

Tanulmánykötet a 7. BBK előadásaiból



2016

Tartalomjegyzék

<i>Tartalomjegyzék</i>	1
<i>Nemzetközi sportrendezvények turisztikai hatásai</i>	6
<i>A KKV-k fejlődése és gazdasági szerepvállalásuk Magyarországon</i>	18
<i>Önkormányzati eszközök a helyi környezetvédelem szolgálatában</i>	39
<i>Originált és reciklált PET keverékek folyási tulajdonságainak tanulmányozása</i>	46
<i>A biometrikus azonosítás könyvtárbiztonsági alkalmazása</i>	52
<i>A szabadgyök-kutatás évtizedei és magyar vonatkozásai</i>	60
<i>A környezetpedagógia a fenntartható vízgazdálkodás tükrében</i>	72
<i>Diplomás pályakezdő fiatalok karriertervezési tudatossága</i>	92
<i>Munkaerőpiac – az Európai Unió és Magyarország kontextusában</i>	106
<i>A fejlődés hajtóereje a tudat!</i>	114
<i>Az egészségnevelés múltja, jelene, jövője</i>	121
<i>A redox állapot jelentősége és vizsgálata növényekben</i>	130
<i>A robottechnika reformja – új alapanyagok és megoldások az új típusú aktuátorok fejlesztésében</i>	138
<i>Analyzing the Properties of Polymer Based Machine Parts Manufactured by Additive Technology</i>	148
<i>Investigation of the Mechanical Properties and Material Structure of Experimental Specimens Manufactured by 3D Printing Technology</i>	154
<i>Műveltség és nyelv magyar titka, írása</i>	164
<i>Az ökoturizmus fejlesztési lehetőségei a Zselicben</i>	207
<i>Tervezélméletek és várostervezési gyakorlatok</i>	215
<i>Vízbiztonsági szemlélet a vízellátásban</i>	221
<i>Az idült májbetegségek diagnosztikája Magyarországon – 2016</i>	227
<i>Rendszerlogisztika és az Infokommunikációs együttműködés a XXI. században</i>	233
<i>Intelligens ágens alapú rendszerek fejlesztésére alkalmazott módszertanok</i>	237
<i>Nyelvünk ősisége avagy a magyar nyelv kialakulásának alapelvei</i>	243
<i>Az etruszk nyelvi rejtély kulcsa</i>	259
<i>Gondolatok a teremtés nyelvéről</i>	267
<i>Személy és alkotmány és gazdaság</i>	278
<i>A klímavédelmi szabályozás helyi szintje</i>	287
<i>Gazdaságelméleti megfontolások a születésszám kapcsán</i>	293
<i>Festékérzékenyített napelemek</i>	302
<i>Szakképzettség és tudományos érdeklődés 1814 és 1832 között Magyarországon</i>	311
<i>A vegyes házasságok, házasságkötések alakulása a szlovákiai magyarok körében</i>	327
<i>A klímavédelem helyi adaptációs megoldásai</i>	341
<i>Acél és alumínium karosszérialemezek komplex kísérleti vizsgálata</i>	347
<i>Polipropilén homopolimer folyási tulajdonságainak széles deformációs sebességű vizsgálata</i>	355

<i>Fenntarthatóságra nevelés a tanítóképzésben a hallgatók globális szemléletének alakításáért</i>	380
<i>Választási rendszerek változásai a Kárpát-medencében 1945 után.....</i>	389
<i>A szövegfelolvasó szoftverek alkalmazása a nyelvoktatásban.....</i>	401
<i>A háromdimenziós nyomtatás alkalmazásának egyik lehetősége a nyelvoktatásban</i>	410
<i>A minőségirányítási rendszerfejlesztés új követelményei az ISO 9001:2015-ös szabvány tükrében.....</i>	419
<i>Versenysztratégiai kihívások a magyar mezőgazdaság előtt</i>	428
<i>A magyarországi települési szilárdhulladék-lerakók energetikai célú hasznosítása.....</i>	438
<i>Innovatív vállalatok térbeli jellemzői az Alföldön.....</i>	444
<i>Felvidéki magyar kultúráközvetítő civil szervezetek működésének összehasonlító elemzése</i>	454
<i>Tudományos megalapozottság az igazságügyi szakértői bizonyításban</i>	460
<i>Folyékony edzőközegek hűtőképességének vizsgálata</i>	471
<i>Megismerés a büntetőeljárársban, különös tekintettel az ügyész megváltozott szerepére</i>	480
<i>Környezetpedagógia gyakorlata a nemzetközi hulladékgazdálkodási vállalatok munkájában</i>	488
<i>Magyarország, a Kárpát-medencei és a visegrádi országok gazdasági felemelkedésének tényezői, különös tekintettel az emberi erőforrásra.....</i>	501
<i>Piacgazdaság és etikus jövedelmek.....</i>	519
<i>Mit tudsz a coachingról – a coaching megítélésének vizsgálata.....</i>	527
<i>A Falusi Porta Tanoda program.....</i>	538
<i>Horvátország geostratégiai helyzetének változásai a balkáni migrációs folyamatokban</i>	544
<i>Kulturális örökség és életminőség</i>	554
<i>Problémafelvetés a személyekből építkező rendszerek deduktív modelljéről</i>	563
<i>A klímavédelmi szabályozás helyi szintje</i>	572
<i>Gazdaságelméleti megfontolások a születésszám kapcsán.....</i>	578
<i>Festékérzékenyített napelemek</i>	587
<i>Szakképzettség és tudományos érdeklődés 1814 és 1832 között Magyarországon</i>	596
<i>A vegyes házasságok, házasságkötések alakulása a szlovákiai magyarok körében</i>	612
<i>A klímavédelem helyi adaptációs megoldásai.....</i>	624
<i>Acél és alumínium karosszérialemezek komplex kísérleti vizsgálata</i>	630
<i>Polipropilén homopolimer folyási tulajdonságainak széles deformációs sebességű vizsgálata</i>	637
<i>Az adatorientált diplomácia a nemzetközi kapcsolatokban</i>	644
<i>Nyugdíjasok halandósága a 2004-2014-es években</i>	661
<i>Civil drónok fejlődése és alkalmazhatósága</i>	670
<i>Védett helyiségek jelene és jövője</i>	677
<i>A schengeni folyamat, és jövője</i>	683
<i>Indiai mustár (Brassica juncea L.) csíranövények alkalmazása nehézfémstressz vizsgálatában.....</i>	692
<i>Hídépítés- interkulturális párbeszédpedagógia GERFEC alapokon</i>	704
<i>A szeretetkörök helyreállítása – mint a Kárpát-medence versenyképességének legfőbb meghatározója .</i>	723

TANULMÁNYKÖTET **a 7. BBK előadásából**

Szerkesztők:

Prof. Dr. Rajnai Zoltán
Dr. Fregán Beatrix
Marosné Kuna Zsuzsanna

ISBN 978-615-5460-97-5

Az Óbudai Egyetem kiadványa
Budapest, 2016

Indiai mustár (*Brassica juncea* L.) csíranövények alkalmazása nehézfémstressz vizsgálatában

Szóllósi Réka¹, Sz. Varga Ilona

¹ SZTE TTIK Növénybiológiai Tanszék

email: szoszo@bio.u-szeged.hu

Absztrakt:

Napjainkban komoly környezetvédelmi, s áttételesen egészségügyi problémát okoz, hogy az esszenciális nehézfémeken (pl. Cu, Zn) kívül a toxikus nehézfémek (pl. Cd) is egyre nagyobb mértékben kerülnek vizekbe, talajba és az egész táplálékláncba, ezáltal kóros elváltozásokat, megbetegedéseket okozhatnak. Ezen kórfolyamatok hátterében többnyire az ún. reaktív oxigénformák (ROS) egyensúlyának megbomlása áll. A nehézfémekkel szennyezett területek, közegek növényekkel való megtisztításánál gyakran alkalmazott tesztnövény az indiai mustár (*Brassica juncea* L.), melyen jól vizsgálható, hogy a növényekben a nehézfémstressz milyen anatómiai és élettani változásokat idéz elő. Már az egyedfejlődés korai érzékeny szakaszában, a csírázás során is jelentkezhetnek tünetek. Ezért tanulmányoztuk a réz (Cu) és a toxikus kadmium (Cd) a csírázás menetére gyakorolt hatását.

A magokat steril Petri-csészékben sötétben 12, 24, 48 és 96 órán át (12-96h) csíráztattuk különböző Cu- és Cd-koncentrációjú (jelölés: Cu5-200 és Cd50-200) oldatokban. Az oxidatív stressz biokémiai paraméterei (ferri-ion redukáló képesség, lipid peroxidáció, kataláz aktivitás) mellett stressz-indukált sejtfalanyagok (kallóz, lignin) szintézisét, a sejtmembrán károsodását, valamint a H₂O₂ keletkezését igyekeztünk hisztokémiai festésekkel igazolni.

Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét nehézfém hatására már a csírázás kezdetén a gyökércskében és a belőle fejlődő elsődleges gyökérben jelentős oxidatív stressz-folyamatok generálódnak, a biokémiai paraméterek idő- és koncentráció-függést mutattak. Elsősorban a Cu-stressz hatására gyorsan szintetizálódó poliszacharid, a kallóz sejtfalba történő beépülésével igyekeztek a növények növelni a fiatal gyökerek ellenállóképességét, míg faanyag (lignin) keletkezését nem sikerült kimutatni.

Kulcsszavak: nehézfémek, oxidatív stressz, gyökércsúcs, kallóz, membránintegritás

1. Bevezetés

A napjainkban is egyre fokozódó bányászati és ipari tevékenységnek, a mezőgazdaságban a különböző kemikáliák alkalmazásának, valamint a lakossági hulladék- és szennyvízkibocsátásnak köszönhetően környezetünk jelentős nehézfémterhelésnek van kitéve. Az esszenciális nehézfémeken (pl. Cu, Zn, Fe) kívül nagy problémát okoz a toxikus nehézfémek (pl. Cd, Pb, Hg) vizekbe, talajba, onnan a növényekbe és az egész táplálékláncba való kerülése, hiszen az adott szervezetben kóros elváltozásokat, megbetegedéseket okozhatnak [1, 2, 3]. Akár növényi, akár állati vagy humán kórfolyamatokról van, ezek hátterében többnyire az ún. reaktív oxigénformák (ROS) túlermelődése áll [4]. Bár hazánkban a természetes élőhelyeken a talaj illetve a vizek nehézfém-koncentrációi általában a szennyezettségi határérték alattiak, de az intenzív mezőgazdasági, ipari, bányászati művelés következtében ezek akár 10-15-szörösére növekedhetnek. Az ilyen nehézfémekkel szennyezett területek, közegek növényekkel való megtisztítását célzó eljárás, a fitoremediáció egyik kedvelt tesztnövénye a keresztesvirágúak családjába tartozó indiai mustár (*Brassica juncea* L.), amely fajtársaihoz (*Alyssum*-, *Arabidopsis*-, *Thlaspi*-fajok) hasonlóan hiperakkumuláló, emellett nagy biomasszát produkál rövid idő alatt [5, 6, 7]. Számos kutatási eredmény ismeretes ezzel a fajjal kapcsolatban, de ezek általában kifejlett növényeken végzett, többnyire előnevelést követő nehézfém-kezelésből származnak. Ezért tartjuk fontosnak, hogy megismerjük a csírázás idején, vagyis az egyedfejlődés legérzékenyebb, korai szakaszában alkalmazott nehézfém-stressz hatását [8].

Kísérleteinkben az esszenciális Cu és a toxikus Cd a csírázás menetére gyakorolt hatását, valamint a gyököcskében jelentkező esetleges morfológiai-anatómiai eltéréseket vizsgáltuk, továbbá különböző biokémiai stressz-paraméterek idő- és koncentráció-függő változásait követtük nyomon.

2. Anyagok és módszerek

2.1. A növénynevelés körülményei

A magokat steril Petri-csészékben szobahőmérsékleten ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), sötétben 12, 24, 48 és 96 órán át (12-96h) csíráztattuk. A csíráztatáshoz használt oldatok desztillált víz és a nehézfémek (Cu és Cd) különböző sóinak (CuSO_4 , illetve $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) felhasználásával készítettük 50, 100 és 200 mg L^{-1} koncentrációkban (rövidítések: Cu50, Cu100, Cu200, illetve Cd50, Cd100 és Cd200). A kontroll csíranövényeket desztillált vízben neveltük.

Mivel látványos morfológiai-anatómiai elváltozások szinte csak a Cu-zel kezelt csíranövények gyököcskéjénél illetve primer gyökerénél jelentkeztek, vizsgálatainkat a Cu kisebb, de szupraoptimális koncentrációival (5, 10 és 25 mg L^{-1}) folytattuk (jelölés: Cu5, Cu10 és Cu25), 48, 72 és 96 órás kezelésekkkel.

2.2. Biokémiai paraméterek vizsgálata

A biokémiai vizsgálatokhoz a különböző időtartamú és koncentrációjú kezeléseket követően desztillált vizes lemosást követően a csírázó magvakból, illetve azok gyököcskéjéből 6-8 ismétléssel foszfátpufferrel és kvarchomokkal homogenizátumot készítettünk, majd lecentrifugáltuk, és a felülúszóból mértük a kívánt paramétereket. Az oxidatív stressz mértékének kifejezéséhez az alábbi paramétereket mértük: FRAP (ferri-ion redukáló képesség; [9, 10, 11]), a membránkárosodást jellemző lipid peroxidáció (LP; [12]), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) semlegesítésében szerepet játszó kataláz enzim aktivitása (CAT; [13]). Az enzimaktivitás kifejezéséhez szükséges össz fehérje-tartalmat Lowry és Rosebrough [14] módszerével határoztuk meg.

2.3. Hisztokémiai vizsgálatok

A nehézfémkezelés illetve az oxidatív stressz okozta morfológiai-anatómiai változások (pl. bizonyos sejtfalanyagok beépülése) nyomon követésére a fiatal gyökércsúcsokat *in vivo* festettük anilinkékkel (jelölés: AB), Trypan-kékkel (TB) és sósavas floroglucinnal (Phl). Az anilinkék a kallóz mint *de novo* gyorsan szintetizálódó és beépülő, poliszacharid jellegű sejtfalanyag kimutatására alkalmas [15, 16]. A sejtleletképeség, valamint a membránok állapotának felméréséhez alkalmaztuk a Trypan-kéket, amely csak az elhalt sejteket festi meg [17, 18]. A stresszhatásra másodlagosan a sejtfalba beépülő és annak ellenálló-képességét, rigiditását fokozó lignin (faanyag) detektálásához sósavas floroglucint használtunk [19, 20]. Ez utóbbi specifikus festék meggyipiros elszíneződéssel jelzi a lignin jelenlétét. A mintákat sztereomikroszkóp segítségével, 50-szeres nagyítással vizsgáltuk.

Az alacsonyabb Cu-koncentrációkkal (Cu5, Cu10 és Cu25) kezelt csíranövények esetében az anilinkék-festés mellett a H_2O_2 -t, mint az oxidatív stressz egyik markerét is igyekeztünk láthatóvá tenni az Amplex Red (AR) alkalmazásával [21]. Mindkét esetben fluoreszcencia intenzitás alapján következtítettünk a kallóz- illetve a H_2O_2 - szintézis mértékére (a kontrollt vettük 100%-nak).

2.4. Szöveti vizsgálatok a gyökércsúcsokban

A nehézfémstressz és az oxidatív károsodások szöveti jeleit is vizsgáltuk gyököcskében és az elsődleges gyökércsúcsokban. A növényi mintákat fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk [19]. Fénymikroszkópos metszeteket készítettünk, amelyekről 100-szoros nagyítású fotókat készítettünk. A metszeti képeken figyeltük a fontosabb szöveti részeket, vagyis a borszövet, kéregszövet és a központi henger egymáshoz viszonyított arányait.

2.5. Adatok feldolgozása

A statisztikai analízist a STATISTICA 8.0 és 9.0 program segítségével végeztük el. Mivel az adatok általában nem mutattak normál eloszlást, nem-parametrikus tesztek alkalmaztak a szignifikancia-vizsgálathoz. A különböző paraméterek közti összefüggések feltáráshoz Spearman-féle rangkorrelációt használtunk. A szignifikancia-szintek jelölése: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

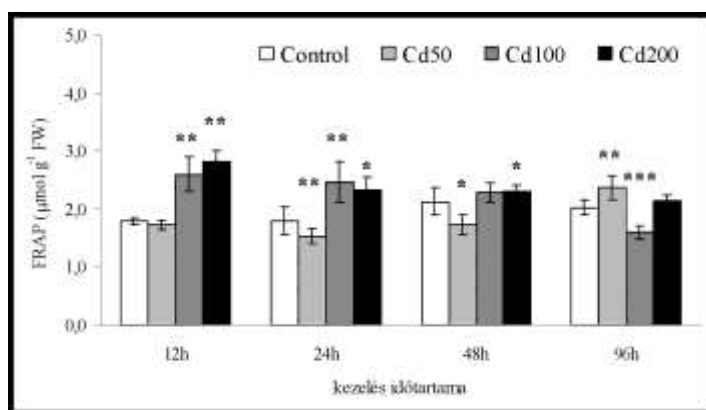
3. Eredmények és diszkuszió

3.1. Az oxidatív stressz paraméterei

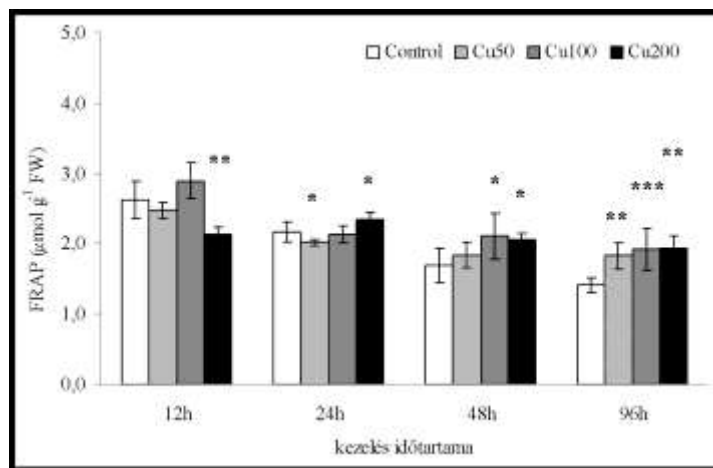
Mindhárom nehézfém esetében a varianciaanalízis (ANOVA) során kiderült, hogy a vizsgált biokémiai paraméterek alakulását szignifikánsan befolyásolja mind a kezelés időtartama, mind az alkalmazott koncentráció.

3.1.1. A ferri-ion redukálóképesség (FRAP)

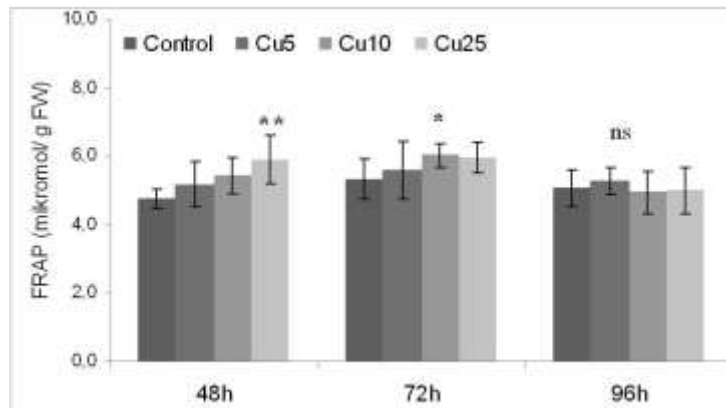
Mind egyik nehézfém esetében azt tapasztaltuk, hogy a FRAP-értékek koncentráció-függő módon emelkednek főleg a rövidebb távú (12-48h) kezeléseknél, ugyanakkor ez időben fokozatosan mérséklődik (1. A, B, C ábra). Mindez az antioxidáns védelmi rendszer, elsősorban a vízdékony komponensek (pl. fenolok) gyors indukciójára utal [22, 23, 24].



1. A ábra: A különböző Cd-koncentrációkkal kezelt *Brassica juncea* csíranövények össz antioxidáns kapacitását kifejező FRAP-értékek. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.



1. B ábra: A különböző Cu-koncentrációkkal (Cu50-200) kezelt *Brassica juncea* csíranövények össz antioxidáns kapacitását kifejező FRAP-értékek. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

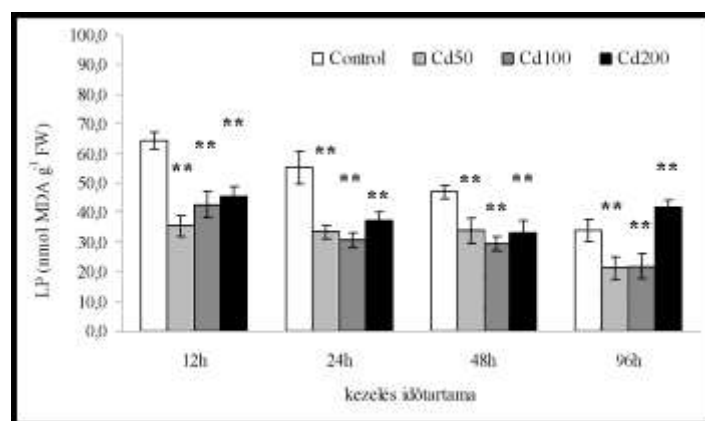


1. C ábra: A különböző Cu-koncentrációkkal (Cu5-25) kezelt *Brassica juncea* csíranövények gyökércsúcsaiban mért össz antioxidáns kapacitást kifejező FRAP-értékek. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

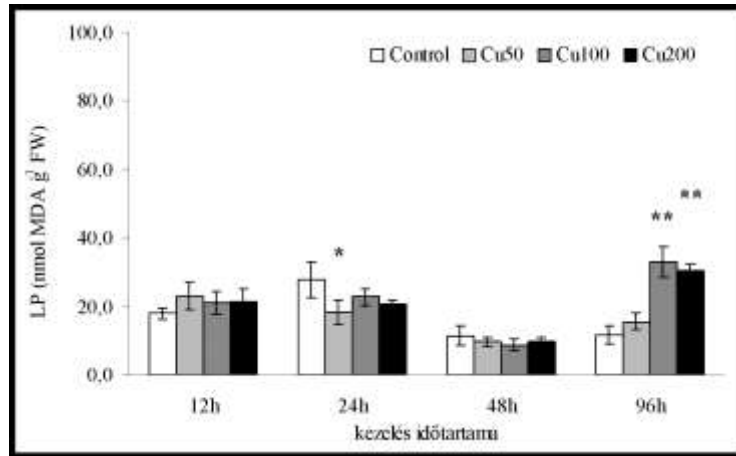
3.1.2. A lipid peroxidáció (LP) vizsgálati eredményei

A toxikusnak számító Cd-mal való kezelés hatására a membránkárosodást kifejező LP –értékek a kontrollhoz képest általában szignifikáns csökkenést mutattak (2. A ábra), míg az irodalomban rendszerint a Cd-stressz LP-fokozó hatásáról lehet adatokat találni [25, 26, 27]. Ugyanakkor -hozzánk hasonlóan- már Cd-kezelt uborka csíranövényeknél is tapasztaltak LP-csökkenést [28]. Eredményeink a faj Cd-mal szembeni toleranciájával és a stressz által stimulált vízdékony antioxidánsok (pl. glutation, GSH) illetve polifenolok jelenlétével magyarázhatók.

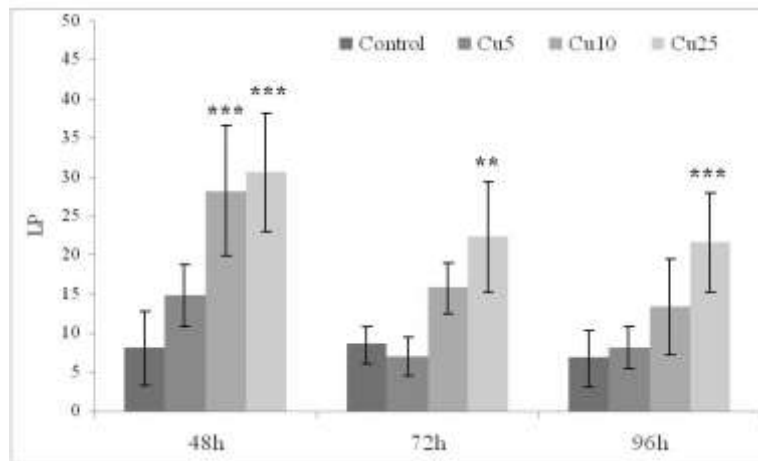
A nagyobb koncentrációjú Cu-stressz (Cu50-200) a csíranövényekben alig okozott számottevő LP-növekedést vagy -csökkenést a csírázás első 48 órájában a kontrollhoz képest, csak 96 óra elteltével tapasztaltunk szignifikáns növekedést (2. B ábra). Ugyanakkor a kisebb Cu-koncentrációk már 48 órát követően jelentős LP-t váltottak ki a gyököcskében, ami időben mérséklődött (2. C ábra). Az esetünkben tapasztalható ellentmondás háttérében az is állhat, hogy a kisebb koncentrációjú Cu-kezelést követően csak a gyököcskéből végeztünk méréseket, míg a másik kísérlet sorozatban az egész növényt dolgoztuk fel – gyakorlati okokból. Az általunk is megfigyelt koncentráció-függő LP-növekedést irodalmi adatok is megerősítik indiai mustár és lencse csíranövények esetében [29, 30]. A LP mértékének időbeli csökkenése pedig a fenolos komponensek jelenlétével kapcsolható össze [31, 32].



2. A ábra: A különböző Cd-koncentrációkkal kezelt *Brassica juncea* csíranövényekben mért lipid peroxidáció (LP). A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.



2.B ábra: A különböző Cu (Cu50-200) -koncentrációkkal kezelt *Brassica juncea* csíranövényekben mért lipid peroxidáció (LP). A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

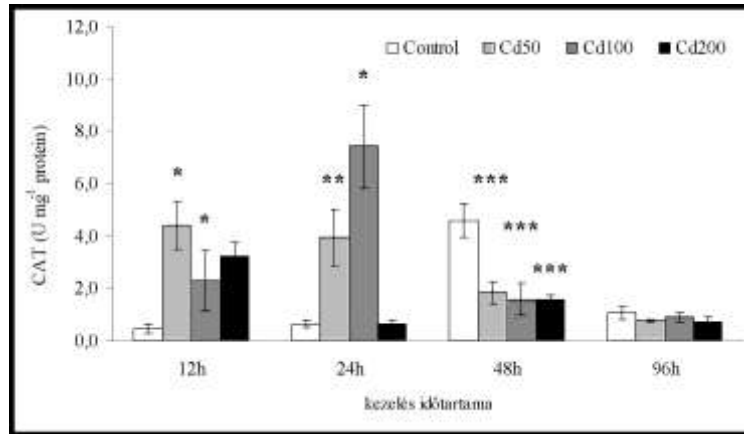


2.C ábra: A különböző Cu-koncentrációkkal (Cu5-25) kezelt *Brassica juncea* csíranövények gyökércsúcsaiban mért LP-értékek. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

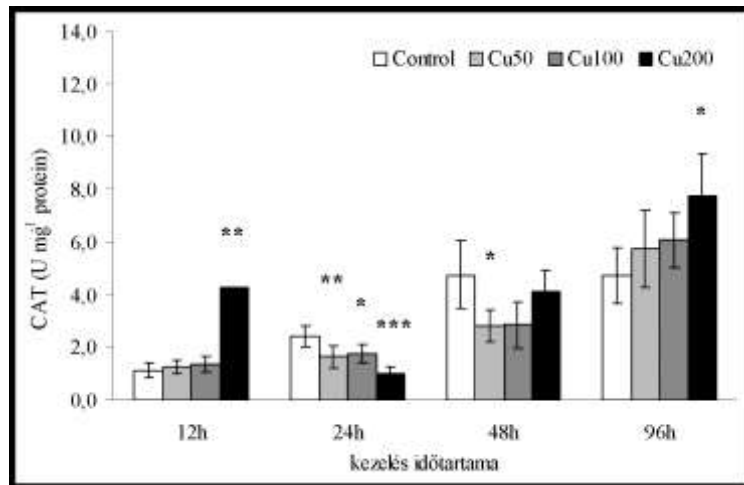
3.1.3. A kataláz (CAT) aktivitása

A Cd-kezelés főleg rövid távon okoztak a CAT-aktivításban markáns növekedést, de a vártaktól eltérően nem a legnagyobb koncentráció váltotta ki a legnagyobb hatást (3. A ábra). A hosszabb távú kezelések ugyanakkor gátlást eredményeztek az enzim működésében. Eredményeinkhez hasonlóan, vagyis az aktivitás kezdeti, koncentráció-függő növekedését, majd csökkenését figyelték meg korábban napraforgó és borsó esetében [24, 33]. Ugyanakkor az irodalmi adatok többsége a Cd CAT-inhibitor jellegéről számolnak be [4, 8, 34].

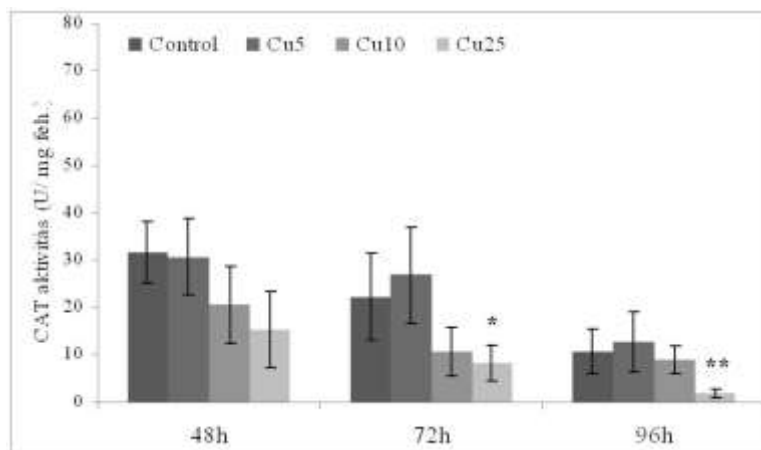
A nagyobb Cu-stressz (Cu50-200) a hosszú távú (96h) kezelés hatására fokozta a CAT aktivitását a növényekben, rövidebb távon inkább gátlás volt tapasztalható (3. B ábra). A gyengébb Cu-terhelés (Cu5-25) egyértelműen visszaesést okozott az enzimműködésben mind koncentráció-, mind időfüggő módon (3. C ábra), ami összhangban van a szakirodalomban leírtakkal [35, 36]. A CAT-gátlás hátterében az enzimfehérje szerkezetében bekövetkezett változások állhatnak.



3.A ábra: A különböző Cd-koncentrációkkal kezelt *Brassica juncea* csíranövényekben mért kataláz (CAT) aktivitás. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.



3.B ábra: A különböző Cu-koncentrációkkal kezelt *Brassica juncea* csíranövényekben mért kataláz (CAT) aktivitás. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

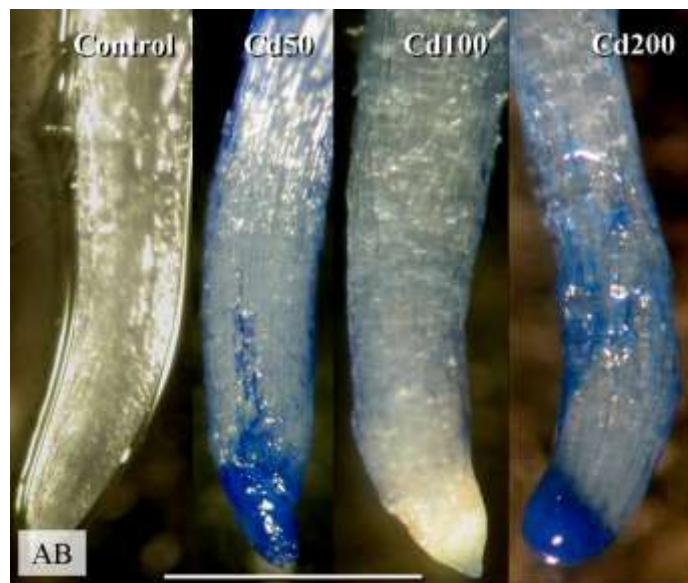


3.C ábra: A különböző Cu-koncentrációkkal (Cu5-25) kezelt *Brassica juncea* csíranövényekben mért kataláz (CAT) aktivitás. A csillagok a kontroll és a kezelt növények közti szignifikáns különbségeket jelzik: *, ha $p < 0,05$; **, ha $p < 0,01$ és ***, ha $p < 0,001$.

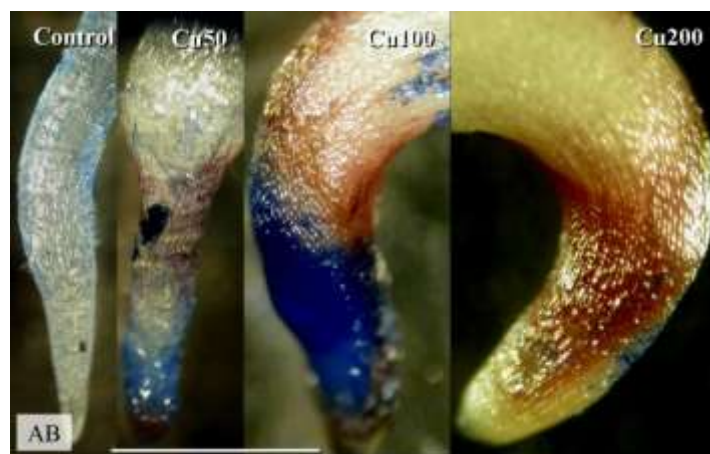
3.2. Hisztokémiai vizsgálatok eredményei

Az anilinkék (AB)- festődések alapján úgy tűnik, hogy csak a hosszabb távú (48-96h) Cd-kezelések váltottak ki enyhe kallóz-produkciót elsősorban a gyökércsúcs osztódási és megnyúlási zónájában (4. A ábra). A hosszú távon kezeltéknél (96h) mutatkozott kisebb mértékű gyökérrövidülés, ami a Cd gyökérelongációt gátló hatásának tudható be [37].

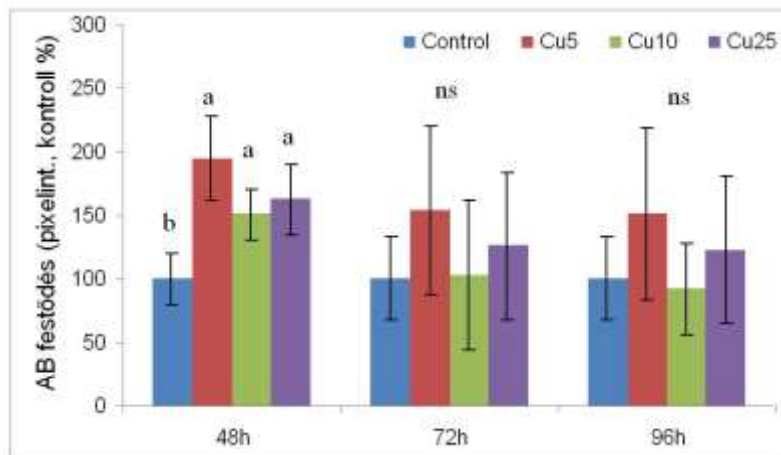
A Cu-kezelés is főleg a hosszabb távon (48h-96h) eredményezett kallóz-beépülést a gyökércsúcs megnyúlási zónájában sejtfaalakba (4. B ábra), ugyanakkor a gyökércsúcsok visszagömbölyése, barnás elszíneződése, valamint a gyökerek megvastagodása és rövidülése is megfigyelhető volt, az irodalomban leírtakhoz hasonlóan [37, 38]. A barnás elszíneződés eredetére hisztokémiai eljárásokkal eddig nem sikerült fényt deríteni. Azonban szakirodalmi adatok alapján feltehető, hogy a bőrszöveti és a közvetlenül alatta levő alapszöveti sejtek vakuólumában és apoplastjában levő flavonoidok különböző peroxidázok számára elektron-donorként szolgálnak, és velük reagálva barnás-feketés fenol-polimereket képeznek [39, 40]. A kisebb Cu-koncentrációkkal végzett terhelésre is a gyökércsúcs-sejtek gyors kallóz-szintézissel reagáltak, amelyet a fluoreszcencia intenzitásának mérésével is igazolni tudtunk (4. C ábra).



4. A ábra: Az anilinkéssel (AB) festett gyökércsúcsok 96h Cd-kezelést követően. A mérce 1 mm-t jelöl.



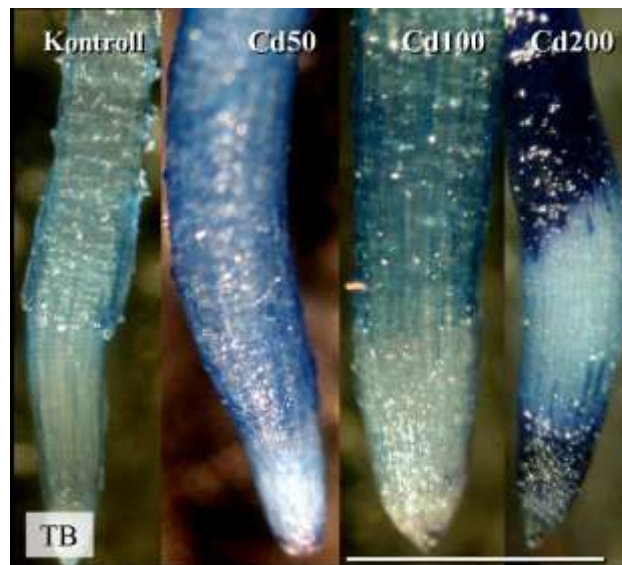
4.B ábra: Az anilinkéssel (AB) festett gyökércsúcsok 96h Cu-kezelést követően. A mérce 1 mm-t jelöl.



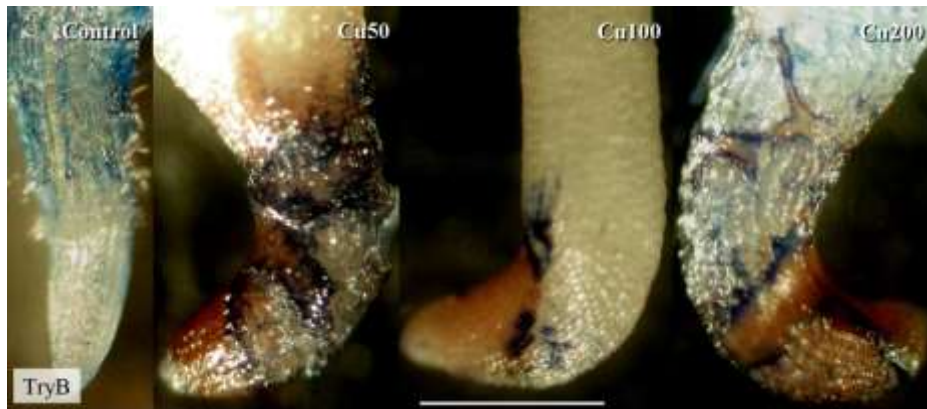
4.C ábra: Az anilinkékkel (AB) festett gyökércsúcsokban 48, 72 és 96h Cu-kezelést követően mért fluoreszcencia-intenzitás. A különböző betűk szignifikáns eltéréseket jelölnek $p < 0,05$ esetén.

A sejtek életképességét a Trypan-kék (TB) festéssel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a gyökércsúcsokban eleinte a megnyúlási és a differenciáltabb zónában volt sejtpusztulás elsősorban a bórszövetben, míg később (96h) már az osztódási zónára is áterjedt a károsodás (5. A ábra). Ennek háttérében feltehetően a sejtmembrán peroxidatív sérülése áll [26, 41].

A Cu-terhelés esetében a kezelési idő növelésével egyre erőteljesebb sejtelhalást, szöveti szakadozást figyeltünk meg főleg a megnyúlási zónában (5. B ábra). A szöveti sérülések valószínűleg a bórszöveti sejtek és az alattuk levő kéregszöveti sejtek falának nagyobb rigiditásának köszönhetőek [20, 42].



5. A ábra: Az Trypan-kékkel (AB) festett gyökércsúcsok 96h Cd-kezelést követően. A mérce 1 mm-t jelöl.

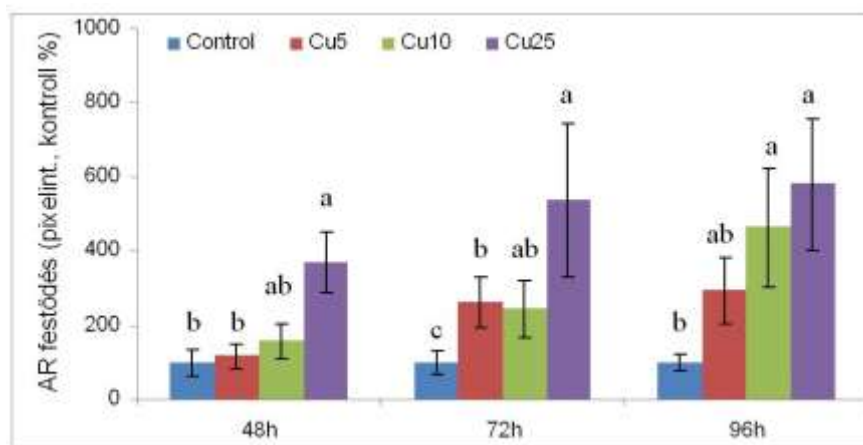


5. B ábra: Az Trypan-kékkel (AB) festett gyökércsúcsok 96h Cu-kezelést követően. A mérce 1 mm-t jelöl

A sósavas floroglucinnal való inkubálás nem mutatott ki a gyökércsúcsokban lignifikációt egyik nehézfém esetében sem. Bár a Cu-ról ismert, hogy számos, a lignin-szintézisben érintett enzim (pl. peroxidázok, lakkázok) kofaktora, így a gyökérsejtek apoplastjában felhalmozódott Cu az említett enzimeket stimulálja, amelyek a sejtfall merevségét és a nehézfémmel szembeni védekezését fokozzák [43, 44, 45]. Ez magyarázhatja az általunk is tapasztalt erőteljes gyökércsúcs-rövidülést és a visszagörbülést.

A már említett Cu-stressz (Cu5-25) okozta CAT-gátlás nyomán felszaporodó H₂O₂ kimutatására jól alkalmazható volt az Amplex Red (AR) fluoreszcens festék. A CAT-gátlás mértéke és a fluoreszcencia intenzitása jól korrelált egymással ($r = -0.43^{***}$, 6. ábra). A képződő H₂O₂-nak szerepe lehet a lignifikációban, hisz e folyamat számos enzime peroxidáz aktivitású. A sejtalba beépülő lignin – kallózhoz hasonlóan- apoplastikus gátként szolgál, de gátolja is sejtmegegyülést [20, 37, 45].

A sejtmegegyülés szabályozásában és a gyökércsúcs visszagörbülésében fontos szerepe lehet Cu-terhelés nyomán megváltozó auxin-egyensúlynak is, bár – a kínai kutatók szerint- ez nincs kapcsolatban a H₂O₂-felszaporodással [46].



6. ábra: Az Amplex Red (AR) festékkel inkubált gyökércsúcsokban 48, 72 és 96h Cu-kezelést követően mért fluoreszcencia-intenzitás. A különböző betűk szignifikáns eltéréseket jelölnek $p < 0,05$ esetén.

3.3. Szöveti változások a gyökércsúcsokban

A gyökércsúcsból illetve a fejlődő elsődleges gyökércsúcsból készített keresztmetszeteken a Cd-kezelést követően jelentős szöveti elváltozásokat nem tapasztaltunk, ami nem meglepő, hisz az indiai mustár Cd-toleráns és –hiperakkumuláló fajként ismert [5].

A csírázás során alkalmazott rövid távú (12-24h) Cu-kezelés nem okozott markáns szöveti változásokat a gyökércsúcsban, ugyanakkor a hosszabb kezelésekre hatására a koncentráció emelkedésével a bőrszöveti sejtek külső (tangenciális) falának vastagodása volt felfedezhető, amely a pozitív anilinkék-festődés alapján feltehetően kallóz-beépülésnek köszönhető [47, 48]. Feltűnő volt továbbá, hogy a kezelés hosszának illetve a Cu-koncentráció növekedésével az alapszöveti sejtek eddigi szabályos, lekerekített

alakja szabálytalanná vált, valamint a 96h Cu200 kezelésnél felszíni szöveti károsodás jelentkezett a metszeti képeken, amely Cu okozta rendellenes sejtosztódással is kapcsolatba hozható [8, 49].

4. Összefoglalás

Eredményeink azt mutatják, hogy mind a Cd-, mind a Cu-terhelés hatására már a csírázás kezdetén a gyököcskében és a belőle fejlődő elsődleges gyökérben jelentős oxidatív stressz-folyamatok generálódnak. A FRAP-értékek alakulása mindkét nehézfémstressz esetében az antioxidáns védelmi rendszer gyors, koncentráció-függő, ám időben mérséklődő aktivizálódására utalnak. A membránok sérülését jelző LP-értékek a Cd esetében csökkenő, míg a Cu-kezelést követően inkább növekvő tendenciát mutattak, amely jelzi a növény Cd-hoz való adaptációját, míg a Cu komoly károsodást okozott. A nehézfémstressz által generált H₂O₂ eliminálásában érintett CAT enzim működésében a Cd kezdetben stimulációt, később gátlást okozott. A Cu-stresszre is többnyire az aktivitás mérséklésével reagált az enzim.

A nehézfém-kezelés mint abiotikus stressz hatására – jól kimutatható módon- egy gyorsan szintetizálódó poliszacharid, a kallóz sejtfalba történő beépülésével igyekeztek a növények növelni a fiatal gyökerek ellenállóképességét, ugyanakkor lignin-szintézisre utaló jelek nem mutatkoztak. Hogy az AR-festéssel is kimutatható H₂O₂ szerepet játszik-e lignifikációs folyamatokban, további vizsgálatok szükségesek. Mindazonáltal elmondható, hogy a nehézfémstresszre adott korai válaszok (kallóz-szintézis, antioxidáns védelmi rendszer aktivizálódása, enzimaktivitás változása) jól tanulmányozhatók már az egyedfejlődés korai stádiumában is.

Hivatkozott irodalom

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Yadav S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Botany* 76:167-179. 2010.
- [4] Arora A. Sairam R.K., Srivastava G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10):1227-1238. 2002.
- [5] Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643-668. 1998.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Kranner I., Colville L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Env. Exp. Bot.* 72:93-105. 2011.
- [9] 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.
- [10] Varga I.Sz., Szöllösi R., Bagyánszki M. Estimation of total antioxidant power in medicinal plants (adaptation of FRAP). *Curr. Topics Biophys.* 24 (2):219-225. 2000.
- [11] Szöllösi 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Gahan P.B. (Ed.) *Plant histochemistry and cytochemistry*. Academic Press, London, pp. 120-121., 126., 240-242. 1984.

- [18] 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.
- [19] Mihalik E., Nyakas A., Kálmán K., Nagy E. Növényanatómiai praktikum. JATEPress, Szeged, pp. 137-157. 1999.
- [20] 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.
- [21] Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, Á., Ördög, A., Szepesi, Á., Gémes, K., Laskay, G., Erdei, L. and Kolbert, Z., Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotox. Environ. Safe* 94: 179-189. 2013.
- [22] Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91:179-194. 2003.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Maksymiec W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol. Plant.* 29: 177-187. 2007.
- [26] 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.
- [27] Solanki R., Dhankhar R. Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia* 66:195-204. 2011.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Dinis, T.C., Madeira, V.M. and Almeida, L.M.. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315(1): 161-169. 1994.
- [32] Soengas, P., Cartea, M.E., Francisco, M., Sotelo, T. and Velasco, P. New insights into antioxidant activity of Brassica crops. *Food Chem.* 134(2): 725-733. 2012.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 25(10): 1122-1132. 2006.
- [36] Azpilicueta, C.E., Pena, L.B., Tomaro, M.L. and Gallego, S.M. Modifications in catalase activity and expression in developing sunflower seedlings under cadmium stress. *Redox Report* 13(1): 40-46. 2008.
- [37] 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.
- [38] Bouazizi H., Jouili H., Geitmann A., El Ferjani E. Structural changes of cell wall and lignifying enzymes modulations in bean roots in response to copper stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 136:232-240. 2010.
- [39] Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115:1405-1412. 1997.
- [40] Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Environ. Stud.* 15:523-530. 2006.
- [41] 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.

- [42] Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Menzies N.W. Toxicities of soluble Al, Cu and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* 303:217-227. 2008.
- [43] Degenhardt B., Gimmler H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *J. Exp. Bot.* 51:595-603. 2000.
- [44] Kováčik, J. and Klejdus, B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Reports* 27(3):605-615. 2008
- [45] 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.
- [46] Yuan, H.M., Xu, H.H., Liu, W.C. and Lu, Y.T. Copper regulates primary root elongation through PIN1-mediated auxin redistribution. *Plant Cell Phys.* 54(5): 766-778. 2013.
- [47] Kartusch, R. On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma* 220(3-4): 219-225. 2003.
- [48] 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.
- [49] 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.