

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

Biológia TDK 2015

Tudományos diákköri dolgozat

**A nitro-oxidatív stressz vizsgálata különböző cink érzékenyséű
Brassica fajok gyökérzetében**

Szerző:

Molnár Árpád

Biológus Msc II. évfolyam

Témavezető: Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna

Belső konzulens: Feigl Gábor

2015

Tartalomjegyzék

<u>Bevezetés</u>	2
<u>Célkitűzések</u>	3
<u>Irodalmi áttekintés</u>	4
A cink, mint esszenciális mikroelem.....	4
A cink szerepe a növényi sejtkben.....	4
A cink homeosztázis zavarai és következményei	4
A reaktív oxigénformák (ROF) a növényekben	6
A reaktív oxigénformák általános jellemzői.....	6
Az oxidatív stressz hatásai.....	7
Antioxidáns védelmi mechanizmusok	8
A reaktív nitrogénformák a növényekben	10
A reaktív nitrogénformák tulajdonságai.....	10
A nitrozatív stressz.....	11
A nitro-oxidatív stressz.....	12
A nehézfém tolerancia szövet és sejt szintű mechanizmusai	13
Vizsgált növényfajok.....	14
<u>Anyagok és módszerek:</u>	15
Növényi anyag és nevelési körülmények:	15
A cink felhalmozódás meghatározása szerv, szövet és sejt szinten:.....	15
Morfológiai mérések:.....	16
Az ROF szintek mikroszkópos detektálása és az antioxidáns enzimek aktivitásának spektrofotometriás meghatározása.....	16
A RNF szintek mikroszkópos detektálása	17
A nitro-oxidatívstressz markereinek vizsgálata	17
Az életképesség és a kallózberakódás fluoreszcens mikroszkópos meghatározása	18
A festések mikroszkópos háttere	18
Statisztikai módszerek.....	19
<u>Eredmények</u>	20
A <i>Brassica</i> növények nagy mennyiségű cinket akumulálnak.....	20
A cink többlete gátolja a <i>Brassica</i> fajok hajtás- és gyökérnövekedését.....	22
A cink többlete megváltoztatja a reaktív oxigénformák metabolizmusát a <i>Brassica</i> gyökerekben	25
A cink többlete a reaktív nitrogénformák homeosztázisának felborulását okozza a <i>Brassica</i> gyökerekben	27
A cink-indukált nitro-oxidatív stressz befolyásolja a makromolekulák féléletidejét.....	28
A cink-kezelt <i>Brassica</i> növények túlélési stratégiája és a merisztéma sejtek életképessége	30
Eredmények értékelése.....	31
<u>Köszönetnyilvánítás</u>	35
<u>Irodalomjegyzék</u>	36
<u>Tételes szakmai hozzájárulás</u>	43

I. Bevezetés

Bár a cink egy esszenciális mikroelem, a többlete mégis káros hatású minden eukarióta szervezetre, így a növényekre is. A cink talajokban való felhalmozódása mezőgazdasági károkat és a növényi eredetű élelmiszerek minőségében bekövetkező romlást okoz. Ezért munkám során két gazdasági jelentőségű haszonnövényben, az indiai mustárban (*Brassica juncea*) és az olajrepcében (*Brassica napus*) tanulmányoztam a cinkterhelés következtében fellépő másodlagos, nitro-oxidatív stressz folyamatait és ezek összefüggését a fajok cink érzékenységével.

A gyökérnövekedés és szerkezet módosulásai mellett, analitikai és mikroszkópos módszerekkel tanulmányoztam a növények cink akkumulációját és a felvett cink szövet- és sejtszintű lokalizációját a *Brassica* gyökerekben. A reaktív oxigénformák (ROF: szuperoxid anion, hidrogén-peroxid) és nitrogénformák (RNF: nitrogén-monoxid, peroxinitrit) szintjeiben bekövetkező cink-indukált változásokat *in situ* detektáltam a gyökércsúcsokban, és a szuperoxid-dizmutáz és az aszkorbát-peroxidáz enzimek aktivitását a teljes gyökérzetben határoztam meg. Továbbá a *Brassica* fajok gyökerében vizsgáltam a cinkterhelés hatását a nitro-oxidatív stressz két jól jellemzett markerének, a lipid peroxidációnak (mikroszkóposan) és a fehérje tirozin nitrációnak (Western blot analízissel) a bekövetkezésére. A cink sejtfalösszetételt módosító hatását, a kallóz inkrusztációt fluoreszcens jelöléssel mutattam ki, csakúgy, mint a *Brassica* fajok gyökércsúcsi sejtjeinek életképességében bekövetkező cink-indukált változásokat.

Mindkét növényfaj nagy mennyiségű cinket akkumulált, és ennek legnagyobb része a gyökérsejtek apoplasztjában kötődött meg. A *B. juncea* főgyökér-megnyúlását és a merisztéma sejtek életképességét a cinkterhelés nem csökkentette, ROF képződés és lipid peroxidáció nem volt detektálható a gyökércsúcsokban, a fehérje tirozin nitráció azonban a stressz hatására fokozódott. Ezekkel ellentétben a cink-kezelt *B. napus* gyökérzete gátolt növekedést, életképesség veszteséget, ROF akkumulációt, lipid peroxidációt és tirozin nitrációt mutatott.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a cink többlete másodlagos, nitro-oxidatív stresszt indukál. Az indiai mustár relatív cink tűrése, az olajrepcéhez képest a kisebb mértékű oxidatív károsodásainak köszönhető. Vagyis a *Brassica* növények cink érzékenységét a nitrozatív folyamatok kevésbé, míg az oxidatív folyamatok inkább meghatározzák.

II. Célkitűzések

A talajok nehézfém (cink) terhelése napjainkban jelentős környezeti probléma, mely termésvesztést, így mezőgazdasági károkat is okozhat. Ezért fontos a haszonnövényeink különböző nehézfémek, így cink többletére adott válaszainak a jobb megismerése. Munkám során célom volt az indiai mustár és az olajrepcse cink érzékenységének a tanulmányozása, és a másodlagos nitro-oxidatív stressz folyamatok és a cink tűrés közötti összefüggés feltárása.

A kísérleteim során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- Milyen mértékű a cink akkumuláció és transzlokáció a *Brassica* fajok gyökér- és hajtásrendszerében?
- A cink akkumulációja mutat-e szövetspecifitást a gyökércsúcsokban?
- Megállapítható-e a cink lokalizációja sejtszinten?
- Milyen változásokat okoz a cink többlete a gyökérzet szerkezetében?
- Van-e különbség a fajok cink érzékenységében?
- Hogyan befolyásolja a cink többlete a ROF és RNF metabolizmust?
- Okoz-e a cink többlete oxidatív és/vagy nitroztatív károsodásokat a *Brassica* fajok gyökérzetében?

III. Irodalmi áttekintés

III. 1) A cink, mint esszenciális mikroelem

III. 1) a) A cink szerepe a növényi sejtben

A cink egy esszenciális nyomelem minden élő szervezet számára, bár ismerünk olyan tengeri kovamoszatokat, melyek alacsony cinktartalmú környezetben képesek cink helyett kadmium atomokat hasznosítani enzimeik kofaktoraként. (Lane és Morel, 2000). A szárazföldön a talaj nyomelem tartalma megfelelő a növényi élet számára, így ilyen kivételeket nem találunk. A cinktermészetes közetekben szabadon fordul elő, de felvételét a talajban befolyásolhatja a kötöttsége különböző talajkolloidokhoz.

Az eukarióta sejtek által mikroelemként hasznosított nehézfémek között a cink kitüntetett helyen áll, hisz azon kívül, hogy kofaktorként enzimekbe épül be, képes befolyásolni a génexpressziót és a metabolikus folyamatokat is (Cakmak és Marshner, 1992). Mi sem bizonyítja jobban fontosságát, mint az a tény, hogy az eukarióta proteom megközelítőleg kilenc százaléka cink tartalmú (Adreini és Bertini, 2009), és a növény egy gramm száraztömegében 8-100 µg cinket találunk (Mishra és Mani, 1991). Képes befolyásolni a sejtek osztódását, ami az auxin szintézisben való részvételével együtt világossá teszi fontosságát a növekedés szempontjából. A sejt energiatermelő folyamatai közül a fotoszintézis szabályozásában is részt vesz (Shier, 1994). Hatása van a fehérjeszintézisre, ahol a riboszómák integritásáért felelős, valamint a nukleinsavak képződésére is. Befolyásolhatja más elemek koncentrációját a szövetekben, például a nitrogén felhasználását vegetatív részekben, vagy a nitrogén és foszfor bejutását a magba. Sok metalloproteinben és –enzimben is megtaláljuk, melyek aktív centrumában az enzimműködést szabályozza, vagy a fehérjék szerkezetének fenntartásában játszik szerepet (Hewitt, 1983). Talán a legfontosabb feladatát a sejt életében a transzkripció iniciálásában és az RNS írásában tölti be. A legtöbb nehézfém a különböző redox állapotai miatt veszélyes lehet az érzékeny nukleinsavakra nézve, de mivel a cink csak oxidált formájában fordul elő az élő szervezetekben, így alkalmazása cink ujj domén transzkripciós faktorokban, valamint az RNS polimeráz kofaktoraként biztonságosabb (Maret, 2009).

III. 1) b) A cink homeosztázis zavarai, és következményei

A fenti példákon keresztül láthattuk, hogy a cink mikroelemnyi mennyiségben igen fontos a növények számára, bár többlete toxikus az élőlények számára, ezért a felvétele

finoman szabályozott. A felvételt több tényező is befolyásolja: a talaj kation kicserélő kapacitása és szerves anyag tartalma, a kémhatása, az arbuszkuláris mikorrhiza jelenléte, valamint maga a növény is (Bjerre és Schierup, 1985). A fémionok felvételéhez a pH savas tartományban optimális, mivel akkor oldhatóbbak lesznek, de a cink lúgos pH tartományban is nagyobb mennyiségben felvehető a talajból, mert ezen a pH értéken a nagyméretű, fémiontartalmú szervesanyag komplexek szétesnek. A felvétel növényi szabályozása ennél komplexebb, hiszen jelentős számú fehérje képes a cink felvételre, és ezek aktivitása elősegíthető a gyökér által kibocsátott kelátor molekulákkal. A legfontosabb felvételben szerepet játszó proteinek a ZIP fehérje család tagjai, melyekből lúdfüben tizenöt ismert (Colangelo és Guerinot, 2006). Jelentősek még a nehézfém ATP-áz fehérjék (HMA), amelyek a sejtekből képesek kipumpálni a fémionokat, de fontosak a szállítónyalábok feltöltésében is.

A világ termőterületeinek nagy részét cinkhiánynak vélik (Alloway, 2009), ami nemcsak a termés mennyiségére, de a minőségére is kihatással van, és ebből kifolyólag a világ lakosságának 31%-át cinkhiány veszélyezteti (WHO, 2005). Bármely nyomelem hiánya jelentős tünetekkel jár, amit jelen esetben is megfigyelhetünk: csökkent biomassza, a termékenység csökkenése, klorózis, megnövekedett oldalgyökér képzés és a levelek korai szeneszenciája (Hussain és mtsai., 2004). Mivel a vas és a cink ugyanazt a felvételi rendszert használja, a megnövelt cinkfelvétel általában vas hiánnyal jár, ami másodlagos stresszként jelentkezik az oxidatív stressz mellett.

A nehézfém ionok, mint a cink is, nemcsak hiánytünetek formájában módosíthatják a növényi fiziológiát, de többletfelvétel hatására jelentkező toxicitásuk is igen jelentős. A többlet cink elsődlegesen a talajból származik, amelyek nehézfém szennyezése különböző helyekről származhat. A természetes cinkforrások (pl. vulkáni tevékenység, szél által szállított, nehézfém tartalmú részecskék, anyaközetek eróziója stb.) bár nem tűnnek veszélyesnek, ezek révén mégis évente 45 520 000 kg cink kerül a környezetbe (Pacyna, 1986). Az ipari okok talán még nagyobb mértékűek, és a teljes fémipar, a közlekedés, és az energiatermelés is általában nehézfém szennyezéssel jár (Verkleji, 1993). A mezőgazdasági tevékenység során nagy mennyiségben használt műtrágyák és nehézfém tartalmú permetszerek bár hosszabb távon, de képesek toxikus cink tartalmakat előidézni a környezetben. Fontos megemlíteni még, hogy a magas tápanyagtartalma miatt a termőterületekre kijuttatott szennyvíziszap gazdag lehet nehézfémekben. A háztartási és atmoszférikus szennyezések már elenyészőek a fenti forrásokhoz képest, de valós problémát képviselnek. Az Európai Unió 2002-ben 300 µg/g-ban állapította meg a talaj cink tartalmának

határértékét, amit hazánkban kevés helyen lépnek csak át. A fokozódó szennyezés miatt azonban ez a közeljövőben változhat (Nagajyoti és mtsai., 2010).

A talajok nagy cink koncentrációjának következtében a növényekben fellépő általános toxicitási tünetek a következők: csökkent biomassza termelés, klorózis és nekrózis a leveleken, csökkent fotoszintetikus aktivitás, genotoxicitás, más mikroelemek homeosztázisának vagy transzportjának felborítása. Sejtszinten az egyik legkárosabb hatása ennek a nehézfémnek a lipidek oxidációja és az emiatt bekövetkező membrán destabilizáció. Ez a plazmalemmán kívül kihatással van a mitokondrium összetett membránstruktúráira is, amelyek károsodása az energiatermelő folyamatok megzavarását, így energiahányt okoz a sejtben. A kloroplasztisz tilakoidmembrán-rendszere is károsodhat, de a szén-dioxid - oxigén arány megváltoztatásával a cink a fotoszintetikus aktivitást közvetlenül is csökkentheti. Ezek mellett az egész sejtre jellemző a különböző enzimek inaktiválódása, a tiol-csoportok nehézfém kötése által. Talán a cink hatására a nukleuszban lejátszódó genotoxikus folyamatok a legkárosabbak a sejtre nézve, mivel a DNS javítása igen összetett folyamat. Létrejöhetnek kromoszóma aberrációk, kromatin kondenzáció, és a membrán destabilizációja megzavarja a normális kromoszómaműködést. A nyomelemek közül a vas, réz, mangán, foszfor, kalcium, kálium és magnézium háztartás is változik, komoly hiánytüneteket idézve elő (Rout és Das, 2003). A másodlagos hatások közül igen fontos továbbá a cink többlet által kiváltott oxidatív stressz.

III. 2) A reaktív oxigénformák (ROF) a növényekben

III. 2) a) A reaktív oxigénformák általános jellemzői

Az oxigén 2,8 milliárd évvel ezelőtti megjelenése a légkörben választás elé kényszerítette az élő szervezeteket. Az egyik lehetőség az anaerob életvitel, ami - bár kevés energiával jár - kiküszöböli a reaktív oxigénformák keletkezésének lehetőségét. A másik lehetőség az aerob, sok energiát termelő életforma, ez esetben azonban számolni kell a mérgező reaktív oxigénformák keletkezésével.

A molekuláris oxigén természetes körülmények között nem reaktív molekula, mivel csak olyan elektront lenne képes felvenni, amely antiparallel a két páratlan parallel elektronjával. Természetes körülmények között tehát az oxigén egy relatív biztonságos molekulaállapotban fordul elő, gerjesztés vagy elektronfelvétel hatására azonban reaktivitása fokozódik és az 1. táblázatban látható reaktív formákat hozhatja létre. A reaktív oxigénformák keletkezése természetes folyamat a sejtben. Általában elektrontranszport láncok hibái termelik őket, esetleg enzimek, sőt a régi elmélettel szemben, miszerint, minden ROF káros, ma már

tudjuk, hogy esszenciális termékek a sejt számára. A reaktív oxigénformák szignalizációs útvonalakat aktiválnak, és a sejtekben termelt hidrogén-peroxid (H_2O_2) és szuperoxid gyökanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a jelátviteli molekulaként viselkedik. Az oxidatív robbanás a növény-patogén kapcsolat során is szerepet játszik, hisz segít elindítani a hiperszenzitív reakciót. Ez a reakció, bár néhány sejt elpusztításával jár, a legtöbb patogént is elpusztítja, ami a fehérvérsejtekkel nem rendelkező növények számára igen fontos. Szerepet játszanak még továbbá a sejtfalak szintézisében és vastagításában is. Mivel a ROF-k jelentősége igen nagy, a növények kialakítottak egy precízen szabályozható enzimrendszert, amely képes reaktív oxigénformák kontrollált termelésére, és így biztonságosan kezelhetőek. A molekulák csak akkor tekinthetők károsnak, amikor felborul a természetes antioxidáns-ROF egyensúly (Scandalios, 2005).

Elnevezés	Képlet	Keletkezés	Főbb funkció
Molekuláris oxigén	O_2	Fotoszintézis	Légzés elektronakceptora
Szinglet oxigén	$^1\text{O}_2$	Gerjesztett triplet klorofill energiaátadása	Fotoinhibíció
Szuperoxid gyökanion	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Elektron transzportláncok, redukált koenzimek oxidációja, enzimek	Jelátvitel; makromolekula károsítás
Perhidroxil gyök	$\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$ protonálódása, O_3 és $\text{OH}^{\cdot}$ reakciója	Makromolekula károsítás
Hidrogén-peroxid	H_2O_2	$\text{O}_2^{\cdot-}$ spontán protonálódása, enzimek	Jelátvitel, sejtfal felépítés; makromolekula károsítás
Hidroxil gyök	$\text{OH}^{\cdot}$	Haber-Weiss és Fenton reakció	Patogén védelem, sejtfal szintézis, makromolekula károsítás
Ózon	O_3	Elektromos kisülés	ROF képzés

1. táblázat A reaktív oxigénformák főbb típusai (Scandalios alapján, 2005)

III. 2) b) Az oxidatív stressz hatásai

A természetes antioxidáns-ROF egyensúly az élő szervezetekben általában valamilyen stressz hatására borul fel. Bizonyos esetekben lecsökken az elérhető antioxidánsok mennyisége, de a reaktív oxigénformák mennyisége nem változik, máskor az antioxidáns rendszer nem képes lépést tartani a megnövekedett ROF mennyiségekkel, amit általában valamilyen pro-oxidáns, például nehézfém alakít ki. Mindkét esetben a sejtnak szembe kell néznie egy általános makromolekula károsító oxidatív stresszel.

Az oxidatív stressz egyrészt a lipid membránok integritását veszélyezteti a lipid peroxidáció folyamatán keresztül, ami egy autokatalitikus folyamat. Iniciációját általában szabadgyökök végzik, elindulása után a zsírsav oldalláncok folyamatos károsítása jellemző rá. A membránkárosodás veszélyezteti az ionháztartást, a sejtszervecskékben az energiatermelést, és nagyobb károsodások nekrozist okoznak.

A proteinek oxidatív károsodásainak több lehetősége van: az aminosav oldalláncok megváltoztatása, peptidkötés törése, intra- és intermolekuláris keresztkötések kialakulása, megváltoztatott elektromos töltés, vas-kén központok oxidációja, kofaktorok redoxállapotának megváltoztatása. Mindezek a folyamatok általában a protein inaktiválódásához és proteolízishez vezetnek. Bár a sejt ezt *de novo* enzimszintézissel egy bizonyos szintig ellensúlyozhatja, a küszöbérték felett azonban a komoly enzimkiesések letálisak lehetnek.

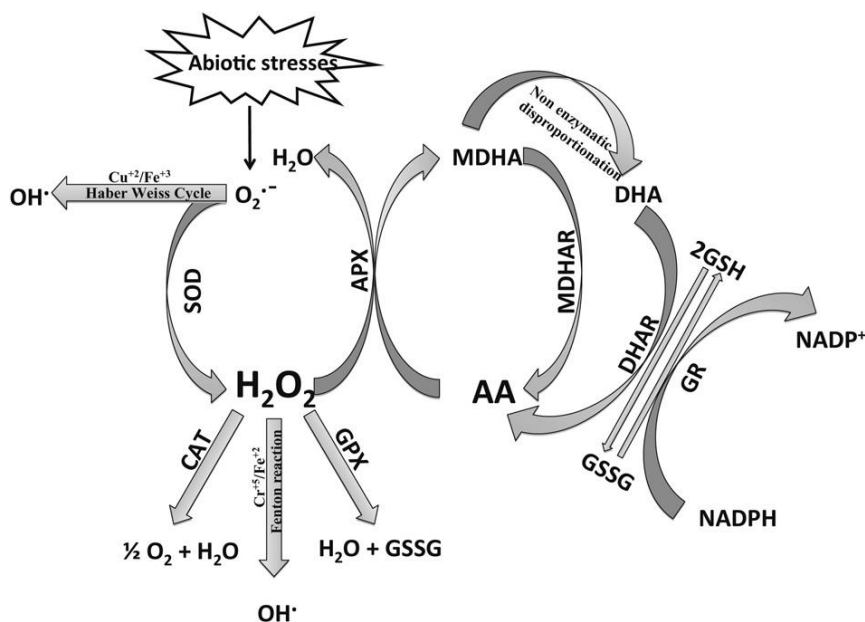
A nukleinsavak a sejt információhordozói, és bár a magmembránnal védve vannak, reaktív molekulák képesek bejutni és károsodásokat okozni. Történhet nukleinsav módosítás, báziscsere, DNS és fehérjemolekulák közötti keresztkötések kialakulása, DNS kettős szál vagy egyes szál törése, kettős száltörés esetén delécio, transzlokáció és más kromoszóma aberrációk. A fehérjékhez vagy a lipidekhez képest a DNS javítása sokkal nehezebb, és kisebb mértékű károsodás is elegendő a sejthalál előidézéséhez (Tuteja és mtsai, 2010).

III. 2) c) Antioxidáns védelmi mechanizmusok

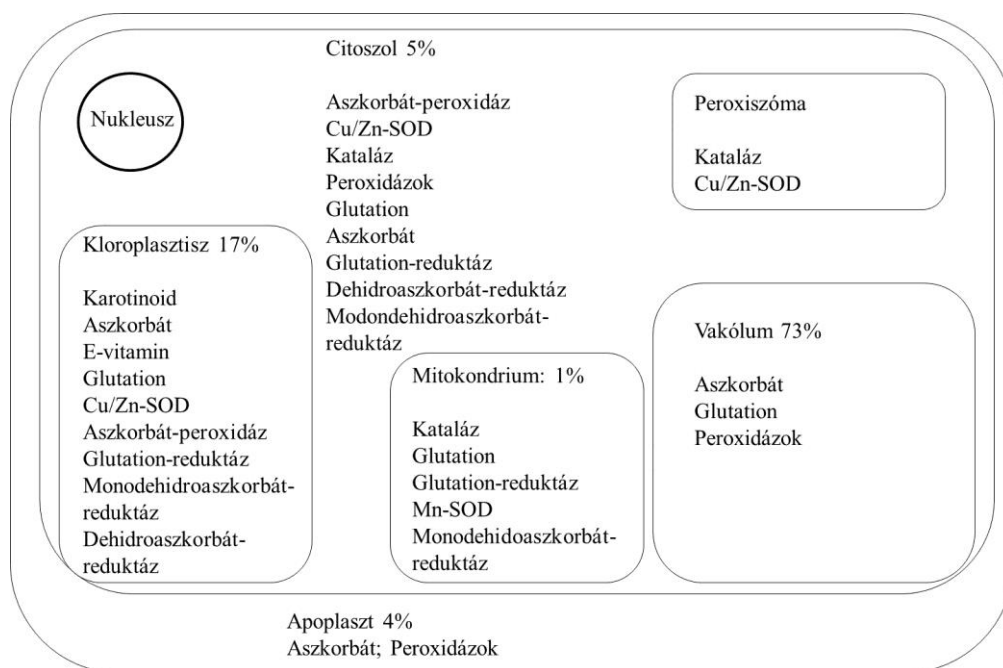
Már az anaerob prokarióták kialakítottak néhány enzimet, amely a reaktív oxigénformák semlegesítésére szolgált, hogy megbirkózzanak az új környezettel, míg ez a rendszer az aerob életformák számára esszenciális. A növények helyváltoztatásra képtelenek, így szinte folyamatosan különböző abiotikus és biotikus stressz-indukált oxidatív stressznek vannak kitéve. Talán ezzel magyarázható az a tény is, hogy a növényi sejt védelmi mechanizmusai jóval komplexebbek, mint az állati sejté (Scandalios, 1997).

Az antioxidáns védelmi rendszer két részre osztható: az antioxidáns molekulákra és az antioxidáns enzimekre. Az enzimatis tagok közé tartozik a kataláz (KAT, EC 1.11.1.6.), a glutation-reduktáz (GR, EC 1.6.4.2.), az aszkorbát-peroxidáz (APX, EC 1.11.1.11.), a szuperoxid-dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1.), a dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR, EC 1.8.5.1.), a guajakol-peroxidáz (GPX, EC 1.11.1.7.) és a monodehidroaszkorbát-reduktáz (MDHAR, EC 1.6.5.4.) (De Vos és mtsai., 1992; Wang és mtsai., 2004; Lombardi és Sebastiani, 2005). Az antioxidánsok vízzoldékony tagjai az aszkorbát és a glutation, amelyek főleg a citoplazmában és a vakuólumban lokalizálódnak (Drazkiewicz és mtsai., 2003). Léteznek

zsiroldékony antioxidánsok is, például az E-vitamin és a flavonoidok, ezek főleg a membránok és a sejtstruktúrák védelmében fontosak (1. ábra, 2. ábra).



1. ábra Az antioxidáns rendszer és a ROF-k kapcsolata
GSSG=oxidált glutation, GSH= redukált glutation, AA=aszorbát,
MDHA=monodehidro-aszorbát, DHA= dehidro-aszorbát (Tuteja és mtsai., 2010)



2. ábra Az antioxidáns védelmi rendszer tagjainak szubcelluláris eloszlása (Scandalios nyomán, 2005)

Az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódása stressz hatására általában a reaktív oxigénformák érzékelésén keresztül valósul meg. A sejtben lévő receptor proteinekben lévő tiol-csoportok képesek érzékelni a redoxpotenciál változásait, és transzkripciós faktorokon

keresztül befolyásolják a transzkripciót. Két ilyen transzkripciós faktort már azonosítottak; ezek az AP 1 és NF- κ B. Ezek az antioxidáns válasz elemhez és az abszcizinsav válasz elemhez képesek kötni és befolyásolni a génexpressziót (Dalton és mtsai, 1999). A reaktív oxigénformák másik jelentős útvonala, amelyen keresztül védelmi reakciókat aktiválnak a MAP kináz kaszkádon keresztül valósul meg (Zhang és Klessing, 2001). Egyes kutatók valószínűsítik, hogy a biotikus és abiotikus stresszek által kiváltott oxidatív folyamatok egyesítik a védelmi rendszereket. A ROF másik érzékelési módja az oxidált antioxidánsokon keresztül történik. A dehidroaskorbát normál esetben csekély részét teszi ki a sejt askorbát tartalmának, ezért az oxidatív stressz alatti ugrásszerű növekedése több metabolikus folyamatot, például a mitózist is befolyásolja. Felismerték továbbá a Rho proteinek részvételét az NF- κ B jelátviteli útban (Gabbita és mtsai, 2000), és kimutatták a poszttranszlációs fehérjemódosítások jelentőségét is a protein kináz B-n keresztül.

III. 3) A reaktív nitrogénformák a növényekben

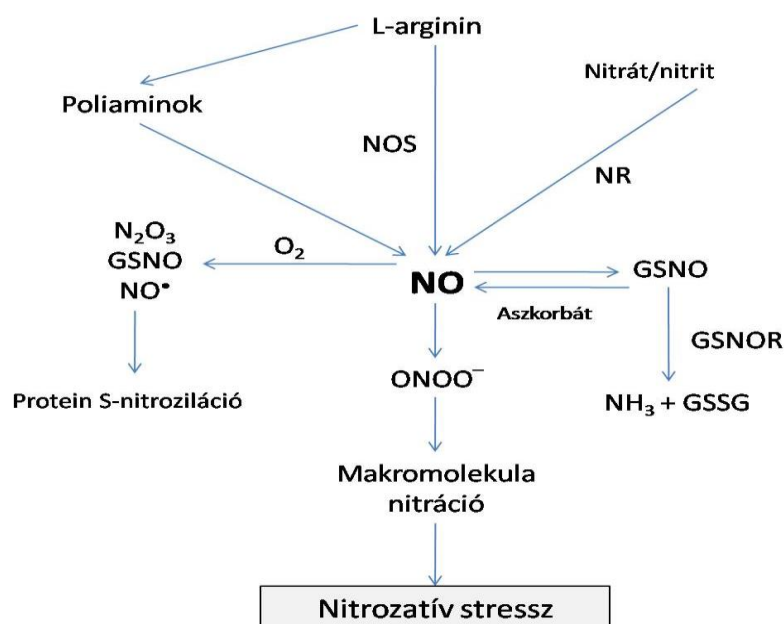
III. 3) a) A reaktív nitrogénformák tulajdonságai

A reaktív nitrogénformák egy újabban nagy figyelmet kapott molekula család, amely hatásai mind a növényekben, mind az állatokban fontosak. Főbb tagjaik közé a nitrogén-monoxid (NO), a peroxinitrit (ONOO⁻), az S-nitrozoglutation (GSNO), a dinitrogén-trioxid (N₂O₃) és a dinitrogén-tetroxid (N₂O₄) tartoznak (Molassiotis és Fotopoulos, 2012).

Képződésük minden esetben nitrogén-monoxidból indul, így először a nitrogén-monoxid molekula képzését mutatom be a növényi szervezetben. A nitrogén-monoxid képződése enzimatis és nem enzimatis folyamatok révén is megvalósulhat (Wilson és mtsai., 2008). Az enzimatis folyamatok közül talán a legfontosabb az L-arginin-függő nitrogén-monoxid szintáz (NOS) aktivitás. Az állati sejtekben ez bizonyítottan létezik, és az enzimet is azonosították a kutatók, míg a növényi rendszerekben mindeddig csak az aktivitását tudták kimutatni, az enzimet kódoló gént nem találták meg a növényi genomban (Chaki és mtsai., 2011). Az enzim hasonlóan az állati NOS-hoz L-arginin szubsztátot és kalmodulin, tetrahidrobiopterint (BH₄), valamint FAD és NADPH kofaktort használ (Corpas és mtsai, 2009). Újabb tanulmányok azonosítottak két, NOS-szerű enzimet *Ostreococcus tauri* algában (Foresi és mtsai., 2010), de továbbra is kérdéses a NOS enzimek létezése a magasabb rendű növényekben. A másik főbb enzim, amely képes nagy mennyiségű nitrogén-monoxid felszabadítására a nitrát reduktáz (NR) (Yamasaki és mtsai., 1999). Egyéb képződési lehetőség a növényi sejtmembránhoz kötött nitrit: NO reduktáz általi út, amelyet dohányban mutattak ki (Stöhr és Stremlau, 2006). Ez az útvonal az oxigénben kevésbé telített

szövetekben következik be (pl. gyökérzet), hasonlóan a NR nitrogén-monoxid termeléséhez, mivel az oxigén az enzimre nézve toxikus (Gupta és mtsai., 2005). Nem enzimatikus útvonal a savas pH-n történő spontán nitrit redukció, a nitrit bontása redukált aszkorbát által, és a karotinoidok fény általszabályozott NO₂ redukciója (Wojtaszek, 2000). Megfigyelték még továbbá, hogy a poliaminok képesek növelni a nitrogén-monoxid szintet a növényi szövetekben, de a folyamat molekuláris mechanizmusa még ismeretlen (Tun és mtsai., 2006).

A növényi NO szerepei rendkívül szerteágazóak, hiszen a magvas növények életciklusának mindhárom szakaszában (embriogenezis, vegetatív- és generatív fejlődés) szerepel, és olyan folyamatokat szabályoz, mint a csírázás, a pollentömlő növekedése, a virágzás, a fő- és oldalgyökerek, valamint a gyökérszőrök növekedése, a gyümölcsérés és a szenescencia (Shapiro, 2005; Corpas és mtsai., 2007A). Mindemellett az abiotikus és biotikus stressz rezisztencia kialakításában is felismerték a szerepét. Képes befolyásolni a különböző hormonok, többek közt az auxin hatását is. ANO/RNF metabolizmusa igen komplex, a finom szabályozás egyik kitűnő példája, de zavar esetén létrejöhet a nitroztatív stressz (3. ábra).



3. ábra A nitrogén-monoxid szintézise és hatásai a növényi sejtben (Corpas és mtsai., 2011)

III. 3) b) A nitroztatív stressz

A ROF-hoz hasonlóan a reaktív nitrogénformák homeosztázisának felborulása is másodlagos stresszhez vezet. A nitroztatív stressz magában foglalja a NO és más reaktív nitrogénformák által okozott összes sejtben belüli molekulamódosítást és –károsodást.

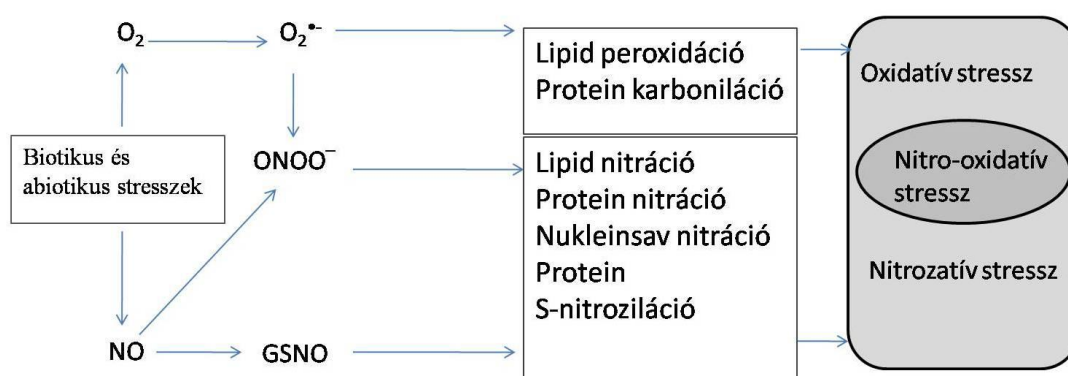
A nitroztatív stressz folyamatai az oxidatív stresszel ellentétben még kevésbé ismertek, de bizonyos ismeretekkel már rendelkezünk ezzel kapcsolatban. Az egyik legfontosabb, RNF-k által katalizált módosító mechanizmus a nitráció. A nitrációt a peroxinitrit vagy más, ritkább RNF okozza, és egy nitro-csoport($-\text{NO}_2$) kovalens kapcsolódását jelenti egy makromolekulához. A proteinek nitrációja a tirozin aminosav oldallánc aromás gyűrűjének orto szénatomján jön létre (Radi, 2004). Ez a módosítás általában funkcióvesztést és gyors lebontást eredményez. Jelenlegi ismereteink szerint ez a módosítás képes legjobban jelezni a nitroztatív stressz súlyosságát (a nitroztatív stressz megbízható markere), mivel erősebb stressz hatására megemelkedik a nitrálódott fehérjék száma (Corpas és mtsai., 2007B). A nitrációs reakció létrejöhet a nukleinsavak bázisain is, így például 8-nitroguanin képződik, ami valószínűleg mutagén, de a pontos funkciója jelenleg ismeretlen. Létrejöhetnek nitrált zsírsavak is, de hatásukat a növényi sejtekben még kutatják. A nitro-zsírsavak állapotokban jelátvitelt közvetíthetnek (Geisler és mtsai., 2012), fehérje funkciót szabályozhatnak (Schopfer és mtsai., 2011), lehetnek NO donorok (Faine és mtsai., 2010) és kovalensen módosíthatják a fehérjéket a Michael addíción keresztül (Baker és mtsai., 2007). Lúdfűben megfigyelték a nitro-linolénsav NO felszabadító hatását (Calvo és mtsai., 2012).

A másik módosítás a proteinek S-nitrozilációja. A glutationból és nitrogén-monoxidból oxigén jelenlétében képződő GSNO képes végrehajtani ezt a másodlagos fehérjemódosítást, aminek következtében a cistein aminosav tiol csoportja nitrozotiol csoporttá (S-NO) alakul. Ez a fehérjemódosítás valószínűleg egy transznitrozilációs reakción keresztül zajlik le, és *in vivo* reverzibilis (Foster és mtsai., 2003). Feltételezik a szabályozó hatását, mivel *in vivo* reverzibilis, és a fehérje funkciójára nemcsak negatív hatással van.

III. 4) A nitro-oxidatív stressz

A RNF és ROF két rokon molekulacsalád, és az újabb vizsgálatok szerint élő sejtekben igen sokrétű kölcsönhatás van közöttük. Mindkét molekulacsalád normál körülmények között is befolyásolja a sejt metabolizmusát, azonban különböző káros környezeti hatásokra mindkét molekulacsoport túltermelődik és módosítja vagy károsítja a makromolekulákat. A túltermelt molekulák nem mindegyike káros, sőt egyes általuk aktivált szignalizációs útvonalak a stressz enyhítéséért felelnek. A ROF és RNF közötti kölcsönhatás jelenleg csupán részben a fehérjék módosítása esetén tisztázott. A proteinek nitrációja és nitrozilációja befolyásolja az éppen aktív enzimeket, ezzel kihatva a ROF metabolizmusára. Például a NADPH-függő izocitrát-dehidrogenáz, amely a nitrogén metabolizmusban és a NADPH termelésen keresztül az antioxidáns mechanizmusokban is szerepet játszik,

nitrációval inaktiválódik stressz esetén (Begara-Morales és mtsai.,2013). Egy másik példa az NPR 1 és TGA 1 protein stressz során bekövetkező nitrozilációja, ami megnöveli a TGA 1 DNS-kötő képességét NPR 1 jelenlétében. Ez a folyamat pedig elősegíti a szisztémás szerzett rezisztencia génjeinek expresszióját (Tada és mtsai., 2008). Mint láthattuk a két molekulacsalád kölcsönhatásainak egyik kulcsmolekulája a GSNO, és az általa kialakított nitroziláció. A glutation egy kisméretű redox aktív tiol-csoportot tartalmazó antioxidáns, amely redukált (GSH) és oxidált (GSSG) formája közötti egyensúly a sejt általános redox állapotának indikátora (Foyer és Noctor, 2011). Új eredmények kimutatták, hogy a sejtben a GSNO mennyisége hasonló a GSSG-hez (Airaki és mtsai., 2011), ami miatt a GSH:GSNO arány szintén hozzájárul a sejt általános redox egyensúlyához, vagyis ezen a ponton is kapcsolódik a ROF és RNF metabolizmusa. A két molekulacsalád és funkcióik átfedése és kölcsönhatása miatt nem lehet egyértelműen elválasztani őket, így hatásukat összesítve nitro-oxidatív stressznek nevezzük (Corpas és Barosso, 2013)(4. ábra).



**4. ábra A nitro-oxidatív stressz és hatásai a növényi sejtben
(Corpas és Barosso, 2013alapján)**

III. 5) A nehézfém tolerancia szövet és sejtszintű mechanizmusai

Mint az irodalmi áttekintés elején bemutatam, a cink egy esszenciális nyomelem a növények számára. Ebből adódóan a cinktolerancia minden esetben a lokális koncentráció csökkentésén alapul. Erre az egyszerű feladatra a növények három stratégiát fejlesztettek ki: az elkerülést, a transzlokációt és a megkötést.

Az elkerülés a legalapvetőbb és talán legegyszerűbb stratégia, mely során nagy külső koncentráció esetén a növény csökkenti a cink felvételét a gyökérbe. Ily módon a szövetekbe már megfelelő mennyiségű nehézfém jut, ami nem okoz kárt. Hozzá kell tenni, hogy ez a mechanizmus nem kötelezően a legjobb, mert más mikroelemek felvétele is sérülhet (Lewitt, 1980).

Ha a növény kénytelen felvenni a cinket, akkor a hatékony eloszlata a szervezetben szintén tolerancia mechanizmus lehet. Például a tarsóka (*Nocca caerluescens*) növény stressz hatására nagy mennyiségű transzportert (többek között HMA 4-etexpresszál), és a szállítónyalábokat gyorsan feltölti a fémionokkal. A hajtásba szállítás bár hosszú távon szintén nem a legmegfelelőbb megoldás, a hajtás felhasználásával a helyi koncentrációk a toxikus szint alatt maradhatnak (Baker, 1978).

A sejtszinten történő cinkmegkötés igényli a legtöbb energiát, és sok fajta mechanizmus létezik. Az első védelmi vonal minden esetben a sejtfal, és itt a poliszacharidok és más sejtfalalkotók között nagy mennyiségű cink megkötése lehetséges. A sejtfal permeabilitásának csökkentése érdekében új komponensek, pl. kallóz és/vagy lignin, rakódhat a sejtfalba (Turner, 1972). Ha a sejt citoplazmájába bejut a cink, a természetes nanomólos koncentráció fenntartása az elsődleges cél. Ezt általában megkötéssel és kompartmentalizációval, valamint a sejtbe szállító transzporterek aktivitásának csökkentésével éri el a sejt. Ilyen kelátor molekulák a metallothioneinek, a glutation, a fitokelatinok (Rauser, 1984), bizonyos szerves savak és egyes aminosavak is (Herstein, 1986). Optimális esetben aktiválódnak a kifelé irányító HMA pumpák, amik szintén csökkentik az intracelluláris ionkoncentrációt.

Mindhárom stratégia elterjedt, de többnyire kombinációikat alkalmazzák a növények. Ha egy növény több stratégia alkalmazására is képes, általában nagy mennyiségű fémre képes jelentőskárosodás nélkül kötni. Ezeket a növényeket nevezzük akkumuláló, extrém esetben hiperakkumuláló növényeknek.

III. 6) Vizsgált növényfajok

A két általunk vizsgált növényfaj a *Brassica napus*, azaz olajrepcse és a *Brassica juncea*, azaz indiai mustár. Mindkettő a keresztesvirágúak családjába (*Brassicaceae*) tartozik, ahol több nehézfém toleráns és hiperakkumuláló fajt is találunk. A két növény igen fontos olajnövény, ami miatt kulcskérdés az abiotikus stressztoleranciájuk jobb megismerése. Mindkét faj nehézfém toleráns, és az irodalomban több fémre is voltak már vizsgálatok. Amellett, hogy gazdaságilag fontos haszonnövények, kezdeményezések vannak ezen *Brassica* fajok fitoremediációs célokra való felhasználására vonatkozóan is. A (haszon) növények nehézfém toleranciájára vonatkozó ismereteink bővítése a jövőre nézve igen fontos lehet, hiszen a környezet nehézfém szennyezése sajnálatos módon világszerte fokozódik.

IV. Anyagok és módszerek:

IV. 1) Növényi anyag és nevelési körülmények:

A kísérletben felhasznált növényfajok az indiai mustár (*Brassica juncea*) és az olajrepcse (*Brassica napus*) voltak. A *Brassica* magokat ültetéshez 50 (v/v)%-os hipóval sterilizáltuk. Az ültetés perlittel töltött Eppendorf csövekbe történt. A csövekben hidropónikus körülmények között fejlődtek a növények teljes Hoagland tápoldaton úszva, amelynek összetétele a következő volt: 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 0,01 mM Fe-EDTA, 10 μM H_3BO_3 , 1 μM MnSO_4 , 5 μM ZnSO_4 , 0,5 μM CuSO_4 , 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ és 10 μM AlCl_3 . A növényeket kilenc napos előnevelési periódus után a tápoldataikhoz adott 50 μM , 150 μM és 300 μM cink-szulfáttal kezeltük. A kontroll növénycsoport 5 μM ZnSO_4 koncentrációjú Hoagland tápoldatban nevelkedett, ezen felül cinkkezelést nem kapott. A mintavétel 7 napos kezelési idő után történt. A növények ellenőrzött körülmények között nevelkedtek, ahol a fényintenzitás $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt, 12 órás nappali és 12 órás sötét periódussal, 55-60% páratartalom mellett 25 ± 2 °C hőmérsékleten. (5. ábra).



5. ábra: Hét napig kezelt *Brassicajuncea* növények és a hidropónikus rendszer

IV. 2) A cink felhalmozódás meghatározása szerv, szövet és sejt szinten:

A növényi szervek nehézfém tartalmának meghatározására alkalmazott eljárás az induktív csatolású plazma-tömegspektrometria (ICP-MS) volt Lehotai és mtsai. (2012) szerint. A cink mennyiségét külön a hajtásban és a gyökérzetben határoztuk meg. Első lépésként a növényi részeket desztillált vízzel átmostuk. A minták 72 órán át 70 °C-on

szárítószekrényben száradtak, majd 65 (v/v)%-ossalétomsavat, és 30 (v/v)%-os hidrogén-peroxidot adtunk hozzájuk. Ezt az elegyet roncsoltuk 200°C-on, 1600 W teljesítményen 15 percig. Az értékeket µg/g száraztömegben adtuk meg.

Az egyes *gyökérszövetek* cink tartalmát specifikus fluoreszcens festékekkel határoztuk meg. A két alkalmazott festék a Zinquin és a Zinpyr-1 volt. A gyökereket PBS pufferbe helyeztük (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4), majd a puffer leszívása után a gyökerekre 25 µM Zinquin-oldatot (PBS pufferben) helyeztünk. A mintát egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk (Sarret és mtsai., 2006). Zinpyr-1 festék alkalmazásához a gyökereket ioncserélt vízben és 10 mM-os EDTA oldatban mostuk, majd a festéshez 20 µM Zinpyr-1-oldatot (PBS pufferben) használtunk, majd három óra inkubáció következett szobahőmérsékleten (Sinclair és mtsai., 2007).

A *sejtszintű* cink lokalizáció meghatározása konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (Olympus LSM 700, Olympus, Tokyo, Japan) történt. A fent ismertetett Zinpyr-1 fluorofóron kívül a sejtfalak jelölésére propídium-jodidot (PI) használtunk a következő módon: első lépés a Zinpyr-1 oldat eltávolítása volt, majd egyperces inkubáció következett a 10 µM-os PI oldattal (Tsukagoshi és mtsai., 2010), és végül a mintákat PBS pufferrel lefedve helyeztük tárgylemezre. A fluoreszcensen jelölt minták gerjesztése 488 nm-es, 100 mW-os argon ion lézerrel történt, továbbá a minták vizsgálatához egy húszszoros víz immerziós objektívlencsét használtunk. A fluoreszcencia emisszió detektálására pedig a fluoreszcein-izotiocianát (FITC) és PI filtereket alkalmaztuk. A felvételek készítése a Fluoview FV100 szoftver segítségével történt, elemzésüket pedig a Fiji programmal végeztük el (<http://fiji.sc/Fiji>, Schindelin és mtsai., 2012).

IV. 3) Morfológiai mérések:

A gyökérszövet és hajtás friss tömegét (g) analitikai mérleg segítségével határoztuk meg. A főgyökérhossz (cm) mérésére szintén a mintavételi napon került sor, egy vonalzó felhasználásával. Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a gyökér architektúra változásairól a növényenkénti oldalgyökerek számát (db/gyökér), valamint a gyökérnyaktól számított első hat oldalgyökér hosszát (mm) határoztuk meg manuálisan.

IV. 4) Az ROF szintek mikroszkópos detektálása és az antioxidáns enzimek aktivitásának spektrofotometriás meghatározása

A szuperoxid-gyökanion kimutatása dihidroetídium (DHE) fluorofórral történt, melyet 10 µM-os koncentrációban használtunk; az inkubációs idő 30 perc volt, sötétben, 37 °C-on

(Kolbert és mtsai., 2012) Ezután kétszeri átmosás következett TRIS-HCl pufferrel (10 mM, pH 7,4).

A sejt összes szuperoxid-dizmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) enzimaktivitásának vizsgálatára az enzim azon képességét használtuk fel, amely szerint gátolja a fény hatására bekövetkező nitroblue tetrazolium (NBT) fotokémiai redukcióját riboflavin jelenlétében (Dhindsa és mtsai., 1981). A növényi minta előkészítésénél 250 mg friss tömeghez 10 mg polivinil-polipirrolidont adtunk, ezt eldörzsöltük foszfát pufferben (pH 7,0) amelyben még 1 mM-os koncentrációban EDTA is volt.

A hidrogén-peroxid meghatározása 50 μ M Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) fluorofórraltörtént. A 20 perces inkubációt követően a gyökérmintákat egyszer mostuk Na-foszfátpufferben (50 mM, pH 7,5) (Lehotai és mtsai., 2012).

A sejt összes aszkorbát-peroxidáz aktivitásának (APX, EC 1.11.1.11) vizsgálata során a szubsztrát, azaz az aszkorbát fogyását vizsgáltuk az idő függvényében, 265 nm-en (Nakano és Asada, 1981). Az enzimkivonathoz 250 mg növényt dörzsöltünk el 1,5ml extrakciós pufferben, ami 0,1 mM EDTA-t, 50 mM NaCl-ot és 0,9 mM aszkorbátot tartalmazott.

IV. 5) A RNF szintek mikroszkópos detektálása

A nitrogén-monoxid detektálására 10 μ M 4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorofluoreszcein diacetát (DAF-FM DA) festék oldatot használtunk. A gyökércsúcsokat 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a fluorofór oldatában, majd kétszeri mosás következett TRIS-HCl pufferben (10mM, pH 7,4) (Lehotai és mtsai., 2012).

Szemikvantitatív módszerrel a NO mellett, a peroxinitritet is vizsgáltuk 3'-(p-aminofenil) fluoreszcein (APF) festékkel. A festéket 10 μ M-os koncentrációban használtuk, és szobahőmérsékleten a minta egyórát töltött az oldatban. Ezt kétszeri TRIS-HCl (10mM, pH 7,4) pufferben történő mosás követte (Kolbert és mtsai., 2012).

IV. 6) A nitro-oxidatívstressz markereinek vizsgálata

IV. 6) a) Fehérje tirozin nitráció vizsgálata Western blottal

A proteinek nitrációjának vizsgálatára egy SDS-PAGE és Western blot alapú rendszert alkalmaztunk. A nyers extraktumok tisztítása immunoprecipitációval történt, amelyhez Thermo Scientific Pierce mágneses IP/Co-IP kitet (Hudson, NH, USA) használtunk fel. A gyöngyökre 3-nitrotirozin elleni antitestet kötöttünk. A tisztított minta denaturáló poliakrilamid gélelektroforézisnek lett alávetve 12%-os akrilamid gélen. A Western blot analízishez az elválasztott fehérjéket PVDF membránra transzfereltük tank transzfer eljárással. A transzfer után a membránokat reakcióképességi vizsgálatokra használtuk fel,

1:2000 hígítású 3-nitrotirozinra specifikus poliklonális nyúlantitestekkel (Corpas és mtsai., 2008). A másodlagos antitest egy megfelelő (kecskében termeltetett nyúl IgG antitestet kötő) ellenanyag volt, amelyhez egy alkalikus-foszfátázt kapcsoltak. A másodlagos antitestet 1:10 000 hígításban alkalmaztuk, és a megjelenítése NBT/BCIP reakcióval történt. Pozitív kontrollként nitrált borjuszérum albumint (NO₂-BSA) használtunk.

IV. 6) b) Lipid peroxidáció kimutatása fénymikroszkópos technikával

A lipid peroxidáció kimutatása Schiff-reagenssel történt. A gyökércsúcsokat 20 percig inkubáltuk a festékoldatban, majd egy 20 perces inkubáció következett kálium-diszulfid 0,5 (v/v)%-os oldatában (Arasimowicz-Jelonek és mtsai., 2009).

IV. 7) Az életképesség és a kallózberakódás fluoreszcens mikroszkópos meghatározása

A gyökér osztódási zónájának életképességét fluorescein-diacetát (FDA) segítségével mutattuk ki, amelynek 10 µM-os oldatát használtuk. Az inkubáció 30 percig tartott, sötétben, szobahőmérsékleten. Mosás négyszer történt MES/KCl pufferben (10 mM, pH 6,15) (Lehotai és mtsai., 2011).

A sejtfalakba történő kallóz berakódást a 0,1 (v/v) %-os anilinekék oldattal tettük láthatóvá, amelyet 1 M glicin felhasználásával készítettünk el. A gyökércsúcsok öt percig inkubálódtak, utána desztillált vízzel egyszer mostuk át őket (Cao és mtsai., 2011).

IV. 8) A festések mikroszkópos háttére

A *Brassica* növények különböző fluorofórokkal jelölt gyökércsúcsait Zeiss Axiowert 200M inverz mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) vizsgáltuk, amihez egy nagy felbontású digitális kamera csatlakozik (Axiocam HR, HQ CCD, Carl Zeiss, Jena, Németország). A mikroszkóp 9-es szűrőjét használtuk a DHE fluoreszcencia detektálásakor (excitációs hullámhossz tartománya: 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-∞ nm), a 10-es szűrő az APF, DAF-FM DA és FDA festékekből származó emisszió megjelenítéséhez volt megfelelő (excitációs hullámhossz tartománya: 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-565 nm). A 20 HE szűrő használatával az Amplex Red fluorofór (excitációs hullámhossz tartománya: 546/12 nm, emissziós tartomány: 607/80 nm), a 49-es filter szettel pedig az anilin kék által kibocsátott fluoreszcens jelet tudtuk detektálni (excitációs hullámhossz tartománya: 365 nm, emissziós tartomány: 445/50 nm). Az osztódási régióról készített felvételeken, az

Axiovision Rel. 4.8 szoftversegítségével 100 mikrométer sugarú körökben mértük a pixel intenzitást, ami egyenesen arányos a jelzett molekula koncentrációjával.

IV. 9) Statisztikai módszerek

Az adatok statisztikai analíziséhez a Microsoft Excel 2007 programot, a statisztikai módszerek közül pedig a Student-féle T-próbát használtuk. Az adatok szignifikanciájának ábrán való bemutatásához pedig a következő jelölést alkalmaztuk: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Minden mérési módszert tíz független mintán végeztünk el és két biológiai ismétlést alkalmaztunk a statisztikai megbízhatóság érdekében.

V. Eredmények:

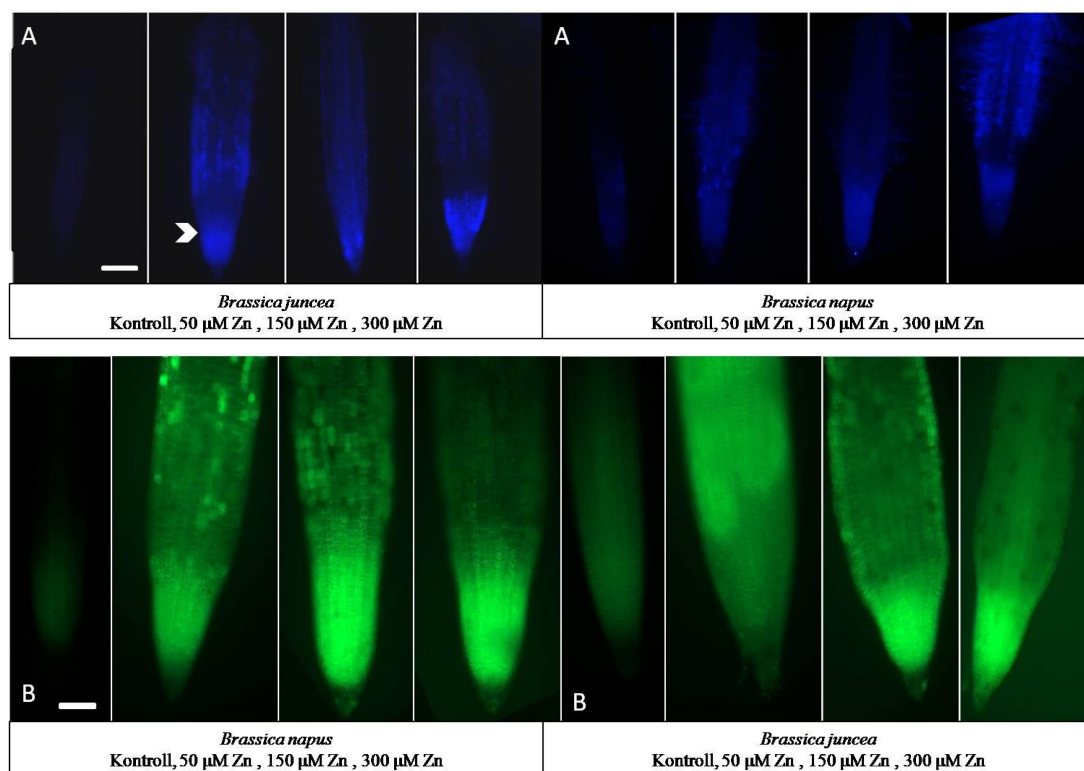
V. 1) A *Brassica* növények nagy mennyiségű cinket akkumulálnak

A növényi szervek nehézfém tartalmát elsőként az induktív csatolású plazma tömegspektrometriával vizsgáltuk. Az eredmények alapján a növények nagy mennyiségben akkumuláltak cinket. A nehézfém szállítási rendszerek a növényi szervezetben nem rendelkeztek megfelelő kapacitással, így a kezelthajtás cink tartalma, bár a kontrollhoz képest igen nagy, a gyökérhez képest egy nagyságrenddel alacsonyabb. Minden adat szignifikáns különbséget mutatott a kontrollhoz képest, és említést érdemel, hogy az indiai mustár száraz tömegének 5,253 %-a maga a kezelési nehézfém, ami jelentős felhalmozásnak tekinthető (2. táblázat).

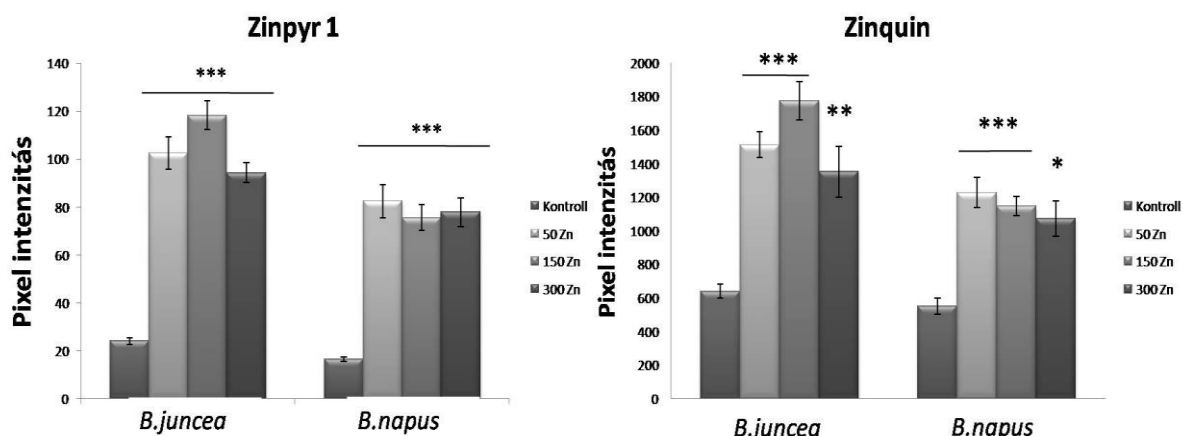
	B. juncea 7. nap				B. napus 7. nap			
	Kontroll	50 μ M Zn	150 μ M Zn	300 μ M Zn	Kontroll	50 μ M Zn	150 μ M Zn	300 μ M Zn
Gyökér (μg/g SZT)	212,8	14570	31110	52530	258,4	14900	32490	45980
		**	***	***		***	***	***
Hajtás (μg/g SZT)	89,25	831,9	1931	3211	155,7	1598	2880	3727
		***	***	***		***	***	***

2. táblázat Cink koncentráció (μ g/g SZT) a *Brassica* fajok hajtásában és gyökérzetében 7 napos cinkkezelést (0, 50, 150, 300 μ M ZnSO₄) követően. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem. ***P $\leq$ 0,001.

A szöveti szintű cinktartalom és lokalizáció vizsgálatát két fluorofórral, a Zinquin-nel és a Zinpyr-1-el végeztük. A két mikroszkópiás módszert hasonlóságuk miatt együtt tárgyalom. A mikroszkópos felvételeken megfigyelhető a fluoreszcencia intenzitásának a növekedése a kezelés hatására, és megállapítható, hogy a kontroll gyökerekben detektált homogén cinkeloszlás a külső kezelés hatására megváltozott, és a cink elsősorban a gyökércsúcsi merisztematikus szövetben halmozódott fel (6. ábra). A merisztémában tehát jelentős fluoreszcencia emisszió fokozódást láthatunk, de az indiai mustár magasabb pixel intenzitás értékeket mutatott, és a hatás nem bizonyult koncentráció függőnek egyik fajban sem (7. ábra).



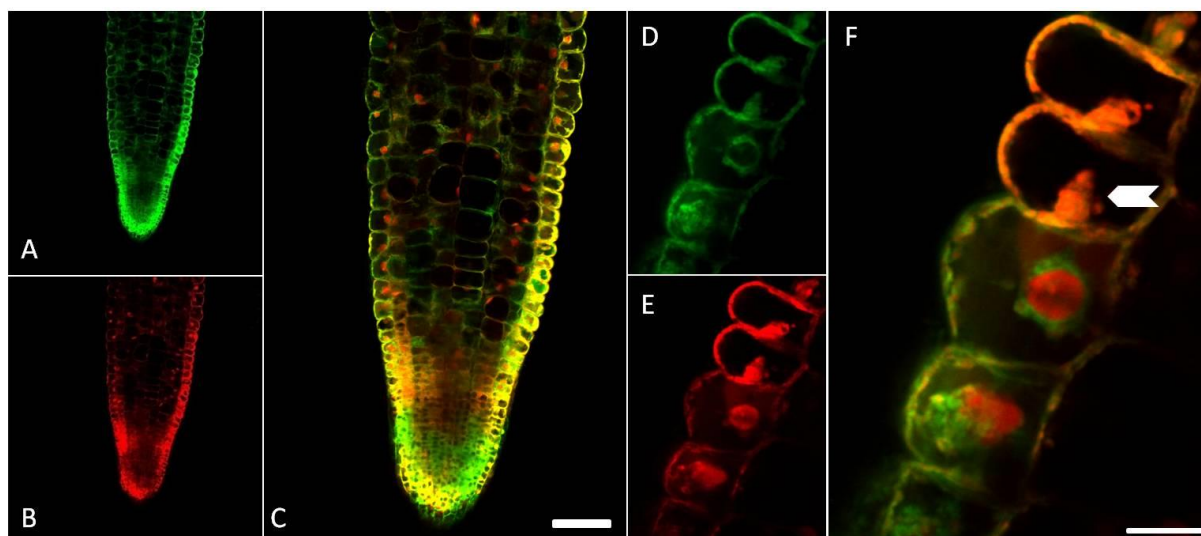
6. ábra Zinquin (A) és Zinpyr-1 (B) fluorofórral festett *Brassica* gyökerekről készített reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek. A gyökércsúcsi merisztéma nyíllal jelölve. Mércse= 0,2 mm; 0,2 mm.



7. ábra Pixel intenzitás a Zinpyr-1-gyel valamint a Zinquin-nel jelölt *Brassica* gyökércsúcsok merisztematikus régiójában 7 napos cinkkezelést követően. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltem. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

A sejtszintű cink lokalizációt propídium-jodid (PI) és Zinpyr-1 fluorofórok együttes alkalmazásával tanulmányoztuk. A Zinpyr-1 egy szelektív cink-kötő fluorofór, míg a propídium jodid DNS-t köt. A PI a Zinpyr-1-el szemben azonban képtelen átjutni az ép plazmamembránokon, így általában a sejtfal vagy halott sejtek jelölésére használják. Az ábrákon egyértelműen látszik, hogy a felhalmozódott cink nagy része a sejtfalakhoz kötődik, amit a Zinpyr-1-ből származó zöld (A), és a PI-ből származó vörös (B) fluoreszcencia emisszió kolokalizációja jelez (8. ábra-C). Érdekes megfigyelni továbbá az epidermisz

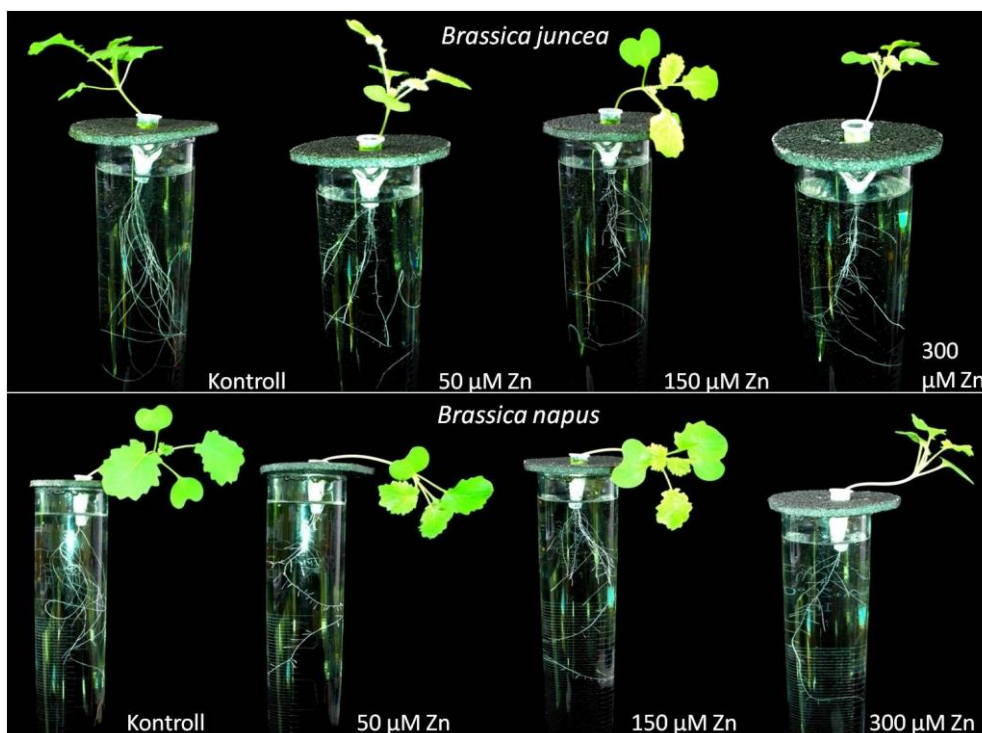
sejteket. Mivel sejtek nagy részében a sejtmag festődik propídium jodiddal (9. ábra E), így egyértelmű, hogy ezek már nem élő sejtek. Egyes sejtek sejtmagjában nagy mennyiségű cink található, ami a sejtmag alakjának változásával jár (nyíllal jelölve 8 ábra D,F).



8. ábra A: Cink-kezelt (300 μ M ZnSO₄) *Brassica juncea* gyökércsúcsokról készített reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek. A teljes gyökércsúcsról készített, kisebb nagyítású (A-C) és az epidermális sejtréteg részletét bemutató nagyobb nagyítású (D-F) fotók. A,D=Zinpyr-1-festett gyökércsúcs, B,E= PI-festett gyökércsúcs, C,F=a Zinpyr-1 és a PI fluoreszcencia kolokalizációja. A cinket tartalmazó sejtmagokat nyíllal jelöltem. Mércék= C: 0,1 mm; F: 0,02 mm.

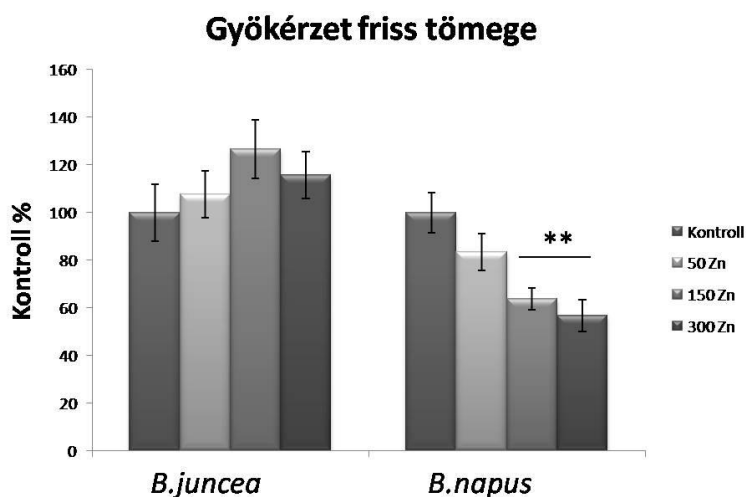
V. 2) A cink többlete gátolja a *Brassica* fajok hajtás- és gyökérnövekedését

A növekvő cink koncentrációk hatására a levél terület, valamint a hajtás friss- és száraztömege csökkent. A levelek elsárgultak, és magasabb kezelési koncentrációknál pedig nekrotikus foltok is megjelentek (9. ábra).



9. ábra Morfológiai változások különböző kezelési koncentrációk hatására.

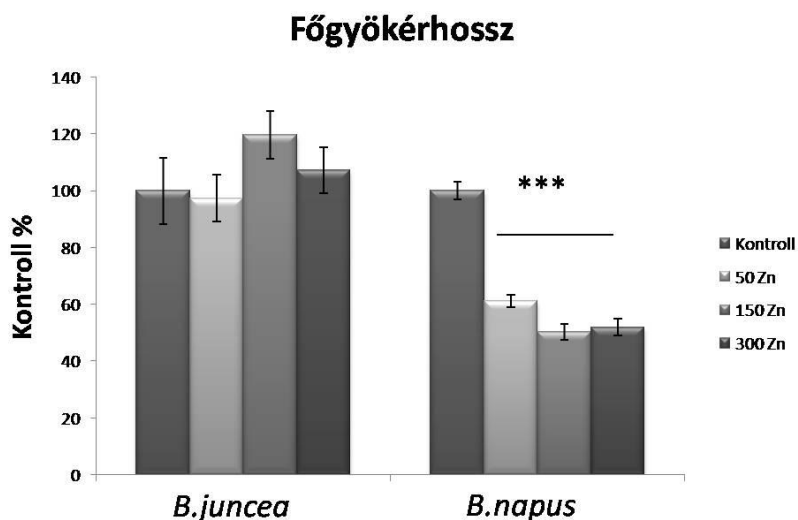
A kísérlet során a nehézfémkezelés hatására a repcében csökkenést tapasztaltunk a gyökér friss tömegében, mely hatás koncentráció-függőnek bizonyult. Az indiai mustár esetében azonban nem következett be a friss tömeg csökkenése, sőt egy enyhe növekedés volt megfigyelhető a cink hatására (10. ábra).



10. ábra A gyökérzet friss tömege kontroll százalékban kifejezve a *Brassica* fajokban 7 napos cinkkezelést követően. ** $P \leq 0,01$

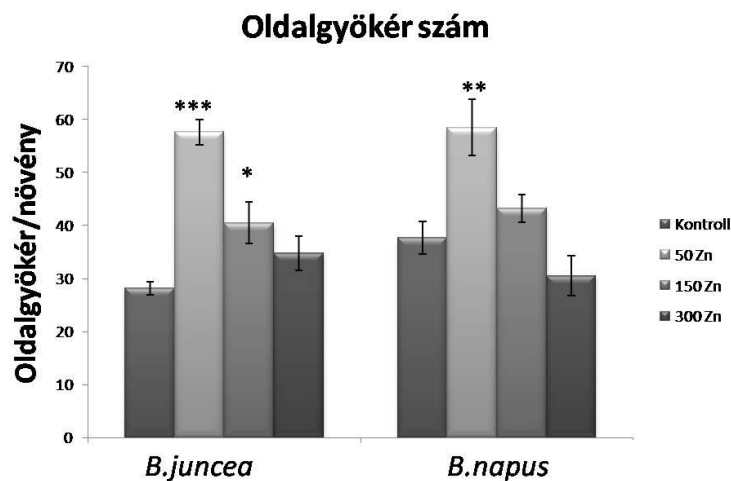
A repcében minden kezelési koncentráció a főgyökér (FGY) hosszának erőteljes csökkenését okozta, a növekedés gátlás mértéke pedig ~50% volt. A cinkkezelt indiai mustár

gyökérnövekedése a friss tömeghez hasonlóan nem mutatott szignifikáns változást a kontrollhoz képest (11. ábra).



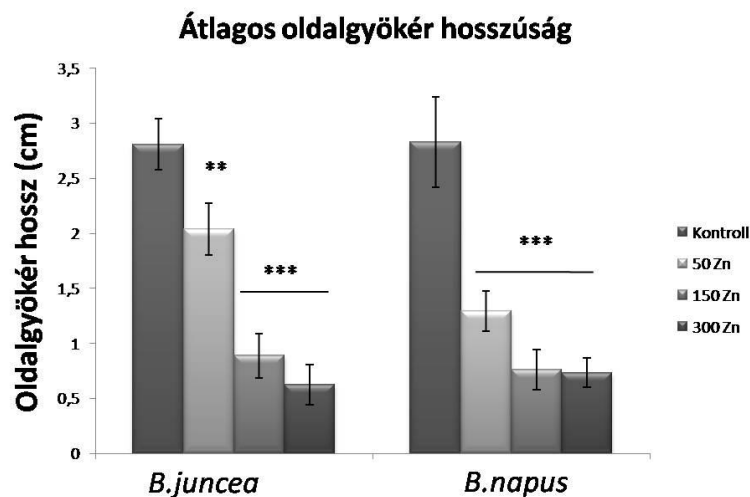
11. ábra A főgyökér hossz kontroll százalékban kifejezve a *Brassica* fajokban 7 napos cinkkezelést követően. ** $P \leq 0,01$

Az alacsony koncentrációjú cinkkezelés (50 μM) hatására fokozott oldalgyökér képződést tapasztaltunk, míg a magasabb kezelési koncentrációk egy enyhébb serkentést eredményeztek (12. ábra).



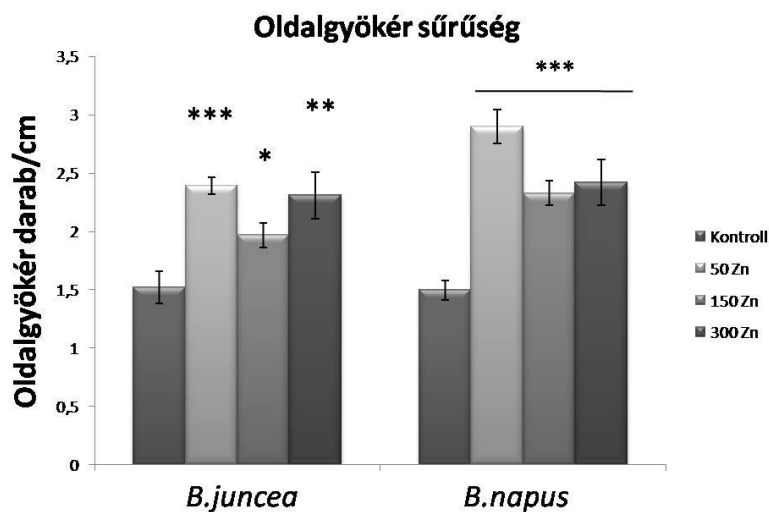
12. ábra A látható oldalgyökerek száma *Brassica* fajokban 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

A tápanyagfelszívás szempontjából fontos az oldalgyökerek hossza, mivel ez a paraméter is befolyásolja a gyökérzetszerkezetét. Az oldalgyökerek hosszúsága az indiai mustár esetében koncentráció-függően csökkent, míg az olajrepce egy drasztikusabb gátlást mutatott. A magasabb koncentrációk igen rövid oldalgyökereket eredményeztek a kontrollhoz viszonyítva (13. ábra).



13. ábra A látható oldalgyökök hosszúsága (cm) a *Brassica* fajokban 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

Egy gyökér architektúrát leíró további paraméter az oldalgyökér sűrűség, hiszen ez határozza meg a felszívás hatékonyságát egy gyökérszakaszon. Ez minden cink koncentráció esetében szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz viszonyítva, az oldalgyökér szám növekedésének és a főgyökér rövidülésének együttes eredményeképp (14. ábra).

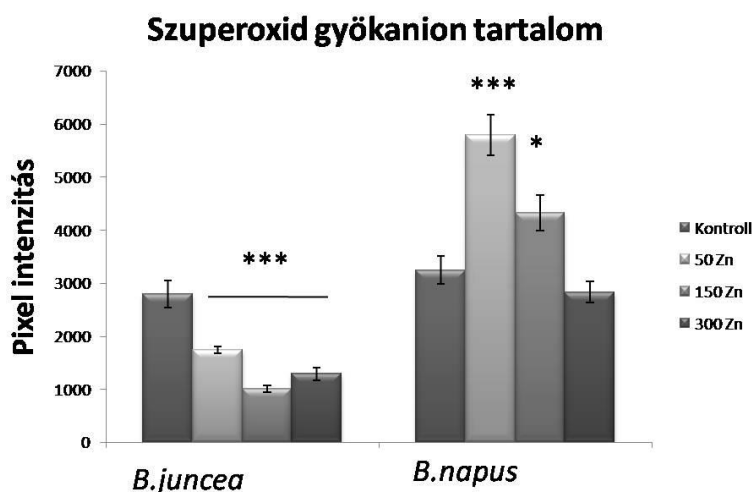


14. ábra Oldalgyökér sűrűség (db/cm) a *Brassica* fajokban 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

V. 3) A cink többlete megváltoztatja a reaktív oxigénformák metabolizmusát a *Brassica* gyökerekben

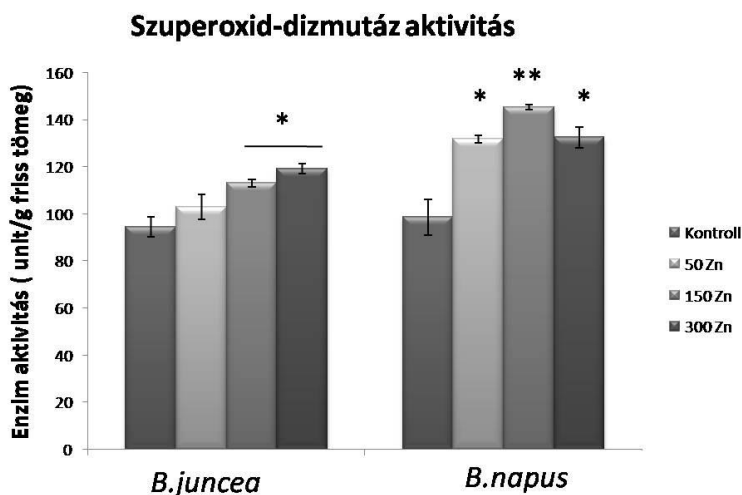
A szuperoxid gyökéanion a molekuláris oxigéntől indulva az első képződő reaktív oxigénforma a növényi sejtekben, így szerepe az oxidatív stressz kialakulásában jelentős. A két növényfaj között jelentős különbségeket tapasztaltunk, mivel az indiai mustárban a cink

szignifikáns módon csökkentette, a repcében pedig növelte a szuperoxid gyökanion szintjét a gyökércsúcsokban (15. ábra). Érdekes módon az alacsonyabb cink koncentrációk okozták a legjelentősebb szuperoxid képződést a *B. napus* esetében.



25. ábra Szuperoxid gyökanion szint (pixel intenzitás) a *Brassica* fajok gyökércsúcsi merisztémájában 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

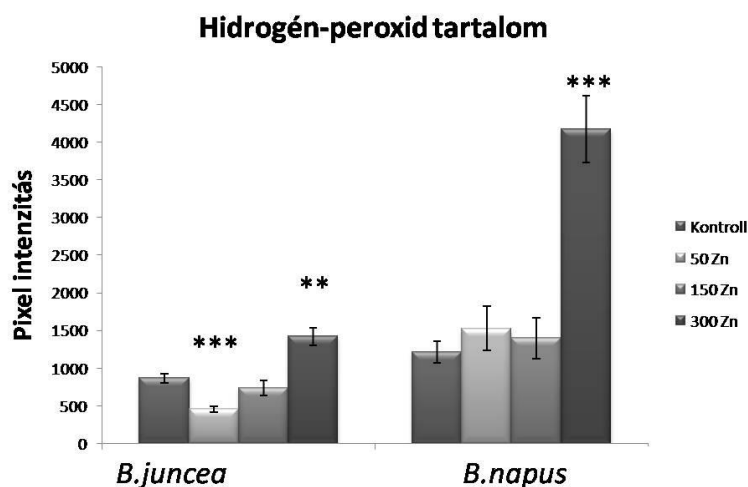
A szuperoxid gyökanion eliminálásában kulcsszerepet játszó szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitása megemelkedett mindkét növényfajban minden cink koncentráció esetén. Az indiai mustárgyökérzetében a cink SOD aktivitásra gyakorolt hatása kisebb mértékű, de koncentrációfüggő volt. (16. ábra)



36. ábra A szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitása (unit/g friss tömeg) a *Brassica* fajok gyökérzetében 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

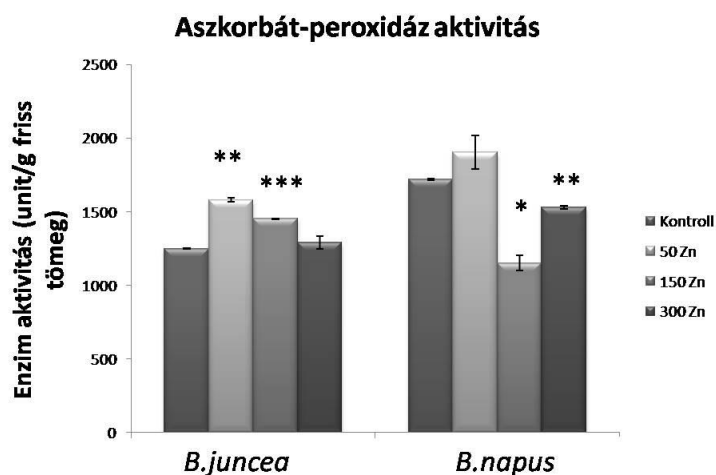
A szuperoxid-dizmutáz enzim a szuperoxid gyökanionból kevésbé reaktív hidrogén-peroxidot képez, ami azonban nagy koncentrációban toxikus lehet. Az indiai mustár gyökércsúcsaiban az 50 μM -os kezelés csökkentette, a 300 μM cink viszont megemelte a H_2O_2 szintjét. Az olajrepcé gyökerében az alacsonyabb koncentrációjú cinkkezelés kontroll-szerű

H₂O₂ tartalmat eredményezett, míg a 300 µM cink hatására egy nagyon jelentős akkumulációt detektáltunk. (17. ábra)



47. ábra Hidrogén-peroxid szint (pixel intenzitás) a *Brassica* fajok gyökércsúcsi merisztémájában 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

A hidrogén-peroxid elbontásáért az többek között az aszkorbát-peroxidáz enzim a felelős. Az enzimaktivitása indiai mustárban kisebb cink koncentráció hatására megnövekedett, míg olajrepcénél a legmagasabb kezelési koncentráció (300 µM) váltott ki szignifikáns emelkedést. (18. ábra)

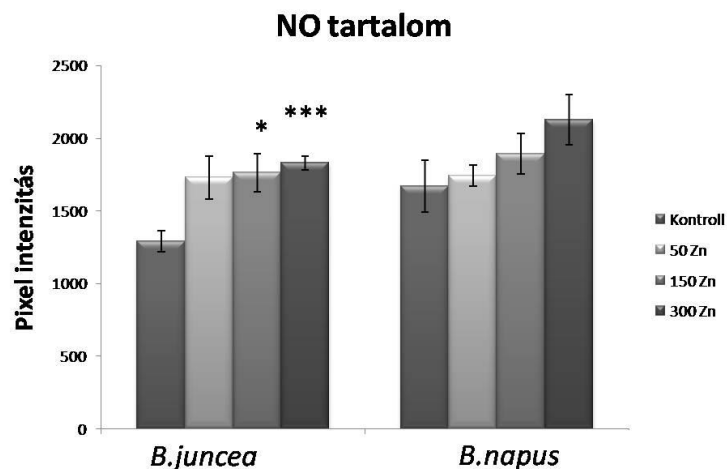


58. ábra Az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitása (unit/g friss tömeg) a *Brassica* fajok gyökérzetében 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

V. 4) A cink többlete a reaktív nitrogénformák homeosztázisának felborulását okozza a *Brassica* gyökerekben

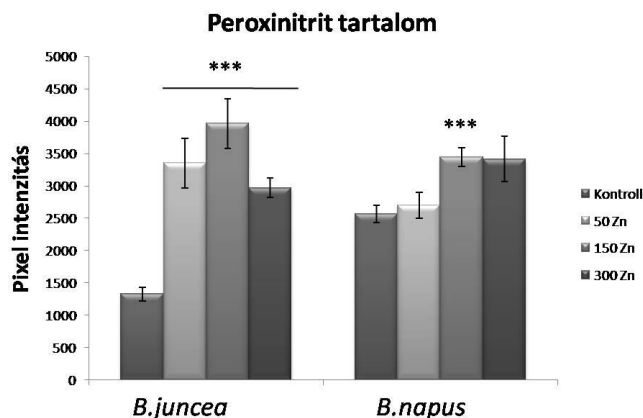
A reaktív nitrogénformák legismertebb képviselője a nitrogén-monoxid. Az indiai mustár gyökércsúcsaiban egy enyhe, de szignifikáns emelkedést detektáltunk minden

alkalmazott cinkkoncentráció hatására, míg az olajrepcé NO szintje nem szignifikáns, de emelkedő tendenciát mutat. (19. ábra)



19. ábra Nitrogén monoxid szint (pixel intenzitás) a *Brassica* fajok gyökércsúcsi merisztémájában 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

A nitrogén-monoxid szuperoxid gyökánionnal peroxinitritet alkothat, ami fehérje károsító hatású lehet. A peroxinitrit tartalom az indiai mustárban minden cink koncentráció hatására megemelkedett, az olajrepcében pedig csupán a nagyobb cink koncentrációk hatására fokozódott. (20. ábra)

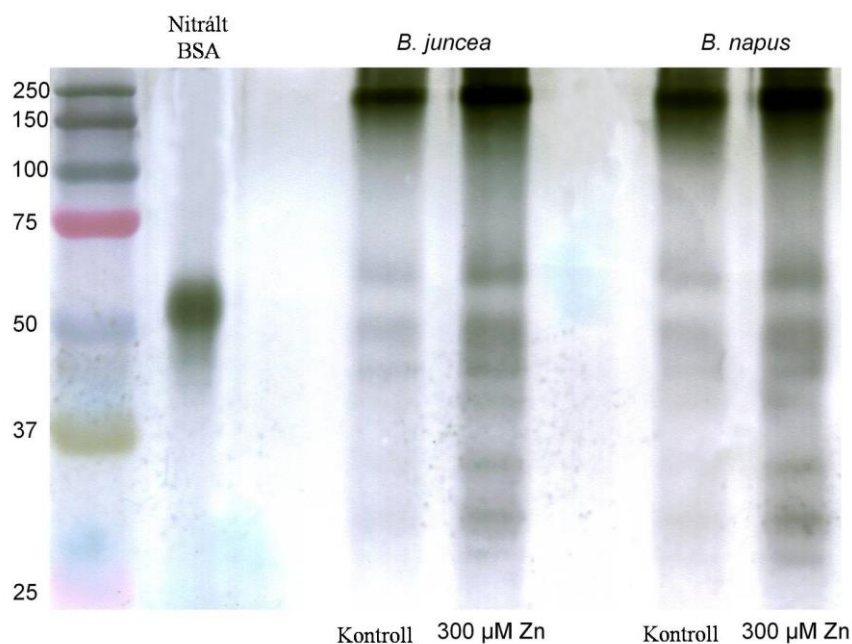


20. ábra Peroxinitritszint (pixel intenzitás) a *Brassica* fajok gyökércsúcsi merisztémájában 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

V. 5) A cink-indukált nitro-oxidatív stressz befolyásolja a makromolekulák féléletidejét

A *Brassica* növényeink gyökérzetében kimutattuk a fehérje nitrációt Western blot analízis segítségével. Megállapítottuk, hogy a kontroll növényben is történt nitráció, és hét, nitrotirozinnal szembeni immunopozitivitást adó fehérjesávot mutattunk ki. A cink kitettség

az immunreakció erősödését okozta, de ez esetben is a kontrollhoz hasonló fehérje mintázatot kaptunk.(21. ábra)



21. ábra Nitrált tirozin oldalancú proteinek kimutatása Western blot analízissel 300 μ M cinkkezelésnek kitett *Brassica juncea* és *Brassica napus* gyökérzetében. Pozitív kontroll= nitro-BSA.

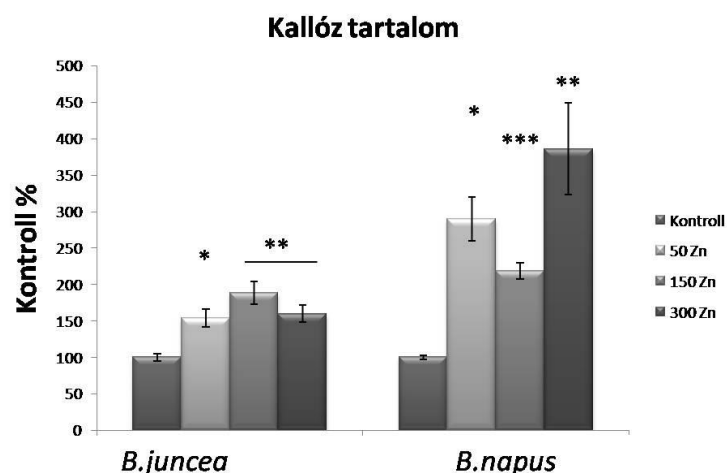
A másik makromolekula károsító folyamat a lipid peroxidáció, amit *in situ* mutattunk ki a gyökércsúcsokban Schiff-reagens segítségével. Az indiai mustárban nem volt detektálható lipid peroxidáció, az olajrepcében azonban mindhárom cink koncentráció esetén megjelent a rózsaszín elszíneződés, ami a lipid peroxidáció megtörténtére utal. (22. ábra)



22. ábra Lipid peroxidáció (rózsaszín színreakció) a *Brassica* fajok gyökércsúcsában 7 napos cinkkezelést követően.

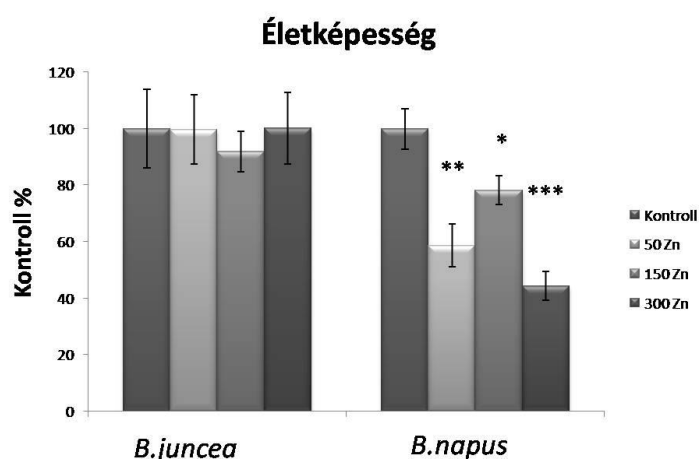
V. 6) A cink-kezelt *Brassica* növények túlélési stratégiája és a merisztéma sejtek életképessége

A magas nehézfém koncentráció enyhítésére a sejtek számos tolerancia mechanizmussal rendelkeznek, melyek közül a sejtfal módosítás egyik típusát, a kallóz berakódást vizsgáltuk. A sejtfal kallóz tartalma (anilin-kék fluoreszcencia pixel intenzitása) mindkét növényben minden cinkkoncentráció hatására jelentős emelkedést mutatott, bizonyítva a mechanizmus szerepét. A cink terhelés hatására az olajrepce gyökerében nagyobb mértékű kallóz berakódás volt megfigyelhető (23. ábra)



23. ábra A sejtfal kallóz tartalma (pixel intenzitás kontroll %-ban megadva) a *Brassica* fajok gyökércsúcsában 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$..

A merisztéma sejtek életképessége a cink terhelések hatására nem csökkent az indiai mustárban, míg az olajrepcse gyökér osztódási zónájának sejtjei jelentős cink-indukált életképesség-vesztést szenvedtek el (24. ábra).



24. ábra A gyökér osztódási zónájában található sejtek életképessége (pixel intenzitás kontroll százalékban kifejezve) a *Brassica* fajokban 7 napos cinkkezelést követően. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$.

VI. Eredmények értékelése

A keresztesvirágúak (*Brassicaceae*) családjába számos nehézfém toleráns és hiperakkumuláló növényfaj tartozik. Ennek megfelelően az általam használt kísérleti növényfajok, a *Brassica juncea* és a *Brassica napus* képesek voltak túlélni és tolerálni a felvett cinket. Az ICP-MS technika alkalmazásával meghatároztam, hogy a kezelési koncentrációkkal egyenesen arányosan nőtt a gyökérzet és a hajtás cink tartalma (2. táblázat), ami hatékony cink transzlokációra utal, bár a gyökérben egy nagyságrenddel nagyobb cink koncentrációk alakultak ki. Ebbs és Kochian (1997) eredményeivel egybehangzóan, mindkét faj cink akkumulálónak bizonyult, hiszen a felhalmozott Zn mennyisége több volt, mint hajtás

száraz tömeg 0,1 %-a. A fluorofórokkal történt szövetszintű cink lokalizáció vizsgálata során két megfigyelést tettünk: mindkét fluoreszcens festék képes volt szelektíven érzékelni a cink ionokat és kimutatta a szignifikáns cink akkumulációt a gyökérben, valamint a gyökércsúcsi merisztéma jelentős mennyiségű cinket akkumulált (6. ábra, 7. ábra), amit az itt lévő sejtek vékony, nagy áteresztőképességű sejtfalai magyarázhatnak. A konfokális mikroszkópia segítségével kimutattam a cink és a sejtfalak kolokalizációját (8. ábra), ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a *Brassica* növények a gyökérsejtjeik falában kötik meg a felhalmozott cinket (Küpper és mts. 2000). A sejtfalak metabolikus inaktivitásuk révén ideális fémkötők, így segítik a citoplazmából a toxikus fémek kizárását (Krzesłowska 2011). Szembetűnő továbbá az, hogy az epidermisz sejtek nagy mennyiségű cinket kötnek meg a falaikban, és sejthalált szenvednek el, ezáltal feltehetően enyhítik a sztele nehézfém terhelését, míg a belsőbb sejtrétegek élők maradnak. Érdekes megfigyelni a halott sejtek sejtmagjaiban felhalmozódott cinket, aminek oka a genomi DNS-hez való kötődése lehet, amit korábban Rathore és mts. (1972) is kimutattak.

A nagy mennyiségű akkumulált cink a hajtás méretének csökkenését, klorózist és nektrózist okozott (9. ábra). A gyökérzet architektúráját különböző objektív paraméterekkel jellemeztük. Mivel a növény a tápanyagfelvételt a gyökérzetén keresztül végzi, így annak méretében beálló negatív irányú változás utalhat a növény víz és nyomelem háztartásának felborulására. A gyökérzet friss tömege és a főgyökér hossza is csupán a cink-terhelt olajrepcében csökkent, míg indiai mustárban kontroll közeli értékeket vett fel (10. ábra, 11. ábra). Stresszmentes körülmények között a növény tápanyagszükséglete irányítja az oldalgyökér képződést, de stressz esetén a tolerancia mechanizmusok, mint például a sejtfal rigiditás megnövekedése is befolyásolják az oldalgyökér számot. Fokozott oldalgyökér képződést figyeltünk meg az 50 μM cink koncentrációnál mindkét fajban (12. ábra), és ez az olajrepcé esetén a főgyökér rövidülésével járt együtt (11. ábra). Vagyis az olajrepcé gyökérzetében az általunk alkalmazott legalacsonyabb cink koncentráció stressz-indukált morfogenetikai választ alakított ki (Potters és mts. 2009). Hasonló stressz-válasz fenotípus jelent meg szelén- vagy rézkezelt lúdfűben, valamint krómterhelésnek kitett búzában (Lehotai és mts. 2012, Pető és mts. 2011, Hasnain és mts. 1997). Az indiai mustárban a cink-indukált oldalgyökér szám gyarapodás mellett a főgyökér hossz nem csökkent (11. ábra, 12. ábra), vagyis egy kiterjedtebb gyökérzet alakult ki a cink többlet hatására, ami az akklimatizáció része lehet, hiszen jobb víz- és tápanyagfelvételt eredményezhet. A nagyobb cink koncentrációk sem csökkentették az oldalgyökerek számát (12. ábra), azok hosszúsága azonban szignifikánsan csökkent (13. ábra). Ez arra utal, hogy a megnyúlási és osztódási folyamatok az oldalgyökér csúcsokban érzékenyek, míg az oldalgyökér iniciációt lehetővé tévő antiklinális osztódások a periciklusban kevésbé érzékenyek a cink többletre.

A továbbiakban megvizsgáltam a reaktív oxigén- és nitrogénformák metabolizmusának néhány aspektusát, és az esetlegesen kialakuló cink-indukált oxidatív és nitrozatív stresszt. ROF és RNF szinteket, valamint a lipid peroxidációt *in situ* detektáltam a gyökércsúcsokban, az antioxidáns enzimek aktivitását és a fehérje nitrációt pedig a teljes gyökérzetben határoztam meg. A szuperoxid gyökanion szint a cink-kezelt indiai mustárban jelentősen csökkent a kontrollhoz viszonyítva feltehetőleg részben a SOD enzimaktivitásának növekedése miatt. Az olajrepcében nagymértékben megemelkedett a szuperoxid gyökanion szint a cink terhelés hatására, amit az emelkedett SOD aktivitás nem volt képes kivédeni (15. ábra, 16. ábra). A sejtben a hidrogén-peroxid főleg szuperoxid gyökanionból keletkezik a SOD enzim katalizációjával, így nem meglepő a hidrogén-peroxid tartalom csökkenése az indiai mustárban. Az olajrepcében ezek az értékek kontroll közeli szinten maradtak, kivéve a 300 μM cinkkezelést, ahol jelentős H_2O_2 akkumulációt láthatunk (17. ábra). Az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitása fordítottan arányos volt a H_2O_2 szintjével az indiai mustárban, míg olajrepcében az emelkedett hidrogén-peroxid szint csökkent APX aktivitással járt (18. ábra). Összegezve elmondható, hogy a cink többlete a ROF képződését és az antioxidáns kapacitás megváltozását eredményezi, ahogyan azt korábban cukorrépában, babban, kukoricában vagy borsóban közölték (Jain és mts. 2010, Chaoui és mts. 1997, Lozano-Rodríguez és mts. 1997). A reaktív nitrogénformák közé tartozó nitrogén-monoxid és peroxinitrit szintjei indiai mustárban szignifikáns emelkedést mutattak a kontrollhoz képest, míg olajrepcében kisebb mértékű felhalmozódást tapasztaltunk (19. ábra, 20. ábra). A cink többlet hatására bekövetkező NO képződésnek több útvonala is elképzelhető. Xu és mts. (2010) szerint a NO képződésért részben a cink-indukált vas hiány a felelős. A gyökér fő NO-ot szintetizáló enzime a nitrát reduktáz, bár ennek aktivitása a cink terhelt *Brassica* gyökerekben nem nőtt (Bartha és mts. 2005). Továbbá az átmeneti fémek hatására az S-nitrozoglutation raktárakból NO szabadulhat fel, ami magyarázhatja a cink-indukált NO képződést. A NO a szuperoxid gyökanionnal reakcióba lépve képezheti a nitráló és oxidáló ágensként ismert peroxinitritet (Arasimowicz-Jelonek és Floryszak-Wieczorek 2011). Az indiai mustár magas peroxinitrit tartalma (20. ábra) valószínűleg utal az alacsony szuperoxid gyökanion szint eredetére, mivel a gyors peroxinitrit képződés is szerepet játszhat a szuperoxid gyökanion szint csökkenésében.

A szignifikáns cink-indukált peroxinitrit képződést figyelembe véve feltételeztük a fehérje nitráció fokozódását a *Brassica* gyökerekben. A kontroll gyökérmintákban is kimutatható volt hét nitrotirozin-immunopozitív fehérje sáv (21. ábra), ami arra utal, hogy a proteinek nitrációja stresszmentes körülmények között is lejátszódik, és a nitráció a fehérjeaktivitás alapvető szabályozója. Ugyancsak a fehérjék alap nitrációs állapotát publikálták napraforgóban, citromban és borsóban (Chaki és mts. 2009, Begara-Morales és

mts. 2013, Corpas és mts. 2013). A 300 μ M Zn kezelés mindkét fajban az immunoreakció fokozódását okozta ugyanabban a hét fehérjesávban, új sávok megjelenését nem eredményezte. A nitráció fokozódását írták le só stressznek kitett olíva levelében, hideg-kezelt borsóban és vízhiányos *Lotus japonicus* növényben (Corpas és mts. 2008, Valderrama és mts. 2006, Signorelli és mts. 2013). Tudomásunk szerint azonban nehézfém hatására bekövetkező nitrációt eddig nem publikáltak, így jelen munka úttörőnek tekinthető ebből a szempontból. A nitrált tirozin oldalláncok miatt fellépő protein inhibíció és lebomlás felboríthatja a sejt metabolizmusát, így a protein nitráció fokozódása erős stresszre enged következtetni. Mindemellett a peroxinitrit felhalmozódása lipid peroxidációhoz is vezethet, aminek terméke a malondialdehid hisztokémiai módszerrel detektálható. A membrán destabilizációval járó lipid peroxidáció az indiai mustár gyökércsúcsaiban nem volt detektálható, míg az olajrepcében számottevő volt (22. ábra).

A sejtek a nehézfémek ellen tolerancia mechanizmusokat fejlesztettek ki, ilyen a módosult sejtfalba történő megkötés is. Ezt a folyamatot a kallóz berakódáson keresztül vizsgáltuk, és az adatok szerint minden kezelés növelte a kallóz depozíciót a sejtfalban (23. ábra). Ez alátámasztja a konfokális mikroszkópos eredményeket, vagyis megállapítható, hogy a kallóz cink kötése a sejtfalakban kulcsfontosságú a kísérleti növények számára. Ugyanakkor a kallóz gátolhatja a gyökér növekedését is, azáltal, hogy a sejtfal rigiditását fokozza. A növekedéshez szükséges jelmolekulák apoplasztikus transzportja ugyanis gátlódhat a kallózzal telített sejtfalakban (Piršlová és mts. 2012). A cink stressz mértéke és a tolerancia mechanizmusok hatékonysága végül a növények életképességében összesítődik. Az indiai mustár képes volt a gyökérsejtjeinek az életképességét megőrizni cink stressz alatt is, míg az olajrepcé esetén életképesség veszteséget detektáltam (24. ábra).

Az eredményeket összefoglalva, elmondható, hogy mindkét növényfaj nagy mennyiségű cinket akkumulált, és ennek legnagyobb része a gyökérsejtek apoplasztjában kötődött meg. A *B. juncea* főgyökér megnyúlását és a merisztéma sejtek életképességét a cinkterhelés nem csökkentette, ROF képződés és lipid peroxidáció nem volt detektálható a gyökércsúcsokban, a fehérje tirozin nitráció azonban a stressz hatására fokozódott. Ezekkel ellentétben a cink-kezelt *B. napus* gyökérzete gátolt növekedést, életképesség veszteséget, ROF akkumulációt, lipid peroxidációt és tirozin nitrációt mutatott.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a cink többlete másodlagos, nitro-oxidatív stresszt indukál. Az indiai mustár relatív cink tűrése, az olajrepcéhez képest a kisebb mértékű oxidatív károsodásainak köszönhető. Vagyis a *Brassica* növények cink érzékenységet a nitrozatív folyamatok kevésbé, míg az oxidatív folyamatok inkább meghatározzák.