

A növényi produktivitást befolyásoló nehézfém stressz által kiváltott védekező mechanizmusok vizsgálatáról nagyszámú publikáció jelent meg az elmúlt évtizedek során. A különböző laboratóriumok a legkülönbözőbb tesztnövényeket, az egysejtű algáktól az egy- és kétszikű növényekig, eltérő nevelési körülményeket, eltérő koncentráció tartományban alkalmazott nehézfém kezeléseket alkalmazva sajnos nem mindig összevethető kísérleti eredményeket kaptak.

Kevés kísérlet van arra vonatkozóan, hogy egy-egy védelmi reakció a növényben hogy alakul ki, milyen az időbeli lefutása, illetve ezt hogyan befolyásolja az alkalmazott fémion koncentrációja.

Munkánk során elsősorban a kadmium, réz és nikkelt hatását kívántuk vizsgálni. Kísérleteink egy része szorosan kapcsolódott egy, a NATO Science Program keretében folyó vizsgálatához. A vizsgálat egyik fő szempontja az volt, hogy É-Ny Marokkó nehézfém szennyezett száraz és vizes területeinek nehézfémhez adaptálódott ökoszisztémáiból származó növényeken (*Salix purpurea* és *Phragmites australis*) vizsgáljuk a nehézfémek (réz és kadmium) által kiváltott stressz válaszokat.

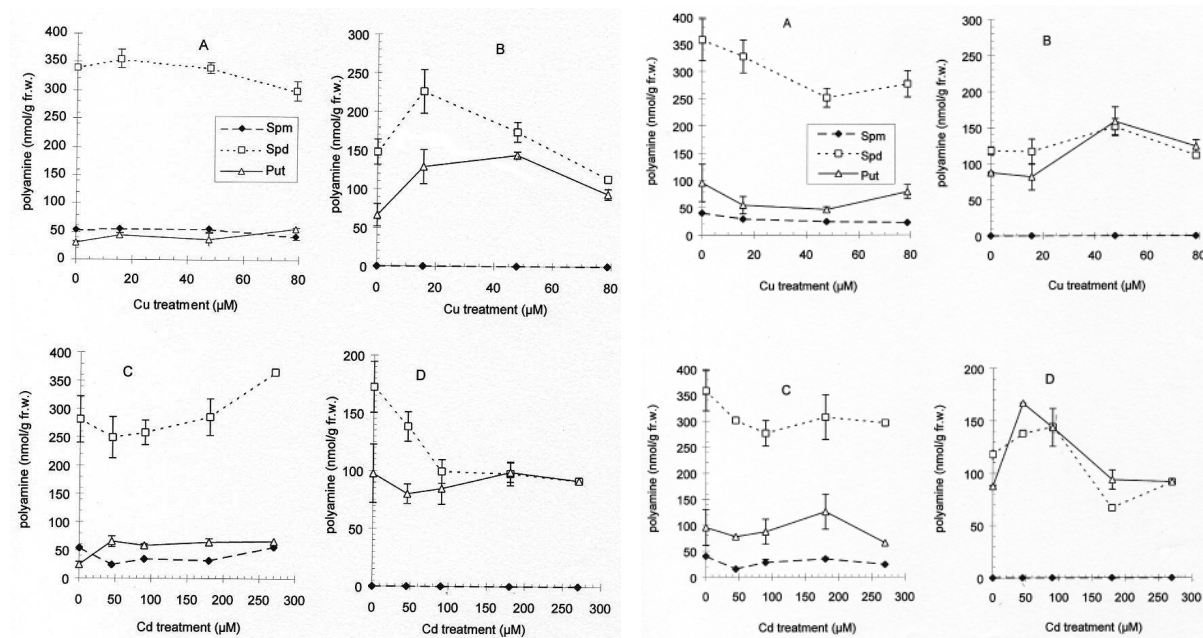
A kísérleteinkben alkalmazott növények közül a fűz, mint biológiai filter használatos ipari-szennyezett területek, iszapok tisztítására (Perttu és Kowalik 1997, Robinson és mts-i 2000), kadmiumot, cinket és rezet magas koncentrációban képes akkumulálni (Greger és mts-i 1997 és 1999, Salt és mts-i 1998). A nád elterjedten használt az ipari szennyvíztisztításban, mivel extrém körülmények között, magas nehézfém tartalmú szennyezés mellett is képes megélni (Ye és mts-i 1997, Dunbabin és mts-i 1992). A növények a marokkói M'dig Centrumból származtak, ahol szennyvíz tisztítására alkalmas ökoszisztémák hatékonyságát vizsgálják.

Az együttműködés keretében laboratóriumunk a poliaminok és az oldható cukrok felhalmozódását, illetve az antioxidáns enzimek aktivitásának változását vizsgálta. A stressz hatására a növény bizonyos metabolikus útjainak átrendezésével, metabolitok (stressz-markerek) felhalmozásával válaszol. A poliaminoknak számtalan funkció fenntartásában és optimális működésében van szerepük. Közrejátszanak a sejtosztódás szabályozásában, morfogenetikai folyamatokban, a csírázás folyamatában, gyümölcsképzésben, annak fejlődésében, de szerepük van a különböző stresszhatásokkal szembeni védelemben. A poliaminok szintje a legkülönbözőbb biotikus és abiotikus (pl. extrém hőmérsékletváltozás, szárazság, anoxia, ionhiány, sóstressz és környezetszennyezés) stressz hatására megnövekszik, így stressz-markereknek is tekinthetjük.

A *Phragmites* rhizómákat perlitben, fitotrónban 14 óra fény és 10 óra sötét periódus mellett  $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitásnál hajtattuk, majd a 21 napos hajtásokat vízkultúrában neveltük tovább. Azonos korú és méretű *Salix* ágakat 3 hétig gyökerezettünk, majd szintén vízkultúrában, fitotrónban, a fent említett körülmények között neveltük tovább. A vízkultúrák neveléséhez feles koncentrációjú Hoagland oldatot használtunk, amit a nehézfém kezeléshez különböző koncentrációban hozzáadott réz és kadmium sókkal egészítettünk ki ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 15,7  $\mu\text{M}$ , 47,2  $\mu\text{M}$  és 78,6  $\mu\text{M}$ , vagyis 1, 3 és 5 ppm, valamint  $\text{CdCl}_2$ : 44,5  $\mu\text{M}$ , 89  $\mu\text{M}$  és 133,5  $\mu\text{M}$ , azaz 5, 10 és 20 ppm). A nehézfém kezelés hatását 10 nap után vizsgáltuk. A kezelés ideje alatt a tápoldatot cseréltük és levegőztettük.

Az oldható, szabad ill. konjugált formában levő poliaminokat Flores és Galston (1982) módszerével vontuk ki és OPLC-vel választottuk el. A kapott kromatogramok kvantitatív kiértékelése 313nm-nél densitométeren történt.

Vizsgáltuk mindkét növény levelének és gyökerének poliamin összetételét és mennyiségét. Réz és kadmium kezelés hatására sem a *Phragmites*, sem a *Salix* leveleiben nem változott a poliamin tartalom.



I.ábra Nehézfémmel való kezelés hatása a *Phragmites australis* (baloldalt) és a (jobb oldalt) leveleinek (A,C) és gyökereinek (B,D) poliamin tartalmára. A,B: réz kezelés, C,D: kadmium kezelés. (Az adatok négy független mérési sorozat átlagát jelentik)

Kadmium kezelés hatására a *Phragmites australis* gyökerében csak a rézkezelés váltott ki poliamin tartalom növekedést: 47 μM, azaz 3 ppm réz a putreszcin szint 150%-os, a spermidin 70%-os emelkedését okozta. Meglepő módon a kadmium kezelés hatására nem tapasztaltunk változást a gyökér putreszcin és spermin szintjében, és a konstitutíve magas spermidin koncentráció a kadmium kezelés hatására csökkent. Ez utóbbinak oka lehet a SAM → spermidin átalakulás gátlása a spermidin szintézisében.

A *Salix purpurea* gyökerének poliamin összetételében a 47 μM rézkezelés a putreszcin szint 60%-os emelkedését okozta, az 5 és 10 ppm (44,5 μM és 89 μM) kadmium kezelés a putreszcin koncentrációjának 80%-os illetve 50% -os emelkedését okozta.

A két növényben a kadmium ionok növekvő koncentrációja különbözőképp befolyásolta az egyes poliaminok mennyiségének alakulását a gyökérben. A *Phragmites australis* levelében vagy gyökerében a kadmium kezelés, még magas, 180 μM koncentráció esetén sem okozott változást a poliamin tartalomban, annak összetételében. A *Phragmites* anoxiás körülmények között él, számos sajátos, a szárazföldi növényektől eltérő élettani folyamattal rendelkezik. Ez magyarázhatja a *Salix*, mely szintén egy fém szennyező környezetbe adaptálódott növény, esetében tapasztalt reakcióktól való eltérő stressz választ.

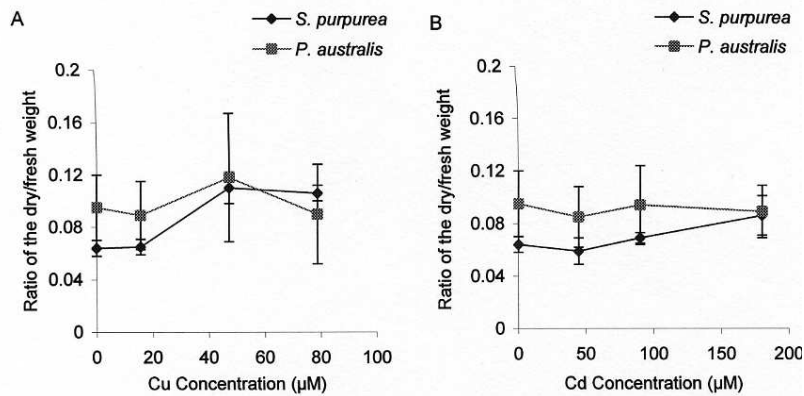
Számos cikkben (Végyvári és mts-i, 2000; Sárdi és mts-i, 1999) a szénhidrátok mennyiségének és összetételének biotikus és szárazság stressz hatására bekövetkező változását írták le. A cukrok szintjének emelkedése nehézfémmel való kezelés hatására egyaránt lehet a fotoszintézisre, respirációra, vagy a transzlokációra kifejtett hatás következménye (Greger és Bertell 1992, Sheoran és mts-i 1990). A cukrok szintjének stressz indukálta megváltozása,

mint elsődleges tápanyag és energiaraktározó vegyületek, kiemelt jelentőséggel bírnak a növényi stressz válasz és stressz tűrőképesség kialakításában és fenntartásában.

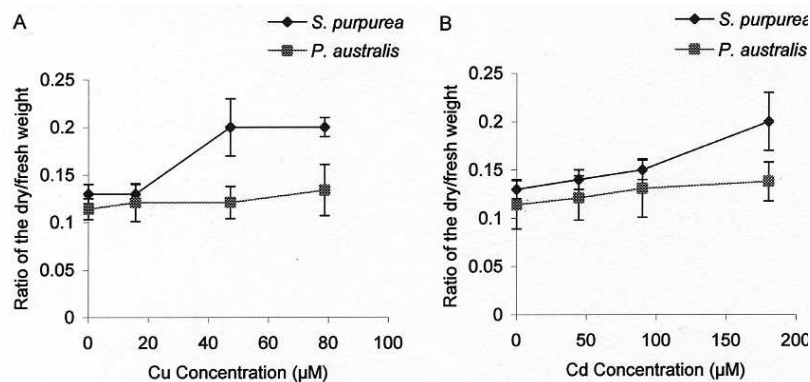
Az irodalomból ismert, hogy a kadmium kezelés hatására a növényben a transzlokáció gátlődik. Az oldható cukrok mennyiségének változását OPLC történő elválasztással, majd kvantitatív kiértékeléssel vizsgáltuk. Levél és gyökér mintákból metanollal extraháltuk az oldható cukrokat (Sárdi és mts-i 1999), majd OPLC-vel választottuk szét (acetonitril/víz 85/15), majd denzitométerrel 540nm-nél határoztuk meg a kromatogramok mennyiségét. A mintákban a szacharóz, glükóz és fruktóz volt kimutatható mennyiségben.

A rézkezelés nem okozott változást a cukor tartalom mennyiségében a nád levelében vagy gyökerében, míg a kadmium kezelés a gyökérben háromszoros szacharóz tartalomnövekedést okozott.

A *Salix purpurea* levelében és gyökerében mindhárom cukor koncentrációja megnövekedett réz és kadmium kezelés hatására. Mindkét fém jelentősen befolyásolja a *Salix* növény szárazanyag tartalmának növekedését, azaz a szárazanyag/ friss tömeg arány növekedését, valamint a hajtás és gyökér növekedését.



2. ábra: A *Salix purpurea* és *Phragmites australis* gyökerének száraz /friss tömegének változása réz kezelés hatására



3. ábra: A *Salix purpurea* és *Phragmites australis* gyökerének száraz /friss tömegének változása kadmium kezelés hatására

A fémkezelés nem befolyásolta a nád száraz/friss tömeg arányát, míg a *S. purpurea* esetében megnövelte, ami jelzi a jelentős különbséget a két növényfaj anyagcseréjében és tápanyag transzportjában. A Cd toxicitás következtében a szövetek fokozott vízvesztését leginkább a kutikula vízáteresztő képességének megváltozásával lehet magyarázni (Greger és Johansson 1992, Sheoran és mts-i 1990).

A nehézfém kezelés a növények hajtásának, gyökerének növekedését is jelentősen gátolja. A *Phragmites australis* és *Salix purpurea* gyökerének növekedése egyaránt gátolt volt réz és kadmium kezelés hatására. A hajtások növekedésének gátlása a gyökéréhez képest kisebb arányú volt, a növekedés jelentősebb csökkenése csak az alkalmazott magas fém koncentrációnál ( $79\mu\text{M CuSO}_4$  /5ppm/ és  $133,4\mu\text{M CdCl}_2$  /15ppm/) volt tapasztalható.

Total stems/shoot length (cm/plant)		Root length (cm/plant)	
willow	reed	willow	reed
31.01±5.88 <sup>a</sup> (100)	7.46±1.50 <sup>a</sup> (100)	114.04±29.88 <sup>a</sup> (100)	31.87±9.23 <sup>a</sup> (100)
28.62±9.57 <sup>a</sup> (92)	6±1.22 <sup>ab</sup> (80)	100.62±29.31 <sup>a</sup> (88)	33.42±9.52 <sup>a</sup> (105)
19.42±7.65 <sup>b</sup> (63)	5.50±1.22 <sup>b</sup> (74)	49.37±14.05 <sup>b</sup> (43)	21.98±5.63 <sup>b</sup> (69)
1.98±0.77 <sup>c</sup> (6)	4.16±1.32 <sup>c</sup> (56)	0 <sup>c</sup> (0)	4.16±1.60 <sup>c</sup> (13)
44.91 ***	12.69 ***	66.79 ***	41.31 ***

1. táblázat: A *Salix purpurea* és *Phragmites australis* növekedési paraméterei 10 napos réz tartalmú tápoldaton történt nevelés után

Total stems/shoot length (cm/plant)		Root length (cm/plant)	
willow	reed	willow	reed
31.01±5.88 <sup>a</sup> (100)	7.46±1.50 <sup>a</sup> (100)	114.04±29.88 <sup>a</sup> (100)	31.87±9.23 <sup>a</sup> (100)
25.21±6.49 <sup>b</sup> (81)	5.17±1.84 <sup>b</sup> (69)	104.21±19.54 <sup>a</sup> (91)	10.04±3.73 <sup>b</sup> (32)
15.83±5.24 <sup>c</sup> (51)	3.46±1.32 <sup>c</sup> (46)	37.33±13.81 <sup>b</sup> (33)	3.83±1.11 <sup>c</sup> (12)
8.62±3.74 <sup>d</sup> (28)	2.79±1.05 <sup>c</sup> (37)	16.54±5.57 <sup>c</sup> (15)	3.04±0.75 <sup>c</sup> (10)
39.90 ***	24.52 ***	75.03 ***	86.42 ***

2. táblázat: A *Salix purpurea* és *Phragmites australis* növekedési paraméterei 10 napos kadmium tartalmú tápoldaton történt nevelés után

A nehézfém kezelés a fotoszintetikus folyamatok fény és sötét szakaszát egyaránt gátolja, így a szénhidrát felhalmozás a levélben transzlokáció gátlásával, azaz a szövetek vízvesztésével (amit a száraz és friss tömeg arányának növekedése mutat) magyarázható. Mivel a gyökérben is emelkedett a cukrok szintje a jelenség oka nem lehet csupán a transzlokáció gátlása. Mindkét nehézfém kezelés hatására a fotoszintézis aktivitásának csökkenésénél a hajtás kismértékű, a gyökér jóval nagyobb mértékű növekedés gátlása volt tapasztalható. Ez viszont a szintetizált cukrok felhasználásának csökkenésével, azaz a cukor felhalmozódásával jár. A rézkezelés kisebb hatással volt a *Phragmites australis* gyökerének növekedésére:

a, csak a  $79\mu\text{M Cu}^{2+}$  /5ppm/ csökkentette drasztikusan (a kontroll 13%-a),

b, nem növelte meg a száraz és friss tömeg arányát

c, réz kezelés hatására nem tapasztaltunk szénhidrát felhalmozódást sem a levélben, sem a gyökérben.

A kadmium kezelés hatására a nád gyökérnövekedésének gátlása már  $44,5\mu\text{M}$  /5ppm/ koncentrációnál a kontroll 32%-ra csökkent. Ez a gyors redukció magyarázhatja a  $\text{Cd}^{2+}$  hatására bekövetkező cukor felhalmozódást a gyökérben.

Az antioxidáns enzimek érzékeny markerei a különböző biotikus és abiotikus stressz faktorok oxidatív hatására. A keletkező reaktív oxigén gyökök enzimatis úton, vagy spontán dizmutáció útján hidrogén peroxiddá alakulnak. A keletkezett  $\text{H}_2\text{O}_2$  elbontását katalizáló peroxidázok közül a gvajakol peroxidáz (POD) és az aszkorbát peroxidáz (APX), valamint az aszkorbát-glutation ciklus másik kulcsenzimjének, a glutation reduktáz (GR) aktivitásának változását vizsgáltuk.

Az enzim aktivitások Chance és Maehly (1995), Nakano és Asada (1981) és Smith és mts-i (1988) módszere szerint lettek mérve. A vizsgált mindkét növény levelében nem változott az antioxidáns enzimek aktivitása, sem réz, sem kadmium kezelés hatására. Ez ellentétben van a nehézfémre szenzitív növények esetén tapasztalt enzimaktivitás növekedéssel (Hegedűs és mts-i 2001). A *Phragmites australis* gyökérében a POD és APX enzimek aktivitása emelkedett: 5 és 10 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ , 1 és 3 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  kezelés hatására a kontrollhoz képest a duplájára emelkedett. Az alkalmazott legnagyobb koncentrációk hatására aktivitás csökkenést tapasztaltunk, aminek oka a gyökérben felhalmozódott magas fémion mennyiség okozta enzimműködés gátlás.

A *Salix purpurea* gyökérében a *Phragmites* esetében tapasztaltakkal ellentétben a POD és APX enzimek aktivitása sem réz, sem kadmium kezelés hatására nem változott, a glutation reduktáz (GR) aktivitása viszont a fémion koncentráció emelkedésével arányosa nőtt.

Tehát a két növény védelmi rendszerében különböző mértékben játszanak szerepet az antioxidatív enzimek, ami a védelmi rendszer mechanizmusának különbözőségére utal.

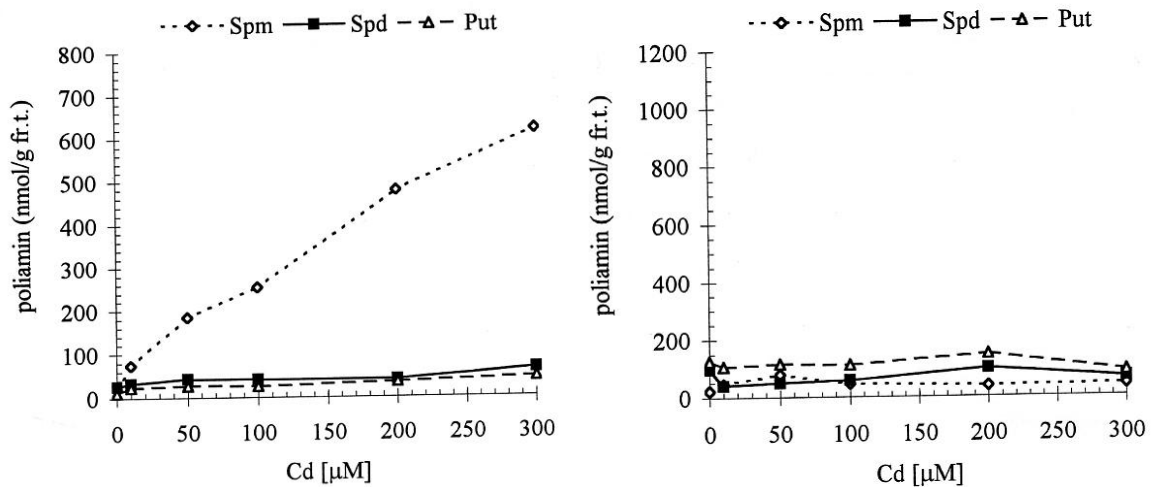
Ha a nehézfém hatására aktiválódó különböző védelmi mechanizmusokat a kezelés kezdetétől időben vizsgáljuk, egy-ugyanazon növényen, képet kaphatunk arról, hogy az egyes védelmi utak párhuzamosan, vagy egymást követően aktiválódnak-e, az aktivitásuk a kezelés során meddig emelkedik, majd cseng le.

Laboratóriumunkban már korábban számos mérést végeztünk a kadmiumnak a fejlődő árpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Triangel) csíranövényre gyakorolt hatásaival kapcsolatban. Vizsgáltuk a klorofill szintézisének, a fotoszintetikus elektron transzport aktivitásának gátlását. Jelen munkánkban vizsgálni kívántuk a poliaminoknak, mint az oxidatív stressz okozta gátló hatások egyik eliminátorának a mennyiségében, összetételében bekövetkező változásokat kadmium kezelés hatására.

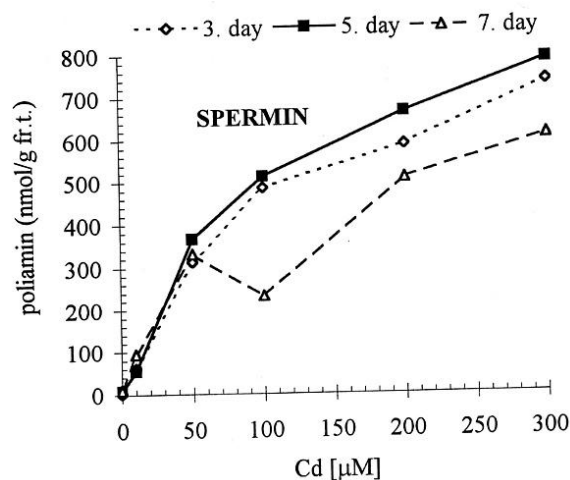
Ismert, hogy a poliaminoknak fontos szerepük van a csírázásban, a sejtsztódásban. Fontosnak találtuk, hogy megvizsgáljuk, a csírázás után (a csíráztatás 3. napja után) a fejlődő csíranövényben hogyan változik a poliamin tartalom a kontroll növényben. Azt tapasztaltuk, hogy a levélben és gyökérben a konstitutíve magas putrscin és spermidin szint a vizsgálat 10. napjára csökkent le egy standard értékre: 50-70nmol/g friss tömeg értékre a levélben és 100-150 nmol/g friss tömeg értékre a gyökérben. A spermin koncentrációja 0-50nmol/g friss tömeg volt a levélben és gyökérben.

Az árpa növény nevelését a már fentebb leírtak szerint végeztük, a kadmium kezelés 0, 10, 50, 100, 200 és  $300\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ -t tartalmazó feles koncentrációjú Hoagland oldatban történt. A kezelést követő 3., 5. és 7. napon mértük poliamin tartalmat. Nem tapasztaltunk változást a gyökér poliamin tartalmában, azonban a levélben a spermin felhalmozódás

indukálódott: már a kezelést követő 3. napon 600nmol/g friss tömeg volt a koncentrációja 300 $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> hatására (4. és 5. ábra).



4. ábra: Árpa levél és gyökér poliamin összetételének változása a kadmium kezelést követő 7. napon

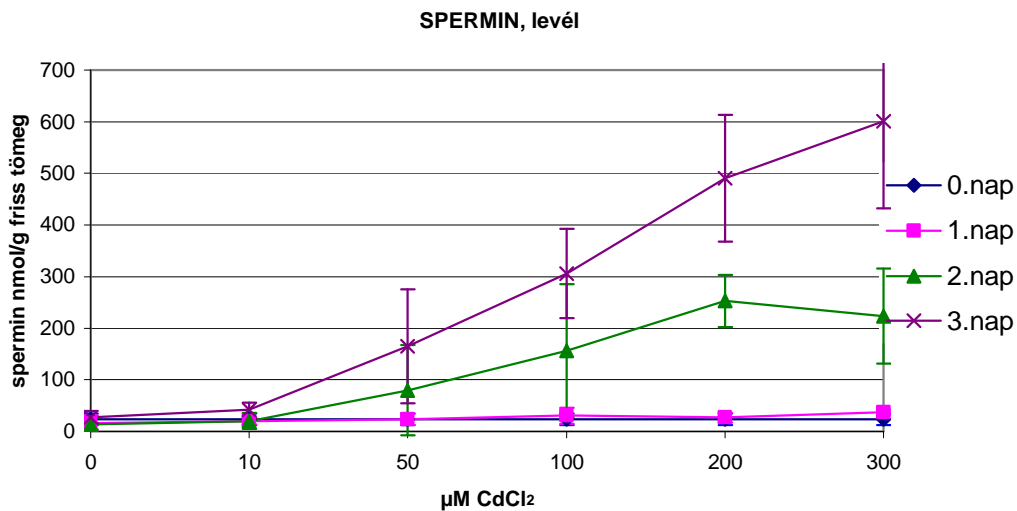


5. ábra: A spermin tartalom változása a kadmium kezelést követő 3. 5. és 7. napon.

További mérésekkel megállapítottuk, hogy a kezelést követő első 24 órában még nem emelkedik a spermin koncentrációja, ez csak a következő 24 órában következik be (6. ábra).

Bouchereau és mtsai szerint (1998) számos esetben kifejezetten a tényleges poliaminoknak (a sperminnek és a spermidinnek), és nem a diamín putreszcinnek köszönhető a stressztolerancia kialakulása. Ennek oka, hogy a diamín putreszcin és a poliaminok más mechanizmus szerint fejtik ki hatásukat. A Put a membránok depolarizációját okozza, és fokozza azok kálium áteresztő képességét. A Spm és a Spd az etilén szinézisét gátolják, akadályozva ezzel a növényi szervezet stressz hatására kialakuló rendellenes öregedési folyamatait. Ezen kívül a klorofill bomlását is csökkentik, még hozzá a spermin nagyobb mértékben, mint a spermidin. A poliaminok, mint gyöksemlegesítők is szerepelnek a stresszfolyamatokban, a Spm hatékonyabb gyöksemlegesítő, mint a Spd, ami arra utal, hogy az aminocsoportok száma ebből a szempontból meghatározó. A spermidinről és sperminről

kimutatták, hogy gátolják az ACC(aminociklopropán)–szintetáz enzim aktivitását, ami katalizálja az aminociklopropán átalakulását etilénné.



6.ábra: A spermin tartalom változása a levélben a tápoldat kadmium koncentrációjának függvényében a kezelést követő első három napon

Számos abiotikus stressz hatására a putreszcin szint emelkedését írták le, jelentős szerepet tulajdonítva az oxidatív stressz kivédésében (Langebartels 1991). A putreszcint a peroxidázokhoz hasonlóan sokan stressz markereknek tartják, azonban nem lehet a putreszcinnek elsődleges tulajdonítani a detoxifikációban. Kimutatták, hogy a spermidinnek, de különösen a sperminnek membrán stabilizáló szerepe van, aminek különös jelentősége van a tilakoid membránok működésének fenntartásában stressz körülmények között ( Popovic és mts-i 1979, Besford és mts-i 1993). A négy amino csoporttal rendelkező spermin jelentősebb superoxid megfogó, mint a putreszcin, vagy a spermidin, ami arra utal, hogy az amino csoportok szerepet játszanak a szabad gyök detoxifikálásban. A poliaminok közvetlenül, vagy közvetve szabad gyök megfogó szerepet tölthetnek be (Bors és mts-i 1989).

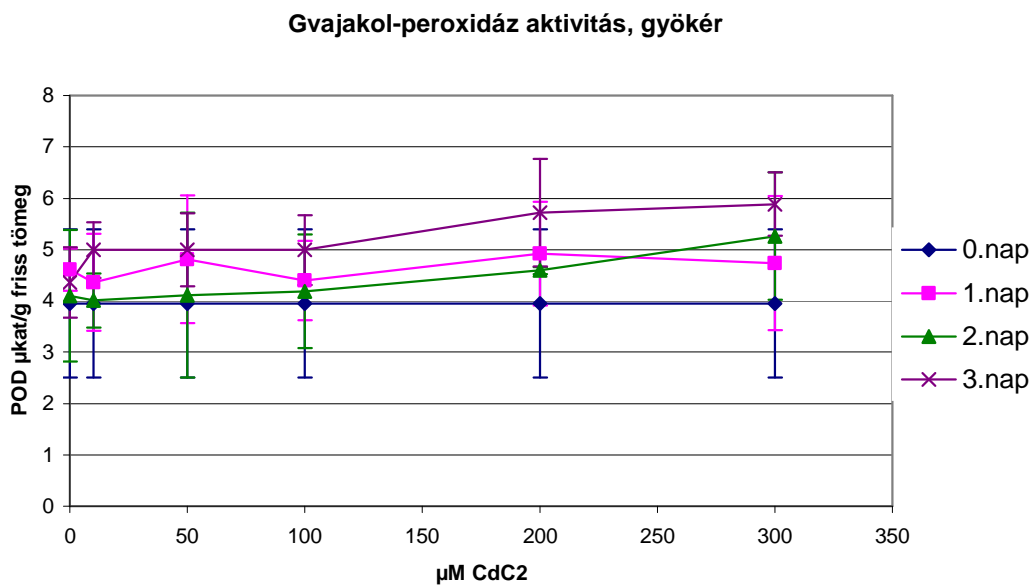
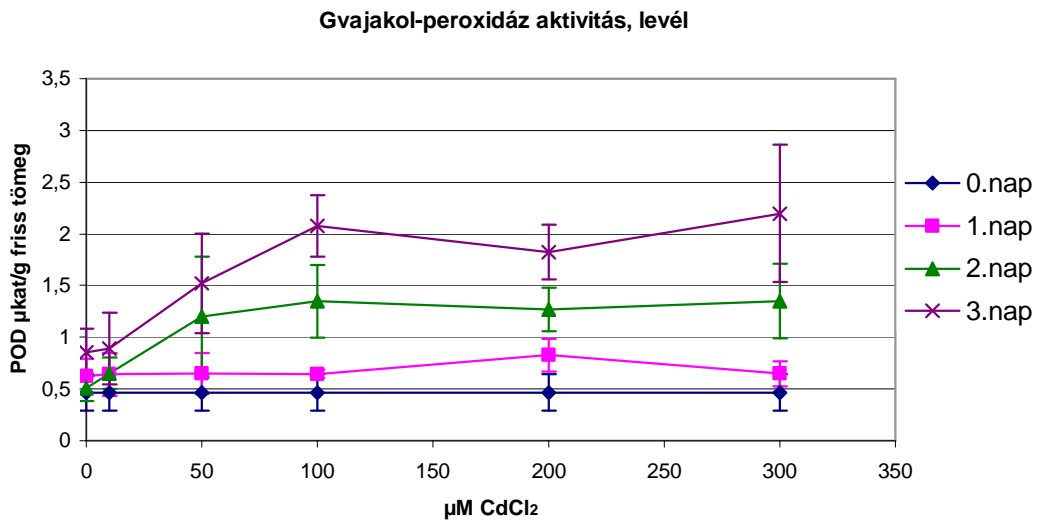
Az árpa gyökerében konstitutíve magasabb volt a putreszcin és spermidin szint, mint a spermidin. Kadmium kezelés hatására, még az extrém magas,  $300\mu\text{M CdCl}_2$  koncentráció esetén sem tapasztalhattunk poliamin koncentrációnövekedést. Ez azt is jelentheti, hogy a gyökér detoxifikációjában nem a poliaminoké az elsődleges szerep.

A levélben a poliaminok közül a spermin szintje sokkal drasztikusabban nőtt, mint a Spd vagy Put szintje. A levélben tehát a négy amino csoporttal rendelkező spermin detoxifikáló hatása érvényesül. Ennek a hatásnak a mechanizmusa, mint ismert, rendkívül összetett lehet, a sejt számos funkciójára hathat, esetleg egyidejűleg.

A kadmium stressz számos antioxidáns enzim aktivitását megváltoztatja már a hatás kezdeti szakaszában. Vizsgáltuk a gvajakol peroxidáz enzim (POD) aktivitás változását a kadmium kezelést követő első 36 órában (7. ábra)

Az árpa gyökerében majdnem egy nagyságrenddel magasabb volt az enzim aktivitása, mint a levélben, és nem változott a kadmium kezelés hatására. Hasonló megfigyelést tett Lee és mts-i (1976) és Van Asshe és mts-i (1988), akik kadmium kezelés hatására csak a levélben tapasztaltak peroxidáz enzim aktivitásnövekedést. Kísérletünkben szintén csak a levélben

tapasztaltunk POD aktivitásnövekedést. A kezelést követő második napon vált intenzívvé az enzim aktivitásának növekedése a levélben.



7. ábra: A gvajakol peroxidáz (POD) aktivitásának változása a kadmium kezelést követő első 3 napon az árpa levelében és gyökerében.

A kadmium kezelés során végig nyomon követtük a kadmium tartalom változását a gyökérben és levélben. Az első 24 órában a levélbe jutó kadmium mennyisége, még a  $300\mu\text{M CdCl}_2$  hatására sem érte el az  $50\mu\text{g/g}$  száraz tömeg koncentrációt (a gyökérben  $2000\mu\text{g/g}$  száraz tömeg volt). Ez az alacsony koncentráció még nem váltja ki a peroxidáz enzim aktivitásának megnövekedését, valamint a poliaminok szintézisének megváltozását. További vizsgálatok szükségesek, hogy tisztázzuk, a növény levélben a detoxifikációs utak közül melyek azok, amelyeknek döntő szerepük van a kezelést követő első órákban.

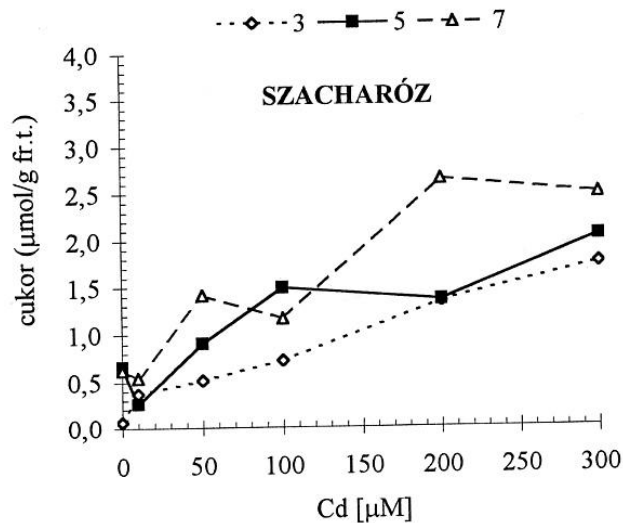


Ismert, hogy a növény sperminnel és spermidinnel való kezelése sok esetben csökkenti az oxidatív stressz okozta károsodásokat (Yamakawa és mts-i 1998, Velikova és mts-i 2000, Groppa és mts-i 2001).

Megvizsgáltuk, hogy a kadmium kezelés során az levél felületére permetezett 1mM spermin hogy befolyásolja a levél poliamin tartalmát, illetve az antioxidáns enzimrendszer enzimjei közül a POD, APX és a GR aktivitását.

A sperminnel kezelt levelekben a kadmium kisebb mértékű spermin felhalmozódást okozott, mint a kontroll, nem kezelt növények leveleiben. Lehetséges, hogy a spermin szintézis enzimatisz folyamatok gátlódik feedback mechanizmuson keresztül. Kramer és Wang 1989-ben szintén az endogén spermin mennyiségének hirtelen csökkenését tapasztalta külsőleg alkalmazott spermin kezeléssel. A vizsgált anoxidatív enzimek közül a POD aktivitását a spermin kezelés csökkentette, ami a mérsékelt oxidatív károsodással függ össze, és ez összhangban van Velikova és mts-i (2000) eredményeivel.

Az árpa növényben is vizsgáltuk a cukrok mennyiségét a csírázást követő első 15 napon. A csírázást követő 10. napon az oldható cukrok mennyisége egy standard értéket mutatott, így a kadmium kezelést 10 napos növényen végeztük. Kimértük, hogy a növény megvilágításának fény-sötét periódusában a megvilágítást követően hányadik órában van a cukrok mennyiségének optimuma, a mintavételt a megvilágítás 8. órájában végeztük. Kimutatható mennyiségben csak a szacharóz, fruktóz és glükóz jelenlétét tudtuk kimutatni a növényben. A kadmium kezelés hatására csak a levélben tapasztaltunk szénhidrát felhalmozódást: a szacharóz mennyisége növekedett meg (8.ábra).



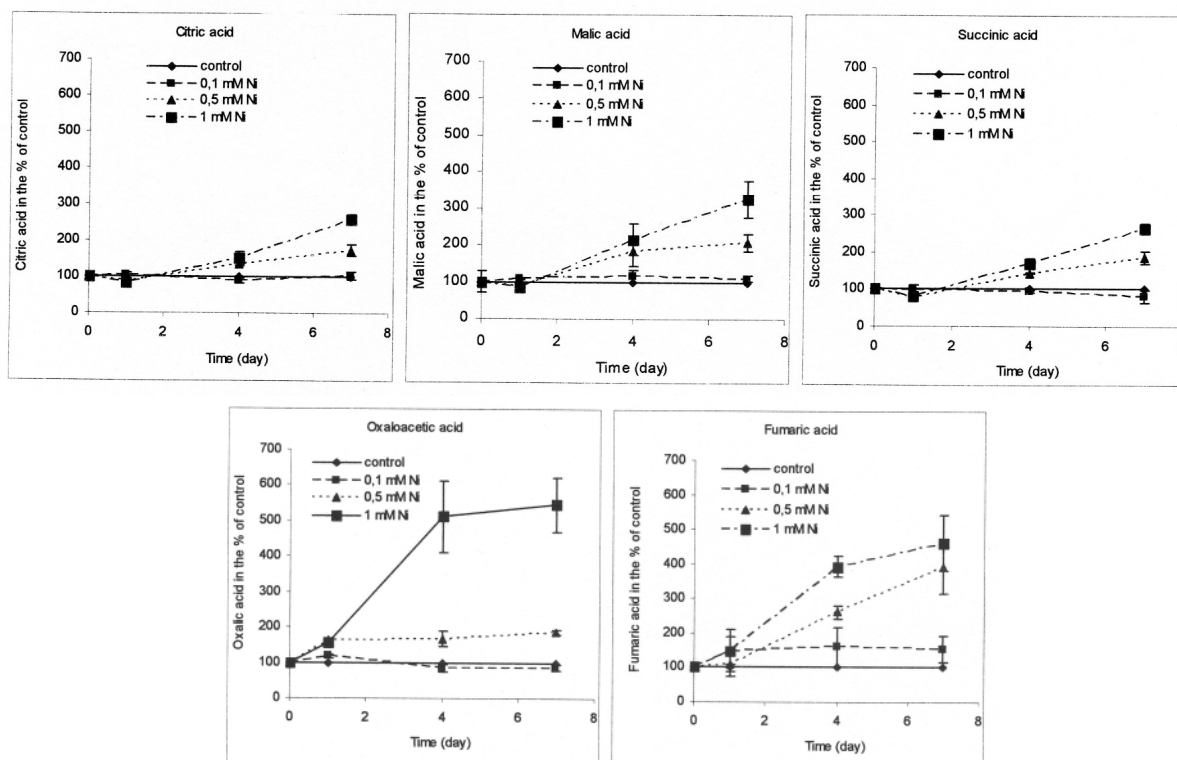
8. ábra: A szacharóz felhalmozódása árpa csíranövény leveleiben a kadmium kezelést követő első héten.

Az alkalmazott legmagasabb kadmium koncentrációnál (300μM) a kezelt növény levelében a szacharóz koncentrációja a kontroll érték hatszorosa volt már a kadmium kezelést követő 3. napon. Szükséges lenne a poliamintartalom mérésekhez hasonlóan, a kezelést követő első 2 napon is meghatározni, hogy változik a szénhidrátok szintje a levélben, mikor kezdődik el a felhalmozódás, valamint ez mennyire van összefüggésben a száraz és friss tömeg arányának növekedésével.

A nehézfémek reaktivitása rendkívül nagy a kén és nitrogén atomokon túl az oxigén atomokkal, így különböző szerves savak, illetve aminosavak potenciális ligandot jelentenek a fémek számára. Alacsony  $\text{Cd}^{2+}$  koncentrációnál a fém citromsavval képzett ligandjai alakulnak ki. Ugyancsak citromsavval képez ligandot a nikkelt a  $\text{Ni}^{2+}$ -hyperakkumuláló növényekben (Sagner és mts-i 1998). Azonban más szerves savak (pl.: almasav, oxálcetsav) is képesek a cinkkel, nikkellel vagy kadmiummal komplexet képezni és a vakuolumban felhalmozódni. (Kartz és mts-i 1989, Brooks és mts-i 1981).

Megvizsgáltuk, hogy az árpa növényben a nikkelt és kadmium hatására az egyes szerves savak szintje hogyan változik a kezelést követő első héten. A szerves savakat a növényi kivonatból HPLC-vel választottuk el.

Nikkelt kezelés hatására (0,1, 0,5 és 1mM  $\text{Ni}^{2+}$ ) a szerves savak mennyisége a levélben megemelkedett.



9. ábra: A szerves savak mennyiségének változása  $\text{NiCl}_2$  kezelés hatására az árpa levelében

Tatár és mts-i (2000) kimutatták, hogy a nikkelt kezelés megnövelte a citrom-, alma- és fűmársav mennyiségét a xilém nedvben, ami azt jelenti, hogy a szerves savak részt vesznek a nikkelt szállítási folyamatokban. Kimutattuk, hogy az árpa levelében e három szerves savon kívül az oxálcetsav és a borostyánkősav mennyisége is megemelkedett, bár valószínű, hogy a nikkelt megkötéséért közvetlenül a citromsav és az almasav felelős, de erre jelenleg nincs még közvetlen bizonyíték (Tatár és mts-i 2000, Brooks és mts-i 1981). Annak ellenére, hogy abszolút mennyiségük alacsony, érzékenységüket tekintve az oxálcetsav és fűmársav reagált leggyorsabban a növény szöveiteiben megnövekedett nikkelt mennyiségre (9. ábra). Ez a szukcinát dehidrogenáz és malát dehidrogenáz enzimek aktiválódásával magyarázható, bár a fémkezelés ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , vagy  $\text{Ni}^{2+}$ ) hatására bekövetkező aktivitás változásról ellentmondó eredmények jelentek meg az irodalomban (Bansal és Sharma 2000, Mosquót és mts-i 1996).

A kadmium hatására az almasav és borostyánkősav mennyisége emelkedett, ami e két enzim gátlásával magyarázható.

Feltételezzük, hogy a citrát ciklusban résztvevő enzimek közül e két enzim a legérzékenyebb a nehéz hatására, valamint az enzimek másképp lépnek kölcsönhatásba két fémionnal, de ezt enzim aktivitás mérésével még igazolnunk kell.

Terveztük a kadmium legfontosabb kelátorainak, a fitokelatinoknak mérését. Ismert, hogy a gyökérben a fitokelatinok szintézise a kadmium, de ólom és réz hatására is indukálódik. Szerettük volna nyomon követni, hogy a fitokelatinok mennyiségének változása, milyen mértékben korrelál a gyökér és levél nehézfém tartalmával, illetve más detoxifikáló utak aktivitásával. Célunk az volt, hogy időben együtt kövessük a fitokelatinok változását az antioxidáns enzimek aktivitásának változásával.

A méréshez szükséges feltételeket, fitokelatin standard (a régi kifogyott) szintetizáltatását, a HPLC készülék fejlesztését, csak későn tudtuk megteremteni, így a mérések még folyamatban vannak.

#### Idézett irodalom:

- Bansal P., Sharma P. (2002) Impact of lead and cadmium on enzymes of citric acid cycle in germinating pea seedlings. *Biol. Plant* 45: 125-127
- Besford R.T., Richardson C.M., Campos J.L., Tiburcio A.F. (1993) Effect of polyamines on stabilization of molecular complex of thylacoid membranes of osmotically stressed oat leaves *Planta* 189: 201-206
- Bors, N., Langebartels, C., Michael, C., Sanderman, H., ( 1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage, *Phytochemistry* 28: 1589-1595
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development *Plant Science* 140:103-125.
- Brooks R.R., Shaw S., Asesi Marfil A. (1981) The chemical form and physiological function of nickel in some Iberian *Alysum* species. *Physiol Plant* 51: 167-170
- Chance B., Maehly A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases *Methods Enzymol.* 2: 764-817
- Dunbabin Y.S., Bowner K.H. (1992) Potencial use of constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters containing metals. *The science of the total enviroment.* 111: 151-168.
- Flores H.E., Galston A.W. (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69: 707-706.
- Greger M. (1997) Willow as phytoremediator to heavy metal contaminated soil. *Proceeding of 2<sup>nd</sup> International Conferences on element cycling int he environment, Warsaw* pp 167-172.
- Greger M., Bertell G. (2000) Effect of Ca<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> ont he carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*) *J.Exp. Bot.* 43: 167-175.
- Greger M., Johanson M. (1997) Cadmium effect on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*) *Physiol. Plant.* 86:465-473
- Greger M., Landberger T. (1999) Use of willow in phytorextraction. *International Journal of Phytoremediation* 1: 115-123.

- Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P. (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf disc. *Plant Sci.* 161: 481-488.
- Hegedűs A., Erdei S., Horváth G. (2001) Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress *Plant Science* 16: 1085-1093.
- Kortz R.M., Evangelou B.P., Wagner G.J. (1989) relationship between cadmium, zinc, Cd-peptide and organic acid in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* 91: 780-787
- Kramer G.F., Wang C.Y. (1989) Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash *Physiol. Plant.* 76: 479-484
- Langebartels, C., Kerner, K. J., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W., Sanderman, H., (1991) Biochemical plant response to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco, *Plant Physiol.* 9: 882-887.
- Lee, K. C. Cunningham B.A., Paulsen, G. M., Liang, G.H., Moor K.C.: (1976) Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings *Physiol. Plantarum* 36: 4-6
- Mosquó B., Vangronsveld J., Clijsters H., Mench M. (1996) Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effect on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities. *Plant Soil* 182: 287-300
- Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Perttu K.L., Kowalik P.J. (1997) *Salix* vegetation filters for purification of waters and soil. *Biomass and Bioenergy* 2: 9-19.
- Popovic R.T., Kyle, D.J., Colen, A. S., Zalik, S., (1979) Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs, *Plant Physiol.* 64: 721-726
- Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung L.E., Green S.R., Clothier B.E., (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implication for phytoremediation. *Plant and Soil* 227: 301-306.
- Sagner S., Kneer R., Wanner G., Cosson I.P., Deus-Neumann B., Zenk M.H., (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata* *Phytochemistry* 47: 339-347.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Sárdi É., Velich I., Hevesi M., Klement Z. (1999) Ontogenesis- and biotic stress dependent variability of carbohydrate content in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Z. Naturforsch.* 54c, 782-787.
- Sheoran I., Singal H.R., Sing R. (1990) Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) *Photosynth. Res.* 23: 345-347.
- Smith J.K., Vierheller T.L., Thorn C.A. 1988 Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) *Anal. Biochem.* 175: 408-413.
- Tatár E., Mihucz G., Kmety B., Záray Gy., Fodor F. (2000) Determination of organic acids and their role in nickel transport within cucumber plants. *Microchemical Journal* 67: 73-81
- Van Assche F., Cardinaels, C., Clijsters, H., (1988) Induction of enzyme capacity in plant as a result of heavy metal toxicity: dose-response relation in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. *Environmental Pollution* 52: 103-115.

- Végyári, A., Sárdi É., Csőke B., Stefanovits-Bányai É., Szarka J. and Velich I. (2000) Chancing of carbohydrate by inoculation of *Pseudomonas savastanoi* pv. Phaseolicola on bean lines with different resistance. Int. Hort. Sci. 6: 82-85.
- Velikova V., Yordanov I., Edreva A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant system i nacid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines Plant Sci. 151:59-66.
- Yakamawa H., Kamada H., Satoh M., Ohashi Y. (1998) Spermine is a salicilate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistant against tobacco mosaic virus infection Plant physiol. 118: 1213-1222.
- Ye Z.E., Baker A.J.M., Wong M.H., Willis A.J. (1997) Zink, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin Ex. Steudel. Annals of Botany 80: 363-370.