

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**NEHÉZFÉMKEZELÉS ÁLTAL KIVÁLTOTT
OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA CSÍRÁZÓ INDAI
MUSTÁR (*BRASSICA JUNCEA* L.) MAGVAKBAN**

Szóllósi Réka



Témavezető:

Dr. Mihalik Erzsébet
egyetemi docens

SZTE TTIK
Környezettudományi Doktori Iskola

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék

SZEGED
2012

BEVEZETÉS

A bányászati, 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. Ezek a talajból kerülnek a növényekbe, majd a növények elfogyasztása által a táplálékláncba, végül az emberi szervezetbe is, ahol számos megbetegedést, kóros elváltozást válthatnak ki. Az esszenciális nehézfémek közé tartozó réz (Cu) és cink (Zn), valamint a toxikus kadmium (Cd) magas koncentrációja általában a növények gyengébb fejlettségét okozza, klorotikus és nekrotikus tüneteket eredményez, valamint az öregedés jelei is mutatkoznak. Ezek háttérében reaktív oxigénformák (reactive oxygen species, ROS) túlermelődése, vagyis az oxidatív stressz kialakulása, a nehézfémeknek a redox homeosztázis fenntartásáért felelős antioxidánsokkal való interakciója, továbbá más esszenciális elemek metabolizmusában keletkezett zavarok állnak. A nehézfémekkel szennyezett vizek és talajok növények bevonásával történő megtisztítására (fitoremediáció) évtizedek óta folynak kísérletek. A nehézfémeket nagyobb mennyiségben felvevő ún. hiperakkumulálók közé tartozó az indiai mustár (*Brassica juncea* L.) egészen fiatal, még csírázó egyedein vizsgáltuk a nehézfémek élettani, anatómiai hatását.

CÉLKITŰZÉSEK

A szakirodalomból jól ismert tény, hogy a nehézfém-stressz hatására a morfológiai elváltozásokon túl a növények oxidatív károsodást is szenvednek. Mivel 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.

Kísérleteinkben a Cu, illetve a Zn mint esszenciális, és a Cd mint toxikus nehézfémeknek a csírázás menetére gyakorolt hatását vizsgáltuk, továbbá az egyes stressz-paraméterek idő- és koncentráció-függő változásait, valamint az esetlegesen bekövetkező morfológiai, anatómiai elváltozásokat követtük nyomon indiai mustár (*Brassica juncea* L.) csírázó magjaiban mint tesztnövényekben.

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?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkben indiai mustár (*Brassica juncea* L.) magvakat csíráztattuk steril Petri-csészékben, szobahőmérsékleten ($24\pm 1^\circ\text{C}$), sötétben 12, 24, 48 és 96 órán át (rövidítve 12h, 24h, 48h és 96h). A csírázatáshoz használt oldatok desztillált víz és a nehézfémek (Cu, Zn és Cd) különböző sóinak felhasználásával készítettük, a nehézfémekre számítva 50, 100 és 200 mg L⁻¹ koncentrációkban. Ezután kerültek feldolgozásra az eltérő csírázási stádiumban levő magok. A különböző időtartamú és koncentrációjú kezeléseknél desztillált vizes lemosást követően a csírázó magvakból friss anyagot mértünk ki, majd ezeket homogenizáltuk, lecentrifugáltuk és a felülúszóból mértük a különböző stressz-paramétereket (FRAP, GSH, LP, össz fehérje- tartalom, GST, SOD, CAT, GPOX, GR).

A csírázás során a magvak által felvett nehézfémek kvantitatív meghatározása atomabszorpciós spektroszkópiás módszerrel (AAS). Négyféle *in vivo* festési eljárást alkalmaztunk az oxidatív stressz sejt és szövet szintű kimutatására: Schiff-festést, anilinkékkel, Trypan-kékkel, valamint sósavas floroglucinnal való festést.

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, amelyeken vizsgáltuk, 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. Továbbá anilinkékkel, toluidinkékkel, malachitzölddel és sósavas floroglucinnal festettük meg a metszeteket, annak kiderítésére, hogy a nehézfém-stressz hatására bekövetkezik-e számottevő kallóz- illetve lignin-szintézis a különböző szövettájak sejtjeiben.

EREDMÉNYEK

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 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-depléció 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-kezeléshez képest ugyanakkor időben kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk.

3. A lipid peroxidáció eltérően alakult a három nehézfémnél. A legnagyobb mértékű LP-t a Cd váltott ki a csirázó magvakban, melyet hisztokémiailag (Schiff-festés) is sikerült igazolni. Általában az adott nehézfém koncentrációval párhuzamosan nagyobb MDA-szintet mértünk, ugyanakkor az idő előrehaladtával mérséklődött, ami az enzimes és nem enzimes 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. Bár fejlődésbeli rendellenesség jelei nem mutatkoztak, a Zn-kezelt növények gyökércsúcaiban 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 kimutatni. A Cd-kezelés meglehetősen hamar (12h) kimutatható volt a LP, amely kezdetben az osztódási zónában, majd később 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.

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.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

Folyóirat cikkek:

1. Iona Sz. Varga, **Réka Szöllősi**, Mária Bagyánszki (2000). Estimation of total antioxidant power in medicinal plants (adaptation of FRAP method). Current Topics in Biophysics 24:219-225.
2. **R. Szöllősi**, I. Varga-Szöllősi (2002). Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method), Acta Biologica Szegediensis 46: 125–127.
3. **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. **IF: 2,133**

4. **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 55:175-178.

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

Tudományos folyóiratban megjelent konferencia absztraktok:

R. Szöllősi, 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. **IF: 2,536**

Egyéb kiadványban megjelent konferencia absztraktok:

1. 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

2. **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

3. **Szőllősi 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
4. **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.
5. **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
6. **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
7. **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)
8. **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

Egyéb az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

Folyóiratban megjelent cikkek:

1. 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.
2. **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 54:103-110.
3. Feigl, G., **Szollosi, R.**, Mihalik, E. (2010). Studies on established *Acorus calamus* (L.) populations. Acta Biologica Szegediensis 54: 99-101.
4. **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: 409-422.
5. Bolda, V.V., Botau, D., **Szollosi, 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 55:255-259.
6. Kolbert Zs, Petó A, **Szőllősi R**, Erdei L, Tari I (2011). Nitric oxide (NO) generation during vegetative/generative transition of the apical meristem in wheat. Acta Biologica Szegediensis 55:95-97.

Egyéb kiadványban megjelent konferencia absztraktok:

1. Then, M., **Szőllősi, 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

2. **Szőllősi, 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.

3. Mihalik E., Németh A., **Szőllősi 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.

4. Mihalik E, Németh A, **Szőllősi 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.

5. Mihalik E, Németh A, **Szőllősi 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.

6. **Szőllősi, 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.

7. **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

8. **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

9. **Szóllósi 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 absztraktkötet: 145. (2008. november 6-9. Nyíregyháza, poszter).

10. Medvegy A, **Szóllósi 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.)

11. **Szóllósi R**, Benyes E, Medvegy A, Mihalik E (2009). Reproductív sikeresség vizsgálata az *Iris sibirica* L. egy telepített populációjában. (Poszter, 8. Magyar Ökológus Kongresszus, Szeged, 2009. augusztus 26-28. p. 215.)

12. Medvegy A, **Szóllósi 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.)

13. Németh A, Makra O, Mihalik E, **Szóllósi 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.)

Könyvfejezet:

Szentmihályi Klára, Blázovics Anna, Hajdú Mária, **Szóllósi 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.

NYILATKOZAT

Kijelentjük, hogy Szöllősi Réka

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

Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method),
Acta Biologica Szegediensis 46: 125–127.

Impakt faktor: 0,00

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.

Impakt faktor: 2,133


Réka Szöllősi, Erika Kálmán, Anna Medveg, 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* 55:175-178.

Impakt faktor: 0,00


címmel megjelent közleményekben végzett munkája meghatározó jelentőségű, és ezen publikációkat mindeddig nem használtuk fel tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére, mint ahogy azt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2012. május 6.


Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilona


Prof. Dr. Erdei László


Dr. Mihalik Erzsébet


Medveg Anna


Kálmán Erika


Pető Andrea