

Mennyire láthatunk a levelekbe? Klorofill és fenolos vegyület tartalom vizsgálatok non invazív fluoreszencia- és feltáró analitikai eljárásokkal

XXXII. OTDK Biológiai Szekció

Készítette: Pávkovics Dóra Ildikó
biológia Bsc hallgató
Évfolyam:III.

Témavezető: Dr. Hideg Éva
PTE TTK Növénybiológiai Tanszék



Pécs

2015

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
I. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3-9.
I.1. A dolgozatban vizsgált levél metabolitok jellemzése	3.
I.1.1. Klorofillok és karotinoidok.....	3-5.
I.1.2. Flavonoidok és antocianinok.....	5-6.
I.2. A pigment tartalom non-invazív mérése.....	6-9.
I.2.1.A klorofil tartalom meghatározása.....	8.
I.2.2.A flavonoid tartalom meghatározása.....	8-9.
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	9-10.
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	10-13.
III.1. A felhasznált növényanyag ismertetése	10-11.
III.2. Levélkivonatok analízise.....	11.
III.2.1. Klorofil és karotin tartalom meghatározás.....	11.
III.2.2. Teljes fenol tartalom meghatározás.....	12.
III.2.3. UV-abszorbeáló pigmenttartalom.....	12.
III.2.4. Antocián tartalom meghatározás.....	13.
III.2.5. Az adatok értékelése.....	13.
IV. EREDMÉNYEK	13-21.
IV.1. Pigment tartalom változások nyomon követése szenescencia során (<i>G.biloba</i> kísérletek)	
.....	13-17.
IV.1.2. Pigment tartalom változások vizsgálata különböző <i>Vitis vinifera</i> fajok leveleiben	
.....	17-19.
IV.1.3. Klorofil tartalom mérése magas antocián tartalmú szövetekben (<i>Euphorbia pulcherrima</i> kísérletek)	
.....	19-21.
V. ÖSSZEFOGLALÁS.....	21-22.

I.BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I.1. A dolgozatban vizsgált levél metabolitok jellemzése

A levelekben található metabolitok jelentősen befolyásolják a növény egésze számára meghatározó biológiai funkciókat. Ezek a mennyiségi változások – más élettani adatokkal kiegészítve – fontos információt adhatnak a levelek fejlettségéről, stresszélettani állapotáról. Munkánk során a fotoszintézishez nélkülözhetetlen klorofillokkal és a növények stressz elleni védekezésében is fontos szerepet játszó fenolos vegyületekkel foglalkoztunk. Meghatároztuk analitikai eljárások segítségével a levelek teljes klorofill és teljes flavonoid tartalmát, illetve a non invazív módon meghatározó optikai eljárás alkalmazási lehetőségeit vizsgáltuk meg.

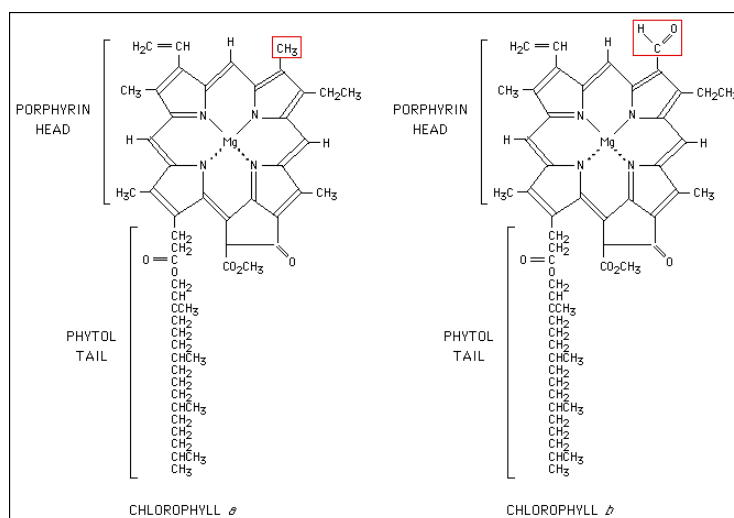
A növényélettani kísérletek során sokszor nagyszámú mintavételre van szükség, a hagyományos, levélkivonatok vizsgálatán alapuló analitikai módszerek túlságosan időigényesek. Az elmúlt évtizedben többféle nem beavatkozó jellegű (non invazív) eljárás került kifejlesztésre, melyek egyszerű és gyors kivitelezhetőségük mellett azt is lehetővé teszik, hogy ugyanarról a mintáról a kísérlet során több különböző időpontban is lehessen adatokat gyűjteni. Munkánk során, különböző modell növények mintáit felhasználva, azt vizsgáltuk, mennyire helyettesítheti a non-invazív optikai eljárás a hagyományos, levélkivonatokon végzett méréseket.

A dolgozatban bemutatott és tesztelt mérőműszer a gyártó adatai szerint, a non invazív mérésekkel a levelek klorofill és flavonoid tartalmára jellemző klorofill- és flavonoid-index értékeket ad meg. A levélkivonatokban a frisstömegre vonatkoztatott klorofill és fenolos vegyület tartalom mellett, a teljes karotinoid és antocián tartalmat is megmértük, így a bevezetőben ezeket a pigmenteket is áttekintem.

I.1.1. Klorofillok és karotinoidok

A klorofillok a magasabbrendű növények kloroplasztisaiban, azon belül is a tilakoid membránokhoz kötött pigment-protein komplexekben találhatóak, klorofill-a vagy klorofill-b formájában. Mindkét típusú klorofill molekula négy pirrolgyűrűt tartalmaz, amelyek egymással összekapcsolódva hozzák létre a porfirinvázat.

A gyűrű közepén egy Mg atom helyezkedik el, egyik karboxil csoportjához pedig egy hosszú szénhidrogénlánc, fitol kapcsolódik. A klorofill-a és -b között csak egyetlen különbség van, míg a klorofill-a-nál a II. pirrolgyűrűben a harmadik szénatomhoz egy metil csoport kapcsolódik, addig a klorofill-b-nél egy formil csoport (1.ábra).



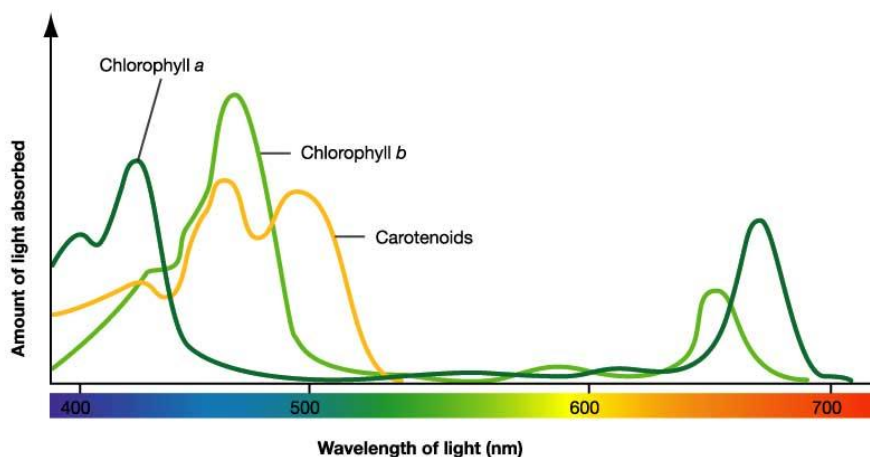
1. ábra: A klorofill-a és klorofill-b szerkezeti képlete
 Az ábra forrása: <http://mattressale.eu/tag/chlorophyll-b>

Ez a szerkezeti különbség eltérést okoz az abszorpciós tulajdonságokban (2. ábra), ezért a levélkivonatokban a teljes klorofill tartalmat két hullámhosszágon mérve határozzuk meg (III.2.1.).

A levelekben a fotoszintetikus működés során a klorofill molekulák fény hatására gerjesztett energia állapotba kerülnek és ez az energia alakul át kémiai energiává.

A levelek klorofill tartalmát jelentősen befolyásolják a fényviszonyok, és a levél fejlettségi állapota. A klorofill tartalom a szeszszcencia során szabályozottan csökkenhet, de stressz körülmények hatására még nem szeszszcens levelek is veszíthetnek a klorofill tartalmukból. Klorofill tartalmat csökkentő tényező lehet többek között a magnézium- és a vízhiány, vagy a nagy intenzitású napfény hatására bekövetkező a klorofill károsodás.

A levelekben előforduló egyik legfontosabb kísérőpigmentek a karotinoidok, amelyek minden fotoszintetizáló szervezetben megtalálhatóak. Szerkezetüket tekintve ezek 40 C-atomos poliizoprének, melyek kettős konjugált kötések tartalmazznak. Két fő csoportra oszthatók: karotinok (szénhidrogének) és a xantofilok (oxigént is tartalmazó karotinok). Többségük a sárga és kék színű tartományban abszorbeálnak (2. ábra). Energetikai kölcsönhatásba kerülhetnek a klorofilokkal, így a különböző karotinoidok részt vesznek a fényenergia klorofill felé történő továbbításában, de a fotoszintézis során nem feldolgozható gerjesztési energia elvezetésével a fotoszintetikus apparátus védelmében is.



2.ábra: A klorofill-a, klorofill-b és a karotinoidok abszorpciós tulajdonságainak szemléltetése.
Az ábra forrása: <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect10.htm>

I.1.2. Fenolos vegyületek: Flavonoidok és antocianinok

Ökológiai és növénykórtani szempontból nagy jelentőségűek a fenolos vegyületek, melyek bioszintézisét a 3. ábra mutatja be. A változatos biológiai funkciókban előforduló sokféle vegyület közül a dolgozatomban két csoportot emelek ki, a flavonoidokat és az antocianinokat. A flavonoidok nevű vegyületcsoport elnevezése Geissmantól ered, mely a latin "flavus"(sárga) szóból származik. A csoport tagjainak hasonló az alapváza, melyhez hidroxil(-OH) és metoxi(-CH₃O) csoportok kapcsolódnak. A növényekben szabadon vagy cukorhoz kötve, glikozidok formájában fordulnak elő. A cukormentes flavonoidok az úgy nevezett aglükonok, melyek glikozidáció során vízzeloldhatóvá és stabilabbá válnak.

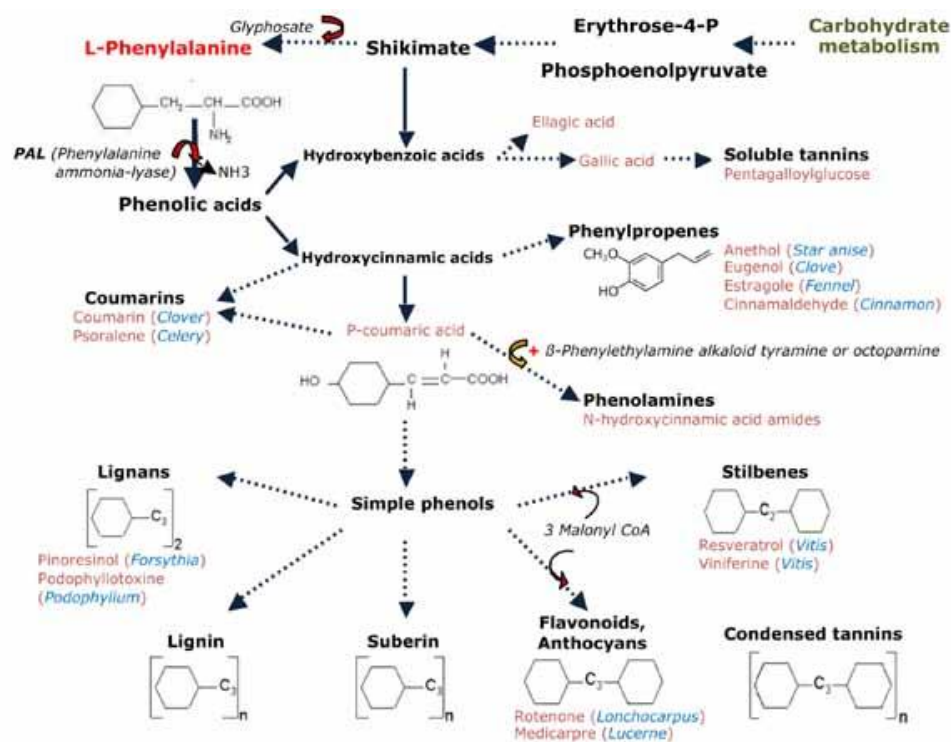


Figure 2. Simplified pathway of phenolic compound synthesis (adapted from Roland Douce, 2005) — Voie de synthèse simplifiée des composés phénoliques (d'après Roland Douce, 2005).

3.ábra A fenolos vegyületek bioszintézise.

Az ábra forrása: Ewané és mtsai. (2012)

Az antocianinok vagy antociánok a növényvilágban igen elterjedt vegyületek, a növény életében bekövetkező vörös és sárga színűvé való átalakulás, ennek a pigmentnek köszönhető. Az eddigiekkel eltérő módon az antocianinek feloldódnak a vakuólumokban, így az általuk előidézett szín érzékeny a fényre, hőmérsékletre és legfőképp a kémhatásra. Színüket a közeg kémhatásának megfelelően változtatják, így indikátor jellegűek. Az indikátortermészet a hidrogénion koncentráció változás következtében való elektronszerkezeti átrendeződésnek köszönhető, mert ekkor a fénnel szembeni viselkedés is megváltozik.

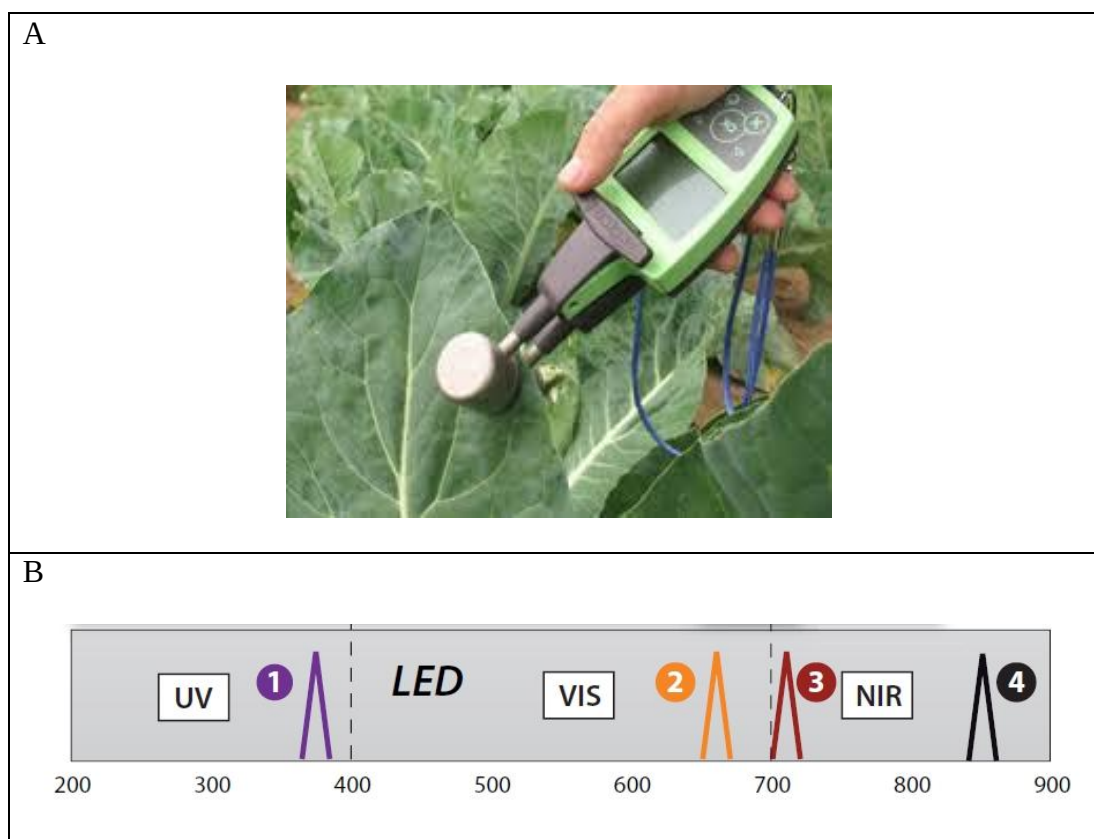
I.2. A pigment tartalom non-invazív mérése

Az előbbieken taglalt vegyületek mennyiségi tartalmát, növényi kivonatokból feltáró analízissel vizsgáljuk, léteznek azonban úgynevezett nem beavatkozó jellegű, vagyis non-invazív optikai eljárások.

Ezek az eszközök a leveleken áthatoló, illetve onnan a detektorba visszajutó fényt mérik, így határozva meg a levelek klorofill tartalmát (Bilger és mtsai 1997). Ezeknek a klorofill mérőknek az előnye a gyorsaság és a roncsolásmentes klorofill tartalom meghatározás (Marquard és Tipton, 1987; Pinkard és mtsai, 2006). Az egyik ilyen eljárás a két vörös és

ultraibolya gerjesztőfényt egyidejűleg alkalmazó, a klorofillok illetve a fenolos vegyületek fluoreszcenciáján alapuló mérés.

Az általunk alkalmazott optikai eljárás neve: Dualex, vagyis duális excitáció, azaz kettős gerjesztés (Gualas és mtsai, 2004). A mérés során a 4.A. ábrán szemléltetett módon a levéllemez a mérőfej két oldala közé illesztjük; úgy, hogy a mérő- illetve a fluoreszcencia gerjesztőfény felülről éri a mintát. Az átengedett mérőfény, illetve a gerjesztéssel kiváltott fluoreszcencia fény intenzitását a minta alatt elhelyezkedő detektorok mérik (Cеровic és mtsai, 2012).



4.ábra: A méréseink során alkalmazott Dualex műszer (A) és az alkalmazott mérési hullámhosszak bemutatása (B).

Az ábrák forrásai: <https://www.interempresas.net/Horticulture/Articles/118519-Estimate-content-nitrogen-in-leaves-cauliflower-methods.html>

Az ábra a készülék leírásban (<http://www.force-a.eu/an/dualex-plus.php>) található séma alapján került ábrázolásra

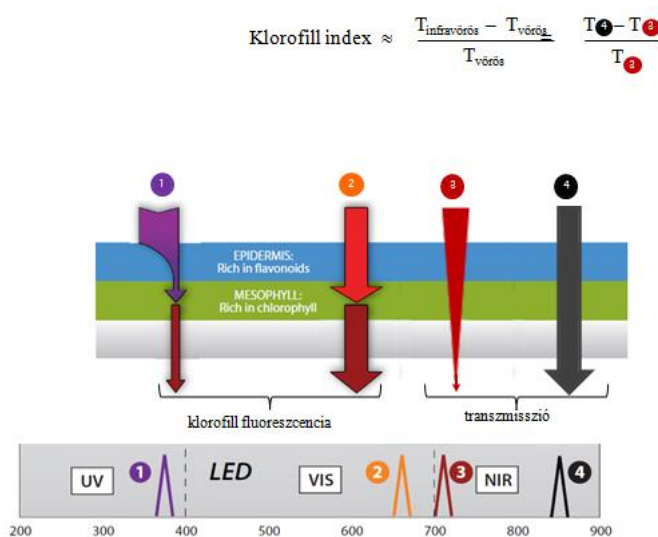
A készülék az alábbiakban ismertetendő eljárásokhoz négy különböző hullámhosszágú monokromatikus fényt használ az ultraibolya (UV), kétféle vörös és infravörös tartományban (4.B. ábra). Ezek közül a levélszövet, az infravörös kivételével, valamennyi hullámhosszon

rendelkezik abszorpcióval, de ezeket különböző vegyületcsoportok okozzák.

I.2.1. A klorofill tartalom meghatározása:

A levélben található klorofill molekulák abszorpciója alapján lehetséges a klorofill tartalom becslése. A klorofilok a legtöbb fényt a kék és a vörös hullámhosszon nyelik el, a zöld és sárga tartományban már kisebb az abszorpció, míg az infravörös hullámhosszon elhanyagolható (2. ábra).

A mérőkészülék a 650 nm-es vörös fényt használja, mert ennek abszorpcióját a levél karotin tartalma nem befolyásolja (Ványiné, 2008). A referenciaként használt infravörös 940 nm-es fény a levélszövetben sokkal kisebb mértékben nyelődik el. A mérés 5. ábrán szemléltetett elve szerint minél több vörös fény nyelődik el a növény levelében, vagyis minél nagyobb az infravörös fény transzmissziója a vöröséhez képest, annál magasabb a levél klorofill-tartalma (Ványiné, 2008; Bullock és mtsai, 1998).

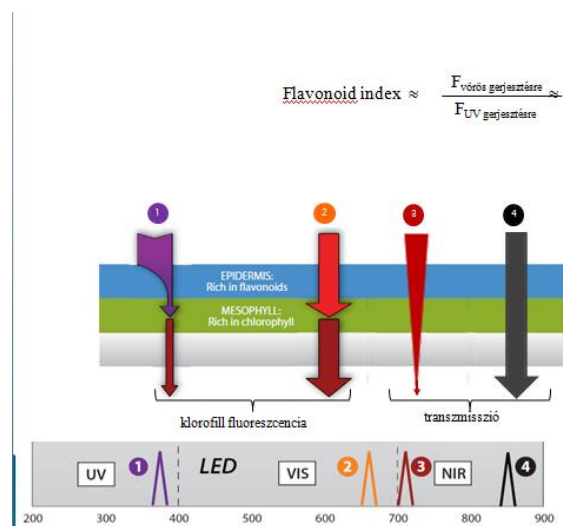


5.ábra: A Dualex műszerrel történő klorofill-tartalom meghatározás alapelve.
Az ábra a készülék leírásban (<http://www.force-a.eu/an/dualux-plus.php>) található séma alapján került átrajzolásra és kiegészítésre.

I.2.2. A flavonoid-tartalom meghatározás

A klorofill tartalom esetében használt transzmisszió mérés helyett a levél flavonoid tartalmának becslése fluoreszcencia méréssel történik, azonban a klorofill jelenléte ebben az esetben is kulcsfontosságú. Az eljárás alapja, hogy a klorofill molekulák mind a 650 nm-es

vörös, mind pedig a 375 nm-es UV fényt elnyelik és mindkét gerjesztés kb. 680-700 nm-es fluoreszcencia emissziót vált ki. Az UV fényt a levélben található fenolos vegyületek is elnyelik, ezzel csökkentik az UV-gerjesztett klorofill fluoreszcencia emissziót (Goualas és mtsai, 2004). Így a gyártó által „flavonoid index”-ként definiált mennyiség, vörös és UV fény által kiváltott fluoreszcencia intenzitások aránya annál nagyobb, minél több klorofilltól eltérő UV abszorbeáló vegyületet tartalmaz a levél (6. ábra). Fontos megjegyezni, hogy az eljárással minden 375 nm-es fényt abszorbeáló metabolit mérésre kerül. Bár ezen a hullámhosszon a flavonoidok abszorpciója jelentős mértékű, más fenolos vegyületek jelenléte is befolyásolja a mérést.



6.ábra: A Dualex műszerrel történő flavonoid-tartalom meghatározás alapelve.
Az ábra a készülék leírásban (<http://www.force-a.eu/an/duallex-plus.php>) található séma alapján került átrajzolásra és kiegészítésre.

A fentiekben vázolt „dual excitation” elv alapján történő mérés során várható, hogy annak eredményét a tényleges klorofill, illetve flavonoid tartalom mellett befolyásolhatják a levélszövet optikai tulajdonságai és a levélben található más, a mérésekben alkalmazott megvilágítást elnyelő pigmentek jelenléte is.

II.CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja: a Dualex mérőműszerrel mérhető értékek (klorofill- és flavonoid-index) összehasonlítása a hagyományos, levélkivonat készítéssel járó analitikai módszerek eredményeivel. Megvizsgáltuk:

- helyettesítheti-e a non-invazív optikai eljárás a laboratóriumi méréseket,
- kalibrálhatóak-e a Dualex mérések, vagyis átszámíthatóak-e a fenti index paraméterek, mennyiségi értékekre
- általános érvényűek-e a fenti vizsgálatok eredményei, mennyiben befolyásolja ezeket vizsgált a növény faja, kora, illetve más pigmentek jelenléte a levélben.

A fentiek fontosságát az adja, hogy megfelelő mennyiségi kapcsolat megállapítása esetén, a Dualex eljárás valóban megfelelhet stresszélettani kutatásokban elvárt nagyszámú gyors mérések elvégzésére.

III.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. A felhasznált növényanyag ismertetése

Mérési paramétereinket három növényi fajon vizsgáltuk: *Ginkgo biloba* (páfrányfenyő), *Euphorbia pulcherrima* (mikulásvirág) és *Vitis vinifera*(bortermű szőlő). A növényi anyag a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Intézetének fajtagyűjteményéből és Botanikus kertjéből származik.

A *Ginkgo biloba* növény esetében a levelek szeneszencia folyamatát követtük végig. A mérések szeptembertől-novemberig zajlottak, egyazon növényen. A páfrányfenyő levelek magas fenolos anyag tartalommal rendelkeznek, mint pl: flavonol-glikozidok, biflavonoidok közül: amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin (Lobstein és mtsai, 1991), ezáltal kitűnő kísérleti növény volt a flavonoid-index vizsgálatokhoz.

Az *Euphorbia pulcherrima* esetében a növény zöld levelét és színes murvalevelét vizsgáltuk, a mintáink ugyanazon növényről származtak. A mikulásvirág köztudottan magas antocián-tartalommal rendelkezik (Asen S.,1958), így e növény segítségével megnézhattuk, hogy ez az UV abszorpcióval is rendelkező kísérőpigment, mennyire befolyásolja a méréseinket.

A szőlőlevél vizsgálatokat különböző fajták összehasonlításával is kiegészítettük, ami a Növénybiológiai Tanszéken folyó kutatások szempontjából kiemelkedő jelentőségű. Tizenhárom különböző fajtát vizsgáltunk meg. A szőlő levélgyűjtések nyáron és szeptemberben zajlottak le, különösképpen a korai őszi időszakot helyeztük előtérbe, mivel ez az idő alkalmas volt arra, hogy egyes szőlőfajtáknál már a szeneszencia hatásait is

vizsgálhassuk. A vizsgált fajtákat úgy választottuk, hogy köztük többféle levélmorfológiával és genetikai háttérrel rendelkezők is előforduljanak. Szőlő fajták a három fő származási csoport szerint :

- *Vitis vinifera* L. convarietas orientalis (keleti fajták) *Afuz ali*, *Irsai Olivér*,
- *Vitis vinifera* L. convarietas pontica (balkáni fajták) *Hárslevelű*, *Kadarka*, *Piros furmint* , *Fehér furmint*, *Változó gohér* , *Piros gohér*, *Fehér gohér*
- *Vitis vinifera* L. convarietas occidentalis (nyugati fajták) *Merlot*, *Olasz rizling*, *Koshu sanjagu*, *V.candicans*.

III.2. Levélkivonatok analízise

A kivonatkészítés előtt a vizsgálandó leveleken, először a fő levélerek közötti területen a Dualex (gyártó Force-A, Orsay, Franciaország) segítségével megmértük a klorofill- és a flavonoid-indexet, ugyanazon a levélterületen mind az adaxiális és abaxiális oldalon. Ezek után dugófúró segítségével eltávolítottuk azt 8mm átmérőjű részt, ahol az optikai mérés történt és ebből a levélkorongból készített kivonaton végeztük a laboratóriumi méréseinket.

III.2.1. Klorofill és karotin tartalom meghatározás

A levélkorongokat először analitikai mérleg segítségével lemértük, majd 1 ml 99, 99%-os metanollal mozsárban homogén állapotúra dörzsöltük. Az így elkészített kivonatot laboratóriumi asztali centrifugával (Eppendorf AG 22331) szobahőmérsékleten 10 percen keresztül 1500-as fordulatszámon fugáltuk. A felülúszóból automata pipetta segítségével 200 µl optikailag tiszta oldatot használtunk fel fotométeres (UV-1800 SHIMADZU 240V IVDD) pigment tartalom meghatározásnál. Ezt az oldatot mérés előtt metanollal az ötszörösére hígítottuk.

A klorofill és karotin tartalmat Lichtenthaler és Buschmann (2001) módszerével határoztuk meg a levélkivonat 470, 653 és 666 nm-en mért abszorpciója (A470nm, A653nm, A666nm) alapján. Ezeket az adatokat a levélminták friss tömegére vonatkoztatva adtuk meg az alábbiak alapján:

teljes klorofill tartalom = Kl-a + Kl-b

Kl-a: (15,65 x A666nm) – (7,34 x A653nm)

Kl-b: (27,05 x A653nm) – (11,21 x A666nm)

Karotin: (1000 x A470nm – 2,86x Kl-a 1,29 x Kl-b) / 245

III.2.2. Teljes fenol tartalom meghatározás

A flavonoid-indexszel jellemzett mennyiség vizsgálatához a levélminták teljes fenolos vegyület tartalmát vizsgáltuk meg. Ennek több oka volt: egyrészt a flavonoidokon kívül jelen levő többféle más fenolos vegyület jelenlétével fennálló lehetséges kapcsolatot. Másrészt nem találtunk a flavonoidok csoport vegyületeit szelektíven, más fenolos vegyületek kizárásával mennyiségileg azonosító, spektrofotométeres eljárást. Az irodalomban flavonoid meghatározó módszerként használatos eljárásról korábban megállapítást nyert, hogy többféle nem flavonoid vegyületre is érzékeny (Csepregi és mtsai 2013). Megjegyezzük, hogy a kutatás folytatásaként elképzelhető az egyes flavonoidokat külön-külön azonosító, HPLC eljárás alkalmazása, ez azonban túlmutat a jelenlegi dolgozat céljain.

A fenoltartalmat Singleton és Rossi (1965) által leírt spektrofotometriás módon, Folin-Ciocalteu reagens segítségével határozzuk meg. Az eljárás alapelve, hogy a reagens a fenolok hidroxid-csoportjával kék színű komplexet képez. Az oldat abszorbanciája arányos a kivonat fenoltartalmával. Az összes fenoltartalmat galluszsavra vonatkoztatva határozzuk meg

A szükséges reagensek: metil-alkohol és desztillált víz 1:1 arányú keveréke; Folin-Ciocalteu reagens 1:10 arányú hígítása; 6%-os nátrium-karbonát (Na_2CO_3) oldat; 0,3 mM-os galluszsav oldat (metil-alkohol és desztillált víz elegyével hígítva). A mérés előtt a hígított galluszsavval kalibrációs görbét készítünk. A minta össztérfogata 1100 μl , amely 500 μl Folin-Ciocalteu reagensből, 50 μl MeOH-ból, 50 μl mintából, (5 perc után hozzáadott) 500 μl Na_2CO_3 oldatból áll. Az oldatokat ezután 90 percig sötétben inkubáltuk, majd $\lambda=760\text{ nm}$ -en mértük az abszorbanciát, spektrofotométer segítségével (UV-1800 SHIMADZU 240V IVDD). Mintánként három párhuzamos mérést végeztünk. A mért abszorbanciából a kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg az összes fenoltartalmat mg galluszsav/ml egységekben.

III.2.3. UV-abszorbeáló pigmenttartalom

A teljes UV-abszorbeáló pigmentek meghatározására a levélkivonatainkat 280-400 nm hullámhosszon lemértük spektrofotométer segítségével (UV-1800 SHIMADZU 240V IVDD), majd az Excell programban ábrázoltuk eredményeinket. Az abszorpciós görbe alatti területet integráltuk, majd a friss levéltömegre vonatkoztatva adtuk meg az értékeinket. (Mirecki és Teramura, 1984).

Ugyanígy jártunk el az UV-A és UV-B abszorbeáló pigment kiszámításánál is. Különbség a megmért hullámhossz tartományban van, míg UV-A meghatározásnál a 315-400 nm-es tartományt, addig UV-B abszorbeáló pigmentnél a 280-315 nm-es tartományt integráltuk. (Majer és mtsai, 2014)

III.2.4. Antocián tartalom meghatározás

Az antocián tartalom meghatározásához Giusti és Wrolstad (2001) módszerének módosított változatát használtuk. Ehhez a levélkivonatok abszorpciós spektrumát vettük fel először semleges, majd alacsony pH-n. Utóbbit 2 μ l 3, 7 % sósav hozzáadásával érték el. Az antociánokra jellemző, alacsony pH-n 530 nm körüli maximumal rendelkező abszorpciós sávot a görbe alatti területtel jellemeztük, amihez a semleges pH-n mért spektrumot használtuk referenciának.

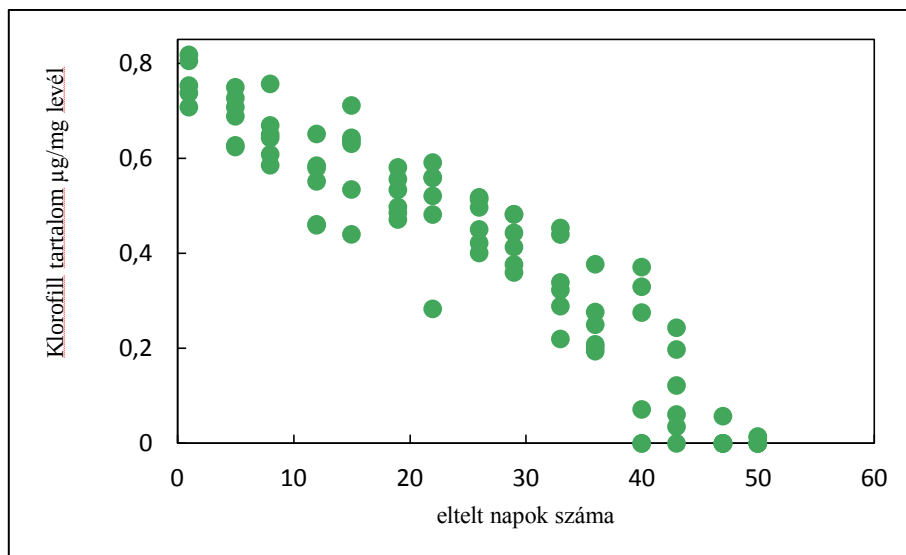
III.2.5. Az adatok értékelése

Az adatainkat Excell program segítségével ábráztuk és elemeztük. Két vizsgált paraméter korrelációját a Pearson-féle korrelációs együtthatóval (r) jellemeztük, az eredmény szignifikanciáját 5% szinten a korrelációs együttható statisztikai elemzésével ellenőriztük (t-próba, $n-2$ szabadsági fokkal, ahol n a mérések száma). A jó korrelációt mutató adatsorok esetében lineáris regressziós egyenest is illesztettünk, itt az illesztést a determinációs együtthatóval (R^2) jellemeztük.

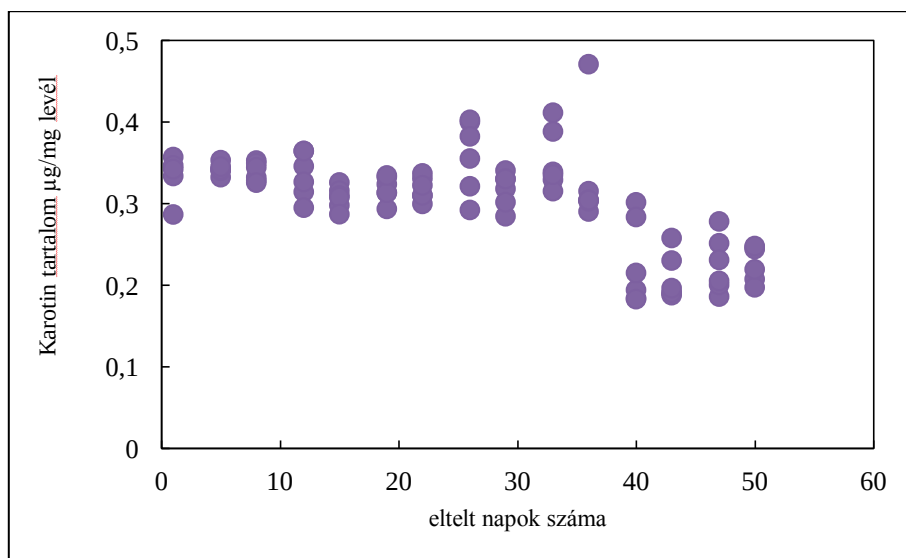
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

IV.1. Pigment tartalom változások nyomonkövetése szeneszencia során (*Gingko biloba* kísérletek)

A levélkivonatok vizsgálata azt mutatta, hogy a szeneszencia során a *Gingko* levelek klorofill tartalma az eltelt napok száma függvényében intenzív csökkenést mutatott (7. ábra), míg a karotinoid tartalma sokkal kisebb mértékben csökkent (8. ábra). Ez az eredmény összhangban van a szeneszencia ismert folyamataival (Dhindsa és mtsai, 1981).



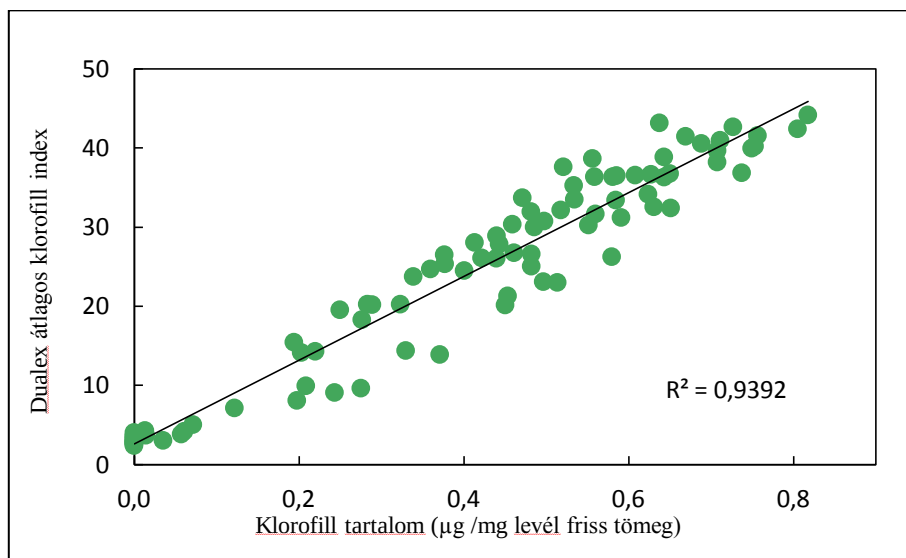
7.ábra *G. biloba* levélkivonat klorofill tartalom változása szeneszcencia során. A méréseket 2013.szeptember 30-án kezdtük, ez felel meg a nulladik napnak.



8.ábra *G. biloba* levélkivonatok teljes karotin tartalmának változása szeneszcencia során. A méréseket 2013.szeptember 30-án kezdtük, ez felel meg a nulladik napnak.

A fenti, levélkivonatokon végzett mérések eredményeit összehasonlítottuk a kivonatkészítés előtt mért Dualex eredményekkel. Utóbbiak esetében a színi és fonáki értékek átlagát tekintettük a teljes levélre jellemzőnek. A kivonat teljes klorofill tartalmát a levelek átlagos klorofill indexével összehasonlítva, azt tapasztaltuk, hogy analitikai módon meghatározott mennyiség igen szoros kapcsolatban áll az optikai módon megállapított mennyiséggel, a két

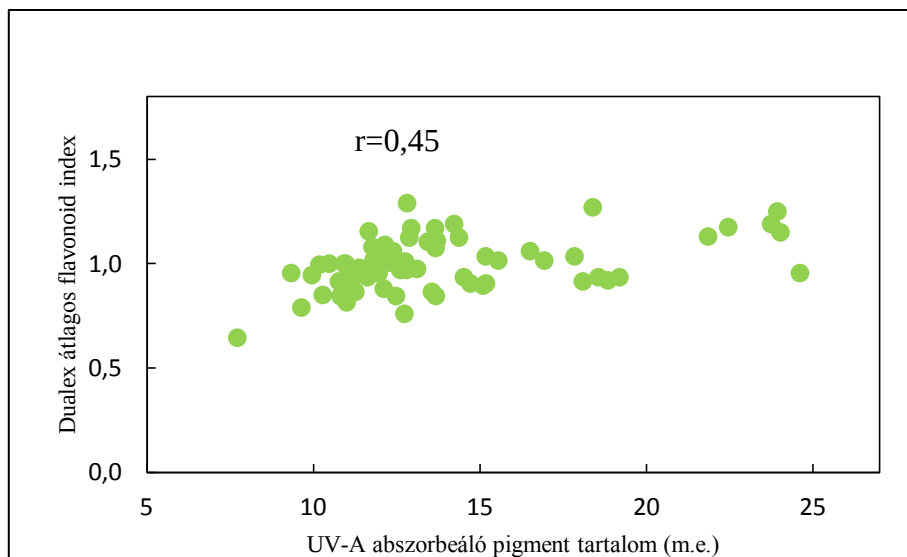
adatsor között lineáris kapcsolat volt, melyet magas ($R^2 = 0,9392$) determinációs együttható jellemzett (9. ábra). A kísérlet során azt is kijelenthetjük, hogy ezt a kapcsolatot nem befolyásolta a levelek karotinoid tartalma, a szeneszencia előtt álló magas klorofill és karotinoid tartalmú levelekben éppúgy fennállt az összefüggés, mint az előrehaladott öregedésű, magas karotinoid és alacsony klorofill tartalmú levelekben.



9.ábra *G.biloba* levélkivonat klorofill tartalmának és a leveleken mért Dualex klorofill-index értékek összefüggése

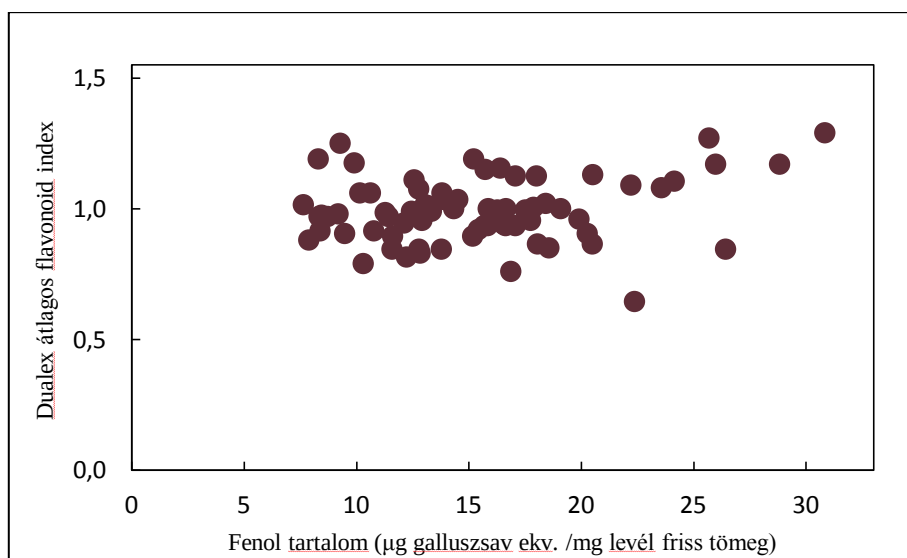
A Dualax flavonoid-index és a kivonatokban mérhető metabolit tartalom összehasonlításához kétféle paramétert vizsgáltunk. Egyrészt a műszer UV abszorpción alapuló működési elve (részletek I.2. fejezet) miatt a kivonat UV-A abszorpciós képességét(ugyanis a Dualax műszer az UV-A segítségével határozza meg a flavonoid tartalmat), másrészt a levélkivonatok teljes fenolos vegyület tartalmát, amit a spektrofotometriás flavonoid-szelektív módszer hiánya (I.2.) miatt választottunk.

A 10. ábrán az UV-A abszorbeáló képességet hasonlítottuk össze a flavonoid indexszel. Az ábra azt mutatja, hogy a két paraméter között található kapcsolat, de a korreláció gyenge.



10.ábra *G.biloba* levélkivonat UV-A abszorbeáló pigment tartalom és a leveleken mért Dualex flavonoid-index összefüggése

A 11. ábrán látható, hogy a teljes fenoltartalom és a Dualex által mért flavonoid index között gyenge a kapcsolat, nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció kimutatható. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a flavonoid-index meghatározásához használt Dualex meghatározás hullámhosszán (375 nm) a fenolos vegyületeken kívül más metabolitok is elnyelnek.

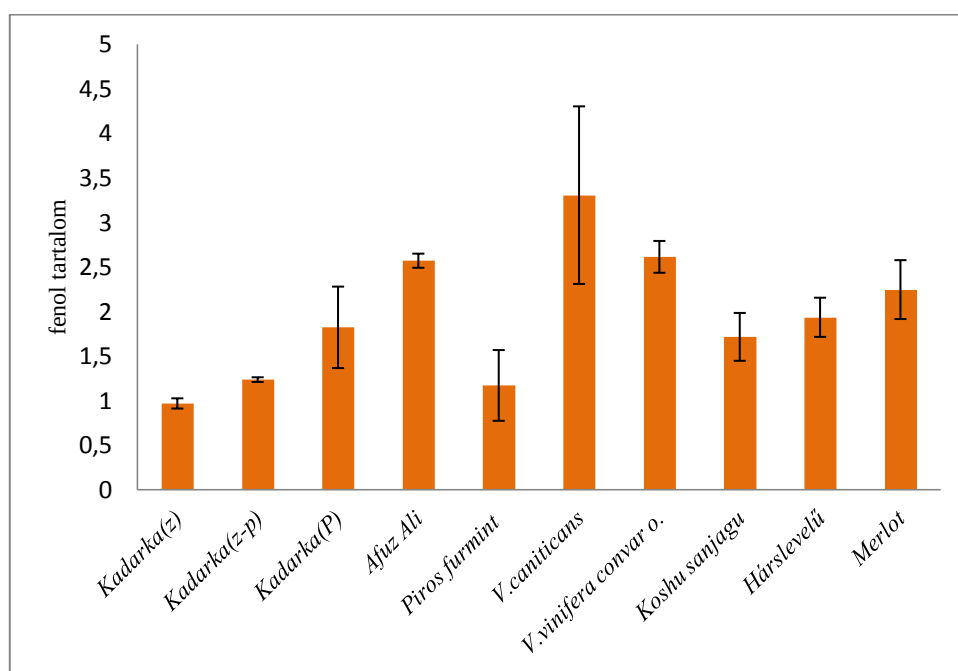


11.ábra *G.biloba* levelek flavonoid indexe a levélkivonatainak teljes fenol tartalmának függvényében

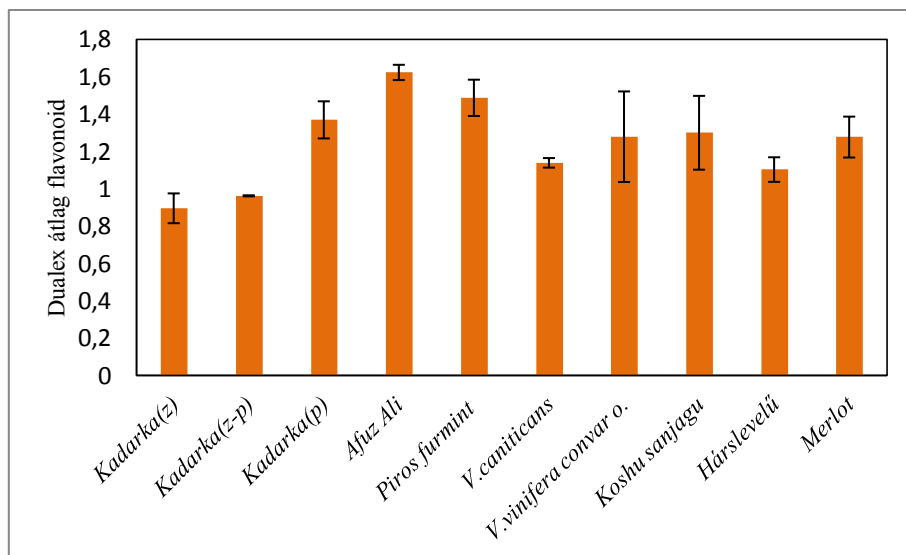
Elképzelhető azonban az is, hogy a vizsgált *G.biloba* minták flavonoid illetve fenolos vegyület tartalma nem változott elég nagymértékben ahhoz, hogy a különböző eljárások közti összefüggéseket megvizsgálhassuk, így a méréseket megismételtük egy újabb modell növény csoporton.

IV.1.2. Pigment tartalom változások vizsgálata különböző *Vitis vinifera* fajok leveleiben

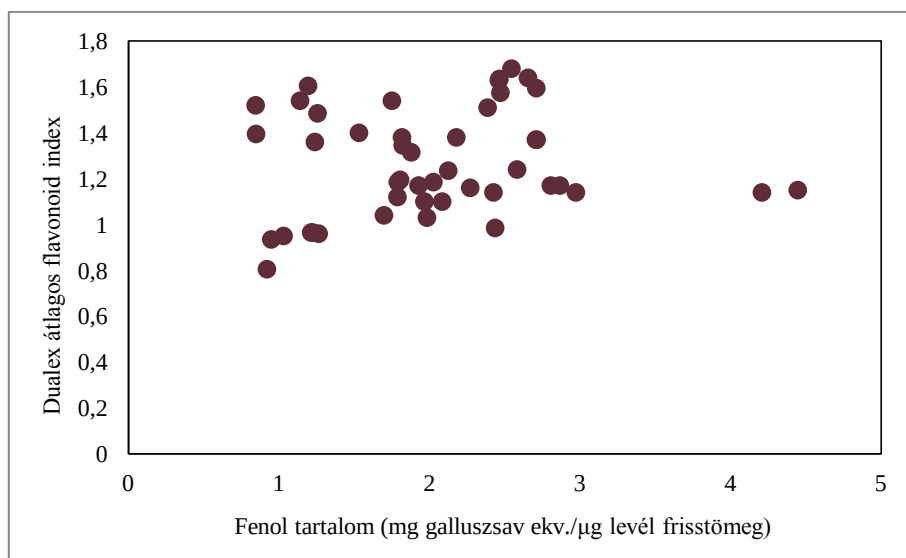
A különböző genetikai háttérű szőlőlevelek kivonatai változatos átlagos fenol tartalommal rendelkeztek (12. ábra), és a non-invazív módon mért flavonoid-index paramétereik is szélesebb tartományban változtak, mint az előzőekben ismerttetett kísérlet eredményei (13. ábra). A 14. ábrán azt vizsgáltuk, hogy a különböző szőlőfajták összfenol-tartalma mennyire áll kapcsolatban a flavonoid- indexszel. Hasonló eredményt kaptunk, mint pl. a *G.biloba* esetében (IV.1.1.), a két paraméter között nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció.



12. ábra Különböző szőlő fajták levélkivonataiban mért összfenol tartalom. Az oszlopok magassága az átlagos értéket, a hibasávok a standard deviációt mutatják. Minden oszlop három mérés adatainak felel meg.

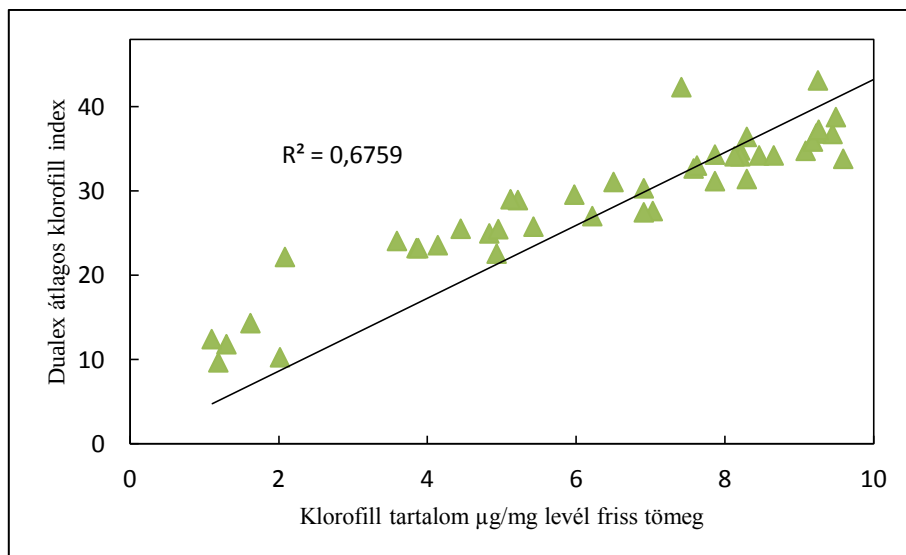


13.ábra Különböző szőlő fajták és flavonoid indexük. Az oszlopok magassága az átlagos értéket, a hibasávok a standard deviációt mutatják. Minden oszlop három mérés adatainak felel meg.



14.ábra Különböző szőlő fajták leveleinek flavonoid indexe a levélkivonatainak teljes fenol tartalmának függvényében

A szőlőlevelek kivonataiban mért különböző, széles tartományban változatos klorofill tartalma a *Gingko* kísérletekhez hasonlóan jó korrelációt ($r = 0.822$) mutatott az optikai eljárással meghatározott klorofill-indexszel. A *Gingko* kísérlethez hasonlóan itt is lehetséges volt egy lineáris korreláció megállapítása, bár a determinációs együttható ($R^2 = 0.6759$) kisebb volt.



15.ábra Szőlő levél kivonatok klorofill tartalmának és a leveleken mért Dualex klorofill-index értékek összefüggése. Az ábra a 13. és 14. ábrák adatai alapján készült, azonban nem fajtánként átlagolt adatokat tartalmaz, hanem minden pontja egy-egy levélmintának felel meg.

IV.1.3. Klorofill tartalom mérése magas antocián tartalmú szövetekben (*Euphorbia pulcherrima* kísérletek)

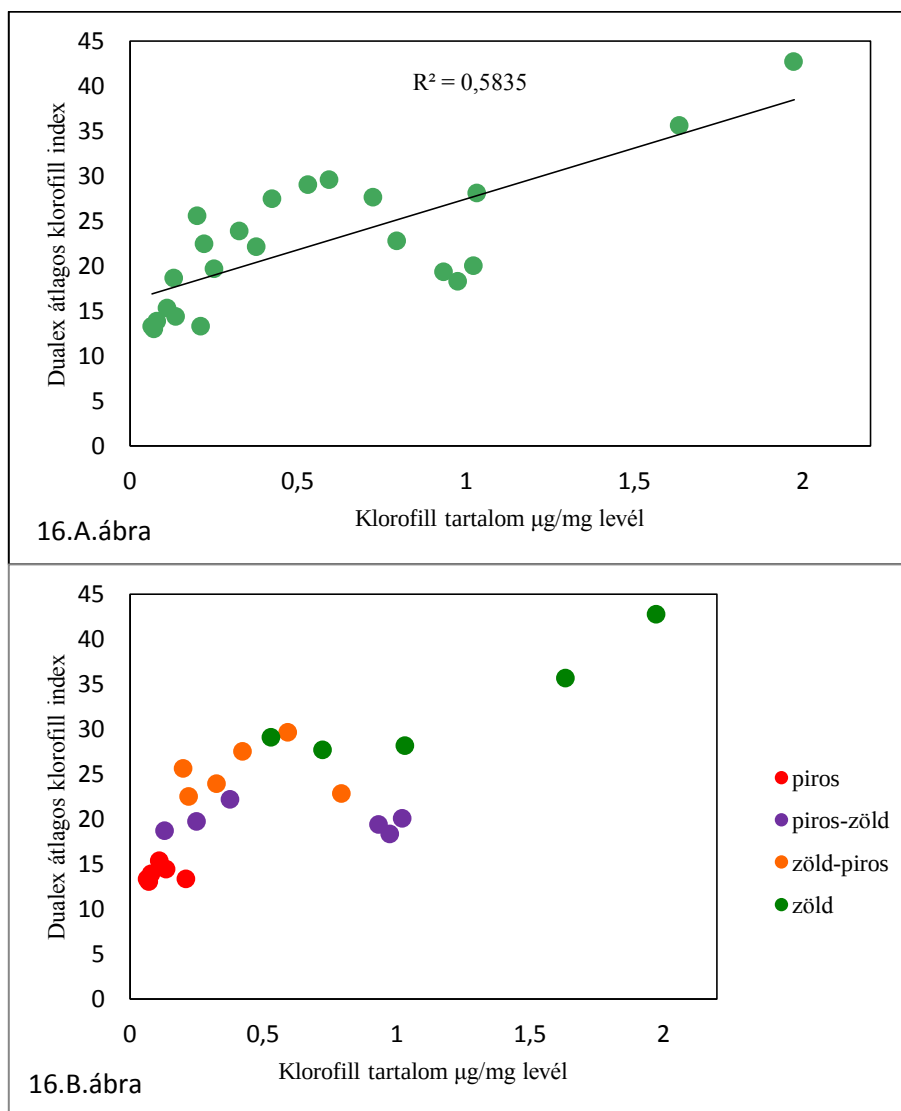
Harmadik modell növényként *E.pulcherrima* levelekkel és murvalevelekkel végeztünk kísérleteket. Ezek közül teljesen zöld, teljesen vörös, illetve a két szín közti átmenetet képviselő mintákat választottunk. A különböző mintacsoportokat, különböző antocián tartalom jellemezte.(1.táblázat)

<i>E.pulcherrima</i> minták színezettsége	Antocián tartalom
Piros-1	16,593
Piros-2	14,457
Piros-3	12,537
Piros-4	11,056
Piros-5	10,907
Piros-6	11,328
piros-zöld-1	8,184
piros-zöld-2	0,829
piros-zöld-3	0,968
piros-zöld-4	1,006
piros-zöld-5	4,497
piros-zöld-6	3,909
zöld-piros -1	1,941
zöld-piros -2	1,658
zöld-piros -3	1,613
zöld-piros -4	2,198

zöld-piros -5	1,548
zöld-piros -6	1,421
zöld-2	0
zöld-3	0
zöld-4	0
zöld-5	0
zöld-6	0

1.táblázat *E.pulcherrima* minták antocián tartalma

A 16. ábrán bemutatottak szerint az antocián tartalom nem volt befolyással a Dualex klorofill meghatározás sikerére: a kivonatok klorofill tartalma és a minták klorofill-indexe között jó korreláció volt ($r = 0.763$). A két adatsort itt is kalibráló egyenessel összekapcsolható lineáris kapcsolat jellemezte, bár a más fajokkal végzett kísérleteben tapasztaltaknál kisebb determinációs állandóval ($R^2 = 0.5835$)



16.ábra: *E.pulcherrima* kivonatok klorofill tartalmának és a mintákon kivonatkészítés előtt mért Dualex klorofill-index értékek összefüggése. (A) a különböző antocián tartalommal jellemzett mintákat elkülönítve (B) az összes adatot együtt ábrázolva.

Az eredményekből két következtetést vonhatunk le: Egyrészt az antocián jelenléte, a karotinoidokhoz hasonlóan, nincs jelentős befolyással az optikai úton történő klorofill meghatározás sikerére. Másrészt, a háromféle modellkísérlet klorofill tartalom – klorofill-index összefüggéseit megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy a különböző növényfajok vizsgálatai különböző lineáris összefüggéseket adtak, tehát a klorofill-index átszámítását jelentősen befolyásolják a vizsgált levelek optikai tulajdonságai, így minden tanulmányozni kívánt faj esetében meg kell határozni a kalibrációs összefüggést.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Az eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy a Dualex, mint non-invazív optikai mérőműszer jó kiegészítést adhat kutatásaink során, de nem helyettesítheti teljes mértékben a laboratóriumi eljárásokat. Ezt bizonyítja, hogy, míg a klorofill tartalom esetében egy lineáris korrelációt tapasztaltunk, addig a fenolos vegyületeknél nem volt ilyen szoros a kapcsolat. Megállapítottuk, hogy:

- a klorofill-index meghatározása helyettesítheti a levélkivonatból történő klorofill meghatározást. Célszerű az adaxiális és az abaxiális oldalon mért klorofill-index értékek átlagát használni.
- a Dualex mérés kalibrálható, a klorofill-index adatok átszámíthatóak frisstömegre vonatkoztatott klorofill tartalomra.
- a mérést nem befolyásolja jelentősen más pigmentek (karotinoidok vagy antociánok) jelenléte
- ugyanazon a fajon belül ezt a kalibráció különböző fajtákra is érvényes, az eredményt pedig nem befolyásolja a levelek kora (*Ginkgo* szeneszencia kísérleteink).
- azonban különböző növényfajok esetében új kalibrációs összefüggést kell megállapítani. Ennek oka feltehetően a különböző levelek különböző optikai tulajdonságaiban (pl. szöveteken belüli vagy szövethatárok közti fényvisszaverődés) keresendő.

Vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy a Dualex műszer megfelelő kalibrálás után alkalmas stresszélettani kutatásokban elvárt nagyszámú gyors mérések elvégzésére és a klorofill-index jól helyettesíti a levélkivonatból történő klorofill mérést. A flavonoid-index és a tényleges metabolit tartalom összefüggésének megállapításához további vizsgálatok szükség