using Anilin blue while lignification of cell walls was detected by phloroglucinol-HCl, mainly in Cu-treated root tips.

7. Alterations of the cells and the tissues due to abnormal cell division and cell elongation occurred mainly in the cross sections of Cu-stressed root tips after 48-96h and not after Zn or

Cd excess. Production of callose was usually detected in the external tangential walls of rhizodermis cells while lignification occurred not only in rhizodermis but in hypodermis, as well, which can be an early adaptation of plant cells against heavy metal stress.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Mihalik Erzsébetnek, és tanszékvezetőnknek, Dr. Tari Irmának, hogy lehetőséget biztosítottak a doktori munkám elvégzéséhez.

Külön köszönettel tartozom Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilonának a sok-sok szakmai tanácsért és emberi támogatásért.

Hálásan köszönöm Kapásné Török Éva segítségét, precizitását a szövettani metszetek elkészítésében, Porkoláb Erzsébetnek az emberi támogatásért.

Szeretnék köszönetet mondani Medvegy Annának, aki éveken át szakmai és emberi szempontból is támaszt nyújtott nekem.

Szakedolgozómnak, Kálmán Erikának is köszönettel tartozom a kísérletek és a mérések kivitelezésében nyújtott segítségéért és pozitív hozzáállásáért.

Továbbá köszönöm a kollégáimnak, a tanszék minden dolgozójának a munkám elvégzéséhez nyújtott emberi és anyagi segítségét.

Nem utolsósorban szeretném doktori munkámat Édesapám emlékének ajánlani. Hálával tartozom neki, hiszen ő ismertette és szeretettette meg velem a növényeket, a növénybiológiát.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

Ahsan N., Lee D-G., Lee S-H., Kang K.Y., Lee J.J., Kim P.J., Yoon H-S., Kim J-S., Lee B-H. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67:1182-1193. 2007.

Anjum N.A., Umar S., Iqbal M., Khan N.A. Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbate-glutathione cycle metabolism. *Bussian J. Plant Phys.* 58:92-99. 2011.

Arduini I., Godbold D. L., Onnis A. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. *Phys. Plantarum*, 92(4):675–680. 1994.

Arduini I., Godbold D.L., Onnis A. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Tree Phys.* 15:411-415. 1995.

Arora A. Sairam R.K., Srivastava G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10):1227-1238. 2002.

Baker D.E., Amacher M.C., Leach, R.M. Sewage sludge as a source of cadmium in soil-plant-animal systems. *Environ. Health Persp.* 28:45-49. 1979.

Barceló J., Poschenrieder Ch. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: Prasad M.N.V. (Ed.) *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 223-248. 2004.

Beers R.F., Sizer I.W. Jr. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195:133-140. 1952.

Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physio.* 17:21-34. 2005.

Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76. 1996.

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91:179-194. 2003.

Bouazizi H., Jouili H., El Ferjani E. Effects of copper excess on growth, H₂O₂, production and peroxidase activities in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Pak. J. Biol. Sci.* 10(5):751-756. 2007.

Bouazizi H., Jouili H., Geitmann A., El Ferjani E. Structural changes of cell wall and lignifying enzymes modulations in bean roots in reponse to copper stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 136:232-240. 2010.

Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. Zinc in plants. *New Phytologist* 173:677-702. 2007.

Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M.H., El Ferjani E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 127:139-147. 1997.

Chaoui A., El Ferjani E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. C. R. Biologies 328:25-31. 2005.

Chaudary S., Sharma Y.K. Interactive studies of potassium and copper with cadmium on seed germination and early seedling growth in maize (*Zea mays* L.). J. Environ. Biol. 30:427-432. 2009.

Chen X-Y., Kim J-Y. Callose synthesis in higher plants. Plant Signaling and Behaviour 4(6): 489-49. 2009.

Cho U-H., Seo N-H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Sci. 168:113-120. 2005.

Gonçalves J.F., Becker A.G., Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Pereira L.B., Battisti V., Spanevello R.M., Morsch V.M., Nicoloso F.T., Schetinger M.R.C. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. Braz. J. Plant Physiol. 19:223-232. 2007.

Corpas F.J., Barroso J.B. del Río L.A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. Trends Plant. Sci. 6:145-150. 2001.

Cuypers A., Vangronsveld J., Clijsters H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress on roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. Biochem. 39:657-664. 2001.

Cuypers A., Vangronsveld J., Clijsters H. Peroxidases on roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparison. J. Plant Physiol. 159:869-876. 2002.

Degenhardt B., Gimmler H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. J. Exp. Bot. 51:595-603. 2000.

Devi S.R., Prasad M.N.V. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems, Prasad M.N.V., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 127-145. 2004.

Devi S.R., Prasad M.N.V. Antioxidant capacity of *Brassica juncea* plants exposed to elevated levels of copper. Russ. J. Plant Phys. 52:205-208. 2005.

De Vos C.H.R., Marjolein J.V., Vooijs R., Schat H. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. Plant Physiol. 8: 853-858. 1992.

Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). J. Exp. Bot. 52:1101-1109. 2001.

Dong J., Wu F., Zhang G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). Chemosphere 64:1659-1666. 2006.

Edwards R., Dixon D.P., Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends Plant Sci. 5(5):193-198. 2000.

Farooqi Z.R., Iqbal M.Z., Kabir M., Shafiq M. Toxic effects of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Albizia lebbeck* (L.) Benth. Pak. J. Bot. 41(1):27-33. 2009.

Gahan P.B. (Ed.) Plant histochemistry and cytochemistry. Academic Press, London, pp. 120-121., 126., 240-242. 1984.

Gallego S.M., Benavides M.P., Tomaro M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science 121:151-159. 1996.

Gallego S.M., Benavides M.P., Tomaro M.L. Effects of cadmium ions on on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Biol. Plant. 42:49-55. 1999.

Gupta M., Cuypers A., Vangronsveld J., Cliijsters H. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant. 106:262-267. 1999.

Halušková L., Valentovičová K., Huttová J., Mistrík I., Tamás L. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity on barley root tips. Plant Phys. Biochem. 47:1069-1074. 2009.

Hasan S. A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. J. Environ. Biol. 30:164-174. 2009.

Hässig A., Linag W.X., Schwabl H., Stampfli K. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. Medical Hypotheses, 52(5):479-481. 1999.

Hegedüs A., Erdei S., Horváth G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Sci. 160:1085-1093. 2001.

Hernández L.E., Ortega-Villasante C., Montero-Palmero M.B., Escobar C., Carpena R.O. Heavy metal perception in a microscale environment: a model system using high doses of pollutants. In: Gupta D.K. and Sandalio L.M. (Eds) Metal toxicity in plants: Perception, Signaling and Remediation. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 23-39. 2012.

Hirano Y., Walthert L., Brunner I. Callose in root apices of European chestnut seedlings: a physiological indicator of aluminum stress. Tree Physiology 26:431-440. 2006.

Hirt H., Shinozaki K. 2003. Plant responses to abiotic stress. Topics in Current Genetics Vol. 4. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 188-189.

Inzé D., Van Montagu M. Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 153-158. 1995.

Janas K.M., Zielińska-Tomaszewska J., Rybaczek D., Maszewski J., Posmyk M.M., Amarowicz R., Kosińska A. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *J. Plant Phys.* 167:270-276. 2010.

Jiang W., Liu D., Liu X. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biologia Plantarum* 44:105-109. 2001.

Jouili H., El Ferjani E. Changes in antioxidant and lignifying enzymes activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. *C. R. Biologies* 326:639-644. 2003.

Jouili H., Bouazizi H., El Ferjani E. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol. Plant.* 33:2075-2082. 2011.

Kartusch R. On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma*, 220:219-225. 2003.

Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Menzies N.W. Toxicity of soluble Al, Cu and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* 303:217-227. 2008.

Kováčik J., Klejdus B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep.* 27:605-615. 2008.

Küpper H., Lombi E., Zhao F J., Wieshammer G., McGrath S.P. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J. Exp. Bot.* 52:2291-2300. 2001.

Kranner I., Colville L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Env. Exp. Bot.* 72:93-105. 2011.

KVVM, Kármentesítési Kézikönyv 2. 2002. Internetes elérhetősége: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:a1O7MpsTJE4J:www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmkezikk2/2-13.htm+talajszennyezets%C3%A9gi&cd=1&hl=hu&ct=clnk&gl=hu&source=www.google.hu>

Lequeux H., Hermans C., Lutts S., Verbruggen N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Phys. Biochem.* 48(8):673-682. 2010.

Li W., Khan M. A., Yamaguchi S. Kamiya Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 46:45-50. 2005.

Lin J., Jiang W., Liu D. Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Bioresource Technology* 86:151-155. 2003.

- Lombi E., Zhao F J., Dunham S.J., Mcgrath S P. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. New Phytol., 145:11-20. 2000.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275. 1951.
- Lux A., Martinka M., Vaculík M., White P.J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. J. Exp. Bot. 62:21-37. 2011.
- Madhava Rao K.V., Sresty T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science 157:113-128. 2000.
- Maksymiec W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. Acta Physiol. Plant. 29: 177-187. 2007.
- Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). Methods Enzymol. 77:231-235. 1981.
- Michaud A.M., Chappellaz C., Hinsinger P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) Plant Soil 310:151-165. 2008.
- Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Environ. Stud. 15:523-530. 2006.
- Mihalik E., Nyakas A., Kálmán K., Nagy E. Növényanatómiai praktikum. JATEPress, Szeged, pp. 137-157. 1999.
- Mihoub A., Chaoui A. El Ferjani E. Changements biochimiques par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois. C. R. Biologies 328:33-41. 2005.
- Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Govindarajan R., Kuriakose S.V., Prasad M.N.V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Phys. Biochem. 44(1):25-37. 2006.
- Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 247(10):3170-3175. 1972.
- Mithöfer A., Schulze R., Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Letters 566:1-5. 2004.
- Mocquot B., Vangronsveld J., Clijsters H., Mench M. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. Plant and Soil, 182(2):287-300. 1996.
- Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. O. F., Dornelas M. C., Mazzafera P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. J. Integrative Plant Biol. 52(4):360-376. 2010.

- Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ.Toxicol.* 22:368–374. 2007.
- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49:623-647. 1998.
- Ozdener Y., Kutbay H.G. Toxicity of copper, cadmium, nickel, lead and zinc on seed germination and seedling growth in *Eruca sativa*. *Fresen. Environ. Bull.* 18(1):26-31. 2009.
- Ozdener Y., Aydin B.K. The effect of zinc on the growth and physiological and biochemical parameters in seedlings of *Eruca sativa* (L.) (Rocket) *Acta Physiol. Plant.* 32:469-476. 2010.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F. J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., Del Río L.A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Phys. Biochem.* 40:521-530. 2002.
- Peralta J.R., Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gomez E., Arteaga S., Rascon E., Parsons J.G. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66:727-734. 2001.
- Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Gogolin K.A., Ye H. Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 9(3):256-263. 2006.
- Pinto R.E., Bartley W. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *J. Biochem.* 112:109-115. 1969.
- Placer Z.A., Cushman L.L., Johnson B.C. Estimation of product of lipid peroxidation (malonil –dialdehyd) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16:359-364. 1966.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Palme K.J., Jansen M.A.K. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Sci.* 12:98-105. 2007.
- Prasad K.V.S.K., Saradhi P.P., Sharmila P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Botany* 42:1–10. 1999.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53:4290-4302. 2005.
- Probst A., Liu H., Fanjul M., Liao B., Hollande E. Response of *Vicia faba* L. to metal toxicity on mine tailing substrate: Geochemical and morphological changes in leaf and root. *Environ. Exp. Bot.* 66:297-308. 2009.
- Qadir A. M., Ghafoor G., Murtaza G. Cadmium concentration in vegetables grown on urban soils irrigated with untreated municipal sewage. *Environment, Development and Sustainability* 2:11–19. 2000.

Qin R., Hirano Y., Brunner I. Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. *Tree Phys.* 27:313-320. 2007.

Quartacci M.F., Argilla A., Baker A.J.M., Navari-Izzo F. Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard. *Chemosphere* 63:918-925. 2006.

Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M., Sanità di Toppi L. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Phys. Biochem.* 43(1):45-54. 2005.

Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Zabalza A., Corpas F.J., Gómez M., Del Río L.A., Sandalio L.M. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ.* 29:1532-1544. 2006.

Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pazmiño D.M., Testillano P.S., Risueño M.C., del Río L. A., Sandalio L. M. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol.* 150: 229-243. 2009.

Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gómez M., Del Río L.A., Sandalio L.M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell, Environ.* 25:677–686. 2002.

Rout G.R., Das P. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23:3-11. 2003.

Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643-668. 1998.

Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41:105-130. 1999.

Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* 50:1267-1280. 1999.

Schützendübel A., Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53:1351-1365. 2002.

Sedlak I., Lindsay R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25:192-205. 1968.

Seregin I.V., Ivanov V.B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4):523–544. 2001.

Seth C.S., Chaturvedi P.K., Misra V. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotox. Environ. Safe.* 71:76-85. 2008.

Sfaxi-Bousbih A., Chaoui A., El Ferjani E. Unsuitable availability of nutrients in germinating bena embryos expose to copper excess. *Biol. Trace Elem. Res.* 135:295-303. 2010.

Sharma S.S, Dietz K-J. The relationship between metal toxicity and cellular redox tolerance. Trends in Plant Science 14:43-50. 2008.

Sharma S., Sharma P., Datta S.P., Gupta V. Morphological and biochemical response of *Cicer arietinum* L. var. pusa-256 towards an excess of zinc concentration. Life Science Journal 7:95-98. 2010.

Shaw B.P., Sahu S.K., Mishra R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad, M.N.V. (Ed) Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag, 2nd Edition, India, pp. 84-126. 2004.

Siddiqui S., Meghvansi M.K., Wani M.A., Jabee F. Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. Acta Physiol. Plant. 31:531-536. 2009.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. Free Rad. Biol. Med. 27:916-921. 1999.

Singh P.K., Tewari R.K. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. J. Environ. Biol. 24:107-12. 2003.

Singh S., Melo J.S., Eapen S., D' Souza S.F. Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: Role of inherent peroxidase and H₂O₂. J. Biotechnology, 123:43-49. 2006.

Singh S., Singh S., Ramachandran V., Eapen S. Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in axenically grown *Brassica juncea* (L.) plants. Ecotox. Environ. Safe. 73:1975-1981. 2010.

Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A., Vangronsveld J. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaesolus vulgaris* after Cd application. Plant Phys. Biochem. 43:437-444. 2005.

Smiri M., Chaoui A., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J-P., El Ferjani E. Redox regulation of the glutathione reductase/iso-glutaredoxin system in germinating pea seed exposed to cadmium. Plant Sci. 179:423-436. 2010.

Smiri M., Chaoui A., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J-P., El Ferjani E. Cadmium affects the glutathione/glutaredoxin system in germinating pea seeds. Biol. Trace. Elem. Res. 142:93-105. 2011.

Solanki R., Dhankhar R. Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. Biologia 66:195-204. 2011.

Sridhar B.B.M., Diehl S.V., Han F.X., Monts D.L., Su Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). Environ. Exp. Bot. 54:131-141. 2005.

Sun Q., Wang X.R., Ding S.M., Yuan X.F. Effects of interactions between cadmium and zinc on phytochelatin and glutathione production in wheat (*Triticum aestivum* L.) Environ. Toxicol. 20:195-201. 2005.

Szöllősi R., Varga I.Sz. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol. Szeged.* 46(3-4):125-127. 2002.

Szöllősi R., Varga I.Sz., Erdei L., Mihalik E. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotox. Env. Safe.* 72:1337-1342. 2009.

Szollosi R. Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) seeds in health. In: Preedy V.R., Watson R.R., Patel V.B. (Eds) *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Elsevier, London-San Diego, pp. 671-676. 2011.

Szöllősi R., Kálmán E., Medvegy A., Pető A., Varga I. Sz. Studies on oxidative stress caused by Cu and Zn excess in germinating seeds of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) *Acta Biologica Szegediensis* 55:175-178. 2011.

Tamás L., Mistrík I., Huttová J., Halušková L., Valentovičová K., Zelinová V. Role of reactive oxygen species-generating enzymes and hydrogen peroxide during cadmium, mercury and osmotic stress in barley root tip. *Planta* 231:221-231. 2010.

Varga I.Sz., Szöllősi R., Bagyánszki M. Estimation of total antioxidant power in medicinal plants (adaptation of FRAP). *Curr. Topics Biophys.* 24 (2):219-225. 2000.

Verma K., Shekhawat G.S., Sharma A., Mehta S.K., Sharma V. Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in roots of seedling and 3-4 leaf stage plants of *Brassica juncea* (L.) *Czern. Plant Cell Rep.* 27:1261-1269. 2008.

Wang S-H., Yang Z-M., Yang H., Lu B., Li S-Q., Lu Y-P. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Bot. Bull. Academia Sinica* 45:203-212. 2004.

Wang A.S., Angle J.S., Chaney R.L., Delorme T.A., Reeves R.D. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil* 281:325-337. 2006.

Wang C., Zhang S.H., Wang P.F., Hou J., Zhang W.J., Li W., Lin Z.P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, 75(11):1468-1476. 2009.

White P.J., Broadley M.R. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* 88:967-988. 2001.

Wójcik M., Tukiendorf A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biologia Plantarum* 49:237-245. 2005.

Zelko I., Lux A., Czibula K. Difference in the root structure of hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *Int. J. Environ. Poll.* 33(2-3):123-132. 2008.

Zhang S., Zhang H., Qin R., Jiang W., Liu D. Cadmium induction of lipid peroxidation and effects on root tip cells and antioxidant enzyme activities in *Vicia faba* L. *Ecotoxicology* 18: 814-823. 2009.

Zhang H., Xia Y., Wang G., Shen Z. Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase on roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta* 227:465-475. 2008.

Xiong Z-T., Wang H. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese Cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.) *Environ. Toxicol.* 20(2):188-194. 2005.

Yadav S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Botany* 76:167-179. 2010.

Yamamoto Y., Kobayashi Y., Matsumoto H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125:199–208. 2001.

Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115:1405-1412. 1997.

Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Phys.* 17(1):145-156. 2005.

10. PUBLIKÁCIÓS LISTA

1. A doktori disszertáció témaköréhez kapcsolódó publikációk:

Folyóirat cikkek:

Ilona Sz. Varga, **Réka Szöllősi**, Mária Bagyánszki (2000).

Estimation of total antioxidant power in medicinal plants (adaptation of FRAP method). *Current Topics in Biophysics* 24(2), 219-225.

R. Szöllősi, I. Varga-Szöllősi (2002).

Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method), *Acta Biologica Szegediensis* 46 (3-4), 125-127.

Szöllősi R., Varga I Sz, Erdei L, Mihalik E (2009).

Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1337-1342.

Réka Szöllősi, Erika Kálmán, Anna Medvegy, Andrea Pető, Sz. Ilona Varga (2011).

Studies on oxidative stress caused by Cu and Zn excess in germinating seeds of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) *Acta Biologica Szegediensis* 55(1), 175-178.

Könyfejezet:

Szollosi, R. (2011). Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) seeds in health. In V. R.

Preedy, R. R. Watson, V. B. Patel (Editors), *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention* (1st ed.) (pp 671-676). London, Burlington, San Diego: Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN: 9780123756886

Konferencia előadások és poszterek:

Ilona Sz. Varga, **Réka Szöllősi**, Mária Bagyánszki (2000).

Estimation of total antioxidant power in medicinal plants (adaptation of FRAP method). Előadás, 5th Symposium (SFRR)- Free Radicals in Biology and Medicine, Łódź, 7-10 June

R. Szöllősi, E. Mihalik (2005).

Estimation of Cu, Zn phytoextraction by weeds grown on contaminated sites. Poszter, XVIIth International Botanical Congress, Vienna, 17 - 23 July 2005

Szöllősi R., Sz. Varga I., Mihalik E., Erdei L (2005).

Cd- kezelés hatására bekövetkező oxidatív stressz vizsgálata *Brassica juncea* L. magvakban. Poszter, 2005. szeptember 26. The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged

- Szőllősi R.**, Sz. Varga I., Erdei L., Mihalik E. (2005).
Oxidatív stressz és antioxidáns paraméterek vizsgálata Cd- kezelt *Brassica juncea* magvakban. Előadás, Magyar Szabadgyök kutató Társaság III. Konferenciája, Debrecen, 2005. október 13-15.
- R. Szőllősi**, I. Varga Sz., E. Mihalik, L. Erdei (2006).
Preliminary Investigations of Oxidative Stress in Cd Treated Germinating Indian Mustard (*Brassica Juncea* L.) Seeds. Poszter, International Symposium on Trace Elements in the Food Chain (TEFC). Budapest, Hungary, May 25-27, 2006
- R. Szőllősi**, I. Varga Sz., E. Mihalik, L. Erdei (2006).
Investigations on oxidative stress caused by Cd treatment in germinating *Brassica juncea* L. seeds. Poszter, XIIIth Biennial Meeting of the SFRRI. Davos, Switzerland, August 15-19, 2006. Free Rad Res (2006) 40, Suppl. 1. p. 98.
- Szőllősi R.**, Mihalik E. (2006).
Effects of Cadmium on floral morphological traits of Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) – Preliminary investigations. Poszter, THE 13th SYMPOSIUM ON ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS. Szeged, Hungary, 25 September 2006
- Szőllősi R.**, Kálmán E, Sz. Varga I, Medvegy A, Erdei L, Mihalik E (2010).
A Cu-kezelés hatásai az indiai mustár (*Brassica juncea* L.) egyedfejlődésének korai szakaszában. Előadás- SZABAD GYÖKÖK ÉS MIKROELEMEEK - miniszimpózium, 2010. szept. 17. Budapest, MTA Kémiai Kutatóközpont)
- Szőllősi R.**, Kálmán E, Sz. Varga I, Medvegy A, Pető A, Erdei L (2010) The influence of copper excess on early development, lipid peroxidation and antioxidative system in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. Poszter, ISIRR, 2010. okt. 13-15. Szeged

2. Egyéb publikációk:

Folyóirat cikkek:

- Then, M., Vásárhelyi-Perédi, K., **Szőllősi, R.**, Szentmihályi, K. (2004).
Polyphenol-, Mineral Element Content and Total Antioxidant Power Of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. Acta Horticulturae ISHS, 629, 123-129.
- Réka Szőllősi**, Anna Medvegy, Anikó Németh, Katalin Kálmán, Erzsébet Mihalik (2010).
Intra-inflorescence variations in floral morphological and reproductive traits of *Iris sibirica* L. Acta Biologica Szegediensis 54(2), 103-110.
- Feigl, G. , **Szöllosi, R.**, Mihalik, E. (2010). Studies on established *Acorus calamus* (L.) populations. Acta Biologica Szegediensis 54(2), 99-101.
- R. Szőllősi**, A. Medvegy, E. Benyes, A. Németh, E. Mihalik (2011).
Flowering phenology, floral display and reproductive success of *Iris sibirica*. Acta Botanica Hungarica 53(3-4), 409-422.

Bolda, V.V. , Botau, D., **Szöllosi, R.**, Peto, A., Gallé, Á., Tari, I.(2011).
Studies on elemental composition and antioxidant capacity in callus cultures and native plants of *Vaccinium myrtillus* L. local populations. *Acta Biologica Szegediensis* 55(2), 255-259.

Kolbert Zs, Pető A, **Szöllősi R**, Erdei L, Tari I (2011).
Nitric oxide (NO) generation during vegetative/generative transition of the apical meristem in wheat. *Acta Biologica Szegediensis* 55(1), 95-97.

Egyéb (poszter, konferenciakiadvány):

Szöllősiné Varga Ilona, **Szöllősi Réka**, Bárkai Tünde (2001).
A FRAP módszer alkalmazásának újabb lehetőségei növényi minták antioxidáns hatásának megállapítására. Előadás, Magyar Szabadgyök Kutató Társaság Kongr. Pécs, 2001. *Folia Hepatologica*, Suppl. 6(1), 19-20.

Then, M., **Szöllősi, R.**, Szentmihályi, K. (2002).
Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts as antioxidants. 5th Internatl. Congress on Cosmetics and Household Chemicals, Budapest, Hungary

Then, M., **Szöllősi, R.**, Szentmihályi, K. (2002).
Polyphenol-, Mineral Element Content and Total Antioxidant Power Of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. Poszter, XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants, August 11-17, Toronto, Canada

Szöllősi, R., Mihalik, E. (2004).
Asteraceae-fajok nehézfém-felvételének összehasonlító vizsgálata.
Poszter, Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében VI. konferencia összefoglalói. Keszthely, 2004. febr. 26-29. p. 114.

Mihalik E., Németh A., **Szöllősi R.**, Medvegy A., Kálmán K. (2005).
Ex situ *Adonis vernalis* populáció pollen életképesség és pollenszám diverzitása. Előadás, Lippay-Ormos-Vas Tudományos Ülésszak, Budapest. 2005. október 19-20.

Mihalik E, Németh A, **Szöllősi R**, Medvegy A, Kálmán K (2006).
A morfológiai bélyegek és a reprodukív kapacitás virágzaton belüli variabilitása egy telepített *Iris sibirica* populációban. Poszter, Az Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében VII. c. konferencia összefoglalói. Kitaibelia 11, 66.

Mihalik E, Németh A, **Szöllősi R**, Medvegy A, Kálmán K, Radvánszky A (2006).
Védett növényfajok ex situ populációinak hosszú távú fenntartása. Az Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében VII. konferencia összefoglalói. Kitaibelia 11, 33.

Szöllősi, R., Mihalik, E. (2006).
Preliminary investigations of pollen viability in Zn treated Indian mustard (*Brassica juncea* L.). Poszter, XIXth International Congress on Sexual Plant Reproduction. Budapest, Hungary, July 11-15, 2006.

Szőllősi Réka, Mihalik Erzsébet (2007).

Pollenprodukcio- és fertilitás vizsgálata kadmiummal kezelt indiai mustár (*Brassica juncea* L.) növényeknél. Poszter, 10. Magyar Magnézium Szimpózium, 2007. április 12-13. Szeged, Hungary

Szőllősi R, Varga Sz I, Mihalik E (2008).

Egy „elfelejtett” gyógynövény, az orvosi kálmos (*Acorus calamus* L.) mint antioxidáns- forrás. MSZKT és MTA MIKROELEM MUNKABIZOTTSÁG munkaértekezlete, Előadás, 2008. szeptember 26., Budapest, MSD Centrum

Szőllősi R, Medvegy A, Mihalik E (2008).

Virágbiológiai vizsgálatok az *Iris sibirica* L. egy telepített populációjában. "Molekuláktól a globális folyamatokig" - V. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Program és absztrakt-kötet: 145. (2008. november 6-9. Nyíregyháza, poszter).

Medvegy A, **Szőllősi R**, Mihalik E (2009).

Temporal floral sex allocation in protogynous *Adonis vernalis* L. (Poszter, 2nd European Congress of Conservation Biology, Book of Abstracts, Prague, 2009. szept. 1-5. p.193.)

Szőllősi R, Benyes E, Medvegy A, Mihalik E (2009).

Reproduktív sikeresség vizsgálata az *Iris sibirica* L. egy telepített populációjában. (Poszter, 8. Magyar Ökológus Kongresszus, Szeged, 2009. augusztus 26-28. p. 215.)

Medvegy A, **Szőllősi R**, Mihalik E (2009).

Florális szex allokáció időbeli variációja a protogyniás *Adonis vernalis* L. populációjában. (Poszter, 8. Magyar Ökológus Kongresszus, Szeged, 2009. augusztus 26-28. p. 148.)

Németh A, Makra O, Mihalik E, **Szőllősi R** (2009).

Studies on temporal changes in several reproductive traits in an ex situ population of *Dianthus diutinus* Kit. (Poszter, 2nd European Congress of Conservation Biology, Book of Abstracts, Prague, 2009. szept. 1-5. p.196.)

Könyfejezet:

Szentmihályi Klára, Blázovics Anna, Hajdú Mária, **Szőllősi Réka**, Rapavi Erika, Then Mária:

Makro- és mikroelem-vizsgálatok jelentősége a gyógynövénykutatásban.

In: Mikroelemek a táplálékláncban. Szerk.: Simon L., Szilágyi M.: Bessenyi György Kiadó, Nyíregyháza, Hungary, 2003. pp. 252-260.

11. MELLÉKLETEK I. (Hisztokémiai festések)

1. képsor: A Schiff-reagenssel festett gyökércsúcsok Cu-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez, a sárga nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

2. képsor: Az anilinkékkel festett gyökércsúcsok Cu-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez. A sárga nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

3. képsor: Az Trypan késsel festett gyökércsúcsok Cu-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez. A sárga nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

4. képsor: A sósavas floroglucinnal festett gyökércsúcsok Cu-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez. A sárga nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

5. képsor: A Schiff-reagenssel festett gyökércsúcsok Zn-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez.

6. képsor: Az anilinkékkel festett gyökércsúcsok Zn-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez. A sárga nyíl a szöveti elváltozásokat jelzi.

7. képsor: Az Trypan késsel festett gyökércsúcsok Zn-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez.

8. képsor: A sósavas floroglucinnal festett gyökércsúcsok Zn-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1mm-t jelez.

9. képsor: A Schiff-reagenssel gyökércsúcsok Cd-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1 mm-t jelez.

10. képsor: Az anilinkékkel festett gyökércsúcsok Cd-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1mm-t jelez.

11. képsor: Az Trypan késsel festett gyökércsúcsok Cd-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mérce 1mm-t jelez.

12. képsor: A sósavas floroglucinnal festett gyökércsúcsok Cd-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A mércé 1 mm-t, a sárga nyíl szöveti elváltozást jelez.

11. MELLÉKLETEK II. (Csírázó magvak)

1. képsor: A csírázó *Brassica juncea* magvak Cu-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A piros nyílhegyek a gyökércsúcs morfológiai elváltozásait jelzik.

2. képsor: A csírázó *Brassica juncea* magvak Zn-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után.

3. képsor: A csírázó *Brassica juncea* magvak Cd-kezelést követően 12h (A), 24h (B), 48h (C) és 96h (D) után. A piros nyílhegyek a gyökércsúcs morfológiai elváltozásait jelzik.

C

D

11. MELLÉKLETEK III. (Szövettani metszetek)

1. képsor: A Cu-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok anilinkékkel (AB) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

2. képsor: A Cu-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok toluidinkékkal (TB) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

3. képsor: A Cu-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok sósavas floroglucinnal (Phl) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércé= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

4. képsor: A Cu-kezelt *Brassica juncea* gyökérsúcsok malachitzölddel (MG) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

5. képsor: A Zn-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok anilinkékkel (AB) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

6. képsor: A Zn-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok toluidinkékkel (TB) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

7. képsor: A Zn-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok sósavas floroglucinnal (Phl) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mérce= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

8. képsor: A Zn-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok malachitzölddel (MG) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

9. képsor: A Cd-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok anilinkékkel (AB) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

10. képsor: A Cd-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok toluidinkékkel (TB) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mérce= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

11. képsor: A Cd-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok sósavas floroglucinnal (Phl) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.

12. képsor: A Cd-kezelt *Brassica juncea* gyökércsúcsok malachitzölddel (MG) festett keresztmetszeti képei 12h (A), 24 h (B), 48 h (C) és 96 h (D) után. A mércse= 0.1 mm. A piros nyilak a szöveti elváltozásokat jelzik.