Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Intézet
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Cd-Fe interferencia a vasháztartásban és a fotoszintézisben

PhD értekezés

Készítette:

Solti Ádám

ELTE Biológia Doktori Iskola (Prof. Dr. Erdei Anna)

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program (Prof. Dr. Szigeti Zoltán)

Témavezetők:

Dr. Sárvári Éva
egyetemi docens

Dr. Tamás László
egyetemi docens

2012.

Budapest

Rövidítésjegyzék

APX	L-aszkorbát peroxidáz
BPDS	4,7-di(4-fenilszulfonát)-1,10-fenantrolin
BSA	szarvasmarha szérum albumin
Cad	kadmium-kezelés kísérleti beállítás szerinti rövidítése
CAT	kataláz
CC	core complex
Chl	klorofill
Cit	citokróm
ΔDEEPS	a xantofill-ciklus pigmentek de-epoxidációs hányadosának fény- és sötétadaptált állapotban mért különbsége
DHA	dehidroaszkorbát
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
$\Delta F/F_m'$	a PSII reakciócentumok aktuális kvantumhatékonysága fényadaptált állapotban
F	fluoreszcencia
Fd	ferredoxin
$\Phi_{f,D}$	a fluoreszcencia és a konstitutív termális disszipáció részesedése az elnyelt fényenergia allokációjában
Φ_{NF}	a nem működőképes PSII reakciócentrumok termális kioltásának aránya az elnyelt fényenergia allokációjában
Φ_{NPQ}	a fényfüggő, ΔpH-és xantofill-mediált, szabályozott termális energiadisszipáció aránya az elnyelt fényenergia allokációjában

Φ_{PSII}	a PSII elektrontranszportjának részesedése az elnyelt fényenergia allokációjában
Fd	ferredoxin
FER	ferritin
FNR	ferredoxin:NADP oxidoreduktáz
F_v/F_m	a PSII reakciócentrumok maximális kvantumhatékonysága
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
LHC	fénygyűjtő antennakomplex (’light harvesting complex’)
MDA	malondialdehid
MDHA	monodehidro-aszkorbát
NA	nikociánamin
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
POD	peroxidáz-szupercsaládba tartozó enzimek
POX	class-III peroxidáz
PQ	plasztokinon
PS	fotoszisztéma
RC	reakciócentrum
ROS	reaktív oxigénformák
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SOD	szuperoxid diszmutáz
TEMED	tetrametil-etiléndiamin
VAZ	violaxantin+anteraxantin+zeaxantin

Tartalomjegyzék

Bevezetés 6
I. Irodalmi áttekintés 7
1. Esszenciális fémek a növényekben 7
1.1. A vas felvétele és szállítása 8
1.2. Vasháztartás a növényi sejtben 12
2. A fotoszintetikus apparátus felépítése és működése 14
2.1. A II. fotokémiai rendszer 15
2.2. A citokróm b_6/f komplex 17
2.3. Plasztocianin 18
2.4. Az I. fotokémiai rendszer 18
2.5. Az elektrontranszportlánc által szállított elektronok tárolása 20
2.6. Fotofoszforiláció 20
2.7. Chl-*a* fluoreszcencia 21
3. Oxidatív stressz és stresszvédelem 23
3.1. Reaktív oxigénformák (ROS) 23
3.2. Az oxidatív stressz elleni védőmechanizmusok 25
4. A kadmium közvetlen és közvetett hatásai a növényekben 30
4.1. A Cd^{2+} felvétele és transzportja 30
4.2. A Cd^{2+} hatása a fotoszintetikus apparátus működésére és biogenezisére 33
4.3. A kadmium és az oxidatív stressz 35
5. A stressz és stresszválasz 36
II. Célkitűzések 37
III. Anyagok és módszerek 38
1. Növényi anyag és alkalmazott kezelések 38
2. Intakt kloroplasztiszok izolálása 39

3. Iontartalom vizsgálatok 40
3.1. Növényi minták iontartalma 40
3.2. Plasztisz vastartalom vizsgálata BPDS-módszerrel 41
3.3. Vasfelvétel mérése tápoldatból BPDS módszerrel 41
4. Pigmentmeghatározás 41
5. A tilakoidok Chl-protein összetételének meghatározása 42
5.1. Tilakoidmembránok izolálása 42
5.2. Chl-proteinek izolálása és elválasztása natív gélelektroforézissel 43
5.3. SDS-PAGE (fehérjetartalom meghatározás) 43
5.4. Gélek értékelése 44
6. Kummulatív fenoloid-tartalom mérés 45
7. Levelek *in vivo* fluoreszcencia-spektruma és natív fluoreszcens mikroszkópiai vizsgálata 45
8. Fotoszintetikus aktivitás vizsgálata: fluoreszcencia indukció 45
9. Fluoreszcencia leképezés 47
10. A lipidperoxidáció mérése 48
11. Enzimaktivitások mérése 48
11.1. Aszkorbát peroxidáz (APX) 48
11.2. Szuperoxid diszmutáz (SOD) 49
11.3. Class-III peroxidáz (POX) 49
12. Mintavétel, statisztikai elemzések, illesztések 50
IV. Eredmények 51
1. Hosszú idejű kadmium-stressz-indukálta változások nyárfában 51
1.1. A növekedési paraméterek változása 51
1.2. A kadmium hatása az elemakkumulációra 52
1.3. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségében és arányaiban kimutatható változások 55
1.4. A fotoszintetikus aktivitást jellemző paraméterek változásai 58

1.5. Tilakoid összetétel 61

1.6. Védelmi mechanizmusok aktiválódása hosszabb távú kadmium-expozíció alatt 64

2. Az akut kadmium-stressz tüneteinek regeneráltatása megemelt vasellátással 75

2.1. A vas és kadmium felvétele 75

2.2. A fotoszintetikus pigmentek változásai 79

2.3. A fotoszintetikus elektrontranszport működése 83

2.4. A tilakoidmembránok összetétele 85

V. Az eredmények megvitatása 87

1. Fe-Cd kölcsönhatás hatása a vasfelvételre, -transzlokációra és a sejtszintű vas-homeosztázisra 87

1.1. A vas felvétele 87

1.2. A kadmium-stressz által okozott zavarok a vas-transzlokációjában 88

1.3. A Cd-stressz hatása a kloroplasztiszok vastartalmára 90

2. A fotoszintetikus struktúrák Cd-stressz-indukálta károsodása és helyreáll(ít)ása 91

2.1. Az akut Cd-stressz 91

2.2. Az akut károsodások mesterséges helyreállítása 94

2.3. Spontán helyreállás hosszú távú Cd-expozíció alatt 97

3. Védekezés tartós Cd-expozíció alatt: az oxidatív károsodások elleni védelem 99

4. A Cd-Fe interferencia összegzése 103

VI. Összefoglalás 104

VII. Summary 105

Köszönetnyilvánítás 106

Referenciák 108

Appendix 133

Bevezetés

A növények életműködéseikhez számos átmeneti fém jelenlétét igénylik. Közülük kiemelendő a vas, amelynek fizikai-kémiai tulajdonságai teszik lehetővé részvételét az elektronátmenettel járó redox-folyamatokban, ezért legnagyobb mennyiségben hem, illetve Fe-S centrumok formájában található meg. Más nem-esszenciális átmeneti nehézfémek, így a kadmium is, mérgezőek a növények számára. A Cd^{2+} szabad ionként fordul elő a természetben és kompetál a vas-anyagcseréjével. Ennek következtében a kadmium-toxicitás egyik kiemelkedően fontos tünete a hajtásban kialakuló erős vashiány: a kadmium-mérgezés növényekben jellegzetes (vas)klorózist okoz a csökkent vas-transzlokáció következtében. Vas hiányában gátolt a klorofillok és a pigment-protein-komplexek szintézise, ami a fotoszintetikus apparátus fejlődésének és működésének zavarát okozza. A működést szempontjából a kadmium jelenlétére a II., míg a vashiány hatására az I. fotokémiai rendszer működése az érzékenyebb. A kadmium-mérgezés, e hatások eredőjeként, végül drasztikusan csökkenti a fotoszintetikus elektrontranszportlánc hatékonyságát. Korábbi vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a kadmium-stressz helyreállítható a vasellátás növelésével. A vas-homeosztázis változásának szerepe a kadmium-okozta károsodások helyreállításában, illetve a szubletális dózisú Cd^{2+} hosszabb távú eltűrésében azonban még kevéssé ismert. Ezért választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a krónikus kadmium-stressz megváltoztatja-e a vas leveleken belüli lokalizációját, illetve milyen összefüggés van a fiziológiai funkciók helyreállása, és a levelek vastartamának növekedése között a mesterséges regeneráltatás során?

A kadmium toxicitásához, a vashiányon kívül, jelentősen hozzájárul az oxidatív stressz is. Mivel a Cd^{2+} vegyértékváltásra nem képes nehézfémion, az oxidatív stressz kialakulása indirekt mechanizmusokkal hozható összefüggésbe. Minden szubletális dózisú stressz azonban védelmi mechanizmusokat indukál, melyek a stressz hosszú távú eltűréséhez is elvezethetnek. Meg kívántuk vizsgálni tehát, hogy a krónikus Cd-stressz kivédésére milyen védelmi mechanizmusok indukciója figyelhető meg, illetve, hogy milyen ok-okozati összefüggés mutatható ki a hosszan tartó kadmium-stressz alatt a metabolikus változások helyreállása közt?

I. Irodalmi áttekintés

1. Esszenciális fémek a növényekben

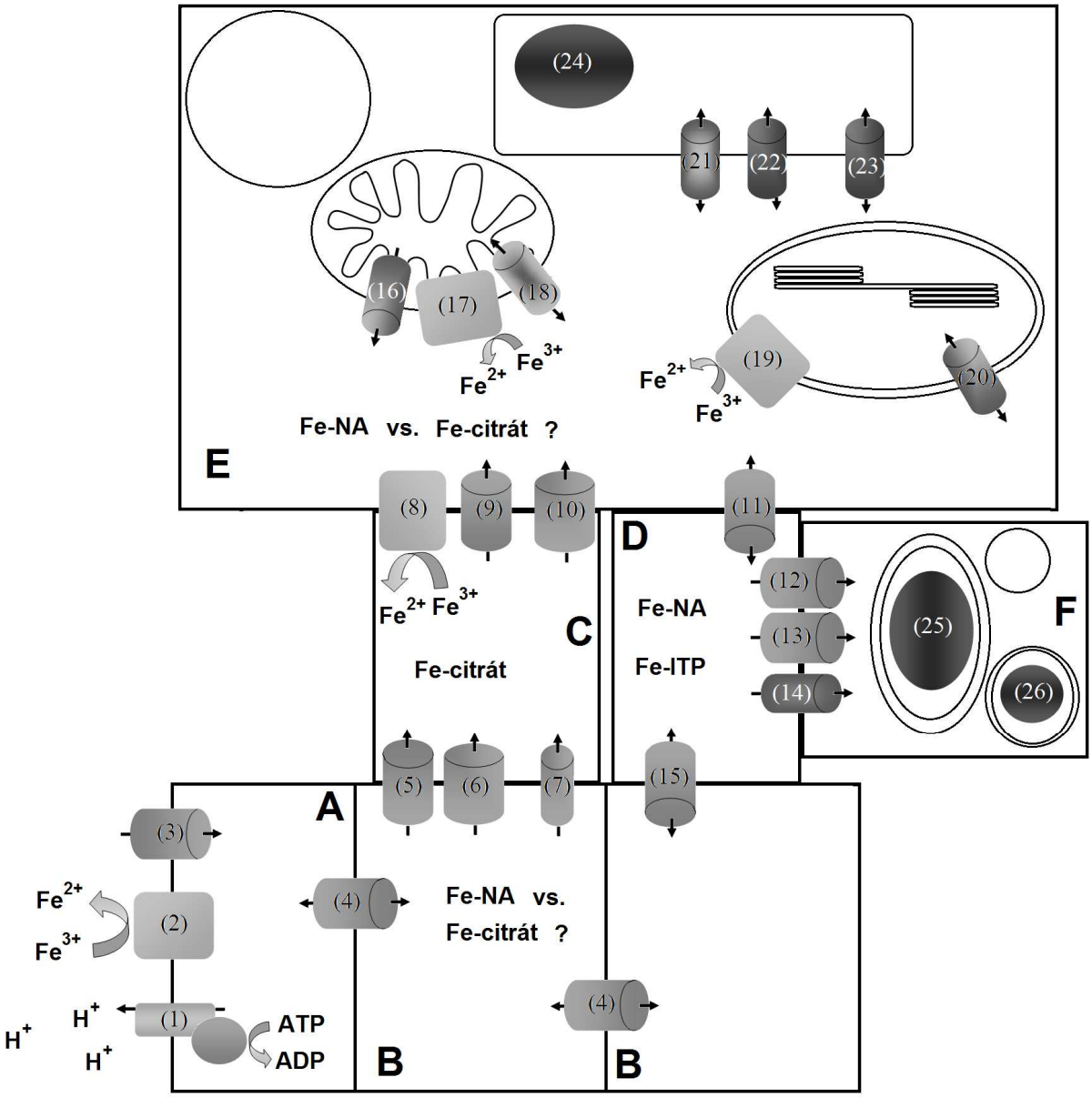
A legtöbb élő szervezetben, így a növényekben is, számos átmeneti fém rendkívül fontos szerepet tölt be, melyek közül a réz, a mangán és a vas redoxtulajdonságai lehetővé teszik, hogy az élő szervezetben adott körülmények közt is részt vegyenek elektronátmenettel járó redox- és elektrontranszport-folyamatokban. Kiemelkedő a vas (Fe^{2+}/Fe^{3+}), a réz (Cu^{+}/Cu^{2+}) és a mangán ($Mn^{2+}/Mn^{3+}/Mn^{4+}$) szerepe, melyek kulcsfontosságú funkciókat látnak el mind a fotoszintetikus, mind a légzési elektrontranszportláncon belül (Raven *et al*., 1999, Merchant, 2006). Vegyértékváltó réz-iont koordinál például a fotoszintetikus elektrontranszportlánc elektronszállítója, a plasztocianin, de a terminális oxidációban is nélkülözhetetlen a mitokondrium citokróm (**Cit**) a/a_3 komplexében. A mangán szerepe növényekben szintén szerteágazó, számos enzimben kofaktorként van jelen (Mukhopadhyay és Sharma, 1991). Legnagyobb mennyiségben a II. fotoszisztéma (**PSII**) vízbontó centrumában található, ahol $Mn^{2+}/Mn^{3+}/Mn^{4+}$ vegyértékváltásokkal a vízmolekulák kovalens kötéseinek lazításában és az oxigénevolúcióban van kiemelkedő szerepe. Emellett nagyobb mennyiségben fordul elő a szuperoxid-diszmutáz (**SOD**) enzimek MnSOD izoformájának kofaktoraként is. A vas legnagyobb mennyiségben hem, illetve Fe-S centrum formájában, fehérjék prosztetikus csoportjaiban található (Hell és Stephan, 2003). Kisebb mennyiségben azonban más formában is előfordul, mint például a PSII-ben az akceptor-oldali nem-hem vas, vagy koordinált ionként a FeSOD-ban. A FeSOD, a MnSOD és a Cu/ZnSOD kulcsfontosságú szerepet töltenek be az oxitadív stressz elleni védelemben, így a sejtfalban, citoplazmában, peroxiszómákban, mitokondriumokban és a kloroplasztiszokban. A fotoszintézis során keletkező nagy mennyiségű, erősen reaktív szuperoxid-anion-gyök eltüntetésében az aszkorbinsav-peroxidázokkal kooperálva, a víz-víz ciklus részeként vesznek részt (Asada, 2006). Mindent összevetve azonban a vasnak a hajtásban mért mennyisége és kofaktorként betöltött szerepe messze a legfontosabbá teszi a mikrotápelemeknek is nevezett fémionok között. A vashiányos növények jellegzetes, (vas)klorózis-tünetegyüttest produkálnak (Marschner, 1995), amely a levélerek környezetében magasabb klorofill-tartalmú, zöldessárga-sárga lomblevelek fejlődésében, a csökkent növekedésben és termésfejlődésben – szélsőséges esetben a levelek kifehéredésében és a növények pusztulásában nyilvánul meg. E tünetek legfőbb oka, hogy a vas eddig említett élettani szerepein kívül alapvető szerepet játszik a klorofill (**Chl**)-

bioszintézisben is. A bioszintetikus útvonalban szereplő Mg^{2+}-protoporfirin-IX-monometil-észter oxidatív cikláz ugyanis egy a számos vastartalmú kofaktorral működő oxidoreduktáz enzim közül (Spiller *et al*., 1982). A vashiánnyal szemben ugyanakkor, a szabad vas nagy mennyiségű felhalmozódása, hasonlóan más, esszenciális nehézfémekhez (réz, mangán, cink, molibdén, nikkel), erőteljes nehézfém-mérgezést vált ki növényekben. Ezek egyik legfontosabb tünete az oxidatív terhelés mértékének drasztikus emelkedése (Briat *et al*., 2010b). A szabaddá váló vas és a vegyértékváltásra képes réz ugyanis részt vehetnek az igen veszélyes, oxidatív gyököket termelő Fenton-reakciókban (Winterbourne 1995). Ezért nem-stresszelt körülmények között minden, az élő szervezetben vegyértékváltásra képes fém, így a vas szabadon nem, csak szerves molekulákkal komplexet alkotva, vagy kelátok formájában lehet jelen. A növények, hogy elkerüljék a nagymértékű nehézfémion-felhalmozást, erőteljesen szabályozzák a nehézfém-ionok felvételét és szervezeten belüli szállítását.

1.1. A vas felvétele és szállítása

A legtöbb növény számára 10^{-9} – 10^{-4} M talajban mérhető vaskoncentráció az optimális. Azt azonban, hogy a talajból mennyi vasat vehetnek fel, a talaj vaskoncentrációján kívül számos egyéb tényező is befolyásolja. Lúgos pH-n, oxigén jelenlétében, a vas vízben oldhatatlan $Fe(OH)_3$ csapadékot alkot, mely így elérhetetlenné válik a gyökérsejtek számára. A vasfelvétel nehézségeinek leküzdésére két vasfelvételi rendszer alakult ki a növények két különböző csoportjában, mely stratégiák révén, eltérő módon bár, de vízben oldható formájúvá alakítják a talaj vastartalmát (Morrissey és Guerinot, 2009, Abadía *et al*., 2011). A növények nagy része, így a kétszikű zárvatermők (tehát a *Populus*-fajok is) és az egyszikűek egy jelentős része, redukálja a talaj ferri- (Fe^{3+}-) vegyületeinek vastartalmát, és az így szabaddá váló ferro-vasionokat (Fe^{2+}) veszik fel a gyökérepidermiszen keresztül (I. stratégia, 1. ábra). A pázsitfüvek (*Poaceae*) túlnyomó többsége viszont szerves kelátorokat választ ki a talajba, melyek stabil $Fe^{(III)}$-komplexet alkotnak a talajoldatban lévő vassal. Gyökereik ezeket a szerves kelátorok által komplexált vasat veszik fel (II. stratégia). Az I. stratégiát követő növényeknél a vasfelvételben fontos szerepet játszanak a gyökérepidermisz plazmamembrán P-típusú ATPázai is, melyek H^+-okat juttatva a talajoldatba savanyítják azt, így is növelve a talaj vastartalmának hozzáférhetőségét (Römheld és Marshner, 1986). A folyamatban az *Arabidopsis* növényekből ismert, P_3A-típusú AHA-családba tartozó H^+/ATPázok játszanak

szerepet (Hell és Stephan, 2003, Kim és Guerinot, 2007). A talaj Fe^{3+}-tartalmának szabad Fe^{2+} ionokká történő redukálásában a gyökér-epidermiszsejtek plazmamembránjában lokalizált ferri-kelát reduktáznak (Ferric Chelate Reductase Oxidase, **FRO2**) van szerepe. A FRO2 expressziója vashiány hatására erőteljesen fokozódik a gyökerekben (Wu *et al*., 2005). A redukált és szabaddá vált Fe^{2+} ionok ezután egy nagy affinitású Fe^{2+}-transzporteren, a **ZIP**-családba (Zinc-Iron Proteins) tartozó **IRT1**-en (Iron Regulated Transporter 1) keresztül vevődnek fel a gyökérepidermisz szimplasztjába (Mäser *et al*., 2001). Élesztő mutánsokban sikerült kimutatni, hogy az IRT1 a Fe^{2+} felvétele mellett szerepet játszik a Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} és Cd^{2+} transzportjában is (Korshunova *et al*., 1999). A szabad gyökök generálását elkerülendő, a felvett vasat szerves molekulák komplexálják a gyökér szimplasztban, így redox-aktivitása jelentősen lecsökken. A citoplazma vasat komplexáló kelátorai kevéssé ismertek (Abadía *et al*., 2011), az egyik jelölt közülük a magasabbrendű növényekben általánosan előforduló nikociánamin (**NA**, Scholz *et al*., 1992). A NA a fitosziderofórok bioszintetikus útvonalának egyik elágazásán szintetizálódik. Magasabb pH-n mind a Fe^{2+}-t mind a Fe^{3+}-t képes komplexálni, de a hidroxi-formákkal szemben a $Fe^{(II)}$-NA mutat nagyobb különbséget a stabilitásban. A $Fe^{(II)}$-NA komplexeknek kiemelt szerepe lehet a gyökér szimplasztba kerülő Fe^{2+} redox-aktivitásának semlegesítésében (Rellán-Álvarez *et al*., 2008). Emellett, a $Fe^{(II)}$-NA komplexek fontos szerepet tölthetnek be a gyökérepidermisz és a xilémparenchima közötti vastranszportban is, miként a floémben is $Fe^{(II)}$-NA komplex formájában mozgó vasat tételez fel sok szerző (Shi *et al*., 2011). A $Fe^{(II)}$-NA komplexek membránokon keresztül történő transzportjában a Curie *et al.* (2001) által leírt **YSL** (Yellow Stripe-Like) transzportereknek van szerepük, melyek az **OPT** (Oligopeptide Transporter) transzporter-családba tartoznak. (A NA voltaképpen egy nem-proteinogén aminosav). Az YSL transzporterek közül az YSL1 kukorica (*Zea mays*) levélben, míg az YSL2 az *Arabidopsis* gyökerek endodermiszének a plazmamembránjában és periciklus-sejtjeiben expresszálódik (Schaaf *et al*., 2005), így itt jelentős szerepe lehet a gyökerek laterális vas-mozgatásában. A gyökéren kívül kimutatták expresszióját levelek xilémparenchima sejtjeiből is (Di Donato *et al*., 2004). Bár a gyökér vas-transzportjáról egyre többet tudunk, de a vas xilém-elemekbe történő bejutásának folyamata máig nem ismert (Abadía *et al*., 2011). Egyes elképzelések szerint szerepe lehet ebben a folyamatban az **IREG1** (Iron-Regulated) transzporternek (Kim és Guerinot, 2007), de YSL közvetítette Fe-NA transzport is elképzelhető (Abadía *et al*., 2011).



1. ábra: A vas felvétele és transzportja növényekben. A transzporterek és a felvételben/transzportban szerepet játszó enzimek részletes leírását ld. a szövegben. A – gyökérepidemisz/gyökérszőr, B – gyökér kortex, C – xilém, D – floém, E – mezofillum, F – fejlődő embrió. Az ábrán szereplő transzporterek: (1) AHA(X),(2) FRO2, (3) IRT1, (4) YSL2, (5) YSL(2), (6) IREG1, (7) FRD3, (8) FRO6, (9) YSL1, (10) IRT2, (11) YSL(1), (12) YSL(1), (13) YSL3, (14) OPT3, (15) YSL(2), (16) STA1, (17) FRO8, (18) feltételezett mitokondriális Fe-transzporter, (19) FRO7, (20) PIC1, (21) VIT1, (22) NRAMP3, (23) NRAMP4, (24) FER1/3/4, (25) FER2, (26) FXN - frataxin.

A xilémnedv savas pH-ján (pH 5,5-6) a Fe^{2+} pillanatszerűen Fe^{3+} ionná oxidálódik, majd stabil citrátkomplexxé alakul. A xilémnedvben a vas $Fe^{(III)}{}_3$citrát$_3$ komplexek formájában mutatható ki, amelyek elsődleges szerepet játszanak a xilémbeli traszlokációban (Rellán-Álvarez *et al*., 2010). A vas szállításában kiemelt szerepet játszó citrátot a **MATE** (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) családba tartozó **FRD3** (Ferric Reductase Defective) citrát transzporter juttatja a xilémnedvbe (Durrett *et al*., 2007). Bár a xilémnedvből NA is kimutatható, de az alacsony pH mellett vassal nem alkothat stabil komplexet, ezért inkább a Cu^{2+} transzportjában vehet részt (Yruela, 2005). A levelekbe szállított vas-citrát komplexekből a levél mezofillum-sejtjeinek vasfelvétele jóval kevésbé ismert folyamat (Abadía *et al*., 2011, 1. ábra). A vas xilémből történő kilépése a parenchima-sejtek által közvetített folyamat is lehet, de apoplasztikus, transpirációs áram által hajtott diffúzió is (Abadía *et al*., 2011). A legtöbb növény minden bizonnyal egy redukciós lépés után szabaddá váló Fe^{2+}-t vesz fel sejtjeibe, bár nem kizárt, hogy mind Fe^{2+}, mind Fe^{3+} felvételére is képesek (Nicolić és Römheld, 2007). A szállítónyaláb körül számos YSL, FRO és ZIP családba tartozó fehérje expresszióját mutatták ki (Wu *et al*., 2005, Jin *et al*., 2007, Ogo *et al*., 2007, Rellán-Álvarez *et al*., 2010). A vas-citrát komplexek redukciójában a levél mezofillum-sejtjei által expresszált FRO oxidoreduktázoknak tulajdonítanak szerepet (FRO6) (Jeong és Conolly, 2009). A redukált vasat nagy valószínűség szerint a ZIP-családba tartozó vastranszporterek veszik fel a plazmalemmán keresztül, azonban nem zárható ki $Fe^{(II/III)}$-NA komplexek felvétele sem (Briat *et al*., 2007, Abadía *et al*., 2011). A reproduktív szervekben, magokban az YSL1 és az YSL3 expressziója lehetővé teszi a $Fe^{(II/III)}$-NA komplexek felvételét, mely az egyetlen felvehető vasforma lehet azokban a szövetekben, ahova nem hatolnak be xilém-elemek (Atkinson és Guerinot, 2011). Minden fiatal szövetben, ahol a xilém nem, vagy csak fejletlen formában van jelen, nagy szerepe van a floémen keresztüli vastranszportnak is, melyről csak nagyon korlátozott információk állnak rendelkezésre. Elméleti meggondolások alapján ott is a $Fe^{(II/III)}$-NA komplexek jelenléte és mozgása valószínűsíthető. A floémben mérhető magasabb pH mellett (pH>7) a vas **ITP** (Iron Transport Protein) proteinekhez is kapcsolódhat és valószínűleg így szállítódik (Tiffin, 1966). Savas pH-n (xilémnedv, sejtfal) azonban a szerves sav komplexek stabilitása magasabb, így ezek jelenléte és felvétele lehet meghatározó. Az ITP proteinekhez kapcsolt vas transzportjában lehet szerepe a közelmúltban azonosított, generatív szervekben expresszálódó OPT3 (OligoPeptid Transzporter 3) fehérjének is (Puig és Peñarrubia, 2009). A mezofillum-sejtek szimplasztjában a vas

valószínűleg mind $Fe^{(III)}$-citrát, mind $Fe^{(II/III)}$-NA komplexek formájában előfordul (Weber *et al*., 2007), de jelentőségük a sejten belüli vas-anyagcserében még nem tisztázott.

1.2. Vasháztartás a növényi sejtben

A növényi sejtben számos organellum- és citoplazmatikus enzim igényel vasat a működéséhez, jelenléte esszenciális. A szimplaszt vas-homeosztázisa erősen szabályozott: a felvett vas a sejten belül felhasználási helyére transzportálódik, illetve rezervoárokban tárolja a sejt a későbbi felhasználásig. A vas transzportja és homeosztázisa azonban nemcsak sejt, de organellum-szinten is erős kontroll alatt áll, így többek között a kloroplasztisz és a mitokondrium vas-anyagcsere mutációi is letális fenotípust eredményeznek (Duy *et al*., 2007, Vazolla *et al*., 2007). A sejten belüli vastranszport és -homeosztázis működéséről azonban csak korlátozott ismereteink vannak (Morissey és Guerinot 2009, 1. ábra). A vakuólum esszenciális szereppel bír a vasháztartásban, elsősorban a vas inaktív formában történő tárolásában (szekvesztrációjában) (Lanquar *et al*., 2005). A vakuoláris transzporterek csak részben ismertek. A vakuólumok Fe-felvételében a **VIT1** (Vacuolar Iron Transporter) fehérjének van kiemelt szerepe (Kim *et al*., 2006). A vakuólum vasháztartásában, elsősorban a magvak csírázása során, kimutatták még az **NRAMP** (Natural Resistance Associated Macrophage Proteins) családba tartozó NRAMP3 és NRAMP4 transzporterek fontosságát is, melyek mind a vas felvételében, mind leadásában közreműködnek, (Lanquar *et al*., 2005). A vakuólumban felhalmozott vas tárolása ferritin (**FER**) fehérjék segítségével történik (Briat *et al*., 2010a).

A mitokondriumok szintén nagy mennyiségű vasat igényelnek mind az elektrontranszportlánc, mind a szolubilis enzimek működéséhez (Vigani, 2012). A vastartalmú kofaktorok (hem, Fe-S centrumok) szintézisére a növényi mitokondriumok azonban csak korlátozottan képesek (Tanaka és Tanaka, 2007), így vas-anyagcseréjükben jelentős szerepe lehet a plasztisz-eredetű vas-tartalmú kofaktorok importjának is. A mitokondriumok frataxin-jellegű fehérjéi is részt vehetnek a vas tárolásában. A növényi mitokondriumok vas-transzporterei kevéssé ismertek. Ismert, hogy a felvételben fontos szerepet játszik a burkolómembránban elhelyezkedő FRO8 ferri-kelát reduktáz enzim (Heazlewood *et al*., 2004), mely mutatja, hogy a növényi sejt vasfelvételéhez hasonlóan a mitokondriális vasfelvételt is egy redukciós lépés előzi meg. A közelmúltban azonosították az

első, mitokondriális vasfelvételben szerepet játszó transzportert (MIT: Mitochondrial Iron Transporter, Bashir *et al*., 2011). Kizárólagos szerepét a mitokondriumok vasfelvételében az mutatja, hogy hiányában nincs mitokondriális Fe-S centrum szintézis, valamint az olyan szén-anyagcserében esszenciális enzimek, mint az akonitáz aktivitása jelentősen csökken.

A kloroplasztiszok vasfelvétele kiemelt jelentőségű, mivel a zöld növényi szövetekben a vas közel 80-90%-a kloroplasztiszokban található (Terry és Abadía, 1986, Morrissey és Guerinot, 2009). A tilakoidmembránok, önmagukban, a teljes vastartalom közel 60%-át tartalmazzák (Castagna *et al*., 2009). Vas hiányában a plasztiszokban megszűnik olyan, oxidoreduktáz enzimekben nélkülözhetetlen kofaktorok, mint a citokrómok illetve a Fe-S centrumok (Fe-S centrumok) bioszintézise. Hiányukban mind a Chl-bioszintézis, mind a pigment-protein-komplexek szintézise, azaz végső soron a tilakoidmembránok biogenezise erősen gátolttá válik (Andaluz *et al*., 2006, Timperio *et al*., 2007). A kloroplasztiszok vasfelvételének mechanizmusa alig ismert folyamat. Eddig egy prokarióta eredetű csatornafehérje a **PIC1** (Permease In Chloroplasts) (Duy *et al*., 2007) és egy burkolómembránban lokalizált, eukarióta eredetű ferri-kelát reduktáz (FRO7) (Jeong *et al*., 2008) közreműködését mutatták ki a folyamatban. A plasztiszokban lokalizált vas nagy része hem koordinációban és Fe-S centrumokban található. Stressz-körülmények között, illetve magvak raktározó plasztiszaiban a FER-kötött vas is megjelenik (Balk és Lobréaux, 2005, Briat *et al*., 2007). A hem-csoportok fontos funkcionális szereppel bírnak a citokrómokban, de megtalálhatóak a peroxidázok több családjában is (Briat *et al*., 2007, Asada, 2006). A Fe-S centrumokat tartalmazó fehérjék közé tartoznak a plasztiszokban a N- és S-anyagcsere meghatározó enzimei (nitrit reduktáz, szulfit reduktáz), a ferredoxinok, a Rieske-féle protein, a PsaA és a PsaB, a **TIC55** (Translocon of Inner Envelope of Chloroplasts 55 kDa), valamint a Chl-*a* oxigenáz (Balk és Lobréaux, 2005, Ye *et al*., 2006). A plasztiszokban eukarióta eredetű, nukleáris genomban kódolt, ferritin jellegű vaskötő proteinek is találhatók (Briat *et al*., 2010a), jelenlétük azonban csak fiatal levelek differenciálatlan plasztiszaiban, illetve stressz-körülmények között mutatható ki (Briat *et al*., 2010b). A ferritinek különösen nagy vastároló kapacitással rendelkeznek, Fe-OH jellegű vasat halmoznak fel, melyek körül egyfajta keretet (klatrátot) alkotnak. A kloroplasztiszokban a vas egy kisebb hányada részben ionos formájú vasként van jelen, mint a PSII akceptor-oldalán kötött, illetve a FeSOD aktív helyén koordinált vas (Guskov *et al*., 2009, McMaster és Oganesyan, 2010).

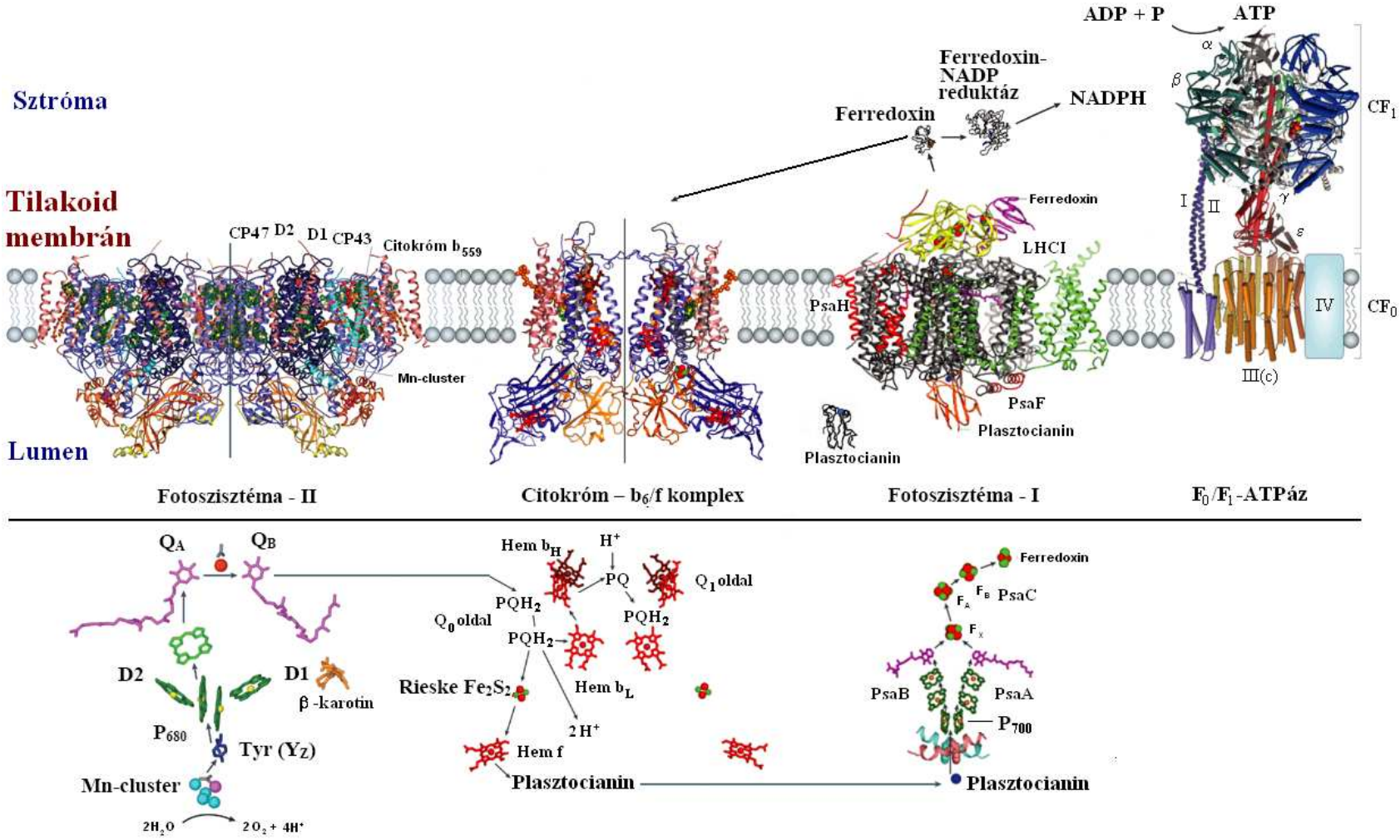
2. A fotoszintetikus apparátus felépítése és működése

A kloroplasztiszok a növényi sejt szemiautonóm, cianobaktérium eredetű organellumai, melyek a sejteket, de a teljes növényt is szerves szénvázzal és energiával látják el. A fotoszintézis a fényenergia konvertálása kémiai energiává, amelynek végeredményeként a fényből származó energia egyrészt az asszimilatív anyagcserében univerzálisan felhasználható energiaként, ATP formájában jelenik meg. Másfelől redukálókapacitást szabadít fel a vízből, melynek melléktermékként pedig a magasabbrendű heterotróf élet szempontjából alapvető fontosságú oxigén képződik. A fotoszintézis folyamatai fehérjekomplexekben gazdag endomembrán-rendszerhez, a tilakoidokhoz kötöttek. A kloroplasztiszban a tilakoidok helyenként korongszerűen kapcsolódó membránokat, gránumokat, illetve ezeket összekötő sztrómatilakoidokat alkotnak. A fent említett folyamatok lebonyolításához szükséges proteinkomplexek az I. és II. fotokémiai rendszer (**PSI és PSII**), melyek fénygyűjtő komplexei az **LHCI** (Light Harvesting Complex I) és **LHCII** antennakomplexek, valamint a citokróm (**Cit**) b_6/f komplex és az ATP-szintáz (Nelson és Yocum, 2006, Rochaix, 2011), melyekhez egyéb, működésben fontos proteinek kapcsolódnak. A lumenben a plasztocianin, a sztrómában pedig a ferredoxin (**Fd**) valamint a Fd:NADP oxidoreduktáz (**FNR**) társulnak (2. ábra). A fotokémiai rendszerek pigment-protein komplexekből: a reakciócentrumból, szorosan kapcsolódó (proximális) antennából és más minor nem-pigmentkötő proteinekből felépülő központi (core) részből, valamint az azt körülvevő, lazábban kapcsolódó (disztális) antennarégióból állnak. A reakciócentrumokat és a belső antennákat a kloroplasztisz genomjában kódolt, csak Chl-*a*-t tartalmazó Chl-protein komplexek alkotják (core). A „core” körül kialakuló antennarendszerek felépítésében viszont a magban kódolt és a citoplazmában szintetizálódó Chl *a/b*-proteinek vesznek részt, melyekre a Chl-molekulák a kloroplasztiszban kerülnek rá. A két fotokémiai rendszer Chl-tartalmának körülbelül 60%-a a PSII-ben, 40%-a pedig a PSI-ben található.

A tilakoidrendszer egy dinamikus szerkezet. Hosszabb ideig fennálló környezeti eltérések a tilakoid komplexek felépítésének (antenna struktúra) és arányainak változását indukálják akklimatizációs változások révén. Ezek szignáljai a plasztokinon (**PQ**) és a Fd/tioredoxin rendszer redox állapotának változásai, valamint stressz-körülmények közt a reaktív oxigénformák (**ROS**) képződése is, amelyek génexpressziós változásokat indukálnak (Pfannschmidt, 2003).

2.1. A II. fotokémiai rendszer

A PSII (2. ábra) a fotoszintetikus apparátus azon komponense, amely képes a fényenergia abszorpciójára. Gerjesztett állapotban redoxpotenciálja révén a víz oxidálását és a PQ redukálását végzi. A víz bontásából felszabaduló H^+ ionoknak köszönhetően transzmembrán potenciál létrehozására képes. A PSII így tulajdonképpen plasztokinon:víz oxidoreduktáz komplexként fogható fel, mely reakció energetikai hátterét az elnyelt fényenergia biztosítja. A komplexben több mint 20 féle fehérje található. A reakciócentrumban központi helyet foglal el a D1 és D2 (PsbA és PsbD) heterodimer. Ezeken kötődnek az elektrontranszport kofaktorai, a P_{680} (Chl-*a* dimer), négy Chl-*a* , két feofitin-*a* és két *β*-karotin molekula. A komplex fontos akceptoroldali kofaktorai az elsődleges (Q_A) és a másodlagos (Q_B) kinon akceptorok, valamint egy nem-hem Fe-atom. A donoroldali kofaktort egy négy Mn- és egy Ca-ionból álló Mn-centrum alkotja, ami a víz bontásában játszik szerepet (Zuoni *et al*., 2001). A vízbontáshoz szükséges Cl-ionokat egy hidrofil fehérjékből álló, ún. reguláló sapka biztosítja (PsbO,P,Q,R). A vízbontó komplex reakciócentruma egy Mn_3CaO_4 kuboid szerkezetként értelmezhető a 3,0 Å felbontás alapján (Loll *et al*., 2005). A negyedik Mn-ion a kuboidhoz kívülről kapcsolódik egy oxid-sarkon keresztül, mely a Ca^{2+} ionhoz közel lokalizált (Brudvig, 2008). A Mn_4Ca szerkezet képezi a centrum katalitikusan aktív helyét. A $Mn^{2+/3+/4+}$ ionok kulcsfontosságú szerepet töltenek be a vízbontó centrum felépítésében és működésében, így a centrum felépülésének zavara a teljes PSII komplex működését gátolja. A Ca^{2+} ion jelenléte a centrumban a Mn-nal szemben inkább strukturálisnak tűnik. Lehet még szerepe az O-O kötés kialakításában, azonban más, kétértékű kationokkal helyettesítve a komplex megőrizheti működőképességét (Brudvig *et al*., 2008). A PSII reakciócentrumban lévő Cit b_{559} (PsbE,F köti) fotoprotektív szerepet tölt be. Részt vesz a PSII ciklikus elektrontranszportjában, amely a PSII egyik fontos relaxáló mechanizmusa lehet gátolt elektrontranszport esetén. A magasabb elektródpotenciállal rendelkező (HP-) Cit $b_{559,}$ szuperoxid anion oxidáz aktivitása révén, szerepet játszhat a szuperoxid eltávolításában, így a PSII oxidatív károsodások elleni védelmében is (Pospíšil, 2011). A reakciócentrumhoz kapcsolódnak a proximális, a kapcsoló, és a disztális antennák, valamint számos kisebb fehérje. Ez utóbbiak elsősorban stabilizáló szerepet töltenek be. A proximális antennák, a CP47 (PsbB) és a CP43 (PsbC) pigment-protein komplexek apoproteinjei Chl-*a* és *β*-karotin pigmenteket kötnek.



2. ábra: a tilakoidmembránokban található fotoszintetikus apparátus felépítése és működése (Nelson és Ben Shem, 2004 alapján, módosítva). Részletes leírást ld. a szövegben.

A PSII disztális antennarendszere, az LHCII háromféle apoproteint (Lhcb1-3 fehérjék) tartalmaz, Chl *a/b* aránya 1,1-1,2 (Standfuss *et al*. 2005). A disztális antennát a proximálishoz kapcsoló antennák (connecting antennae, **CA**) is Chl *a/b* kötő fehérjéket tartalmaznak (Lhcb4-6). A gerjesztett P_{680} a feofitin és a Q_A kinon közvetítésével redukálja a tilakoidmembránban elhelyezkedő PQ-k közül az éppen kötődőt (Q_B). A következő lépésben a $P680^+$ a leadott elektronját a PSII vízbontó Mn-centrumában éppen oxidálódó vízmolekulák O-atomjáról származó elektronokból az Y_z (D1-Tyr) közvetítésével kapja vissza. A redukált PQ-ról az elektronok a Cit b_6/f-komplexre kerülnek.

2.2. A citokróm b_6/f komplex

A Cit b_6/f komplex (2. ábra) a tilakoidmembránban aktív állapotban dimer formában fordul elő és felépítésében négy nagyobb és három kisebb polipeptid vesz részt (Kurisu *et al*. 2003, Stroebel *et al*., 2003). A nagyobb komponensek közül a Cit *f* (PetA) egy *c* típusú hemet, a Cit b_6 (PetB) két *b* típusú hemet (Cit b_{563}) tartalmaz. Nagyobb móltömegű komponense ezeken felül a magas redoxpotenciálú vas-kén centrumot hordozó Rieske-féle Fe_2S_2-fehérje (PetC), valamint a Cit b_6-tal együtt a plasztokinon és plasztokinol kötéséért felelős fehérje (IV-es alegység - PetD) is. A Rieske-féle Fe_2S_2-fehérje a sejtmagban, a másik három a plasztiszban kódolt. A kis móltömegű fehérjéknek komplexstabilizáló szerepe lehet. A mitokondriális Cit b/c_1 komplextől eltérően, a plasztisz Cit *b*/*c* típusú komplexe egy Chl-*a* molekulát, egy β-karotint és egy extra hemet is tartalmaz. A komplex a membrán belseje felé eső oldalán PQ-t és plasztokinolt, a lumenális oldalán plasztocianint köt. A Rieske-féle Fe_2S_2-fehérje a Cit *f*-en keresztül a plasztocianinra juttatja a plasztokinolokról származó elektront, amely ennek segítségével redukálja a PSI-et. A plasztokinol lumenhez közelebb eső kötőhelyen történő visszaoxidációjakor a Cit *b* ágra jutó elektronok viszont a sztrómális oldalhoz közelebb eső kötőhelyen újabb PQ redukciójára képesek. Az így redukálódott plasztokinol hasonlóképpen visszaoxidálódhat a lumenális oldalhoz közel eső plaszokinol-kötőhelyen, s így hozzájárul a proton gradiens kialakulásához (Q ciklus). A Cit b_6/f komplexnek a lineáris elektrontranszporton kívül fontos szerepe van még a ciklikus elektrontranszportláncban is, melyben PSI-eredetű elektronokat juttat a plasztocianinra. A folyamat során a Q-ciklus miatt a lineáris elektrontranszporthoz hasonlóan protongradiens épül ki a tilakoidmembrán két oldala között. A ciklikus elektrontranszportlánc működése

során a 11 alegységből álló NADPH:PQ oxidoreduktáz komplex (NDH) a NADPH-ról származó elektronokat a Cit b_6/f segítségével a PQ-okra jutatja. A következő lépésben a keletkezett plasztokinol a PSII felől elektronokat szállító plasztokinol-molekulákkal megegyező módon oxidálódik a komplex működése során (Munekage *et al*., 2004, Joliot és Joliot, 2006, Benz *et al*., 2010). Általánosan feltételezett, hogy közvetlenül a Fd-ról is juthatnak e^--ok a PQ-ra, melyet például *ndh*-mutánsokkal is bizonyítottak. Nem ismert azonban sem a konkrét mechanizmus, de a folyamatban szerepet játszó fehérjék sem azonosítottak Feltételeznek egy Fd-FNR-Cit b_{559} utat (PGR5), amelynek meglétére azonban kísérletes bizonyítékok nem állnak rendelkezésre (Munekage és Shikanai, 2005, Shikanai, 2007).

2.3. Plasztocianin

A plasztocianin a fotoszintetikus elektrontranszport egyik legismertebb – és legkorábban feltárt, mobilis, lumenben lokalizált komponense, mely a különböző fotoszintetizáló organizmusokat összevetve erősen konzervált struktúrákkal rendelkezik. Ilyen pl. a nyolc antiparallel β-hordó lánc egyik végén elhelyezkedő rézkötő hely is. A rézkötő hely egy elforgatott háromszögletű piramisként írható le. A piramis alapjánál két, külön hisztidinből származó N-atom, és egy ciszteinből származó kénatom foglal helyet, míg csúcsánál egy metioninból származó kén található. A rézion a két kénatomtól eltérő távolságra koordinált, amely koordináció destabilizálja a Cu^{2+} elektronfelhőjét, s ez csökkenti a plasztocianin redoxpotenciálját. A plasztocianin képes kötődni mind a Cit *f*, mind a PsaF,A,B és N fehérjékhez (Sato *et al*., 2003).

2.4. Az I. fotokémiai rendszer

A PSI (2. ábra) a plasztokinonról származó elektronokat a sztrómában elhelyezkedő ferredoxin felé továbbítja, melyhez az elnyelt fényből származó gerjesztési energiát hasznosítja. A PSI voltaképpen plasztocianin:ferredoxin oxidoreduktáz komplexként értelmezhető. A PSI core felépítésében a PSII-höz hasonlóan számos fehérje vesz részt. Központi részét egy heterodimer komplex (PsaA,B) alkotja, amelyen többek között a P_{700}, egy fotoaktív Chl-*a*-Chl-*a*’ dimer is kötődik. A két fehérjén összesen mintegy 100 Chl-*a*, 22

β-karotin és 2 fillokinon, valamint egy Fe_4S_4-centrum (F_x) található, tehát ezek kötik a proximális antennát képező Chl-okat is (Fromme *et al*., 2001; Scheller *et al*., 2001, Amunts *et al*., 2007). Sokáig úgy gondolták, hogy a Fe-S centrumok csak a már tilakoidmembránban helyet foglaló apoproteinekbe épülnek be, de az újabb adatok a sztrómában történő beépülést valószínűsítik (Schötter *et al*., 2011). A fenti kofaktorok közül egyesek a PSI elektrontranszport komponensei: a P_{700}, két járulékos Chl-*a*, az elsődleges elektron akceptor A_0 (két Chl-*a*), a másodlagos elektron akceptor A_1 (a két fillokinon) és a Fe_4S_4-centrum. A PSI reakciócentrumban a töltésszétválás és az elektrontranszport a PSII reakciócentrumokkal analóg módon megy végbe. A plasztocianintól a ferredoxinig terjedő elektrontranszportban még fontos szerepe van a PsaC fehérjén kötött két további Fe_4S_4-centrumnak, valamint a plasztocianin kötődését elősegítő PsaF,N fehérjéknek is (Rochaix, 2011). A $NADP^+$-re az elektrontranszport a ferredoxin és a FNR közreműködésével történik, amelyek a PsaD és PsaE fehérjéken keresztül kötődnek a PSI-hez. A kis móltömegű fehérjék közül egyesek Chl-*a*-t kötve az energia transzferben is szerepet játszanak (PsaH,J,K,L,M,X), de stabilizálják is a PSI szerkezetét, valamint a külső antennát a központi részhez (PsaG,K) kapcsolják. A PSI disztális antennája, az **LHCI** (Light Harvesting Complex I), amely a PSI-ben található összes Chl-*b* pigmentet tartalmazza (Ben-Shem *et al*., 2003). Az LHCI komplexeket négyféle fő Chl *a/b*-kötő fehérje építi fel (Lhca1-4), melyek felépítésükben az Lhcb fehérjékhez hasonlók, de Chl *a/b* arányuk magasabb (2-3 körüli). Az LHCII-vel ellentétben nem trimereket, hanem dimereket képeznek, amelyeket a fluoreszcencia emissziójuk alapján LHC I-680 és LHC I-730-ként is említenek (Karapetyan *et al*., 2006). A PSI reakciócentrumhoz az LHCI dimereken kívül LHCII is kapcsolódhat. Az LHCII-PSI kapcsolódás a PSI PsaH lánca felőli oldalon jön létre, melynek szerkezete kevésbé ismert (Amunts *et al*., 2007, Amunts *et al*., 2010). A kapcsolódásban valószínűsíthetően az LHCII trimernek egy polipeptidlánca vesz részt. A PSI-LHCII kapcsolatnak fontos szerepe van a state-tranzícióban (a state-tranzíciónak a gerjesztési energia allokációja megváltoztatásában, jelesül a PSI-re történő juttatásában van kiemelt szerepe). A folyamat során, nagy abszorbeált fényenergia esetén, a foszforilált LHCII trimerek leválnak a PSII komplex(ek)ről, és a sztrómalamellákban elhelyezkedő PSI komplexekhez kapcsolódva növelik azok abszorpciós keresztmetszetét, ezáltal pedig a ciklikus elektrontranszport hatékonyságát. A kapcsolat a Chl-*a* fluoreszcencia hozamának csökkenésében is megnyilvánul: ennek oka az LHCII-PSI közötti hatékonyabb energiaátadás.

2.5. Az elektrontranszportlánc által szállított elektronok tárolása

A PSI reakciócentrumok fényenergiát abszorbeálva a plasztocianinról származó elektronokat ferredoxin elektronkarrierekre juttatják. A Fe_2S_2 Fd-ok a PSI unikális elektronakceptorai, redoxpotenciáljuk a hidrogénelektód redoxpotenciáljához közel esik, mely lehetővé teszi, hogy elektronokat fogadjanak a PSI felől. Szolubilis, a plasztiszok sztrómájában lokalizált kis fehérjék, amelyek a fotoszintetikus elektrontranszportláncból származó elektronokat továbbítják számos enzim, így a FNR és a Fd:tioredoxin oxidoreduktáz felé, valamint a nitrogén- és kén-asszimiláció, a lipid- és Chl-bioszintézis és a redox-regulációs folyamatok számára is (Benz *et al*., 2010). A Fd-ról az elektronok a FNR közreműködésével NADPH molekulákban halmozódik fel, melyek az asszimilatív anyagcsereutak többségében elektrondonorként szolgálnak. Az FNR a sztrómában lokalizált fehérje, melynek Cit b_6/f komplexhez történő asszociációja szerepet játszik a ciklikus elektrontranszport, valamint a belső burkolómembrán fehérjeimport-komplex redox regulációjában fontos TIC62 (Translocon of Inner Chloroplast envelope 62) tagjához kötődve a proteinimport regulációjában is (Benz *et al*., 2010). A levelekben expresszálódó FNR izoformákkal ellentétben, a gyökerekben az FNR szerepe sokkal inkább a Fd felé irányuló elektrontranszportban van (Carillo és Ceccarelli, 2003).

2.6. Fotofoszforiláció

Az elektrontranszport lánc működése közben protongradiens alakul ki. Ennek oka, hogy a PQ-ok PSII, illetve Cit b_6f komplexek által történő redukciója után töltéssemlegességhez protonokat a sztrómából veszik fel, míg a Cit b_6f komplexen végbemenő reoxidációjuknak során ezeket a protonokat a lumen felé adják le. A PSII vízbontó centrumának működése során a vízből származó H^+-ok szintén a lumen oldalon halmozódnak fel. A protongradiensben, mint elektrokémiai gradiensben tárolt energia terhére képes a tilakoidmembránban (sztróma-, illetve marginális gránumtilakoidokban) lokalizált, bakteriális jellegű CF_1-CF_o ATP-szintáz az ATP szintézisére. Ez a folyamat a fényenergia nagyenergiájú kémiai kötéssé (savanhidrid kötéssé) történő átalakítását jelenti (Mitchell, 1961, Groth és Pohl, 2001). Az CF_1-CF_o ATP-szintáz egy forgómotoros enzim, aminek a rotorikus komponensét (a membránban lévő CF_o-protoncsatornát) a protongradiens elforgatja. Felépítésében hasonlít a mitokondrium, illetve a baktériumok F-típusú H^+/ATPázaira. A CF_1

alegység könnyen izolálható, a többi alegység hiányában azonban nem a szintézist, hanem az ATP bontását katalizálja (Senior *et al*., 2002). Mind a CF_o, mind a CF_1 alegység multiprotein komplex, melyek közül a CF_1 alegységet öt (α, β, γ, δ, ε; $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ sztöchiometriában), míg a CF_o alegységet négy fehérjetípus (I, II, III és IV; I II III_{14} IV sztöchiometriában) építi fel (Böttcher és Gräber, 2008). A szintéziséhez szükséges kinetikai energia a CF_o alegység protonálódása/deprotonálódása következtében jön létre, mellyel együtt jár a proton transzlokációja is. A protoncsatornát a III_{14} láncok képezik, melyek körben állva gyűrűszerű struktúrát alkotnak a tilakoidmembránban. A tilakoid lumen felőli oldalán protonálódnak a III. és IV. alegységekből képződő protoncsatornán keresztül (Junge, 2004). A protont a III. alegység egy aminosava, a $IIIGlu_{61}$ köti meg, amely így töltését vesztve, a fehérjelánc konformációváltozását előidézve, a hidrofób belső felé helyeződik át. A konformációváltozás hatására a CF_o gyűrű egy másik III. alegységének protonált Glu_{61} aminosava az ellentétes oldalon, a sztróma felé nyitott hidrofil csatorna irányába helyeződik át és ezt követően deprotonálódik. A protonfelvétel és -leadás, így a forgás irányát is, mindenkor az aktuális sztróma-lumen ΔpH határozza meg. A forgómozgásban testet öltő kinetikai energia a „tengely" (CF_1 γ alegysége) segítségével a CF_1 αβ működési egységeinek konformációváltozását okozza, mely elősegíti az fejkomplexről az ATP leválását (Richter *et al*., 2005, Junge *et al*., 2009). Az ADP és P_i kötődése, valamint a foszfát-savanhidrid kötés kialakítása energiát nem igénylő folyamatok.

2.7. Chl-*a* fluoreszcencia

A fotoszintetikus aktivitás változásának követésére széles körben elterjedt a Chl-*a* fluoreszcencia mérésén alapuló módszer. Kautsky és Hirsch (1931) fedezte fel, hogy a fotoszintetikus apparátus működését és épségét jellemző fluoreszcens jel és a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése közt szoros összefüggés van. Használatát nagyban elősegíti, hogy nem-invazív technika lévén, a vizsgált növény roncsolása nélkül is alkalmas a stresszválaszok nyomonkövetésére (Baker, 2008).

Butler (1978) modellje szerint a P_{680} reakciócentrumról a PSII kinonakceptorára (Q_A) történő elektrontranszport kioltja a fluoreszcenciát. A jelenséget fotokémiai kioltás néven ismerjük. A termikus energiaveszteség szintén csökkenti a fluoreszcenciahozamot, azonban ez az energiamennyiség elvész a fotoszintetikus elektrontranszportlánc meghajtása szempontjából.

A jelenséget összefoglaló néven a nem-fotokémiai kioltásként (**NPQ**) ismert folyamatok közé sorolják. A fotoszintetikus apparátus működését és struktúráját a környezeti feltételek változása/stressz-körülmények is befolyásolják. A PSI-et és a PSII-t felépítő Chl-protein komplexeknek a fénygyűjtésen, valamint a primer fotokémiai reakción és az elektrontranszporton kívül a gerjesztési energia allokációját szabályozó szerepük is van. Az LHCII 30%-a foszforilálódhat az LHC-II kináz segítségével, amit a PQ-pool túlredukciója (a PSII túlműködése) aktivál (Allen és Forsberg, 2001). A foszforilált LHCII a PSII-ről leválva és a PSI-hez kapcsolódva az elnyelt energiát a PSI-re továbbítja (**qT**). Fordított esetben a foszforilált LHCII a PQ-aktivált LHC-II foszfatáz katalizálta reakcióban defoszforilálódik, így visszaköthet a PSII-re. E folyamaton keresztül a PQ-pool redoxállapota szabályozhatja a fényenergia megoszlását a két fotokémiai rendszer között (Rochaix, 2011). Fényfelesleg esetén, ha az abszorbeált fotonok száma nagyobb a fotoszintetikusan felhasználható fotonok számánál, egyes Chl-proteinek a felesleges fény nem-fotokémiai disszipációjában is részt vehetnek (Niyogi, 2000). Az NPQ típusai között legjelentősebb a ΔpH-függő kioltás (**qE**). Az elektrontranszportlánc működése során keletkező, és ATP-szintézisre nem használódó protongradiens stimulálja a violaxantin ciklus működését. A violaxantin de-epoxidációja révén a kioltást elősegítő zeaxantin keletkezik. Hozzájárul ehhez, hogy a pH csökkenése befolyásolja a klorofill-protein komplexek konformációját és így a kötött Chl-ok kölcsönhatásait. A konformáció-változás hatására a fluoreszcencia és a belső konverzió aránya megváltozik az utóbbi javára, s ennek következtében az energiafelesleg hő formájában emittálódik. A qE típusú kioltásban fontos szerepet játszik a PsbS protein, amely lumenális oldalláncai protonálódásakor szintén konformációt vált (Kiss *et al*., 2008). Kioltó centrumként maga köré gyűjti a PSII lazán kapcsolódó antennarendszerét. Míg a qE és a qT (relative) gyors és reverzibilis, az NPQ egy másik, fotoinhibícióval összefüggő típusa (**qI**) lassan alakul ki és irreverzibilis (Baker, 2008). A fotoinhibíció mellett a PSII működése számos más stresszhatás eredményeképpen is gátlódhat. Inaktivált PSII reakciócentrumok szintén működhetnek kioltó centrumokként (Hendrickson *et al*., 2005), mert képesek gerjesztési energiát átvenni a szomszédos, aktív PSII centrumoktól. Ez a folyamat is védelmet nyújt az igényeltnél nagyobb gerjesztési energia okozta esetleges károsodásokkal szemben (Öquist *et al*., 1992, Lee *et al*., 2001, Chow *et al*., 2005). Stressz-körülmények közt szerepet játszhatnak a gerjesztési energia disszipációjában. Az NPQ-folyamatok nagy jelentőséggel bírnak gátolt fotoszintetikus elektrontranszportlánc esetén, mert megakadályozzák a ROS keletkezését.

3. Oxidatív stressz és stresszvédelem

3.1. Reaktív oxigénformák (ROS)

Az aerob anyagcserét folytató szervezetek számára az oxigén, mint oxidatív ágens, folyamatosan jelen van a sejtekben. A ROS a legtöbb biológiai molekulával reakcióba lépve károsítja azokat, s ez akár a sejt pusztulásához is vezethet (Apel és Hirt, 2004). A ROS képződésének több módja is létezik. Haber-Weiss- (Fenton-) reakciók és gyökös reakciósorozat inicializálására a szabaddá és szabályozatlanná váló Fe^{2+}/Fe^{3+} és Cu^{+}/Cu^{2+} rendszerek képesek. Zöld növényekben a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működéséhez alapvető fontosságú vízbontás melléktermékeként azonban molekuláris oxigén termelődik, így a kloroplasztiszok működése különösen erős oxidatív terhelésnek van kitéve. Az elektrontranszport gátlásakor is erősen nő a ROS mennyisége (Asada, 2006). A ROS képződés megelőzésére, illetve a ROS eliminálására hatékony védelmi rendszer alakult ki a sejtekben. A ROS eltávolítása azonban a növények számára energiaveszteséget jelent, hisz a detoxifikáló enzimek a fotoszintézis során termelődő redukáló molekulákat igényelnek működésükhöz, s ennek következtében a ROS elleni védekezés kompetícióban áll az asszimilatív anyagcsereutakkal.

A fotoszintetikus elektrontranszport gátlásakor több helyen is lehetséges ROS képződés. Zöld növények kloroplasztiszaiban az alaphelyzetben triplet állapotú O_2 a $^{T}P680$ általi gerjesztésével szinglet oxigén ($^{1}O_2$) képződhet természetes körülmények között is, mely erős oxidálószer, és könnyen képes reakcióba lépni a szinglet állapotú biológiai molekulákkal. Rövid életideje alatt átadhatja gerjesztési energiáját, illetve reakcióba léphet egyes vegyületekkel endoperoxidok, vagy hidroperoxidok termelődése mellett. Kloroplasztiszokban az egyik fő támadási felületét a PSII D1 láncának működésben fontos szerepet játszó aminosavak képezik. A PSII károsodása funkcióvesztést okoz. Enyhe stressz-körülmények között lehetőség van a károsodott D1 láncok cseréjére, s a csere lehetővé teszi a reakciócentrumok regenerációját. A stressz erősségének fokozódásával azonban a károsodás mértéke és a javítómechanizmusok működése közti egyensúly felbomlik, így a tilakoidmembránban inaktív PSII reakciócentrumok halmozódnak fel (Murata *et al*., 2006). A PSI-ről az O_2-re is juthatnak elektronok, reaktív szuperoxid anion gyököket ($O_2^{\bullet -}$) képezve. Ezek kinonokat vagy átmeneti fémkomplexeket redukálhatnak, s így befolyásolják egyes

fémtartalmú enzimek aktivitását. A rövid féléletidejű, közepesen reakcióképes, reaktív oxigénforma nem jut át a sejtmembránon. A $O_2^{\bullet-}$ oxidálja a [4Fe-4S] centrumokat, miközben melléktermékként H_2O_2 képződik (Perron és Brumaghim, 2009). A folyamat során Fe^{2+} szabadul fel (Keyer és Imlay, 1996), ami egyrészt destabilizálja a centrumokat, s így a PSI RC inaktiválódik. Másrészt a szabaddá váló Fe^{2+} H_2O_2-dal is reagálhat, s a legreaktívabb oxigénforma, a hidroxil-gyök ($HO^{\bullet}$) képződéséhez vezető Fenton-reakciósort indíthatja be (Winterbourn, 1995).

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

A $O_2^{\bullet-}$ vizes oldatban egy proton felvételével hidroperoxil gyökké ($HO_2^{\bullet}$) alakulhat, mely már át tud jutni a biológiai membránokon, s emellett szerepe van a lipidek oxidációjában is. A szuperoxid-gyök további elektronfelvétellel H_2O_2-dá alakulhat. A H_2O_2 közepes reakcióképességű, a ROS leghosszabb féléletidejű molekulája, amely bizonyos távolságra membránokon keresztül is képes diffundálni.

A ROS, a rövid a féléletidejük ellenére, átmenetileg minden aerob anyagcserét folytató sejtben megjelennek. Bár egyes típusai fontos szignálmolekulaként funkcionálhatnak (pl. H_2O_2), magas koncentrációban erős sejtkárosítók. A ROS veszélyességét a reakcióképességük jelenti, mivel számos, a sejt működésében alapvető szerepet játszó szerves molekulával, így a membránokat felépítő lipidekkel (lipid-peroxidáció), fehérjék oldalláncaival, pigmentekkel és más szerves molekulákkal (aszkorbinsav, tokoferol, stb.) képesek reakcióba lépni (Ahmad *et al*., 2008). A membránlipidek telítetlen kötéseinek peroxidációjával párhuzamosan hidrokarbonok, 4-hidroxinonénal (4-HNA), konjugált diének és malondialdehid (MDA) termelődnek. A MDA viszonylag stabil intermedier, mely magasabb koncentrációban a fehérjék és nukleinsavak károsodását okozza. Az élő rendszerek MDA tartalma arányos a lipidperoxidáció mértékével, így az MDA a különféle membránintegritást érintő stresszhatások fontos indikátora (Bertin-Maghit *et al*., 2000).

3.2. Az oxidatív stressz elleni védőmechanizmusok

A ROS típusainak egyensúlyi szintjét a képződés sebessége és a semlegesítő mechanizmusok aktivitása határozza meg. A folyamatosan jelenlévő oxidatív terhelés ellen a növények hatékony védekező mechanizmusokkal rendelkeznek. A védelemben fontos szerepet töltenek be a nem-enzimatikus antioxidáns anyagok, mint a flavonoidok, az α-tokoferol, a karotinoidok, az aszkorbinsav és a glutation. Ezek a molekulák magas koncentrációban vannak jelen elsősorban a kloroplasztiszokban, de más kompartmentumokban is. A karotinoidoknak elsősorban megelőző szerepe van az oxidatív stressz elleni védekezésben, ^{T}Chl és a szinglet oxigén ($^{1}O_2$) energizált állapotának kioltásával (Arora *et al*., 2002, Gratao *et al*., 2005). A membránokban oldott α-tokoferol a szinglet oxigén és a lipid-peroxidok eltávolításában játszik szerepet (Arora *et al*., 2002). Az aszkorbinsavnak jelentős szerepe van a szinglet oxigén, a hidroxil gyök és a hidrogén-peroxid eliminálásában, de kofaktorként részt vesz az α-tokoferol regenerálásában is (Edreva, 2005). A glutation (γ-glutamil-ciszteinil-glicin) redukálókapacitást tárol az enzimfehérjék tiolkötéseinek és aktív tiolcentrumának redukálására. Emellett képes reagálni különböző reaktív oxigénformákkal, valamint részt vesz az oxidálódott aszkorbinsav regenerációs ciklusában is (Arora *et al*., 2002). A sejt különböző kompartmentjeiben, de különösen a kloroplasztiszban felhalmozódó flavonoidoknak hasonlóképpen gyökfogó hatást tulajdonítanak (Agati *et al*., 2007), bár a legtöbb fenoloidnak, így a flavonoidoknak is szerepe lehet a Fenton-reakcióra képes fémionok komlexálásában, így inaktivációjában (Perron és Brumaghim, 2009). Az antioxidánsok magas redukáltsági foka elengedhetetlen a ROS mennyiségének a növény számára elviselhető szinten tartásához (Mittler, 2002).

A reaktív oxigénformák eltávolításában az antioxidáns anyagokon kívül különböző védőenzim rendszerek is részt vesznek (3. ábra), amelyek szintén fontos szerepet töltenek be a stresszorok, így a Cd által kiváltott megemelkedett oxidatív terhelés kivédésében.

3.2.1. A $O_2^{\bullet-}$ eliminálása: SOD

A szuperoxid diszmutáz (SOD; EC 1.15.1.1) enzimek az oxidatív károsodás elleni védelem első vonalát alkotó, fém kofaktorokkal működő enzimek, melyek a szuperoxid gyököket alakítják át hidrogén-peroxiddá a következő reakció alapján:

$$2\ O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

A SOD-ok szinte minden sejtalkotóban megtalálhatóak (kloroplasztisz, mitokondrium, peroxiszóma, citoplazma, apoplaszt). A reakciócentrumban található fémkomplex minősége alapján SOD izotípus különböztethető meg: réz/cink- (Cu/ZnSOD), mangán- (MnSOD) és vas-SOD (FeSOD). A Mn- és a FeSOD-ok közeli strukturális rokonságban állnak egymással, míg a Cu/ZnSOD-ok csak távolabbi rokonságot mutatnak (Pilon *et al*., 2011). A különböző izotípusok más-más kompartmentben lokalizáltak *(*Bernardi *et al*., 2004*)*: a MnSOD elsősorban a mitokondriumban és a peroxiszómában található, de előfordulhat a citoplazmában és sejtfalban is. A Cu/ZnSOD-ot sokáig csak a citoplazmában mutatták ki, de később megtalálták a kloroplasztiszban és a mitokondriumban is (Pilon *et al*., 2011). Nyárfa levelekben két izoformáját mutatták ki (Bernardi *et al*., 2004). A FeSOD elsősorban a kloroplasztiszban fordul elő, de jelen van a mitokondriumban, a peroxiszómában és a citoplazmában is (Arora *et al*., 2002). Kloroplasztiszokban a SOD-ok sztrómában található szabad és membránkötött izoformában is előfordulnak. Fontos szerepük van a víz-víz ciklusban (Asada, 2006): a vízbontásból származó elektronok a PSI akceptor oldalán O_2-nel szuperoxid anion gyököt képezhetnek, amit a SOD H_2O_2-dá és O_2-né alakít. A keletkező H_2O_2 nagy része az aszkorbát peroxidáz (**APX**) segítségével alakul tovább vízzé. A reakcióhoz a redukáló erőt aszkorbinsav adja, amely végső soron a ferredoxin redukálókapacitását felhasználva regenerálódik (3. ábra). A ciklus működése során az energiafelesleg hő formájában disszipálódik (Edreva, 2005).

3.2.2. A H_2O_2 eliminálása

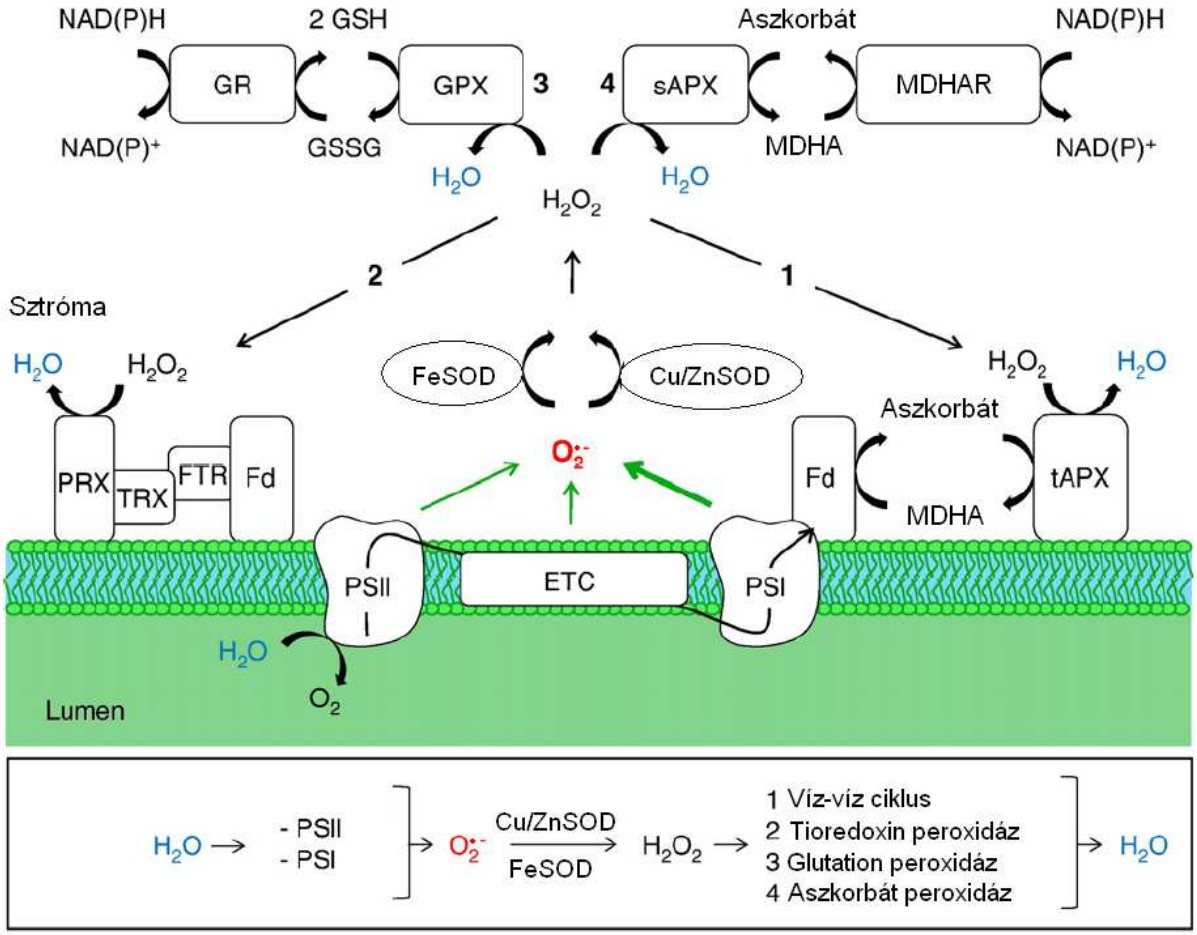
A peroxidáz (**POD**, E.C. 1.11.1.x) aktivitású enzimek hatalmas családjába tartozó enzimek az összes pro- és eukariótában, a sejt minden kompartmentjében előfordulnak, melyeknek – többek között – a H_2O_2 eliminálása a feladata. H_2O_2 vagy szerves peroxidok (R-OOH) felhasználásával oxidálnak más szerves vegyületeket:

$$AH_2 + H_2O_2\ (ROOH) \rightarrow A + 2\ H_2O\ (ROH + H_2O)$$

A POD szupercsaládban hem- és nem hem-kofaktorral működő csoportok különíthetőek el. (Passardi *et al*., 2007).

Nem-hem kofaktorral működő, a ROS eltávolításában fontos növényi enzimek a glutation peroxidázok (**GPX**, Bartosz, 1997*)*. Ezek elsősorban a peroxiszómában lokalizáltak, és jelentős szerepük van a fotorespiráció során képződő H_2O_2 bontásában. A H_2O_2 vízzé

alakításához a redukálókapacitást a glutation oxidálásával nyerik. A glutation redukcióját a glutation-reduktáz (**GR**) végzi NADPH felhasználásával. A GPX, a H_2O_2-on kívül, a szerves molekulákból ROS hatására képződött reaktív gyököket is képes hatástalanítani.



3. ábra: A kloroplasztisz antioxidatív enzimrendszere. Az egyes útvonalak kifejtését ld. a szövegben (Pilon *et al*., 2009 alapján, módosítva). ETC: fotoszintetikus elektrontranszportlánc

Szintén a nem-hem, tiol-peroxidázok közé tartoznak a peroxiredoxin (**PRX**, E.C. 1.11.1.15) enzimek, melyek közül négy izoforma mutatható ki *Arabidopsis* kloroplasztiszokban (Dietz, 2003, Kirchsteiger *et al*., 2009). A PRX-ok H_2O_2-dal reagálva az aktív helyükön Cys-oldalláncaival redukálják azt, majd az így képződött diszulfidhidat a tioredoxin- (**TRX**-) rendszer felől származó elektronokkal redukálják. Végső soron a PRX enzimek a fotoszintetikus elektrontranszportlánc által megtermelt redukálókapacitás terhére eliminálják a H_2O_2-ot (3. ábra).

A hem-POD enzimek közé tartozó kataláz (**CAT**, E.C. 1.11.1.6) jelentős szerepet játszik a H_2O_2 közömbösítésében, diszproporcionálásában (Loewen *et al.*, 2000). Növényekben a peroxiszómában mutatható ki. Elsősorban a fotorespiráció során keletkező H_2O_2 bontását végzi. Négy alegységből álló tetramer, hem prosztetikus csoporttal. A diszproporció kinetikája nagyon gyors, az enzim regenerációs ideje az egyik legrövidebb az egész élővilágban. Működéséhez nem igényel redukáló szubsztrátokat, a reakció a hem vas-atomjának a közreműködésével megy végbe.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Bár a pontos reakció mind a mai napig nem kellően tisztázott, valószínűleg a következő séma szerint zajlik le (Alfonso-Prieto *et al.*, 2009):

$$H_2O_2 + \text{Fe(III)-E} \rightarrow H_2O + \text{O=Fe(IV)-E}^{\bullet +}$$

$$H_2O_2 + \text{O=Fe(IV)-E}^{\bullet +} \rightarrow H_2O + \text{Fe(III)-E} + O_2$$

A H_2O_2-ot kis affinitással köti. A CAT különböző szubsztrátok, így alkoholok, fenolok, formaldehid vagy hangyasav oxidálására is képes. Stresszélettani folyamatokban a megnövekedő fénylégzés miatt kiemelt szerepe van a H_2O_2 eltávolításában. Cd-stressz esetén a CAT transzkripciójának és -aktivitásának erős emelkedését mutatták ki *Arabidopsis thaliana* növényekben (Smeets *et al.*, 2008).

A ROS elleni védekezésben kiemelt szerepe van az ún. nem-állati POD (**POX**) peroxidázoknak (Hiraga *et al.*, 2001, Passardi *et al.*, 2007). Strukturális rokonság alapján három főbb család (class-I, -II és –III POX) különíthető el. A class-I POX enzimek stresszélettani szempontból egyik legfontosabb tagjai az aszkorbát peroxidázok (APX, E.C. 1.11.1.11), amelyek majdnem minden sejtalkotóban megtalálhatók (Mittler, 2002). A kloroplasztiszban a SOD-hoz hasonlóan mind oldott (sAPX), mind tilakoidhoz kötött formában (tAPX) jelen van (3. ábra). A tAPX hidrofób C terminális membránhorgonyával a PSI szomszédságában kapcsolódik a tilakoidmembránhoz (Asada, 2006). A fotoszintézis melléktermékeként keletkező H_2O_2 eltávolításában kiemelt szerepet játszik: a SOD-okkal együttműködve részt vesz a szuperoxidanion-gyök hidrogén-peroxidon keresztül vízzé történő alakításában, a víz-víz ciklusban (Asada, 2006). Az eliminació során szubsztrátként használt aszkorbinsav regenerálódása az aszkorbinsav-glutation ciklusban történik (Asada, 1999), így végső soron a ROS eltávolítása a fotoszintetikus elektrontranszportlánc által termelt

redukálókapacitás terhére valósul meg. Az aszkorbinsav-glutation ciklusban keletkező monodehidroaszkorbinsav (**MDHA**) közvetlenül visszaalakulhat aszkorbinsavvá, NADPH felhasználásával, a MDHA reduktáz segítségével. Két MDHA-ból viszont képződhet aszkorbinsav és dehidroaszkorbinsav (**DHA**) is a DHA reduktáz segítségével. A redukáló erőt glutation szolgáltatja (Asada, 2006). A kloroplasztiszokon kívül APX enzimaktivitás mérhető a citoplazmában is (Asada, 1992).

A class-III POX enzimek (a továbbiakban csak POX) közé vakuoláris, vagy szekretált enzimek tartoznak, melyeknek gélelektroforetikus, illetve EST-adatbázison alapuló kutatásokkal számos izoenzimét határozták meg (Hiraga *et al*., 2001). A POX izoenzimek részt vesznek az indol-3-ecetsav degradációjában és az etilén bioszintézisében (Asada, 1992). Fontos szerepük van továbbá a lignifikációban, így a sejtfal keresztkötéseinek kialakításában is (Haliwell, 1978, Quiroga *et al*., 2000). Mesterséges szubsztrát-specificitás alapján guaiakol POX (GPOX) és syringaldazin POX (SPOX) izoenzimeket különítenek el. A GPOX típusú izoenzimek megtalálhatók a sejtfalban, a vakuólumban és a citoplazmában is. A SPOX típusúak szintén szerepet játszanak a lignifikációban. Mind a GPOX-ok, mind a SPOX-ok részt vesznek azonban a H_2O_2-bontás folyamatában (Smeets *et al*., 2005), így az oxidatív stressz elleni védekezésben is fontos szerepük van. Ezt bizonyítja, hogy Cd-kezelt levelekben mind a transzkripciójuk, mind az enzimaktivitásuk emelkedik (Smeets *et al*., 2008) összefüggésben a megemelkedett lignifikációval (Vollenweider *et al*., 2006).

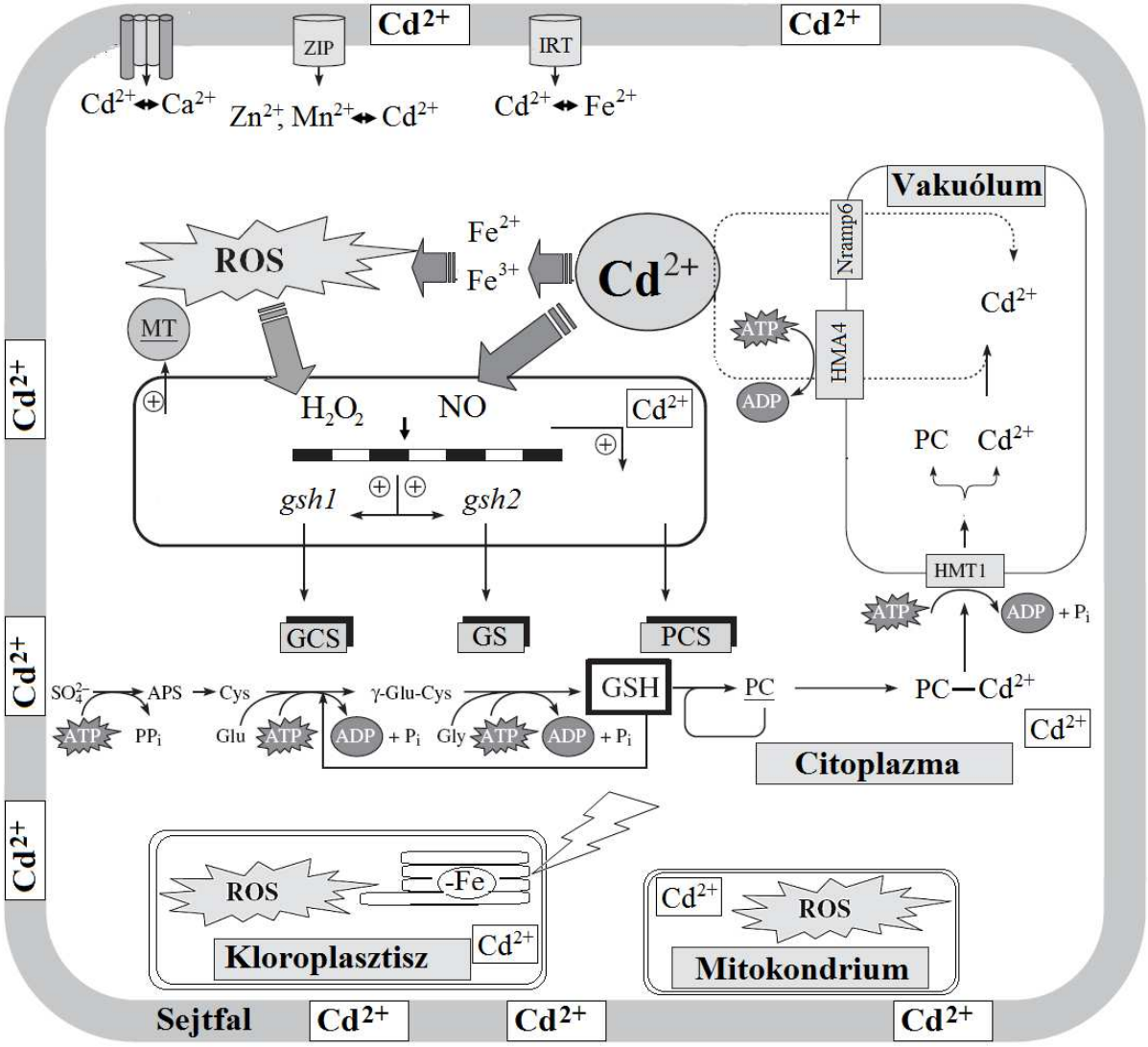
4. A kadmium közvetlen és közvetett hatásai a növényekben

A kadmium (**Cd**) egy nem-esszenciális nehézfém, melynek sói ritka kivételtől eltekintve (Lane *et al*., 2005) különösen mérgezőek minden élőlény számára. Elterjedt szennyező elem, mely az ércbányászat és ipari tevékenységek (galvánelemek fontos alkotóeleme), valamint az intenzív műtrágyahasználat következtében jelentős mértékben felhalmozódik a környezetben. Növényekben zavarja az ion- és vízháztartást (Barceló és Poschenrieder, 1990, Clemens, 2006). A hajtásba transzlokálódva erőteljes oxidatív stresszt okoz, valamint közvetlen és közvetett mechanizmusok révén számos metabolikus folyamatot, köztük a fotoszintézist gátolja (van Assche és Clijsters, 1990, Sanità di Toppi és Gabbrielli, 1999, Rodríguez-Serrano *et al*., 2009).

4.1. A Cd^{2+} felvétele és transzportja

A Cd^{2+} szabad ionként fordul elő a természetben, sói jól oldódnak. Gyökereken keresztül történő felvételének mechanizmusa még nem feltárt: feltételezhetően valamely esszenciális divalens fém-kationt is transzportáló membránfehérje vesz benne részt. Ennek következtében a Cd-stressz egyik fontos hatása növényekben, hogy megzavarja a fémfelvételt és fém–transzlokációt. Többek között interferál a Zn^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} és Ca^{2+} hajtásba történő transzlokációjával (Clemens, 2006, Küpper *et al*., 2007). Kompetícióban van több esszenciális fémion, úgymint a Ca^{2+} és a $Fe^{2+/3+}$, (Boulila-Zoghlami *et al*. 2006, Österås és Greger, 2006, Meda *et al*., 2006, Mendoza-Cózatl *et al*., 2008), de a Mn^{2+} és Zn^{2+} (Ramos *et al*., 2002, Mendoza-Cózatl *et al*., 2008) anyagcseréjével is, mind a gyökér, mind a hajtás több sejttípusa esetén. Állati sejtekben, valamint növényi sztóma zárósejtekben kimutatták, hogy a Cd^{2+} membránokon keresztüli mozgásakor Ca^{2+}-csatornákat/transzportereket használ (Verbost *et al*., 1989, Perfus-Barbeoch *et al*., 2002). Nem zárható ki azonban, hogy a Cd^{2+} a több más esszenciális nehézfémion (Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}) felvételéért is felelős, ZIP-családba tartozó transzporter segítségével (amilyen a gyökérben lokalizált IRT1 is, Rogers *et al*., 2000) vevődik fel (Kim és Guerinot 2007), Cd-stressz hatására ugyanis a gyökérben fokozódik a vas felvételéért felelős IRT1 transzkripciója (Hodoshima *et al*., 2007). Sok esetben vasfelesleg alakul ki a gyökérben (Fodor *et al*., 2005), bár cukorrépában kimutatták, hogy a Cd^{2+} gátolja a ferri-kelát-reduktáz aktivitását (Alcántara *et al*., 1994). Vashiányos közegben fejlődött növények esetében a hajtásba irányuló Cd^{2+}-transzlokáció magasabb intenzitása figyelhető meg. A vas mozgásában szerepet játszó transzporterekről ismert, hogy más, divalens átmeneti

fémek (Mn^{2+}, Zn^{2+}) transzportjában is fontos szerepet játszik, így – bár ez kísérletesen nem bizonyított – feltételezik, hogy ezek a transzporterek képesek lehetnek Cd^{2+} transzportjára is (Korshunova *et al*., 1999). Mindazonáltal a Cd^{2+} toxicitásának egyik kiemelkedően fontos tünete a hajtásban indukált erős vashiány (Fodor *et al*., 2005). A vas gyökérből hajtásba való transzlokációjában fontos szerepe van a citromsavnak (Rellán-Álvárez *et al*., 2010). Kimutatták, hogy Cd^{2+} jelenlétében a xilémparenchima sejtjeiben a citrát transzportjáért felelős FRD3 transzporter expressziója csökken (Yamaguchi *et al*., 2010). Az irodalmi adatok tükrében tehát nem zárható ki teljes bizonyossággal a kadmium-vas kompetíció a transzporterek, illetve a kelátorok szintjén sem. A Cu^{2+} transzlokációja is csökken Cd-stressz hatására (Clark *et al*., 1996). Gyökerekben a Cu^{2+} specializált transzportereket igényel mozgásához (Yruela, 2005). Mivel NA-komplexként transzlokálódik xilémelemekben, így a kelátorért kompetícióban áll más nehézfémekkel, melyek szintén stabil komplexet alkotnak a NA-nal (Pich *et al*., 1996). A Cd^{2+} - a Fe^{3+}-hoz hasonlóan – nem alkot stabil komplexet NA-nal a xilémnedv pH-ján. Nem ismert azonban, hogy a Cu-transzporterek szerepet játszanak-e a Cd^{2+} transzportjában. Pontosan nem ismert emellett, hogy a Cd^{2+} milyen útvonalat használ a hajtásba történő transzlokációja során. Feltételezések szerint a legvalószínűbb, hogy mozgásában a Ca^{2+}, Fe^{2+}, vagy más esszenciális nehézfém transzlokációjában részt vevő útvonalak játszanak szerepet. A hajtásba feljutott Cd^{2+} – hasonlóan más nehézfémekhez (Clemens *et al*., 2002) – leginkább a sejtfalakban akkumulálódik, kisebb mennyiségben azonban bejut a sejtekbe is (da Cunha *et al*., 2008). A szimplasztba jutó Cd^{2+} az apoplasztban felhalmozódó mennyiség 1/6-a körül marad *Lupinus albus* esetében (Vázquez *et al*., 2007). A Cd^{2+} szimplasztba történő bejutásának módja nem ismert, ebben feltételezhetően valamely más nehézfémion transzportját is végző ZIP-, vagy NRAMP-transzporternek van szerepe. Gyökerekben jól dokumentált a Cd^{2+} vas-transzportot és transzlokációt befolyásoló hatása (Clemens, 2006). Nem ismert azonban, hogy gyakorol-e hasonló hatásokat a Cd^{2+} a mezofillum sejtjeinek vas-felvételére illetve sejten belüli vas-transzportjára. A szimplasztba kerülő Cd^{2+} (4. ábra) erős toxikus hatást képes kifejteni a sejt biokémiai működésére. A Cd^{2+} detoxifikálására azonban több megoldás is létezik növényi sejtekben: tiolcsoportot tartalmazó kelátorok, így a glutation, vagy fitokelatinok szintézisének a fokozása (Cobbett, 2000), avagy a citoszolból metabolikusan inert kompartmentekbe történő szekvesztrálása (Calliatte *et al*., 2009).



4. ábra: A levélbe jutott Cd^{2+} hatása a mezofillumsejt metabolizmusára. Az ábra máshol nem alkalmazott rövidítései: GCS – γ-glutaminil-cisztein-szintetáz, GS – glutation-szintetáz, HMT1 – Heavy Metal Transporter 1, MT – metallothionein, PCS – fitokelatin-szintáz, PC – fitokelatin, PP_i – inorganikus pirofoszfát. Seregin és Kozhevnikova (2006) alapján, átdolgozva.

A vakuólumba történő szekvesztrálásban szerepet játszanak a glutation/fitokelatin-kötött Cd^{2+}-ot transzportáló ABC-transzporterek (Kim *et al*., 2007), illetve Cd^{2+}-ot transzportáló P-típusú ATPázok (Williams és Mills, 2005) és NRAMP-transzporterek (Krämer *et al*., 2007). A sejtekkel szemben, a kloroplasztiszokban a Cd^{2+}-felvételi rendszerét jóval kevésbé ismerjük. A Cd^{2+} valószínűleg többféle felvételi rendszeren keresztül is átjut a plasztisz

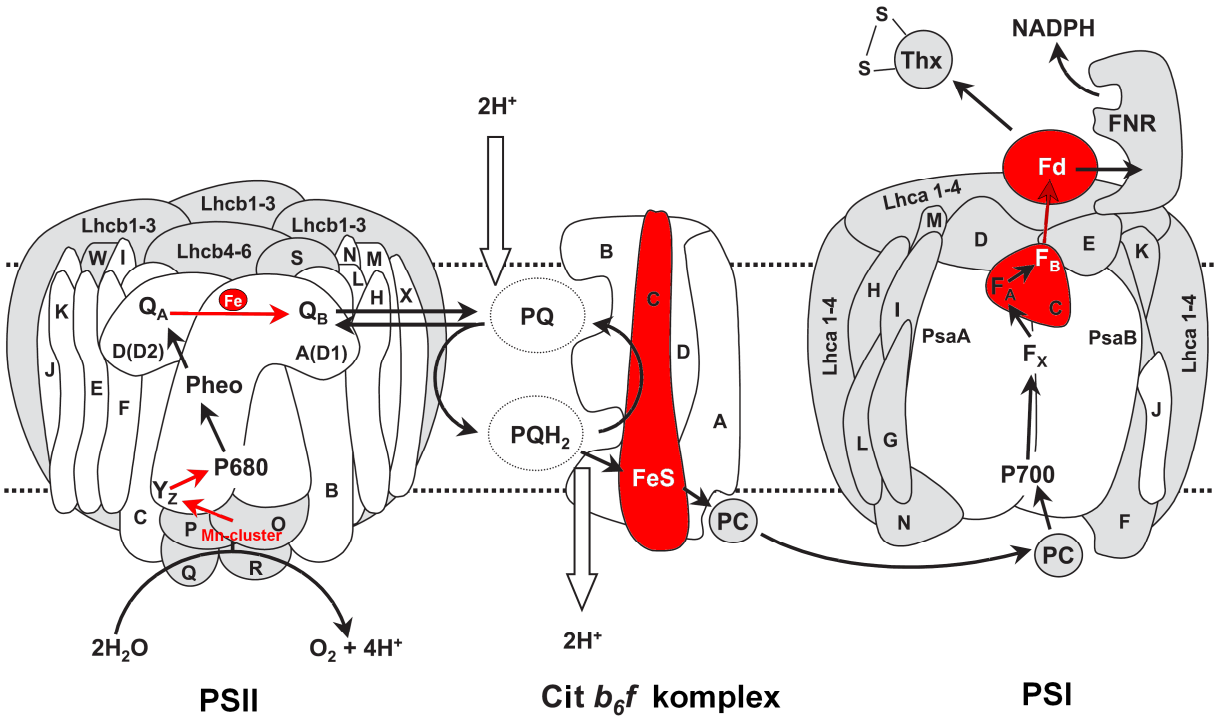
borítómembránján, melyek közül az egyik rendszer Zn^{2+}-ionokkal gátolható *Euglena gracilis* kloroplasztiszai esetén (Mendoza-Cózatl és Moreno-Sánchez, 2005).

4.2. A Cd^{2+} hatása a fotoszintetikus apparátus működésére és biogenezisére

A Cd általában gátolja a metabolikus folyamatokat. Gyenge Lewis-savként elsősorban szulfhidril-csoportokhoz koordinál, tönkretéve ezzel számos enzim aktív centrumát (Siedlecka és Krupa, 2002). Erősen változik a szerves metabolitok, pl. a szerves savak, szénhidrátok, aminosavak koncentrációja a sejtekben (Zoghlami *et al*., 2011). Cd^{2+} jelenlétében zavart szenved a Ca-szignalizációs útvonal, valamint emelkedik a ROS és a NO koncentrációja, mely számos regulációs választ indít el (Rodríguez-Serrano *et al*., 2009). A kadmium-indukált tartós sztómazáródás és a megnövekedett etiléntermelés szeneszcenciát idéz elő a levelekben (Prasad, 1995). Az öregedés jelei az organellumok szerkezetének megbomlása, a lipidperoxidáció mértékének megnövekedése, a membrán permeabilitásának megváltozása. Csökken a kloroplasztiszok mérete, megnövekszik bennük a plasztoglobulusok száma és mérete. A tonoplaszton invaginációk jelennek meg (Sandalio *et al*., 2001). A Cd^{2+} növeli a hidrolitikus enzimek aktivitását (ribonukleáz, dezoxiribonukleáz, savas foszfatáz), melyek aktivitása szintén az öregedéssel kapcsolatba hozott folyamatsorba illeszkedik.

A kadmium fotoszintézisgátlást okozó hatásai közül nagy jelentősége van a Ca-szignalizációval való kompetíció következtében fellépő sztómazáródásnak (Perfus-Barbeoch *et al*., 2002), de emellett a szénasszimilációt és a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működését is gátolja (Krupa és Baszyński, 1995, Prasad, 1995, Myśliwa-Kurdziel *et al.*, 2002, Hasan *et al*., 2009). A kadmium-indukált vashiány is fontos szerepet játszik a fotoszintetikus apparátus fejlődésének zavarában. Bár a Cd^{2+} jelenléte gátolja a Chl-tartalom emelkedését, elsősorban az δ-ALA-dehidratáz gátlásával, de hozzájárul ehhez a kadmium-okozta vashiány is, amely gátolja a Mg^{2+}-protoporfirin-IX-monometil-észter oxidatív ciklázt, és a Chl fehérjéhez való stabil kötődését (Padmaja *et al*., 1990, Horváth *et al*., 1996, Mishliwa-Kurdziel és Strzalka, 2002). Ismert a Cd^{2+} protoklorofillid-oxidoreduktáz:NADPH:protoklorofillid-*a* komplex szerveződésére gyakorolt káros hatása is (Böddi *et al*., 1995). A tilakoid komplexek stabilitása gyengül, melyek erőteljesen függenek a vasellátástól (Sárvári *et al*., 2010, Sárvári *et al*., 2011). A fotoszintézisben a kadmium-okozta hatások sok tekintetben emlékeztetnek a vashiány tüneteire. Vas hiányában, mint a Cd stressz esetében is, a Chl-bioszintézis gátolt (Marschner, 1995), a PSI komplexek mennyisége csökken és az antennák szerveződése

erőteljesen változik (Abadía *et al.*, 1989, Moseley *et al.*, 2002, Timperio *et al.*, 2007, Fagioni *et al.*, 2009). Az elektrontranszportlánc csökkent aktivitása (5. ábra), a Chl-*a* fluoreszcencia, valamint a fölös fényenergia termális energiává történő alakítása hasonló változásokat mutat vashiányos növényekben (Morales *et al.*, 1998, Belkhodja *et al.*, 1998), mint Cd-stressz esetében (Küpper *et al.*, 2007).



5. ábra: A Cd^{2+} hatása a fotoszintetikus apparátus működésére. Az ábra fekete nyilai mutatják az elektronok útját az elektrontranszportlánc komponensei között, míg piros nyilak jelzik Cd^{2+} által közvetlenül gátolt folyamatokat. A pirossal színezett helyeken fehér betűvel írottak az indukált vashiány által érintett Fe-tartalmú komponenseket jelölik. (Wilson *et al.*, 2006, ábrája alapján)

Sok más stresszorhoz hasonlóan, a PSII hatékonysága bizonyult a legérzékenyebbnek. Mindezt jól mutatja a PSII reakciócentrumok maximális hatékonyságában a Cd-stressz következtében fellépő csökkenés (Sigfridsson *et al.*, 2004, Küpper *et al.*, 2007). Számos, a Cd-stresszre érzékeny, avagy Cd^{2+}-kötődésben részt vevő, így a Cd^{2+} közvetlen gátló hatásában szerepet játszó helyet mutattak ki a PSII donor és akceptor-oldalán is (Sigfridsson

et al., 2004, Pagliano *et al.*, 2006). A nagyobb mértékű Cd^{2+}-transzport általában együtt járt a fotokémiai rendszerek erősebb gátlásával (Siedlecka és Krupa, 1999). Ugyanakkor, kadmium-kezelés mellett alkalmazott megemelt vasellátás nagyrészt kivédte a kadmium toxikus hatásait (Siedlecka és Krupa, 1996a, b; Siedlecka *et al.*, 1997, Meda *et al.*, 2006). Pozitív hatás volt kimutatható a Rubisco és az elektrontranszport aktivitásában, a Chl és a karotinoid-bioszintézis intenzitásának emelkedésében. Meg kell jegyezni azonban, hogy magasabb vasellátás mellett a Cd^{2+} hajtásba irányuló transzlokációja jelentősen lecsökkent. A fotoszintézis gátlása oxidatív stresszt indukál (Romero-Puertas *et al.*, 2004, Benavides *et al.*, 2005), mely végső soron a fotoszintetikus struktúrák degradációjához és szeneszcenciához vezet (McCarthy *et al.*, 2001). Bár a Cd^{2+} fotoszintézisre ható számos toxikus hatása ismert, ezek egzakt molekuláris mechanizmusa többnyire kevéssé feltárt. Mikromólos koncentrációban alkalmazott kadmium kompetitíve gátolja az esszenciális Ca^{2+}-kötőhelyeket a PSII vízbontó centrumában (Faller *et al*. 2005). Nem zárható ki azonban az oxigénevolúció direkt gátlása sem (Pagliano *et al*., 2006), mivel a Cd^{2+} képes helyettesíteni a Ca^{2+}-ot a PSII vízbontó centrumában. A csere a PSII működésének teljes inaktivációjához vezet (Brudvig *et al*., 2008).

4.3. A kadmium és az oxidatív stressz

A kadmium toxicitásához jelentősen hozzájárul a Cd-stressz következtében kialakuló oxidatív terhelés (Romero-Puertas *et al*. 2004, Zhang *et al*., 2009, Martinez-Domínguez *et al*., 2010). A kadmium biológiai rendszerekben vegyértékváltásra nem képes nehézfémionként van jelen (Olmos *et al*., 2003), így az okozott oxidatív stressz indirekt mechanizmusok eredményeképpen jön létre. A Cd-kezelt növények leveleiben az oxidatív stressz következtében ROS felhalmozódása figyelhető meg a sejtfalban és részben a kloroplasztiszokban (Zhang *et al*., 2009). A plasztiszokban mérhető magasabb ROS szint a fotoszintetikus aktivitás gátlásával, illetve a védőmechanizmusok csökkent hatékonyságával hozható kapcsolatba. Mindez részben a kadmium-indukált vashiány következtében kialakuló klorózis és fénystressz, valamint a Fe-kofaktort tartalmazó védőenzimek (FeSOD, aszkorbát peroxidáz) gátolt szintézisének/működésének az eredménye. A sejtfalban mérhető, jelentősen megnövekedett ROS szint viszont Fenton-reakciók eredménye lehet (Winterbourne, 1995). A sejtfalban megnövekedett ROS szint tehát a levél mezofillum sejtjeinek gátolt vasfelvételére, ezáltal sejtfalukban történő vas-felhalmozódásra enged következtetni.

5. A stressz és stresszválasz

Az élőlényeket érő terhelés (abiotikus, biotikus vagy mentális) az adott organizmus genetikai repertoárjától és pillanatnyi fiziológiai állapotától függő mértékben okoz károsodásokat egy szervezetben (Selye, 1973). Akut hatásként minden stressz a fiziológiai funkciók romlását okozza, azonban a stressz típusára és az élőlény fiziológiai állapotára jellemző indukciós idő elteltével – amennyiben a stressz nem okozza az élőlény azonnali pusztulását – megjelennek a jellemző védekező mechanizmusok, úgy anyagcsere, mint génexpressziós, regulációs, sőt viselkedési szinteken is. A védőmechanizmusok beindulásának hatására a fiziológiai funkciók javulásnak indulnak, sőt teljesen helyre is állhatnak (az élőlény hozzáedződik a stresszhez: hardening). A kadmium, mint abiotikus stresszor, szintén koncentrációtól, valamint a növénytől (genetikai állomány, fiziológiai állapot) függő válaszokat vált ki. A hiperakkumulátor fajok, bár nagy mennyiségben felveszik és felhalmozzák a kadmiumot szöveteikben (Yang *et al*., 2005, Kirkham, 2006), jelentős részben az effektív kadmium-koncentráció szervezeten belüli csökkentésével képesek a károsító hatásokat elkerülni (Ma *et al*., 2005). A hiperakkumulációra nem képes taxonok Cd-stresszel szembeni válasza nagyban függ a kadmium koncentrációjától. A kadmium taxonra jellemző, nem-letális koncentrációja, bár erős akut károsodásokat vált ki, hosszabb távon sok növény számára mégis többé-kevésbé tolerálható marad. Az olyan, relatíve alacsony érzékenységet és magas transzlokációt mutató taxonok, mint a *Populus* fajok, kadmium-felhalmozási képességük alapján mezoakkumulátor növényeknek tekinthetők. Akkumulációs képességük és nagy biomasszaprodukciójuk lehetővé teszi, hogy szennyezett területek mentesítésében váljanak hasznunkra (Wu *et al*., 2010). A fitoremediációs hatékonyság fokozása szempontjából kiemelt szerepet játszik a Cd-stressz molekuláris mechanizmusának feltárása, mely lehetőséget teremt a toxikus tünetek kezelésére/megelőzésére, így a hatékonyság növelésére is.

II. Célkitűzések

A kadmium közvetlen és közvetett hatásai rendkívül szerteágazóak: hatásmechanizmusában kiemelten fontos célpontot jelent a vas-homeosztázis megbontása. Nem-hiperakkumulátor, érzékeny növények esetében az akut Cd-stressz jól dokumentált. A szubletális dózisú Cd^{2+} hosszabb távú eltűrésének mechanizmusa, illetve a vas-homeosztázis változásának szerepe azonban a kadmium által okozott károsodások helyrehozatalában kevéssé ismertek. Ezért vizsgálatainkban a kadmium hatásaira érzékeny modellnövény kezelés alatt fejlődött leveleinek hosszabb (több hetes) időtartamon keresztüli tanulmányozását tűztük ki célül. Vizsgálni kívántuk továbbá az akut toxikus hatások kifejlődését követően a megemelt vasellátás hatását nagy mintavételi felbontás mellett. Ezekkel a kísérletekkel a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

- Milyen szerepet tölt be a kadmium a vas-homeosztázis zavarának kialakulásában?

- A krónikus Cd-stressz megváltoztatja-e a vas leveleken belüli lokalizációját?

- Milyen időbeli és ok-okozati összefüggésben állnak a fiziológiai funkciók változásai a megemelt vasellátás esetén tapasztalt regenerálódás során?

- Milyen védelmi mechanizmusokat indukál a krónikus Cd-stressz és milyen ok-okozati összefüggés mutatható ki a metabolikus változások között?

III. Anyagok és módszerek

1. Növényi anyag és alkalmazott kezelések

A vizsgálatokat hidroponikus kultúrában nevelt nyárfa (*Populus jacquemontiana var. glauca* (Haines) Kimura, 1982, cv. ’Kopeczkii’) növényeken végeztük (6. ábra). A mikroszaporított nyárfa növényeket klimatizált kamrában (14/10 h fény (120 µE m^{-2} s^{-1})/sötét periódusok, 24/22°C és 70/75% relatív páratartalom mellett) ¼-es Hoagland tápoldaton (1,25 mM $Ca(NO_3)_2$, 1,25 mM KNO_3, 0,5 mM $MgSO_4$, 0,25 mM KH_2PO_4, 0,08 µM $CuSO_4$, 4,6 µM $MnCl_2$, 0,19 µM $ZnSO_4$, 0,12 µM Na_2MoO_4, 11,56 µM H_3BO_3) neveltük 10 µM $Fe^{(III)}$-citrát vasforrás mellett. A tápoldatkészítéshez labortisztaságú vegyszereket (Reanal, Hungary) és deionizált vizet (G<4.0 µS) használtunk.

6. ábra: Cad (balra) és Ko (jobbra) tápoldaton nevelt nyárfa növények klimatizált növénynevelőben nevelve, a kezelés harmadik hetében.

A növénynevelő poharakban tápoldatot minden második napon cseréltük a növények alatt a kiegyenlített tápanyagellátás és tápoldatban oldott oxigén szinten tartására. A mikroszaporított növényeket négy lombleveles korig (~3 hétig) előneveltük, majd az első négy levél fölötti második (a továbbiakban: **+2**) levelet (mely teljes mértékben az alkalmazott kezelés alatt növekedett) vizsgáltuk. A növények egy részénél 10 µM $Cd(NO_3)_2$ kezelést alkalmaztunk (***Cad***) egy illetve három hétig. A regenerációs vizsgálatokat egy hetes Cad kezelt növényeken a Cd-ellátást megszüntetve és a vasellátást 50 µM-ra emelve végeztük (***Cad/Ko50***). A kezelt növények élettani paramétereit kezeletlen (***Ko***) növények adataival vetettük össze. A relatív fénystressz jellemzéséhez a Cad növények adatait a kontroll tápoldaton, de 250 µE m^{-2} s^{-1} fényintenzitáson nevelt növények (***L250*** kezelés) adataival vetettük össze.

2. Intakt kloroplasztiszok izolálása

Főerüktől megfosztott leveleket izoláló pufferben (50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, 0,1% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Na-aszkorbát) 2×3 s-ig homogenizáltunk Waring blendor homogenizátor segítségével. A homogenátumot 4 réteg géz és 2 réteg Miracloth™ (Calbiochem-Novabiochem, USA) segítségével szűrtük. A plasztiszokat 5 perces centrifugálással kilendülő rotorban (Sigma 11133), 1500×g-n, kiülepítettük. A kiülepedett plasztiszokat mosópufferben (50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM $MgCl_2$) szuszpendáltuk, és lépcsős szacharóz-gradiensre (50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 20/45/60% szacharóz, 2 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$) rétegeztük. Az intakt és a törött plasztiszokat kilendülő rotorban 20 perces centrifugálással 2000×g-n elválasztottuk. Az intakt plasztisz frakciót a 45/60% gradiens-határról gyűjtöttük össze, majd térfogatát mosópufferrel ötszörösére növeltük. A plasztiszokat 2500×g-n, 15 perces centrifugálással, kilendülő rotorban kiülepítettük. Az intakt kloroplasztiszokat mosópufferben szuszpendáltuk.

A plasztiszok koncentrációját Bürker-kamrában történő számlálással, Nikon *D*70 DSLR kamerával felszerelt Nikon Optiphot-2 fénymikroszkóppal (Nikon Co, Japan, objektív: Zeiss Apochromatic 40/0.95 160/0.17) határoztuk meg. A burkolómembrán integritását SPOt RT-KE Slider 7.4.2 kamerával (SPOT Imaging, Inc., USA) felszerelt Nikon Eclipse 80i fázis-kontraszt mikroszkóppal (Nikon Co, Japan, objektív: Nikon Plan 40×/0.65 Ph2 DL inf/0.17 WD 0.56), Bürker-kamrában azonosítottuk. A class-I és class-II plasztiszokat (Walker, 1965), a fáziskontrasztos és fénymikroszkópos képek összevetése alapján, a fénymikroszkópos

fényképeken Cell Counter pluginnel felszerelt ImageJ programmal (rsbweb.nih.gov/ij/) számláltuk meg.

3. Iontartalom vizsgálatok

3.1. Növényi minták iontartalma

Az egy hétig 60°C-on szárított szövetminták előkészítése savas feltárással történt. A minták 1 g-jához (kisebb össz száraztömegű minta esetén megfelelő arányban csökkentett) 10 ml cc. HNO_3-at adtunk, majd egy éjszakán át állni hagytunk. Az előroncsolás (30 min, 60°C) után 3 ml H_2O_2 (30% m/m) adtunk hozzá és tovább roncsoltuk (90 min, 120°C). Roncsolás után deionizált vízzel az 50 ml-re kiegészített mintákat MN 640W jelű szűrőpapíron szűrtük. (Kis mennyiségű minta esetén ultrahangos feltárást alkalmaztunk. A bemért mintához 2 ml cc. HNO_3-at adtunk és egy éjszakára állni hagytunk. Ezt követően először 30 min, 60°C-os szonikálást, majd 0,6 mL cc. H_2O_2 (30%, m/m) hozzáadása után 3 h, 80°C-os szonikálást alkalmaztunk. Végezetül a deionizált vízzel 10 mL-re kiegészített mintákat szűrtük.) A nagyobb tömegű mintákat ICP-OES-sel (Induktív Csatolású Plazma Optikai Emissziós Spektrométer, Thermo-Fisher, USA; kimutatási határ 1-10 ppb (µg/kg), a mérés lineáris tartománya 4-5 nagyságrend) mértük. A kisebb tömegűek, illetve a kis mennyiségben jelenlévő toxikus elemek mérésére ICP-MS-t (Induktív Csatolású Plazma Tömegspektrométer, Perkin-Elmer, USA); kimutatási határa 1 ppt (pg/ml), a dinamikus mérési tartomány 8-10 nagyságrend) használtunk.

Plasztiszok elemtartalom-analíziséhez a mosott kloroplasztiszokat deionizált vízben szuszpendáltuk, majd az elemtartalmakat egy hét 60°C szárítást követően a levélmintákkal megegyező módon határoztuk meg.

A mintákban az Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sc, Sr, Ti és Zn koncentrációját vizsgáltuk. A minták feltárását Tóth Brigitta és Dr. Lévai László (Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Növénytudományi Intézet, Növénytani és Növényélettani Csoport), az ICP méréseket pedig a Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum, Élelmiszertudományi Minőségbiztosító és Mikrobiológiai Intézet elemanalitikai laborjának munkatársai végezték.

3.2. Plasztisz vastartalom vizsgálata BPDS-módszerrel

Az izolált intakt plasztiszokat 100 μg Chl mL^{-1} koncentrációra hígítottuk mosópufferrel. A 2500 ×g, 5 min centrifugálással kiülepített plasztisz csapadékot 0,5 mL felvevőpufferben reszuszpendáltuk, és 1% SDS, 1% DTT jelenlétében szobahőmérsékleten 30 percig szolubilizáltuk. A nem-szolubilizálódott anyagokat (keményítő) 10000×g, 5 min centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszóhoz 100 μM aszkorbinsavat és 300 μM BPDS dinátrium sót (Sigma) adva, 60 perc színfejlődési idő leteltével mértük a vastartalmat $[Fe(BPDS)_3]^{4-}$ komplexek formájában UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Japan) 535 nm-en.

3.3. Vasfelvétel mérése tápoldatból BPDS módszerrel

A tápoldat vastartalmát a tápoldatból 1 mL mintát véve 100 μM aszkorbinsav és 300 μM BPDS jelenlétében mértük fotometriásan, UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Japan).

4. Pigmentmeghatározás

Levelek klorofill- (Chl) tartalom meghatározásához dugófúróval (belső Ø: 5,5 mm) levélkorong-mintákat vettünk a levelek különböző részeiből. A minták Chl-tartalmát 5 mM Tricin-KOH-t (pH 7,8) tartalmazó 80%-os (v/v) acetonos kivonatból kéthullámhossz-módszerrel határoztuk meg (Porra *et al*., 1989). A minták fényszórásának kiküszöbölésére a 800 és 730 nm közötti abszorpció-emelkedés mértéke alapján (E_{800}=0) korrekciót végeztünk. A számoláshoz az alábbi képleteket használtuk:

$$\text{Chl-}a\ (\mu g/cm^2) = [(12{,}25\times(E_{663,6}-E_{730}/70\times136{,}4) - 2{,}55\times(E_{646,6}-E_{730}/70\times153{,}4)]\times\text{térfogat (ml)}\times\text{hígítás/felület (cm}^2)$$

$$\text{Chl-}b\ (\mu g/cm^2) = [(20{,}31\times(E_{646,6}-E_{730}/70\times153{,}4) - 4{,}91\times(E_{663,6}-E_{730}/70\times136{,}4)]\times\text{térfogat (ml)}\times\text{hígítás/felület (cm}^2)$$

A karotinoidtartalom-mérésekhez és a xantofill-ciklus komponenseinek meghatározásához 30 percig sötéthez, illetve 120 µE m^{-2} s^{-1} fényhez adaptált levélkorongokat használtunk, melyeket folyékony nitrogénben tároltunk a meghatározásig. A karotinoidokat 4°C-on 0,1 % (v/v) NH_4OH-ot tartalmazó 80%-os (v/v) acetonnal történt kivonás után HPLC oszlopkromatográfiás módszerrel választottuk szét (Nucleosil C18 oszlop, UV/VIS detektor [JASCO Int. Co., Japan]). Az alkalmazott eluensek acetonitril-víz (9:1, 0.01% [v/v] trietilamin) elegy és etil-acetát voltak. A csúcsok azonosítása, valamint a pigmentkoncentrációk számolása zeaxantin standard segítségével történt (Tóth *et al.*, 2002). A xantofill-ciklus de-epoxidáltsági állapotát a (Z+0,5A)/(V+A+Z) képlettel számoltuk, ahol $\Delta DEEPS = DEEPS_{fény} - DEEPS_{sötét}$. A karotinoidok elválasztását Szöllősi Erzsébet és Dr. Mészáros Ilona végezték el (Debreceni Egyetem, Növénytani Tanszék).

5. A tilakoidok Chl-protein összetételének meghatározása

5.1. Tilakoidmembránok izolálása

A leveleket izoláló pufferben (50 mM Tricin-KOH (pH 7,8), 0,4 M szorbitol, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$) homogenizáltunk 3x5 s-ig Waring blendor homogenizátor segítségével 0-2°C-on. A homogenátumot 4 réteg géz és 2 réteg Miracloth™ (Calbiochem-Novabiochem, USA) segítségével szűrtük, ezután 7 percig 1000×g-n (kezelteket 2000xg-n) centrifugálva ülepítettük le a plasztiszokat. A csapadékban kapott plasztiszok borítómembránját és az oldható fehérjéket 10 mM $Na_4P_2O_7$ (pH 7,4) pufferrel mosva távolítottuk el, majd a tilakoidmembránokat 7 percig 5000×g-n centrifugáltuk. A csapadékot 5 mM Tricin-$(CH_3)_4NOH$ (pH 7,5), 0,1 M szorbitolban szuszpendálva a CF_1 nagy részét eltávolítottuk a tilakoidokról. Ezt követően, a keményítő kiülepítéséhez 3 percig 300×g-n centrifugáltuk a szuszpenziót. A felülúszó 10 perces 10000×g történő centrifugálásával kaptuk meg a mosott tilakoidokat, amit 2 mM Trisz-maleátot (pH 7,0) és 40% glicerint tartalmazó (szolubilizáló és tároló) oldatban szuszpendálva felhasználásig folyékony nitrogénben (77 K) tartottunk.

5.2. Chl-proteinek izolálása és elválasztása natív gélelektroforézissel

A tilakoidokat nagyrészt glükozidos detergensekkel szolubilizáltuk. Ezután a Chl-proteineket Deriphat-PAGE segítségével választottuk el egymástól (Sárvári és Nyitrai, 1994).

Szolubilizálás: A kívánt detergens/Chl arány eléréséhez (ennek értéke 10, illetve esetenként 15) szükséges mennyiségű 10%-os detergens oldatot (nonil-glükozid: dodecil-szacharóz: lítium-dodecil-szulfát=4,5:4,5:1) adtunk a mintához. Vortex-szel összekevertük, majd 30 percet jeges vízben állni hagytuk. Eközben időnként újra összeráztuk a mintákat. A nem szolubilizálódott tilakoidokat 10 perces 10000×g-s centrifugálással ülepítettük ki.

Gélelektroforézis: A felülúszóban lévő fehérjéket poliakrilamid grádiens gélelektroforézissel (**PAGE**) választottuk el egymástól. A tömörítő gél összetétele 4% akrilamid (akrilamid:bisz-akrilamid=30:0,8), 0,1 M Trisz-HCl (pH 6,1), 10% glicerin, 0,1% Deriphat, 0,16% TEMED és 0,025% ammónium-perszulfát volt. A szeparáló gél 7-12%-os akrilamid gradienst (akrilamid:bisz-akrilamid=100:1), 5-15%-os szacharóz gradienst, 0,057-0,071%-os TEMED gradienst, 1,3147 M Trisz-HCl-t (pH 9,8), 10% glicerint, 0,1% Deriphatot és 0,0143% ammónium-perszulfátot tartalmazott. A kész géleket (10x8x0,15 cm) MiniProtean (BioRad Laboratories, Inc.) elektroforézis rendszerben, eltérő felső (25 mM Trisz, 192 mM glicin, pH 8,3, 0,2% (w/v) Deriphat) illetve alsó (25 mM Tris, 192 mM glicin, pH 8,3) tartálypuffer használata mellett elektroforetizáltuk 4-8°C-on, 10 mA/géllap állandó áramerősség alkalmazásával.

5.3. SDS-PAGE (fehérjetartalom meghatározás)

Szolubilizálás: a szolubilis és membránfehérjéket 62,5 mM Trisz-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 2% DTT, 10% glicerin és 0,001% brómfenolkék jelenlétében 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd mintahelyenként hozzávetőlegesen 10-50 µg fehérjét vittünk fel a gélekre. A natív gélelektroforézissel elválasztott protein-komplexeket tartalmazó kivágott gélcsíkokat a denaturáló gél tetejére helyeztük, majd agarózt tartalmazó szolubilizáló pufferrel rögzítettük.

Gélelektroforézis: 7 cm hosszú, 10-18%-os gradiens géleken történt. MiniProtean (BioRad Laboratories, Inc.) gélfuttató rendszerrel dolgoztunk. A tömörítő gél 5% (m/v)

akrilamidot, 125 mM Trisz-HCl-t, pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS-t, a szeparáló gél 10-18%-os lineáris akrilamid gradienst, 375 mM Trisz-HCl-t, pH 8,8 és 0,1% SDS-t tartalmazott. Az akrilamid:bisz-akrilamid arány 30:0,8 volt. A polimerizációhoz a tömörítő gélben 0,01% (v/v) TEMED-et és 0,1% (m/v) ammónium-perszulfátot, a szeparáló gélben 0,013-0,017% (v/v) TEMED grádienst és 0,04% (m/v) ammónium-perszulfátot használtunk. Az elektródpuffer 25 mM Trisz, pH 8,3, 192 mM glicin, 0,1% (m/v) SDS volt (Laemmli 1970). Az elektroforézist hűtőszekrényben, 10 mA, majd a minta teljességében a gélbe történt bejutását követően megemelt, 20 mA/géllap állandó áramerősséggel végeztük, amíg a jelzőfesték (körülbelül két óra) elérte a gél alját.

Festés: a futtatás után a géleket 2% (v/v) orto-foszforsavat és 50% (v/v) metanolt tartalmazó oldatban fixáltuk, majd 34% (v/v) metanolt, 17% (m/v) ammónium-szulfátot, 2% (v/v) foszforsavat és 0,5% (m/v) Coomassie G-250-et tartalmazó elegyben festettük (kolloidális Coomassie-festés). Festés után a géleket deionizált vízben tároltuk.

5.4. Gélek értékelése

A futtatást követően a natív géleket szkenneltük, majd a pigmenttartalom alapján kapott denzitogrammokat Phoretix 4.01 szoftver (Phoretix International, Newcastle upon Tyne, UK) segítségével értékeltük ki. A sávokban futó komplex/Chl-protein abszolút mennyiségét az 1 cm^2 felületű levélmennyiség Chl-tartalmának a sávok relatív arányában történő szétosztásával kaptuk meg. A komplexek fehérjeösszetételének meghatározásához a szétválasztott zöld sávok fehérje-komponenseit második dimenzióban, denaturáló körülmények között, SDS-PAGE-n szétválasztottuk. A fehérjemintázat alapján azonosítottuk a sávokat. Az azonos tilakoid-partikulumhoz tartozó komponensek mennyiségét összeadtuk. Fehérjetartalom meghatározáshoz az SDS gélen futtatott minták denzitását egy ismert mennyiségű standard proteinkeveréket tartalmazó minta denzitásával összehasonlítva határoztuk meg.

6. Kummulatív fenoloid-tartalom mérés

A friss levélmintákat 62,5% metanolt és 0,6 M HCL-t tartalmazó közegben 90°C-on 60 percig inkubáltuk, majd 5 perces, 10000 ×g centrifugálás után a felülúszó abszorbanciáját (UV-VIS spektrofotométer, Shimadzu, Japan) 280 és 320 nm között mértük és integráltuk.

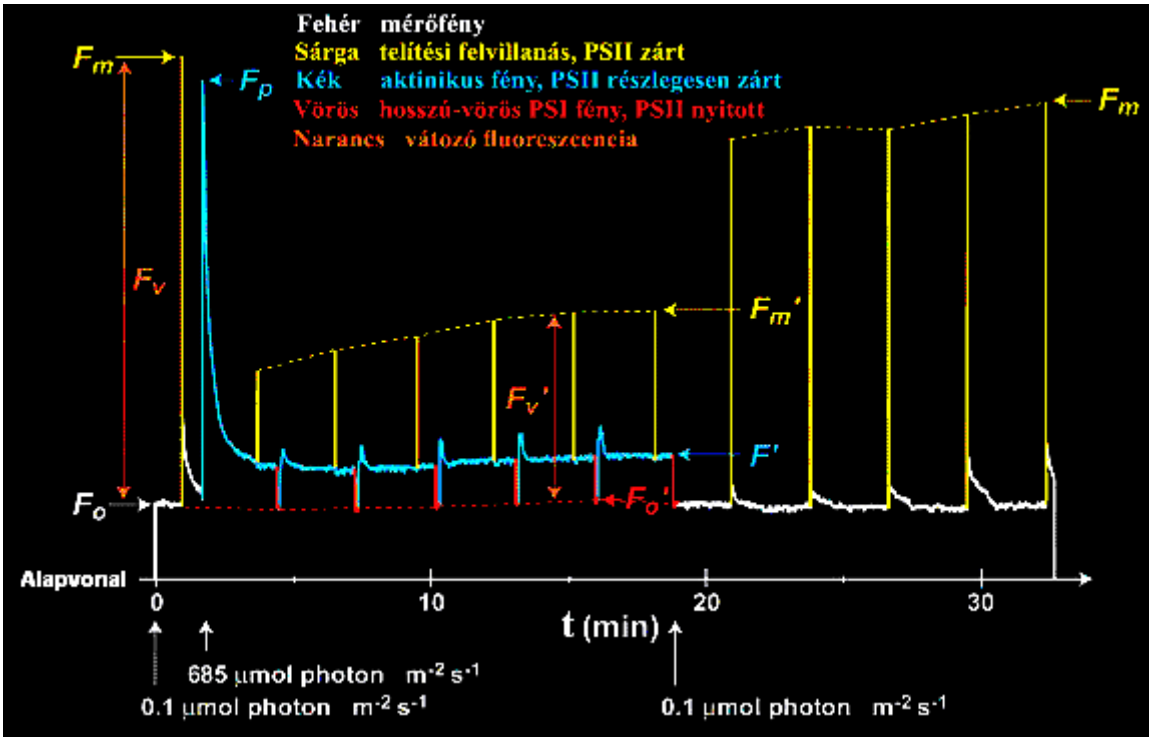
7. Levelek *in vivo* fluoreszcencia-spektruma és natív fluoreszcens mikroszkópiai vizsgálata

Levelek fluoreszcencia-spektrumát 400-700 nm között (2 nm résszélesség mellett) regisztráltuk (λ_{exc}=365 nm) Fluoromax-2 fluoriméter (Jobin Yvonne, France) segítségével.

Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat levelekből készült natív, félvékony kézi metszeteken végeztünk. Olympus BH-2 fluoreszcens mikroszkópot (Olympus Co., Japan) és UG2 gerjesztő szűrőt (λ_{exc}=360-370 nm) használtunk. A fluoreszcens jelet λ = 510-525 nm emissziós szűrőn keresztül mértük.

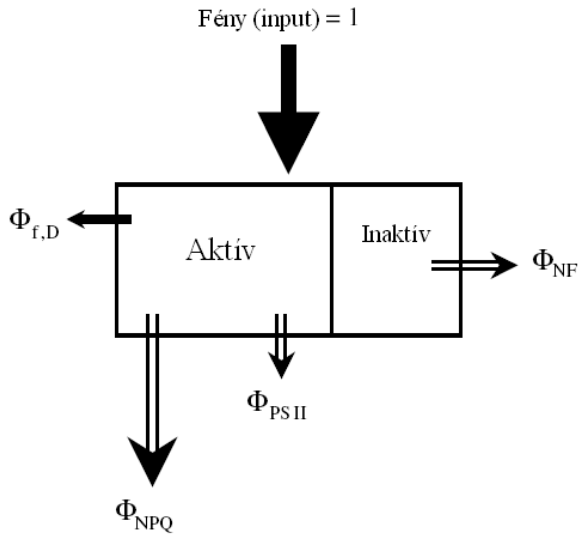
8. Fotoszintetikus aktivitás vizsgálata: fluoreszcencia indukció

A Chl-*a* fluoreszcencia indukciós méréseket PAM 101-102-103 Chlorophyll Fluorometerrel (Walz, Effeltrich, Germany), intakt leveleken végeztük (7. ábra). A leveleket levélkamrában 30 percig sötéthez adaptáltuk. Az F_0-szintet a mérőfény (foton fluxus denzitás [PPFD] <1 µmol m^{-2} s^{-1}, modulációs frekvencia 1,6 kHz) bekapcsolása után határoztuk meg. A maximális fluoreszcencia-hozamot sötét- (F_m) és fényadaptált állapotban (F_m') is meghatároztuk 0,7 s időtartamú telítő fényfelvillanás hatására (3500 µmol m^{-2} s^{-1} PPFD, fényforrás: KL 1500 electronic, Schott, Mainz, Germany), amely zárta a PSII reakciócentrumokat. A PSII reakciócentrumok maximális illetve aktuális hatékonyságát a $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$ illetve a $\Delta F/F_m'=(F_m'-F_t)/F_m'$ képletekkel számoltuk. Kioltási vizsgálatokhoz aktinikus fényt (100 µmol m^{-2} s^{-1} PPFD, KL 1500 electronic) alkalmaztunk 100 kHz modulációs frekvenciára kapcsolással párhuzamosan. A levelek fényadaptált állapotra jellemző fluoreszcencia-értékeit két, 100 s különbséggel alkalmazott fehér fényfelvillanás hatására változatlan F_m' értékek esetén határoztuk meg. A fényadaptált állapotra jellemző F_0' értékeket a redukált elektrontranszportlánc-karrierek 3 s távoli vörös fényimpulzus segítségével történő oxidálása után határoztuk meg.



7. ábra: fluoreszcencia indukció kinetikai diagramja, a mérésben meghatározott paraméterek értelmezéséhez, Baker (2008) alapján.

A gerjesztési energia allokációjának vizsgálatához (8. ábra) a Hendrickson *et al.* (2005) által kidolgozott kioltási paramétereket módosított formában használtuk. A paraméterek definíciója megegyezik a Hendrickson *et al.* (2005) munkában közöltekkel: $\Sigma E_{exc}=\Phi_{PSII}+\Phi_{NF}+\Phi_{NPQ}+\Phi_{f,D}=1$, és a Φ_{PSII} paraméter a PSII elektrontranszportjának részesedése, Φ_{NPQ} a fényfüggő, ΔpH-és xantofill-mediált szabályozott terminális energiadisszipáció aránya, $\Phi_{f,D}$ a fluoreszcencia és a konstitutív terminális disszipációs aránya és Φ_{NF} a nem működőképes PSII reakciócentrumok terminális kioltásának aránya az elnyelt fényenergia allokációjában. A paraméterek számolása azonban Solti *et al.* (2009) által módosítva történt: a párhuzamosan nevelt kontroll növények leveleinek átlag F_v/F_m értékeit alkalmaztuk standardként, mint kvázi inhibíciót nem szenvedett PSII (kontroll) hatékonyságokat (F_{vM}/F_{mM}).



$$\Phi_{PSII} = (1 - \frac{F_t}{F_m'}) * (\frac{F_v / F_m}{F_{vM} / F_{mM}});$$

$$\Phi_{NPQ} = (\frac{F_t}{F_m'} - \frac{F_t}{F_m}) * (\frac{F_v / F_m}{F_{vM} / F_{mM}});$$

$$\Phi_{f,D} = (\frac{F_t}{F_m}) * (\frac{F_v / F_m}{F_{vM} / F_{mM}});$$

$$\Phi_{NF} = 1 - (\frac{F_v / F_m}{F_{vM} / F_{mM}});$$

8. ábra: a II. fotoszisztéma által elnyelt gerjesztési energia sorsa, valamint a számításhoz használt képletek a paraméterek értelmezéséhez.

9. Fluoreszcencia leképezés

A fluoreszcencia leképezéshez felvillanás-indukált fluoreszcencia leképező rendszert (FL-FIS, Szigeti, 2008) alkalmaztunk. A fluoreszcencia intenzitásokat 440, 520, 690 és 740 nm hullámhosszon mértük. A gerjesztéshez 16,7 Hz frekvenciával villogó xenonlámpát használtunk, melynek gerjesztő fényét DUG 11 (Schott, Germany) szűrővel λ_{exc} = 360–370 nm hullámhossztartományra állítottuk be. A gerjesztési tartomány a kék-zöld és a vörös fluoreszcencia egyidejű gerjesztését teszi lehetővé. A gerjesztés hatására a minta által emittált fluoreszcens fény optikai és erősítő rendszeren keresztül jutott a xenon lámpa villogásával szinkronizált, fél megapixel felbontású CCD kamerába (objektív: Nikon-AF Nikkor, Japan, 1:1,4 D, 50 mm Ø). A megfelelő hullámhossz tartományokat a kamera egy megadott program szerint, megfelelő szűrőkkel szűrte ki. Az így keletkező kis intenzitású fluoreszcens jel erősítésére és a pillanatnyi fluktuáció kiegyenlítésére a kamera 400 intenzitásképet vett fel, melyeket a mérőszoftver adott össze. A fluoreszcencia térképeket a levelek adaxiális oldaláról szobahőmérsékleten készítettük. Az intenzitástérképeket korrigáltuk a filterek érzékenységi paramétereivel, a háttérből eredő fényszennyezéssel és fluoreszcens zajjal, valamint a megvilágító fény egyenetlenségéből eredő inhomogenitással. A fluoreszcencia leképezést

Camille 1.04, a korrekciókat és a matematikai műveleteket Camille 1.05 (Photonetics, Kehl, Germany) szoftverrel végeztük. A fluoreszcencia-arányok megállapításához a levél legnagyobb szélességénél maximálisan kijelölhető négyzet felületet használtuk reprezentatív mintaként, elkerülendő hogy a mérőprogram a háttérből származó információt is hozzászámolja az arányok értékeihez. A kijelölt felületek nagysága az arányok értékét érdemben nem befolyásolta (az ebből származó hiba két nagyságrenddel kisebb volt az azonos kezelésű növények közötti különbségnél).

10. A lipidperoxidáció mérése

A lipidperoxidáció mértékét a folyamat egyik fő termékének, a malondialdehidnek (MDA) tiobarbituráttal történő reakciójának kimutatásán alapuló módszerrel határoztuk meg (Heath és Packer, 1968). 100 mg friss növényi anyagot 1 mL 0,1% (v/v) triklórecetsavban homogenizáltunk. A 15000×g, 5 perc centrifugálással nyert felülúszóhoz a térfogatával megegyező mennyiségű 20% (w/v) triklórecetsavat és 0,5 % (w/v) tiobarbiturátot tartalmazó reakcióelegyet adtunk, majd 30 percig, 90°C-on inkubáltuk. A lehűtött reakcióelegy abszorpcióját 532 nm-en UV-VIS spektrofotométerrel (Shimadzu, Japan) mérve határoztuk meg a keletkezett MDA mennyiségét (ε=155 mM^{-1} cm^{-1}).

11. Enzimaktivitások mérése

11.1. Aszkorbát peroxidáz (APX)

Az APX (L-aszkorbát: H_2O_2 oxidoreduktáz, E.C. 1.11.1.11) enzimaktivitását Nakano és Asada (1981) módszere alapján mértük. 100 mg friss növényi anyagot dörzsmozsárban 1 mL pufferben (50 mM Na-K-foszfát (pH 7,0), 1 mM EDTA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 5 mM aszkorbinsav, 2% m/V polivinil-pirrolidin) homogenizáltuk, majd a szolubilis fehérjéket 15000×g, 15 perc centrifugálással elválasztottuk. Az APX aktivitást az aszkorbát H_2O_2-függő oxidációjakor bekövetkező 290 nm-es abszorbancia csökkenés nyomon követésével mértük UV-VIS spektrofotométerben (Shimadzu, Japan) a reakcióban fogyott H_2O_2 mennyisége alapján (ε=2,8 mM^{-1} cm^{-1}). A reakcióelegy összetétele 50 mM Na-K-foszfát puffer (pH 7,0), 0,1 mM H_2O_2, 0,5 mM aszkorbinsav és 0,1 mM EDTA és 100 µl enzimextraktum volt.

11.2. Szuperoxid diszmutáz (SOD)

A SOD (E.C. 1.15.1.1.) aktivitását Smeets *et al*. (2005) módszere alapján határoztuk meg. 100 mg friss növényi anyagot 1 mL izoláló elegyben [50 mM Na-K-foszfát puffer (pH 7,8), 3 mM $MgSO_4$, 3 mM EDTA, 2% m/V polivinil-pirrolidin] homogenizáltunk, majd a szolubilis fehérjéket 15000×g, 10 perc centrifugálással választottuk el. A SOD izoenzimek aktivitását natív poliakrilamid gélen történő elválasztást követően negatív aktivitásfestéssel határoztuk meg. A mintákat elválasztás előtt gyengén szolubilizáltuk (5 mM Trisz-HCl [pH 6,8], 0,01% SDS, 10% glicerin, 0,001% brómfenolkék). A tömörítő gél összetétele 4% akrilamid, 0,125 M Trisz-HCl (pH 6,8), 10% glicerin, 0,01% SDS, 0,056% TEMED és 0,112% ammónium-perszulfát volt. A szeparáló gél 10-18%-os akrilamid gradiens, 5-15%-os szacharóz gradiens, 0,013-0,017%-os TEMED gradiens, 0,375 M Trisz-HCl-t (pH 8,8), 10% glicerin, 0,01% SDS és 0,04% ammónium-perszulfát felhasználásával készült (Laemmli, 1970 alapján, módosítva). A kádpuffer 0,025 M Trisz és 0,192 M glicin volt. Az elválasztás 4-8°C-on, 20 mA/géllap állandó áramerősség mellett történt. A natív elektroforézissel elválasztott izoenzimek aktivitásfestését 50 mM Na-K-foszfát puffer (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metionin, 60 μM riboflavin, 2,25 mM nitroblue-tetrazólium-klorid oldatában 15 perces sötétben végzett pre-inkubáció után 30 perces megvilágítással végeztük. A denzitometrált gélekben a sávok denzitását Phoretix 4.01 szoftverrel (Phoretix International, Newcastle upon Tyne, UK) értékeltük ki.

11.3. Class-III peroxidáz (POX)

A peroxidázok (POX) kinyerését és elválasztását a SOD izoformákkal megegyező módon végeztük. A POX izoformák aktivitásfestését 30 perc, 2 mM benzidin (DMSO-ban oldva), 3 mM H_2O_2, 50 mM K-acetát puffer (pH 4,5) oldatában végeztük. A reakció leállítását követően a géleket 50% metanolban fixáltuk. A szkennelt gélekben a sávok denzitását Phoretix programmal értékeltük.

12. Mintavétel, statisztikai elemzések, illesztések

A levél elemtartalom analíziseket és karotinoidtartalom-meghatározásokat mérési pontonként 2×2 (biológiai×technikai), míg a fluoreszcencia indukciós méréseket és Chl-tartalom méréseket 3×3 ismétlésben végeztük. Az enzimaktivitás- illetve tilakoidmembrán-összetétel vizsgálatokhoz 2-3 biológiai ismétlés során nevelt, több növény azonos levélemeletéről származó, >2 levélből izolált átlagmintákat használtunk.

A statisztikai analízisben párosítatlan t-próbát és ANOVA-t használtunk (Microsoft Office Excel 2007 és InStat v3.00 [GraphPad Software, Inc.] segítségével). A lineáris regressziókat szintén e két program használatával készítettük. A ’szignifikánsan eltérő’ kifejezést – ahol külön nem jelöljük – $P<0,05$ statisztikai hasonlóságra alkalmazzuk.

IV. Eredmények

1. Hosszú idejű kadmium-stressz-indukálta változások nyárfában

Más stresszorokhoz hasonlóan, a kadmium hatása is függ a dózistól, az expozíciós időtől és az organizmus védekezőképességétől is. Így a védekező- és toleranciamechanizmusok megjelenésének időbeliségét, valamint a fotoszintetikus paraméterek helyreállását vizsgáltuk a még tolerálható koncentrációjú Cd hosszabb távú, több hetes jelenléte mellett nyárfa növényekben. A ’**Cad** kezelés’ alatt a nyárfa növények 10 μM $Cd(NO_3)_2$-tal történt kezelését, míg kontroll (**Ko**) alatt a 10 μM vas-citrát táplálással nevelt növényeket értjük.

1.1. A növekedési paraméterek változása

A kadmium-stressz jelentősen befolyásolta a növények növekedését és fejlődését. A kezelés alatt fejlődött második (+2) levelek növekedése erősen gátlódott. Mind a levelek felületnövekedése, mind a száraz- és a frisstömeg gyarapodása jelentősen elmaradt a kontroll növények +2 leveleinél mért értékektől. A kontroll növények +2 levelei a kezelési idő 10-11. napjára fejezték be a felületnövekedésüket, maximális felületük 129,1±6,1 cm^2 volt. A Cad kezelt növények +2 levelei a kezelés 9-10. napjára érték el maximális kiterjedésüket (58,1±2,3 cm^2), ezután további felületnövekedést nem tapasztaltunk. A levelek frisstömeg-gyarapodása a felületnövekedéssel megegyező ütemű volt: A kontroll növények +2 leveleinek friss tömege kifejlett állapotban 785,7±168,2 mg, míg a Cad kezelt növényeké 518,6±20,6 mg volt. A száraztömeg gyarapodása a kontroll növények +2 leveleiben a frisstömegével megegyező ütemű volt, a kezelési idő 12. napjára érte el kifejlett levelekre jellemző értékét (124,0±6,9 mg), utána már csak kismértékű (nem szignifikáns, de tendenciózus) emelkedés volt mérhető. Cad kezelés hatására a száraztömeg szintén mutatott kb. 10%-nyi további emelkedést a levélfelület növekedésének befejeződését követően (a kezelési idő 21. napján 88,9±1,2 mg volt), így a száraztömeg-gyarapodás üteme nem mutatott szignifikáns eltérést kontroll növényekhez képest. Az elhanyagolható mértékű száraztömeg-változás miatt a kezelés második és harmadik hetében végzett transzlokációs vizsgálatokban, a levelek száraztömegét használtuk, mint vonatkoztatási alapot az elemkoncentrációk meghatározásában.

1.2. A kadmium hatása az elemakkumulációra

1.2.1. A növényneveléshez használt tápoldat elemtartalma

A növényneveléshez deionizált vízből (G<4,0 µS) készítettünk tápoldatot, mely a tisztítás ellenére mérhető mennyiségben tartalmazott számos fémes illetve nemfémes elemet (1. táblázat). A deionizált vízben nem volt jelen detektálható mennyiségben Cd, Sc és Ti, az egyéb átmeneti fémek azonban közel azonos koncentrációban voltak kimutathatók. Néhány esszenciális nehézfém, mint a Cu és a Mo, koncentrációja a deionizálás ellenére is magas maradt, így összevethető volt a tápoldatban használt teoretikus koncentrációval. A Na és a Zn koncentrációja pedig meghaladta a negyedes erősségű Hoagland tápoldatét. Számos nem-esszenciális fém, így az Al, Ba, Cr, Li és Sr koncentrációja összemérhető volt egyes esszenciális fémekével (Cu, Mn, Mo). A tápoldat-készítéshez használt vegyszerekből további kis mennyiségű szennyező fém jutott a tápoldatba, mely jól látszik a deionizált víz és a tápoldat elemkoncentrációinak összevetéséből (1. táblázat). Egyes fémek, így a Sc és a Ti koncentrációja azonban még a tápoldatban is alatta maradt az ICP-MS mérési küszöbének.

1.2.2. Változások a levelek elemtartalmában

Kifejlődésük alatt, valamint azt követően is elem felhalmozódás volt mérhető +2 levelekben. Az elemek koncentrációja elsősorban a levélnövekedés periódusa alatt emelkedett, míg a kifejlődés után csak kismértékű további transzlokáció volt megfigyelhető. Ez utóbbi időszakban a makroelemek közül a K és a Ca száraztömegre számolt koncentrációja a Ko növények leveleiben tendenciózus, de nem szignifikáns növekedést mutatott (1. táblázat). A P és a S koncentrációja némileg ellentétesen változott a levélnövekedési időszakot követően, míg a Mg koncentrációja nem mutatott szignifikáns változást. A kifejlődés alatt és után mérhető mennyiségű (>0,1 ppm) esszenciális mikroelem (B, Cu, Fe, Mn, Na és Zn) és nem-esszenciális elem (Al, Ba, Cr, Li, Ni, Sc, Sr és Ti) transzlokálódott és halmozódott fel a levelekben, melyek koncentrációi a levél kifejlődését követően, a 7. – 21. nap között is mutattak növekedést (1. táblázat). A nem-esszenciális elemek koncentrációja alapvetően az esszenciális elemek koncentrációjával parallel változott. Az Al, Ba, Li és Sr koncentrációja azonban csak kismértékben, nem szignifikáns módon emelkedett.

1. táblázat: Táp- és nyomelemek koncentrációi a deionizált vízben (A), a tápoldatban (B), valamint kontroll és Cad kezelt növények leveleiben. Az levelekben mért elemadatok a 21-napos kontroll növényeknél mért elemkoncentrációk %-ában értendők. * - abszolút értékek (µg g^{-1} sz.t.), !! - oldat koncentrációk (µM), nd – detektálási értékhatár alatt.

			7. nap		21. nap	
	A!!	B!!	Ko (%)	Cad (%)	Ko*	Cad (%)
Al	**3,36**±0,13	**3,65**±1,11	**83,5**±22,5	**29,1**±3,2	***121,00**±27,19*	**29,7**±4,7
B	**4,21**±1,18	**11,58**±3,25	**85,4**±9,9	**99,8**±7,4	***44,50**±4,67*	**528,4**±76,6
Ba	**0,28**±0,02	**0,29**±0,03	**92,7**±11,4	**45,6**±1,5	***316,0**±36,0*	**61,4**±4,9
Ca	**17,01**±1,25	**1458,9**±30,0	**79,0**±1,6	**70,3**±1,8	***9683,0**±153,9*	**82,2**±1,5
Cd	nd	**0,19**±0,01	**1,16**±0,20*	**268,0**±17,3*	**2,28**±0,65	**373,0**±28,2*
Cr	**0,10**±0,01	**0,13**±0,01	**53,8**±3,9	**36,0**±3,7	***2,27**±0,03*	**49,3**±5,3
Cu	**0,07**±0,01	**0,13**±0,01	**74,3**±9,4	**52,0**±1,7	***12,70**±2,49*	**54,5**±4,6
Fe	**0,87**±0,10	**10,07**+0,26	**65,0**±5,2	**27,8**±1,7	***149,00**±11,43*	**29,4**±4,1
K	**4,75**±1,50	**1686,2**±20,9	**88,9**±10,8	**77,5**±4,1	***44126,0**±5947,7*	**83,8**±1,4
Li	**0,22**±0,00	**0,42**±0,01	**89,6**±7,3	**38,9**±7,2	***0,46**±0,19*	**40,2**±0,9
Mg	**5,55**±0,50	**569,63**±4,86	**93,9**±9,1	**114,1**±6,4	***2036,0**±108,9*	**125,1**±4,0
Mn	**0,04**±0,00	**5,14**±0,04	**74,4**±9,3	**69,2**±5,4	***95,00**±8,84*	**87,0**±1,6
Na	**27,40**±10,57	**33,62**±0,89	**76,0**±8,3	**52,0**±1,3	***903,00**±21,15*	**57,0**±12,0
Ni	**0,04**±0,00	**0,05**±0,01	**54,4**±3,1	**60,4**±10,3	***1,04**±0,10*	**64,2**±41,0
P	**3,34**±0,25	**252,9**±18,9	**115,1**±30,2	**105,7**±9,4	***5238,5**±1321,5*	**67,9**±7,5
S	**2,51**±0,50	**503,4**±30,1	**117,7**±19,4	**143,5**±6,5	***6199,4**±673,6*	**138,7**±3,2
Sc	nd	nd	**77,3**±11,4	**57,5**±0,6	***0,21**±0,02*	**55,1**±2,0
Sr	**0,04**±0,00	**0,70**±0,01	**86,0**±12,6	**65,6**±2,7	***27,90**±3,50*	**76,3**±0,5
Ti	nd	nd	**71,1**±7,5	**64,9**±2,4	***0,37**±0,04*	**81,2**±25,4
Zn	**0,56**±0,02	**0,57**±0,02	**63,8**±5,6	**117,9**±7,5	***49,20**±2,82*	**142,3**±1,9

Ko növények +2 leveleiben csak elenyésző mennyiségű Cd volt mérhető (átlagban 1,16±0,2 µg g^{-1} sz.t.), mely a kezelés alatt nem változott szignifikánsan. A Cad kezelés a levelek növekedésgátlásával párhuzamosan a levelekben mérhető elemtartalomra is erős hatásokat gyakorolt. Relatíve nagy mennyiségű Cd halmozódott fel a levelekben. Már a 7 napos levelek is jelentős mennyiségű Cd-ot (268,0±17,3 µg g^{-1} sz.t.) tartalmaztak, mely a (további) kezelés alatt is folyamatos emelkedést mutatott (a 21. napon: 373,0±28,2 µg Cd g^{-1} sz.t.). A Cad kezelés szignifikánsan csökkentette a Ca és a K (1. táblázat), valamint növelte a S koncentrációját a +2 levelekben a kezelés első hete alatt, melyek ezután a kontrollhoz képest jórészt változatlanok maradtak. A P száraztömegre számolt koncentrációja azonban sem a

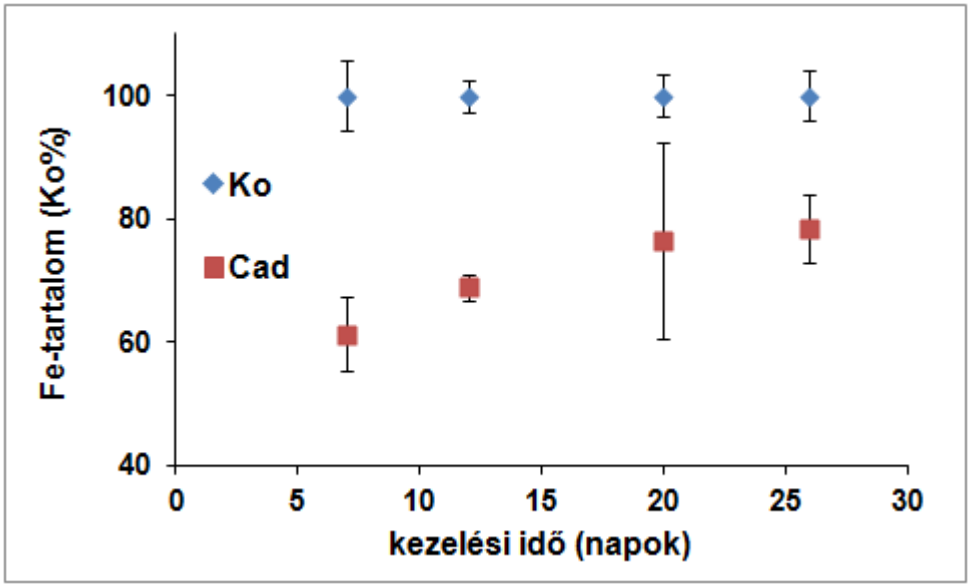
kezelés első, sem harmadik hete után nem különbözött szignifikánsan a kontroll értékéhez viszonyítva (1. táblázat). A Cad kezelés gyengén emelte a levelek Mg-koncentrációját. A mikroelemek közül a Cad kezelés legjobban a Fe koncentrációját csökkentette (1. táblázat). A Fe koncentrációja már a kezelés első hetében, a +2 levél fejlődése alatt drasztikusan csökkent. A további kezelés alatt a Fe koncentrációjában nem történt érdemi változás, ami a kis száraztömeg-gyarapodást figyelembe véve kismértékű nettó Fe-transzlokációra enged következtetni.

A Cad kezelés a levelek fejlődése alatt a Fe-hoz hasonlóan a Mn és a Cu koncentrációját is jelentősen csökkentette, de míg a Cu koncentrációja a levélfejlődési periódus után nem mutatott szignifikáns változást, a Mn koncentrációja gyengén emelkedett. Más esszenciális mikroelemektől eltérően a Zn koncentrációja erős emelkedést mutatott Cad kezelt növények +2 leveleiben, így a kezelési idő végére jelentősen meghaladta a kontroll levelekben mérhető értéket. A Na koncentrációja, hasonlóan a K-hoz, Cad kezelés hatására valamelyes csökkent a kezelés első hetében a kontrollhoz viszonyítva, a további kezelés azonban nem okozott szignifikáns változást. A B koncentrációja szignifikáns és progresszív emelkedést mutatott Cad kezelt növények +2 leveleiben, így a három hetes kezelési idő végére koncentrációja a kontrollban mérhető érték közel két és félszeresét érte el (1. táblázat). A Cad kezelés hatására a nem-esszenciális fémek, így az Al, Ba, Cr, Li, Ni, Sc, Sr és Ti transzlokációja a kontrollhoz viszonyítva fokozatosan csökkent. A csökkenés mértéke azonban az egyes fémekre jellemző mértékűnek adódott. A három hetes kezelési idő végére az Al, Cr, Li és Sc koncentrációja volt a legalacsonyabb a kontroll növényekhez viszonyítva (<50%), míg a Ba, Ni, Sr és Ti koncentrációja a kontroll növényeknél mért koncentráció 60-90%-a közötti tartományban mozgott. A Cad kezelés fém-transzlokációra gyakorolt hatásának részletes ismertetését ld. az Appendix B. fejezetében.

1.2.3. Változások a kloroplasztiszok vastartalmában

A Cad kezelés erősen befolyásolta a kloroplasztiszok vastartalmát is (9. ábra). Bár a kezelés teljes időtartama alatt fokozatosan emelkedő vastartalom volt mérhető mind kontroll, mind a Cad kezelt növények +2 leveleiből izolált kloroplasztiszokban. A kezelés első hetében a kloroplasztiszok vastartalma a Cad kezelés hatására a kontrollhoz viszonyítva jelentősen lecsökkent. A kezelés első hetének végén a kontroll/Cad kloroplasztiszok vastartalma

0,67±0,04/0,41±0,04 fmol Fe kloroplasztisz^{-1} volt. Az első héttől kezdve azonban a Cad kezelt növények kloroplasztiszaiban a vastartalom a kontrollhoz viszonyítva fokozatosan emelkedett. A kezelés negyedik hetének végére a vastartalom így megközelítette a kontroll levelekben mérhető vastartalom (1,23±0,05 fmol Fe kloroplasztisz^{-1}) 80%-át.



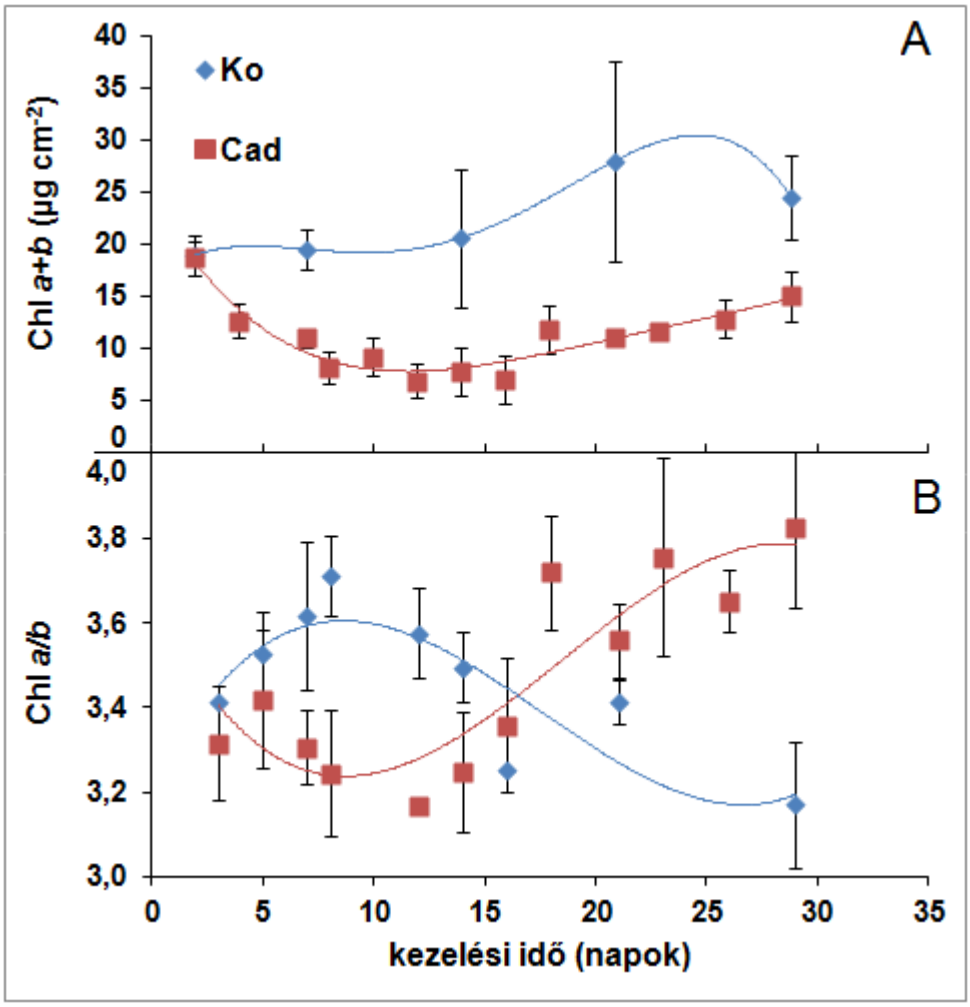
9. ábra: Nyárfa kloroplasztiszok vastartalmának változása a kezelési idő alatt, a kifejlett kontroll %-ában (0,67±0,04 fmol Fe kloroplasztisz^{-1}) megadva.

1.3. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségében és arányaiban kimutatható változások

A vizsgált periódus alatt a kifejlett kontroll +2 levelek Chl-koncentrációja állandó volt, csak a kezelés vége felé volt némi emelkedés az árnyéklevelekké történő átalakulás eredményeképpen (10./A ábra). A Cad kezelés azonban erős hatást gyakorolt a levelek Chl-koncentrációjára. A levélfejlődés időszakában egészen a kezelési idő második hetének végéig a Chl-koncentrációja a kontrollhoz képest lényegesen alacsonyabb volt. A kezelési idő harmadik hetében már némiképp emelkedő tendenciát mutatott. Mindemellett, a Cad kezelt növények leveleiben mért Chl-koncentráció a kezelési idő végére sem érte el a kifejlett kontroll levelekben mért értéket (a különbség szignifikáns volt, $P<0,05$).

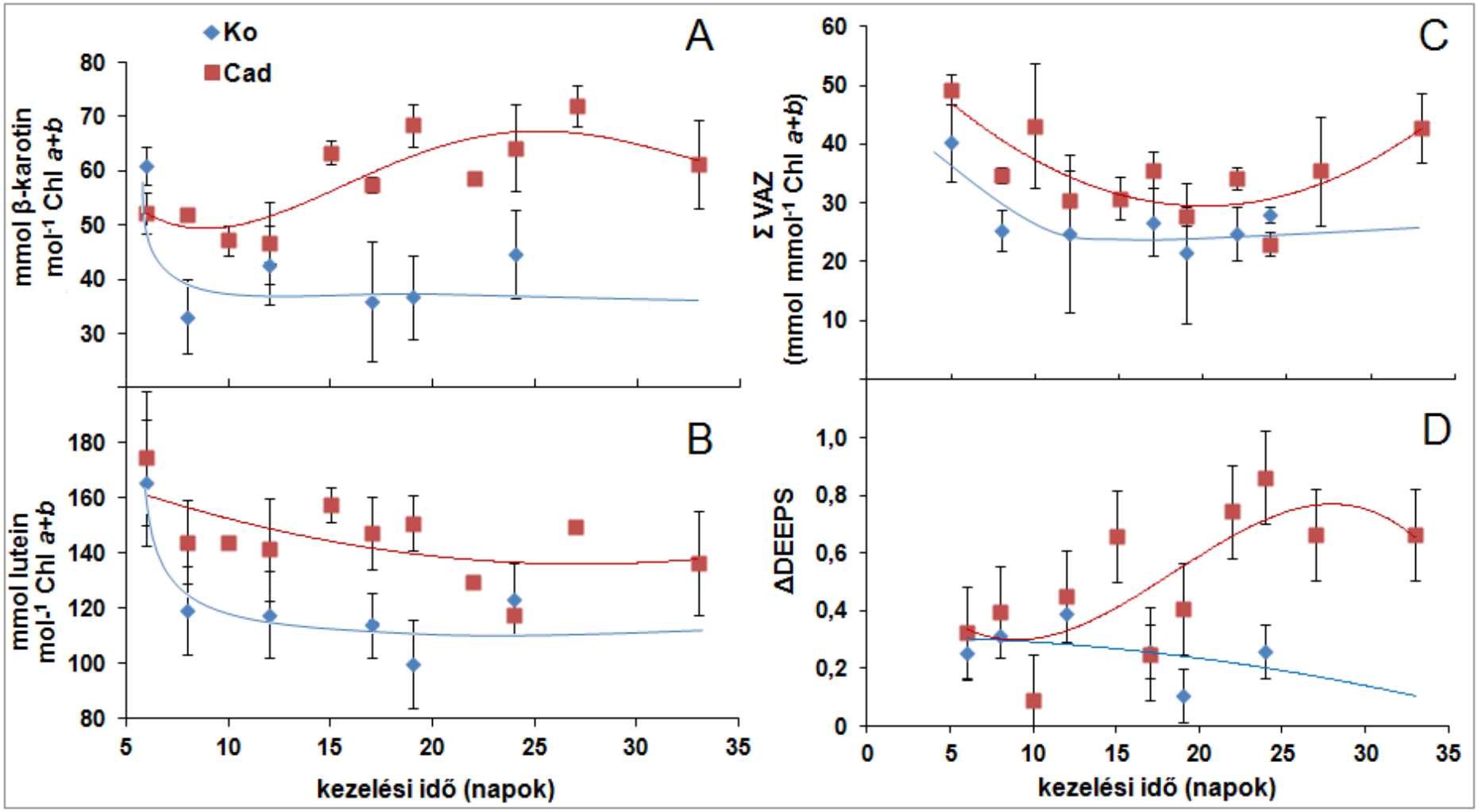
A Cad kezelés jelentősen változtatta a Chl *a/b* arányt is (10./B ábra). Míg kontroll levelekben a kezelési idő első hetében az arány nőtt, a Cad kezelt növények leveleiben erőteljesen csökkent. Kontroll levelekben a kezelés második hetétől volt mérhető a Chl *a/b* arány csökkenése, mely ellentétesen változott a Chl-koncentráció emelkedésével. A Cad

kezelés hatására lecsökkent Chl *a/b* arány a kezelés második hetétől folyamatosan emelkedett. Ez az emelkedés a Chl *a* mennyiségi növekedésével volt összefüggésben. A kezelési idő végére a Cad kezelt növények Chl *a/b* aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a kifejlett (8-10 napos) kontroll levelekben mérhető Chl *a/b* arányoktól.



10. ábra: Nyárfa levelek Chl *a+b* tartalmának (A) és Chl *a/b* arányának (B) változása a kezelés időtartama alatt.

A Cad kezelés erősen befolyásolta a *β*-karotin mennyiségét is (11./A ábra). Míg a kontroll növények leveleiben a kifejlődés során tapasztalt csökkenés után érdemben nem változott a *β*-karotin mennyisége, a Cad kezelt növények leveleiben a kezelés harmadik hetének kezdetétől fokozatosan emelkedett.



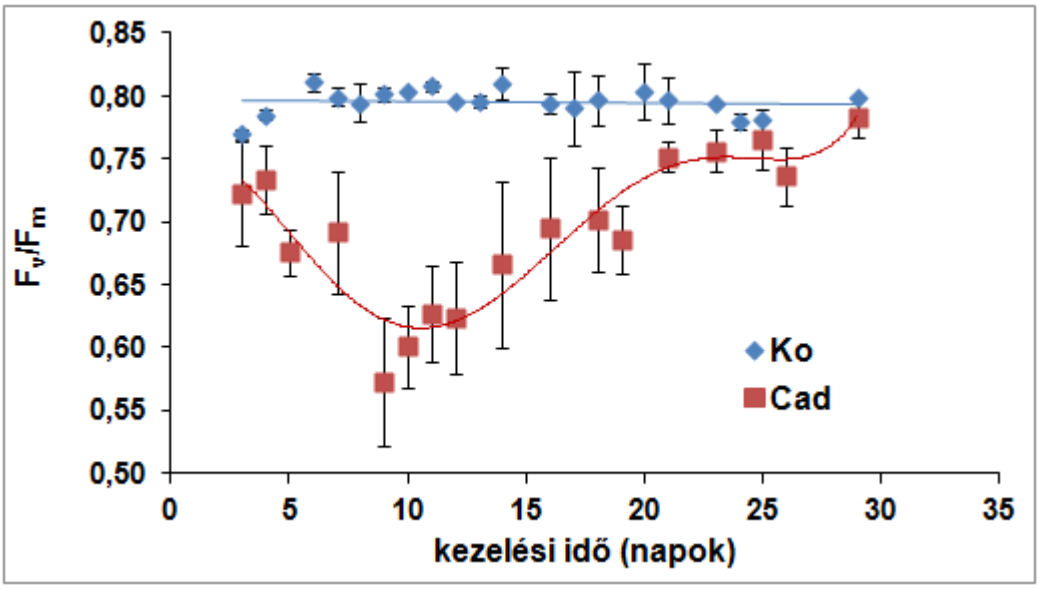
11. ábra: Nyárfa levelek *β*-karotin- (A), lutein- (B) és VAZ tartalmának (C), valamint a xantofill-ciklus de-epoxidáltsági állapotának (D) változása a kezelési idő alatt. VAZ - violaxantin+anteraxanti+zeaxantin, ΔDEEPS - a xantofillok de-epoxidáltságának különbsége fény- és sötétadaptált állapotok között.

57

A Cad kezelés, nem változtatta szignifikáns mértékben a lutein-tartalmat (11./B ábra). A lutein mennyisége a fejlődés alatt tapasztalható csökkenéstől eltekintve érdemben nem változott sem a kontroll, sem a Cad kezelt növények +2 leveleiben. Az egyéb xantofillok mennyisége a luteinhez hasonlóan változott. Cad kezelés hatására a VAZ/Chl arány gyengén megemelkedett (11./C ábra). Sötétadaptált levelekben csak kis mennyiségű zeaxantin és anteraxantin volt kimutatható mind a kontroll, mind a Cad kezelt növényekben. A Cad kezelt növények leveleiben a xantofillok fény-sötét deepoxidációs állapotbeli különbségét jelző ΔDEEPS paraméter értéke, hasonlóan a β-karotin-éhoz, növekvő tendenciát mutatott a kezelés második hetétől kezdve egészen a kezelési idő végéig (11./D ábra), és értéke a harmadik hét végére szignifikánsan magasabb volt a kontrollénál.

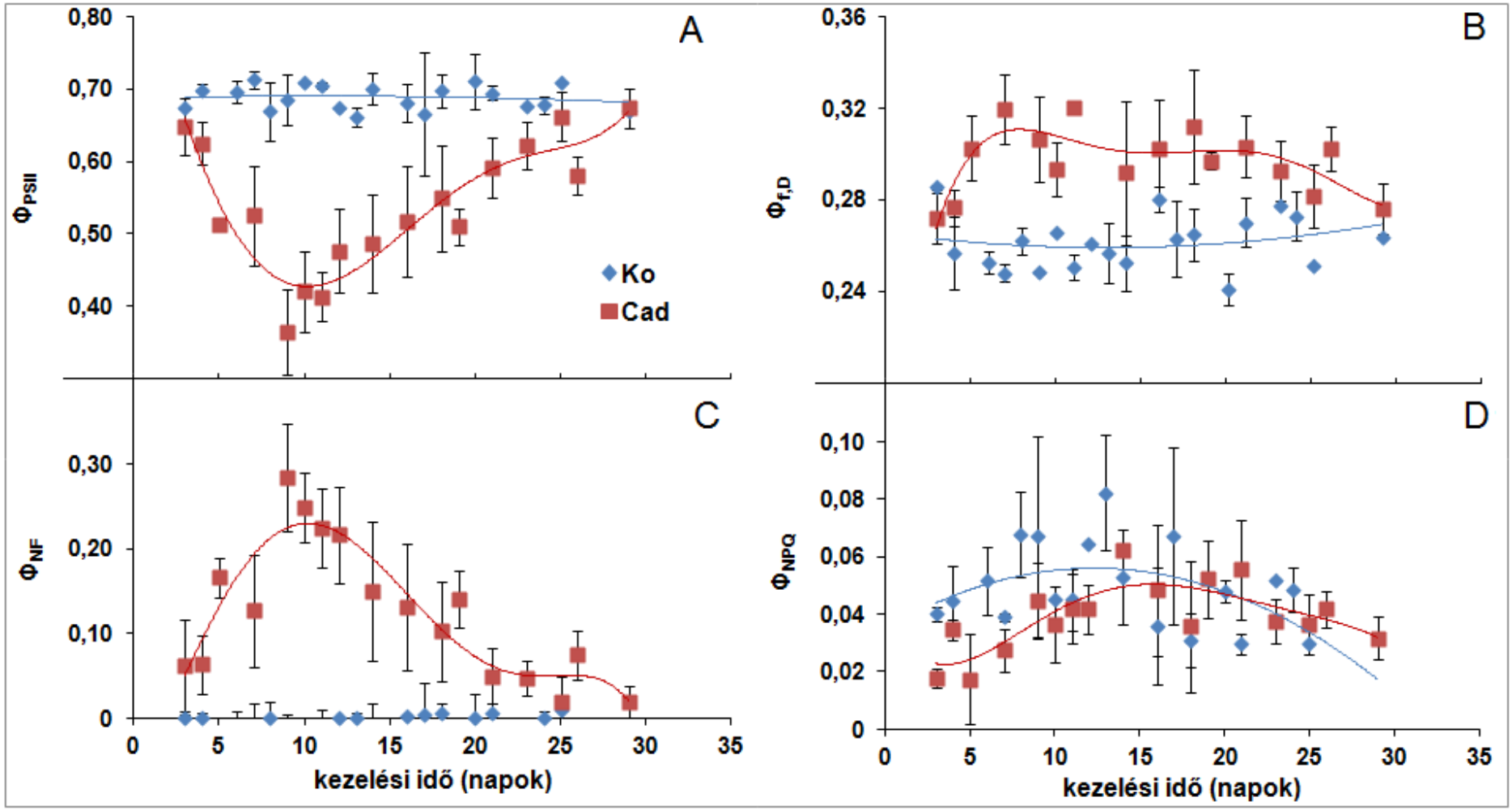
1.4. A fotoszintetikus aktivitást jellemző paraméterek változásai

A Cad kezelés erős gátló hatást gyakorolt a fotoszinzetikus elektrontranszportra. Míg a kontroll levelekben a maximális fotokémiai hatékonyság (F_v/F_m) értéke változatlan volt, egyheti Cad kezelés hatására erősen csökkent (12. ábra). A kezelési idő második hetének közepétől azonban értéke gyengébben majd erősebben emelkedő tendenciát mutatott, amíg el nem érte a kontroll növények leveleiben mért értéket. Az F_v/F_m értékének változását leginkább az F_m értéke befolyásolta, mely a kezelés 9. napján 0,661±0,081, míg a kezelési idő 21. napján 0,885±0,105 volt. Az F_0 értékek variabilitása jóval kisebb. Értéke a kezelési idő 9. napján 0,316±0,057, míg 21. napján 0,220±0,026 volt. Kontroll növények esetében mindkét érték stabil volt a kezelési idő alatt (F_0: 0,190±0,015 és F_m: 0,920±0,096). Érdekes módon, a Cad kezelt növények leveleiben egy hét kezelési idő után a fényadaptálás során aktinikus fény mellett mérhető F_t értékek erőteljesen csökkentek, így a kezelés első és második hetének fordulóján mélyen a sötétadaptált F_0 értékek alá süllyedtek. A legalacsonyabb értékét az aktinikus megvilágítás kezdetétől számított 92,3±12,1 s múlva érte el, és csak lassan emelkedett az F_0 értéke fölé. A kezelési idő második és harmadik hetében egyre kevésbé, illetve rövidebb ideig süllyedt az F_t az F_0 értéke alá. A kezelés harmadik hetének végére a jelenség teljesen eltűnt, így kinetikai szempontból az F_v/F_m változáshoz hasonlóan relaxálódott. Kontroll növényeknél hasonló csökkenést az F_t fluoreszcencia kinetikájában nem tapasztaltunk.



12. ábra: A PSII maximális kvantumhatékonyságának változása a kezelési idő alatt.

A gerjesztési energia stresszelt növényekben történő kioltását Hendrickson *et al.* (2005) alapján vizsgálva az energia allokációjának négy formáját tudtuk mérni; *i*) a PSII reakciócentrumok aktuális fotokémiai hatékonyságát (Φ_{PSII}), *ii*) a nem működőképes PSII reakciócentrumok termális energiakonverzióját (Φ_{NF}), *iii*) az antennák ΔpH és xantofill-ciklus által mediált kioltását (Φ_{NPQ}) és *iv*) a fluoreszcens emisszióból és a konstitutív termális disszipációból származó energiaveszteséget ($\Phi_{f,D}$) (13. ábra). Kontroll növényekben a Φ_{NPQ} értékében a harmadik héten bekövetkezett fokozatos csökkenést leszámítva nem mértünk érdemi változást a gerjesztési energia allokációjában. Ugyanakkor a Cad kezelés minden energia allokációt jellemző paraméter értékére erős hatást gyakorolt (13. ábra).

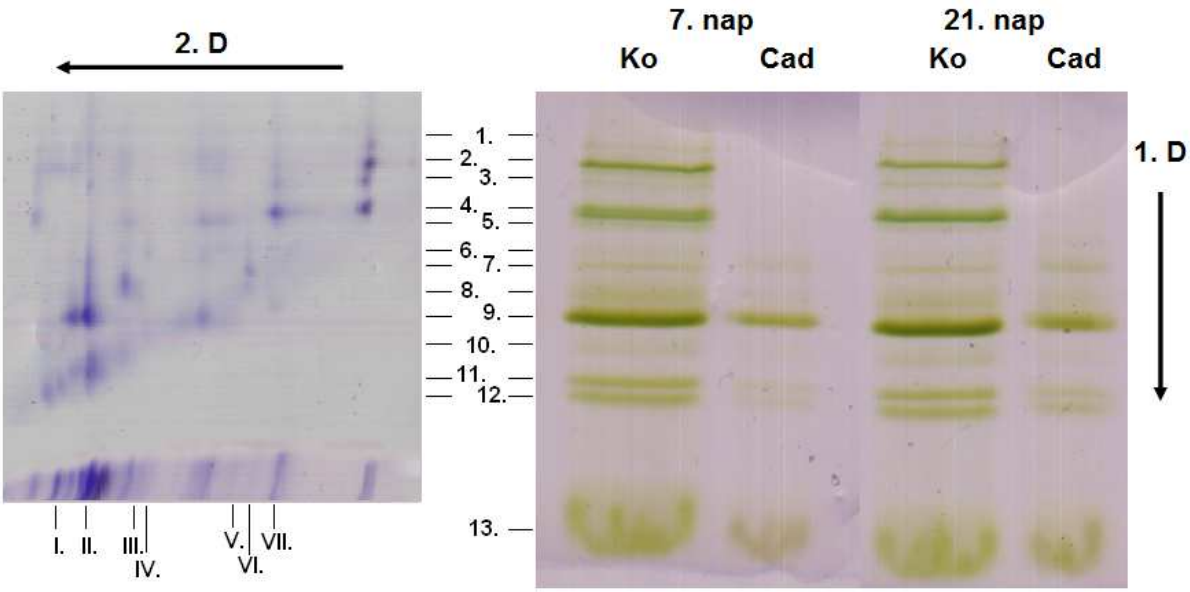


13. ábra: A gerjesztési energia allokációjának változása a kezelési idő alatt: (A) Φ_{PSII} – működő PSII reakciócentrumok fotokémiai kioltása, (B) $\Phi_{f,D}$ – fluoreszcencia és konstitutív disszipáció, (C) Φ_{NF} – nem működő PSII reakciócentrumok kioltása, (D) Φ_{NPQ} – xanthofill-ciklus-függő kioltás.

A Cad kezelt növényekben a Φ_{PSII} paraméter értékében hasonló jellegű változások zajlottak le, mint amilyet a maximális kvantumhatékonyság esetében is mértünk (13./A ábra). A PSII reakciócentrumok aktuális hatékonyságával ellentétes módon változott az inaktív reakciócentrumok kioltásának mértéke (Φ_{NF}) (13./D ábra). A kezelés első hetében a Φ_{NPQ} a Φ_{NF} paraméter növekedésével párhuzamosan csökkent a kontroll növényekhez viszonyítva, de a második hét második felétől kezdve fokozatos emelkedést mutatott, míg el nem érte vagy meg nem haladta a kontroll levelekben mérhető értéket (13./C ábra). A konstitutív disszipáció ($\Phi_{f,D}$) valamelyest növekedett Cad kezelés hatására a kezelés megkezdését követően, de az emelkedési tendencia megállt a kezelés első hetének végére. Értéke ezen a stabil, megemelkedett szinten maradt a kezelési idő teljes hátralévő részében. Számottevő csökkenését csak a 25. kezelési naptól kezdve lehetett megfigyelni (13./B ábra).

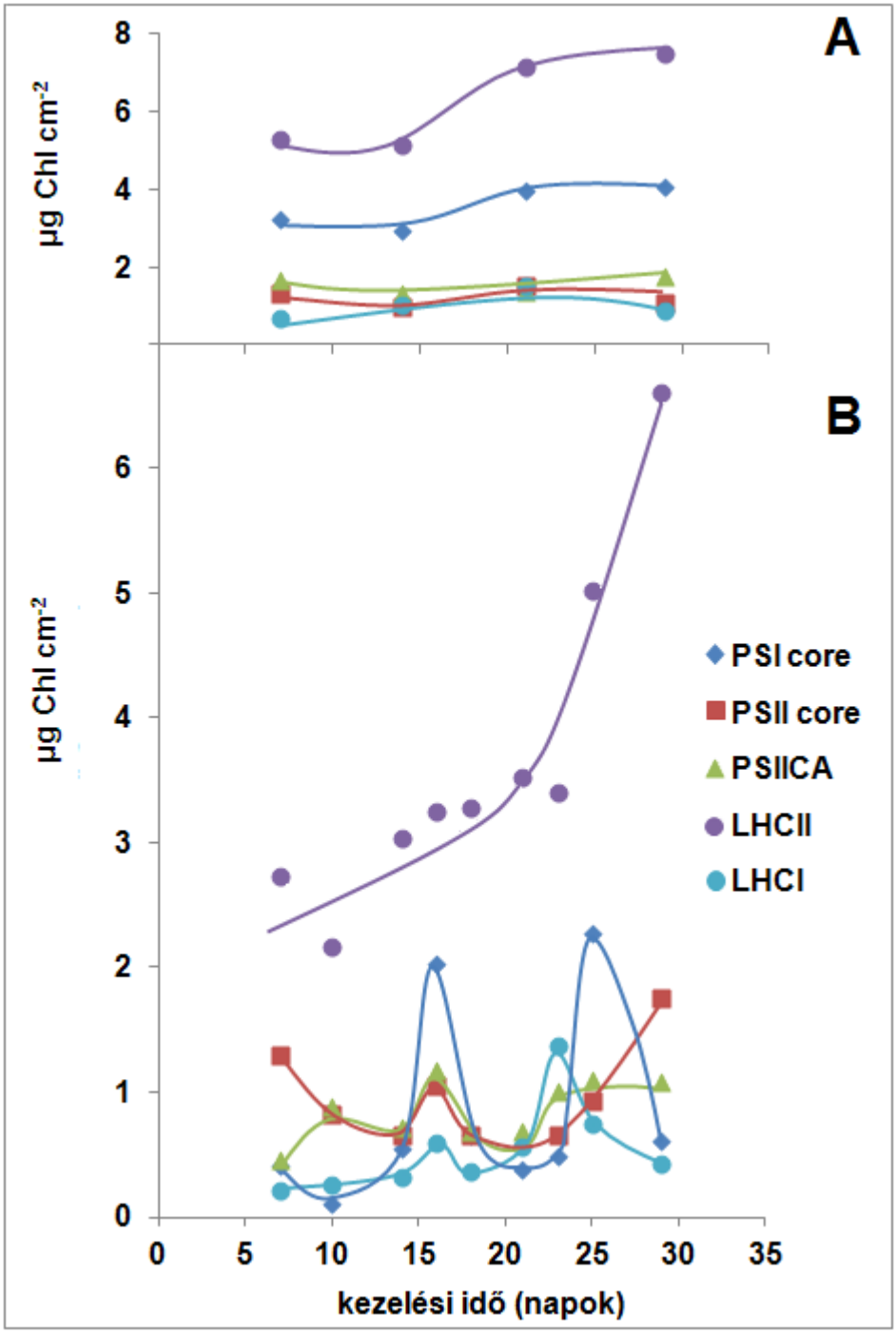
1.5. Tilakoid összetétel

Az izolált tilakoidmembránok pigment-lipoprotein komplexeinek szerveződését 2D (natív/SDS) PAGE segítségével vizsgáltuk (14. ábra). A kontroll növények leveleiből izolált tilakoidmembránok összetételében nem, illetve csak az árnyéklevéllé válással összefüggő változások voltak kimutathatók a kezelés időtartama alatt (15./A ábra): a kezelés negyedik hetétől fogva, a növekedés következtében a +2 leveleket érő megvilágítás intenzitás-csökkenésével párhuzamosan az LHCII és részben a PSI core felületegységre vonatkozó koncentrációja enyhén emelkedett. Ugyanakkor, a Cad kezelés a kezelés első hetében erőteljesen csökkentette a PSI core, illetve az LHCII komplexek mennyiségét. Ezzel párhuzamosan a PSII core, a PSII CA, valamint az LHCI mennyiségében csak kisebb mértékű csökkenés volt kimutatható (15./B ábra).



14. ábra: A pigment-lipoprotein komplexekek szétválasztása natív (1.D), majd denaturáló (2.D) PAGE segítségvel. A futás irányát nyilak jelzik. Az első dimenzió sávjai: 1. – PSI+LHCI+LHCII, 2. – PSI+LHCI, 3. – PSI+LHCII, 4. – PSI CC, 5. – PSII CC, 6. – PSII CC minusCP43, 7. – D1+D2, 8. – LHCII, 9. – LHCII, 10. – CP43, 11. – CP26 és CP29, 12. – CP24 és LHCI, 13. – szabad pigment. A második dimenzió fontosabb sávjai: I. – apoLHCI, II. – apoLHCII, III. – D1, IV. – D2, V. – CP43, VI. – CP47, VII. – apoP700. A második dimenzióban a sávos futás a szétvált foltok azonosításához felvitt SDS-DTT szolubilizált tilakoid-proteinek futásából származik.

A kezelés második hetének végétől, de különösen a harmadik héttől kezdődően markáns és progresszív változások indultak meg a tilakoidmembrán összetételében. Részben a PSII core és az LHCII, de különösen a PSI core complexek mennyiségében erőteljes emelkedés indult meg. Ez a PSI és a PSII core esetében csak rövid távúnak bizonyult. Lokális maximális mennyiségüket a kezelés 16. napján érték el, majd mennyiségük újból a korábban mérhető szintre süllyedt vissza. Az LHCII mennyiségében ugyanakkor lassú, de folyamatos emelkedés volt mérhető. A kezelés negyedik hetének kezdetétől azonban – az LHCI komplexek kivételével – újból erős emelkedés volt mérhető. A kezelés negyedik hetében a tilakoid-összetétel közelítette a kontroll levelekét.



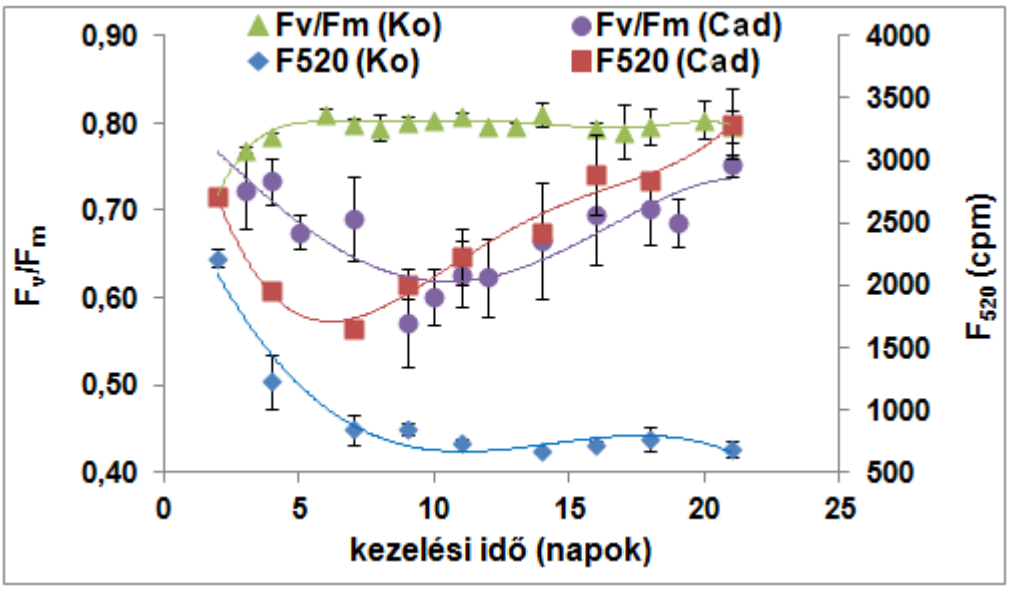
15. ábra: A pigment-lipoprotein komplexek mennyiségi változása a kezelési idő alatt, A – kontroll, B - Cad kezelés.

1.6. Védelmi mechanizmusok aktiválódása hosszabb távú kadmium-expozíció alatt

.

1.6.1. Fenoloid-metabolizmus

A PSII reakciócentrumok maximális és aktuális kvantumhatékonyságában mért kinetikához nagyon hasonló kinetikájú változásokat detektáltunk a Cad kezelt levelek több hullámhosszú fluoreszcencia leképezéssel mért 520 nm-es fluoreszcenciájában (F_{520}, 16. ábra).



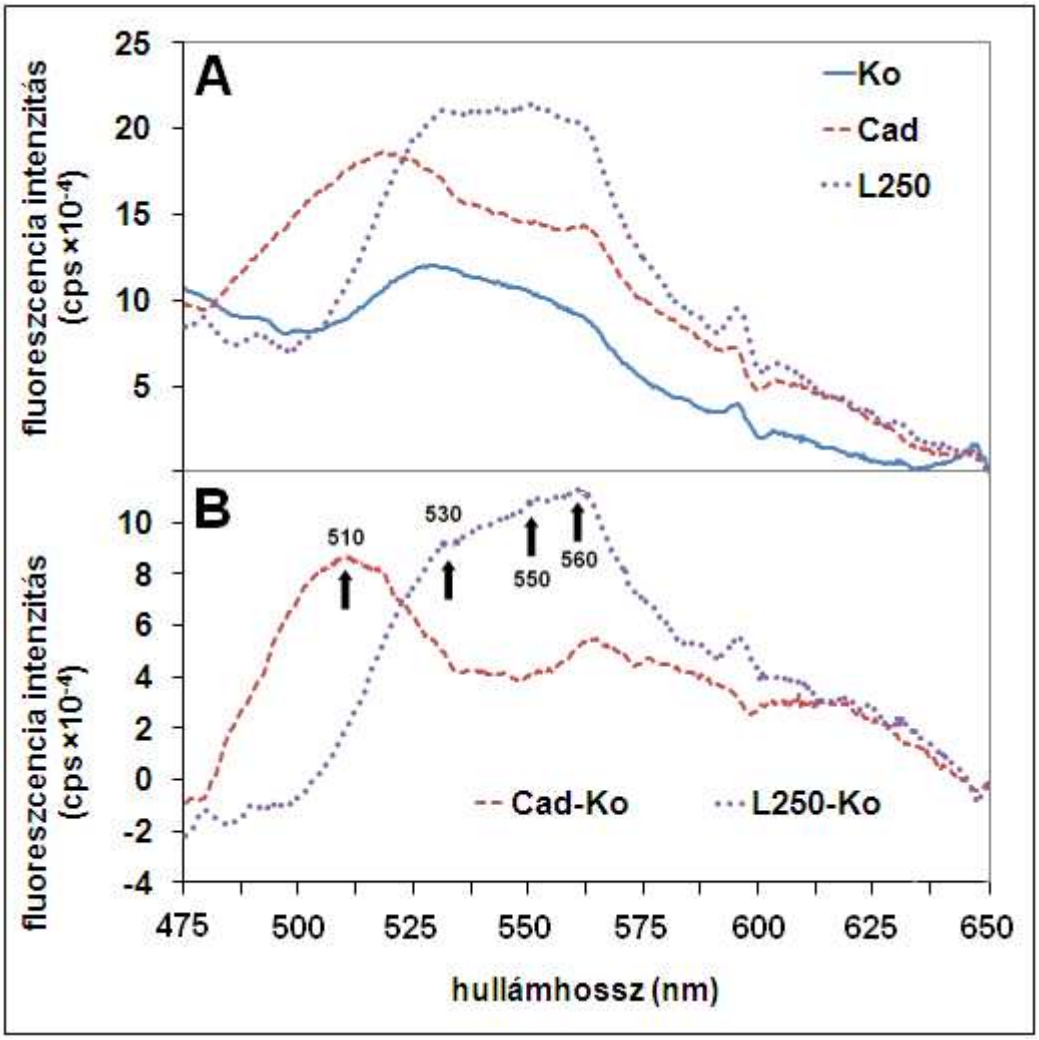
16. ábra: A PSII maximális kvantumhatékonyságának (F_v/F_m) és a levelek zöld tartományú emissziójának (F_{520}) párhuzamos változása a kezelési idő alatt.

A levelek növekedési periódusában mind a kontroll, mind a Cad kezelt növények esetében az F_{520} erőteljes csökkenését mértük. A levelek kifejlődését követően ez konstans/állandó alacsony értéken maradt a kontroll növények leveleiben. A Cad kezelés hatására azonban a kezelés 7.-8. napját követően egy fokozatos, de tartós emelkedés volt megfigyelhető. Fontos megjegyezni, hogy a zöld fluoreszcencia levéllemezen történő eloszlása nem mutatott semmilyen változást, azaz az emelkedés a levéllemez teljes felületén egyenletesen ment végbe (az eredményeket nem mutatjuk). Megemelt fényintenzitáson (L250: 250 µmol m^{-2} s^{-1}) nevelt

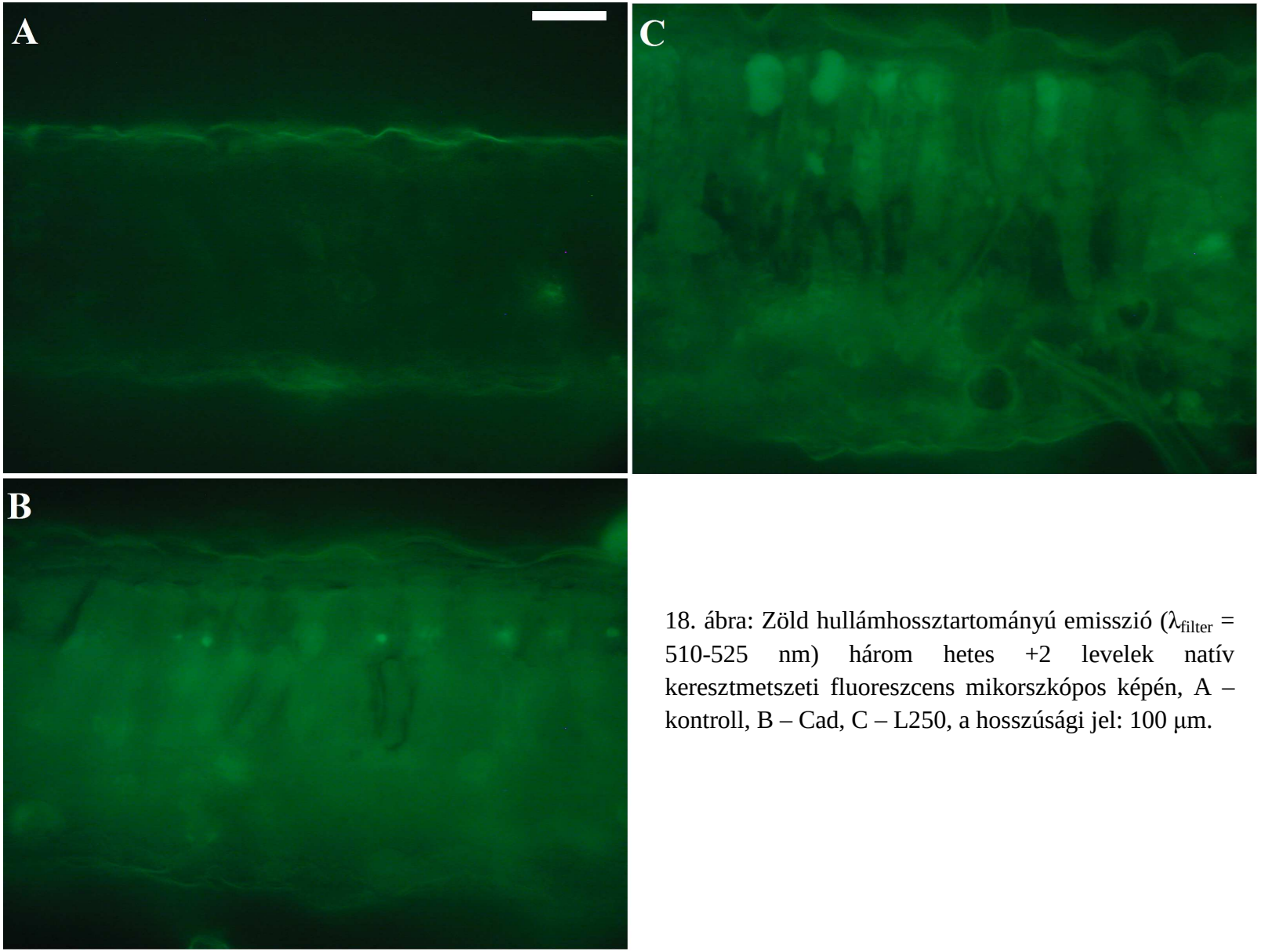
kontroll növények levelei hasonló jellegű változást mutattak. Az F_{520}/F_{440} arányt a Cad kezelés harmadik hetének végére a kontroll levelek értékének 289,0%-ára, míg L250 kezelés hatására 177,7%-ára emelkedett.

Az intakt levelek 365 nm-es gerjesztés mellett vizsgált fluoreszcencia spektrumában, a fluoreszcencia leképezéssel kapott eredményeknek megfelelően, mind Cad, mind L250 kezelés hatására erőteljes emelkedéseket mértünk a spektrum 500-600 nm-es hullámhossz-tartományában (17./A ábra). A fluoreszcencia spektrumnak ebben a tartományában a kontrollhoz viszonyított különbség-spektrumok alapján négy főbb komponenst azonosítomutattunk ki F_{510}, F_{530}, F_{550} és F_{560} emissziós maximummal (17./B ábra). Bár a zöld és sárga hullámhossztartományba eső fluoreszcencia mindkét kezelés esetében növekedett, az F_{510} komponenst csak a Cad kezelés hatására figyeltük meg, míg az F_{530}, F_{550} és F_{560} komponensek különböző mértékben, de mind Cad, mind L250 kezelésre érzékenyen reagáltak.

A levelekből készült félvékony natív metszeteken vizsgáltuk a $F_{510\text{-}525}$ fluoreszcens jel lokalizációját (18. ábra). Mind a kontroll, mind a kezelt növények esetében jelentős fluoreszcens jel származott az epidermisz külső sejtfalából, valamint a szállítóelemek másodlagosan vastagodott sejtfalszakaszaiból. Azonban mind Cad, mind L250 kezelés hatására jelentősen megemelkedett a mezofillumból származó fluoreszcens jel erőssége. Az intenzitás-emelkedés mindkét kezelés esetében csak részben származott a sejtfalakból, leginkább a vakuólumokban illetve a kloroplasztiszokban halmozódtak fel zöld hullámhossztartományban emittáló anyagok. Emellett mindkét kezelés jelentősen növelte a mezofillum vastagságát is.

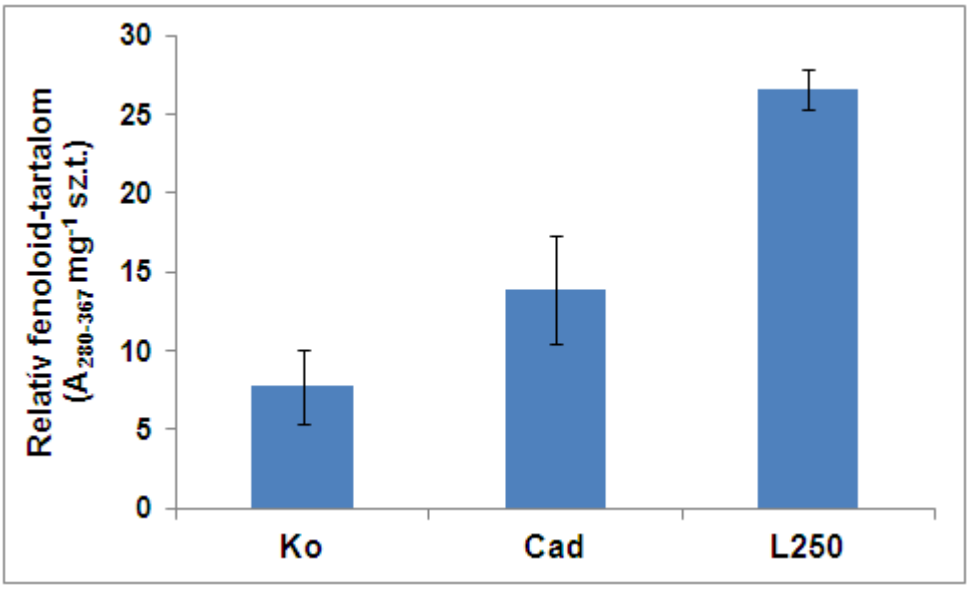


17. ábra: +2 levelek szobahőmérsékleten mért *in vivo* fluoreszcencia spektrumai (λ_{ex}=365 nm) a kezelés harmadik hetének végén (A), illetve Cad-Ko és L250-Ko különbség-spektrumok (B). Négy, a zöld-sárga hullámhossz-tartományba eső fő komponens mutatott a kezelések hatására emelkedést (nyilak mutatják).



18. ábra: Zöld hullámhossztartományú emisszió (λ_{filter} = 510-525 nm) három hetes +2 levelek natív keresztmetszeti fluoreszcens mikorszkópos képén, A – kontroll, B – Cad, C – L250, a hosszúsági jel: 100 μm.

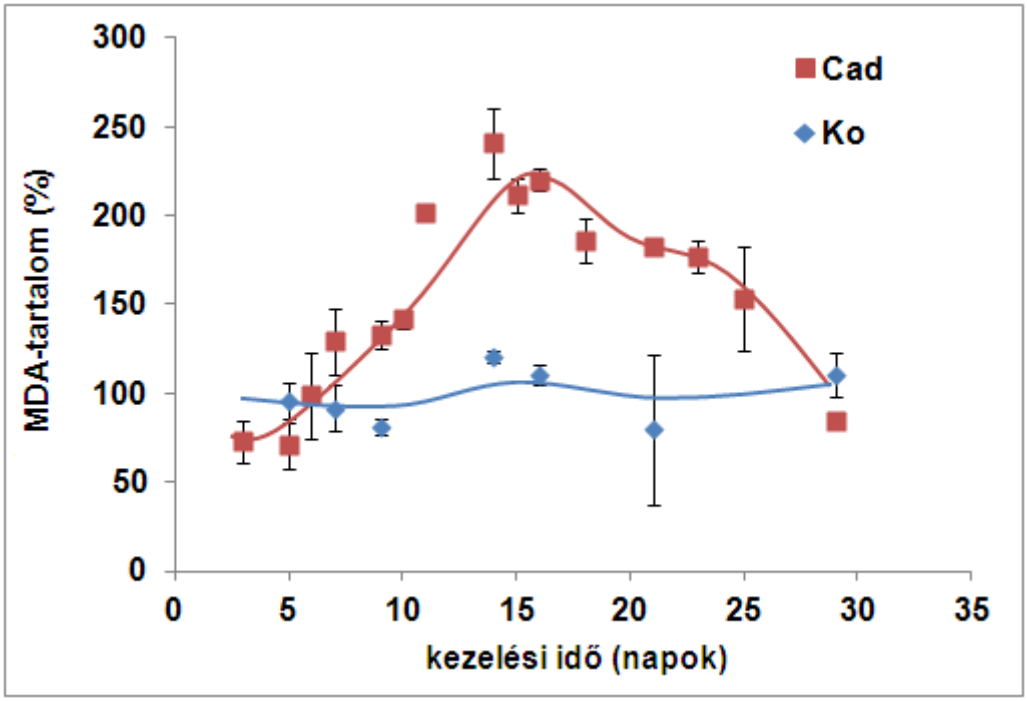
A fenoloid-tartalom változásai követték a zöld és sárga fluoreszcencia változását. Az összes-fenoloid tartalom emelkedése (19. ábra, a kontroll 179,4/344,7%-a) tendenciájában hasonló volt, mint a 17./A ábrán bemutatott zöld-sárga fluoreszcencia kumulatív ($F_{480-600}$) növekedése (a kontroll 159,3/167,2%-a).



19. ábra: Három hetes +2 levelek teljes fenoloid-tartalma (kummulatív abszorbancia 280 és 367 nm között, mg^{-1} száraztömegre vonatkoztatva). A kezelések közötti különbségek szignifikánsak (egy utas ANOVA, Tukey-Kramer poszt-teszttel, $p<0,05$).

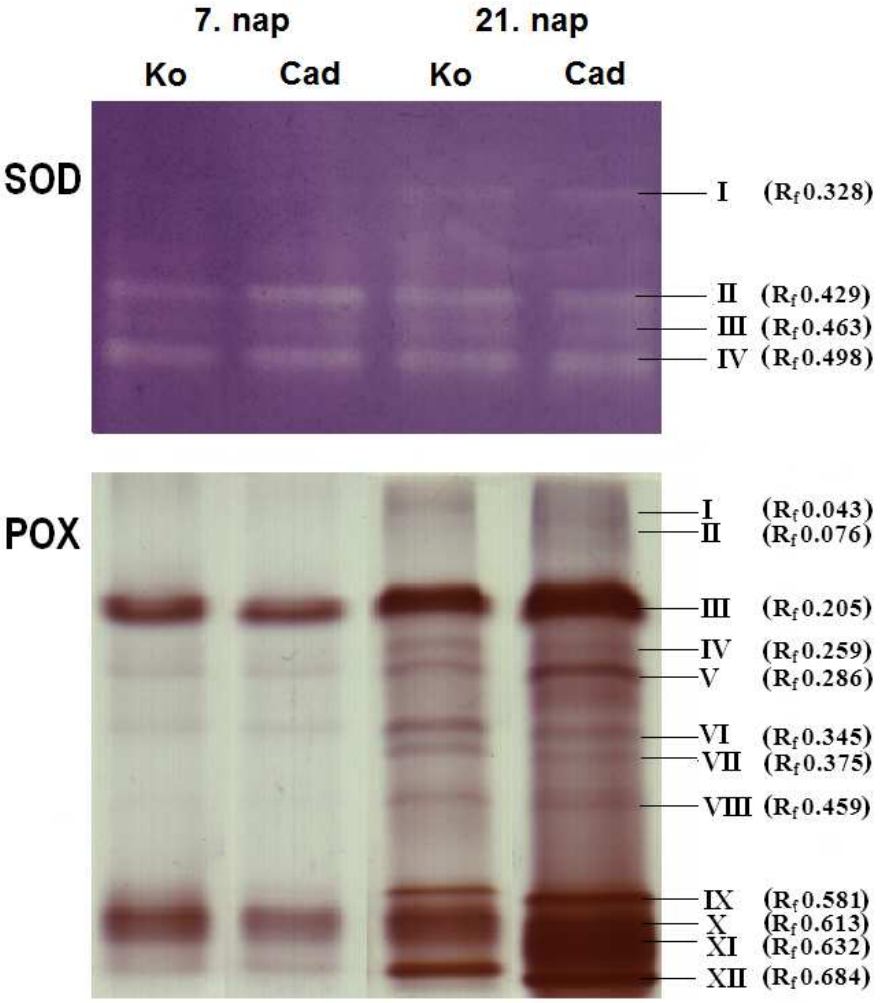
1.6.2. Oxidatív károsodás és antioxidatív védelem

Az oxidatív stressz erőssége egyszerűen mérhető a lipidek peroxidációjakor felszabaduló malondialdehid (MDA) mennyiségi változásának követésével. Cad kezelés alatt az MDA mennyisége jelentős emelkedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva, mely emelkedés a kezelés második hetének végéig folytatódott (20. ábra). Ezen a ponton a Cad kezelt növények leveleiben a kontroll levelekhez viszonyítva 241,0±19,8%-kal magasabb MDA-tartalmat lehetett kimutatni. A kezelés második hetének végétől azonban az MDA-tartalom lassú, fokozatos csökkenése volt megfigyelhető. A kezelés negyedik hetének végére az MDA mennyisége lecsökkent a kifejlett kontroll levelekben mérhető értékre.



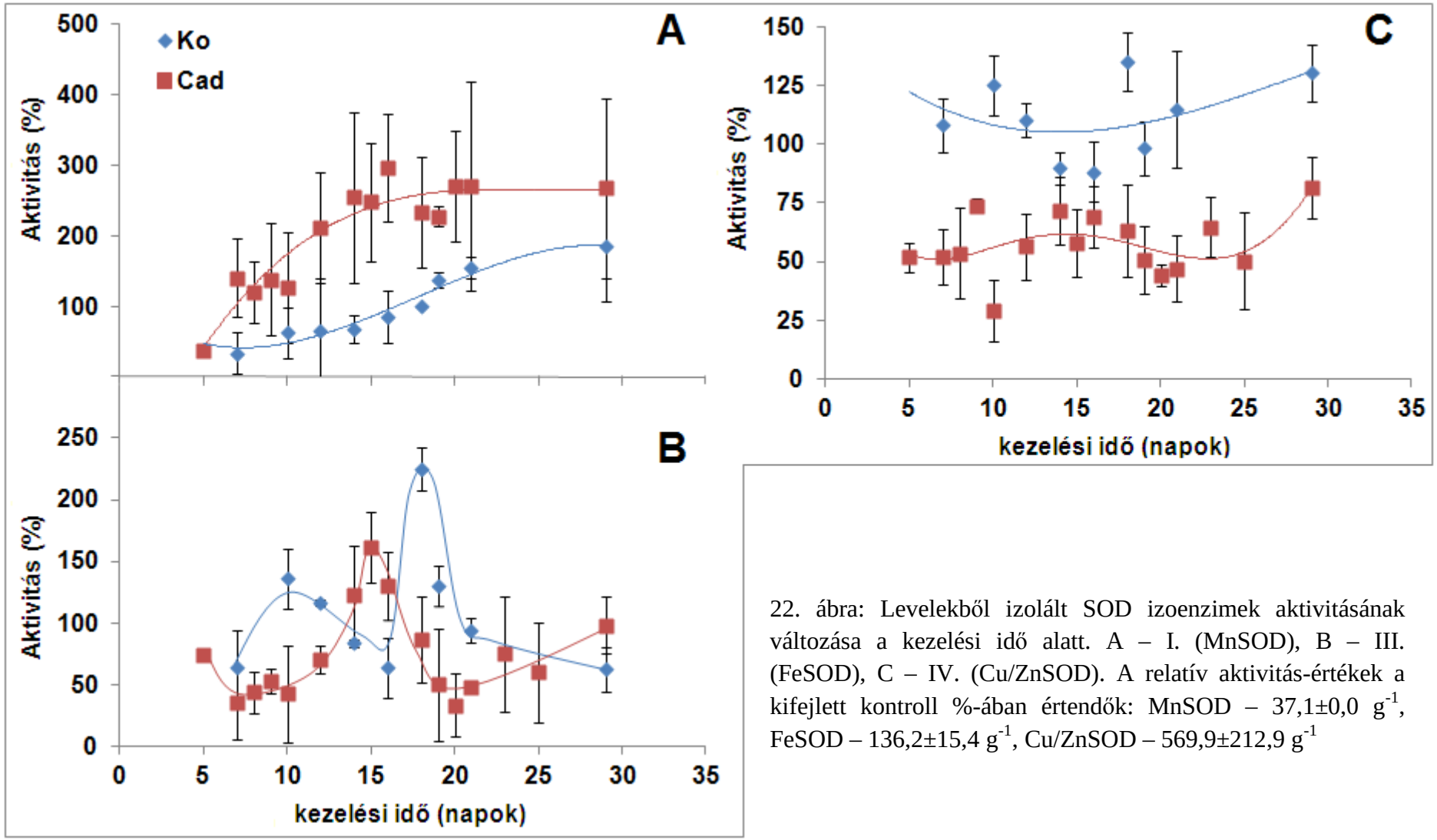
20. ábra: Az MDA-tartalom változása levelekben a kezelési idő alatt, a kifejlett kontroll levelek értékének (82,6±12,2 nM MDA g^{-1} f.t.) %-ában kifejezve.

A SOD izoformák kummulatív aktivitásában többnyire csökkenés volt kimutatható a Cad kezelt növények leveleiben, de ciklikus változásokat mutatott nagyjából kéthetes periódusokban. Így a kezelés 14. és 29. napján nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól. Natív PAGE segítségével a SOD négy izoformáját tudtuk elválasztani (21. ábra). Az egyes sávokat Bernardi *et al*. (2004) és Marron *et al*. (2006) nyárfa SOD izoenzimekkel végzett munkáival összehasonlítva, a növekvő mobilitás sorrendjében az alábbi izoenzimeket azonosítottuk: (I) MnSOD, (II) Cu/ZnSOD, (III) FeSOD és (IV) Cu/ZnSOD.



21. ábra: Natív gélek aktivitás-festésével meghatározott SOD és POX izoformák a kezelési idő első és harmadik hetének végén.

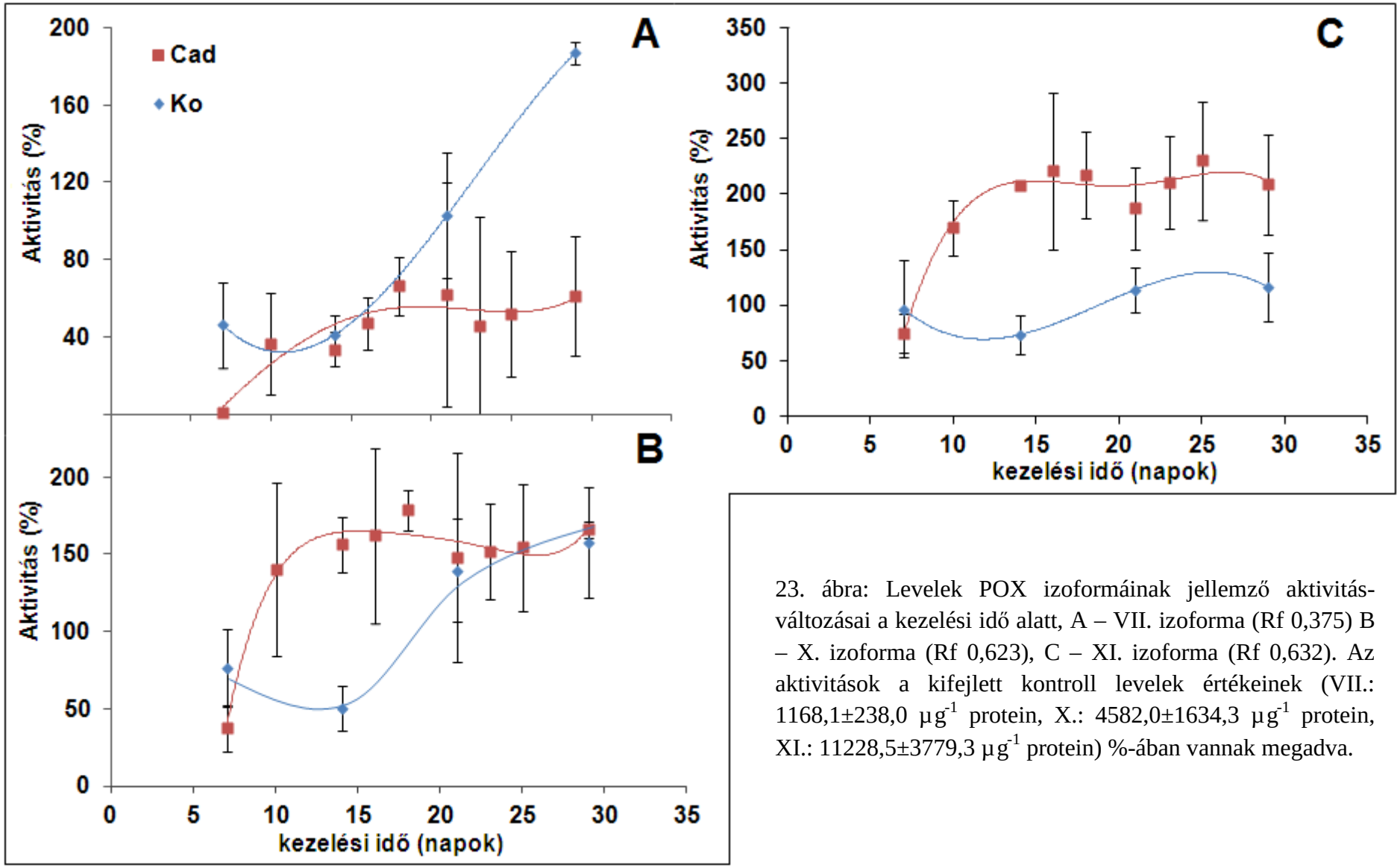
Cad kezelés hatására legérzékenyebben az I (MnSOD; növekedett) és a IV (Cu/ZnSOD; csökkent) izoforma reagált (22./A,C ábra), míg a II. (Cu/ZnSOD) izoforma aktivitása nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest (nem mutatjuk). Periodikus aktivitás-változásokat csupán a III (FeSOD) izoforma esetében mértünk (22./B ábra). Az aktivitás változásának tendenciája hasonló volt mind kontroll, mind kezelt növények levelei esetében, de a ciklusok időbeliségében a Cad kezelésnek erős módosító hatása volt.



22. ábra: Levelekből izolált SOD izoenzimek aktivitásának változása a kezelési idő alatt. A – I. (MnSOD), B – III. (FeSOD), C – IV. (Cu/ZnSOD). A relatív aktivitás-értékek a kifejlett kontroll %-ában értendők: MnSOD – 37,1±0,0 g^{-1}, FeSOD – 136,2±15,4 g^{-1}, Cu/ZnSOD – 569,9±212,9 g^{-1}

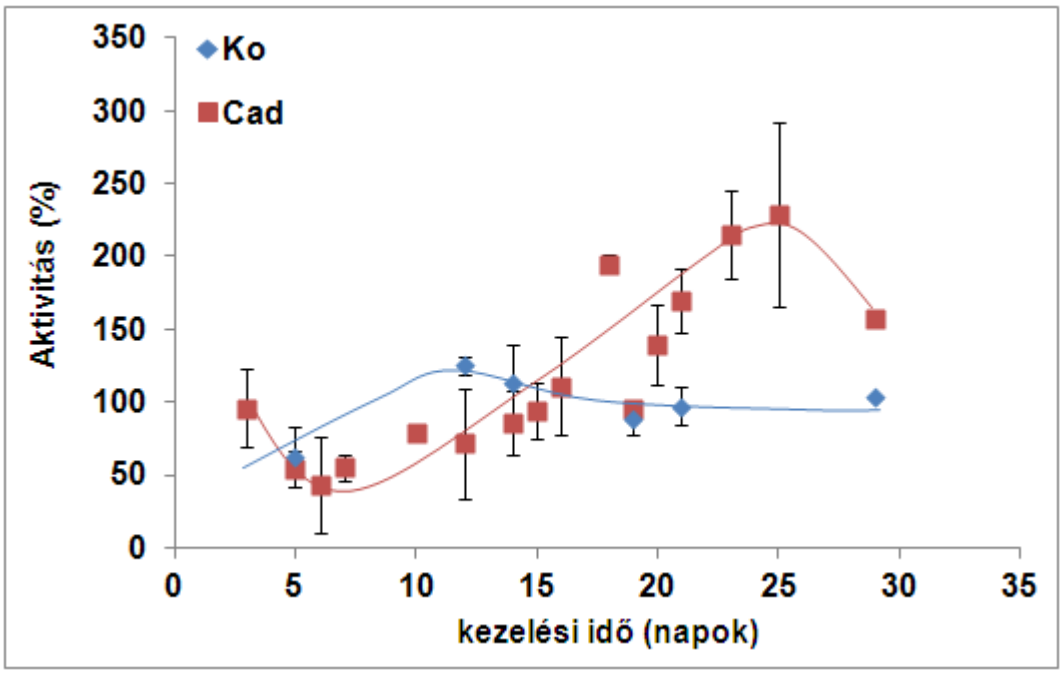
A Cad kezelt növények leveleiben a FeSOD aktivitása a második hét végén érte el a maximumát, míg ez kontroll levelekben csak a harmadik hét közepére esett. Általánosságban minden periódusra elmondható, hogy a Cad kezelés hatására a ciklusok korábban jelentkeztek, így közel 5 nappal tértek el a kontroll növények leveleiben mérhető értékekhez képest. A reakciócentrumok mennyiségének ciklikus változása nagyfokú hasonlóságot mutatott a FeSOD aktivitásának szintén periodikus változásával, mely periodicitásban mind a PSI core mennyisége (v.ö. 15. ábra), mind a FeSOD aktivitása a kezelés megyegyező fázisaiban mutatott maximális értékeket.

Cad kezelés hatására a POX aktivitás a kontroll levelekben mérhető érték fölé emelkedett a kezelés első és második hetében, de a kezelés harmadik hetének végére ez a különbség eltűnt. Megjegyzendő, hogy a kezelési idő teljes hossza alatt a POX aktivitás fokozatos emelkedése volt mérhető mind kontroll, mind kezelt növények leveleiben. Natív akrilamid géleken 12 POX izoenzimet tudtunk elválasztani (21. ábra), melyek közül három izoforma csak a kezelés első két hetét követően jelent meg. A Cad kezelés az egyes izoformákat eltérően befolyásolta. A hatás erőssége és a hatás iránya alapján a POX izoenzimeket négy csoportba soroltuk. Az első csoportba tartozó izoformák (I., III. és IV.) aktivitását a kezelés nem befolyásolta, vagy nem szignifikáns hatást gyakorolt rá (nem mutatjuk). A második csoport izoenzimei (II., VI. és VII) körében a kezelés elején nem volt különbség a kontroll és a kezelt levelek POX aktivitása között, de a második héttől a Cad kezelt levelek aktivitása szignifikánsan alacsonyabbá vált (23./A ábra). A harmadik csoportba sorolt (VIII., X., XII. és részben az V.) izoformák esetében az aktivitás a kezelés első két hetében szignifikánsan magasabb volt Cad kezelt növények leveleiben, mint a kontrollban, de a kezelés második hetére a különbség eltűnt (23./B ábra). A negyedik csoportban (IX. és XI.) az izoenzimek POX aktivitása Cad kezelés hatására a kezelés teljes időtartama alatt a kontrollnál magasabb volt (23./C ábra). Általánosságban elmondható, hogy a kezelt növények leveleinek a kifejlődése után a bennük mérhető POX-aktivitás kevéssé változott, csak kismértékű emelkedést tapasztaltunk.



23. ábra: Levelek POX izoformáinak jellemző aktivitás-változásai a kezelési idő alatt, A – VII. izoforma (Rf 0,375) B – X. izoforma (Rf 0,623), C – XI. izoforma (Rf 0,632). Az aktivitások a kifejlett kontroll levelek értékeinek (VII.: 1168,1±238,0 μg^{-1} protein, X.: 4582,0±1634,3 μg^{-1} protein, XI.: 11228,5±3779,3 μg^{-1} protein) %-ában vannak megadva.

A kontroll levelekben az APX aktivitás a kezelés teljes időtartama alatt nagyjából változatlan volt. A Cad kezelés első hetében az APX aktivitás csökkent a levelekben, majd azután emelkedni kezdett és fokozatosan elérte, később jelentősen meg is haladta a kontroll levelekben mérhető aktivitást (24. ábra). Ez az emelkedés, bár ellentétes előjellel, de hasonló lefutással változott, az MDA mennyiségének csökkenésével összevetve. Fontos megjegyezni azonban, hogy néhány nappal mégis megelőzte azt a változások megjelenésének idejét tekintve.



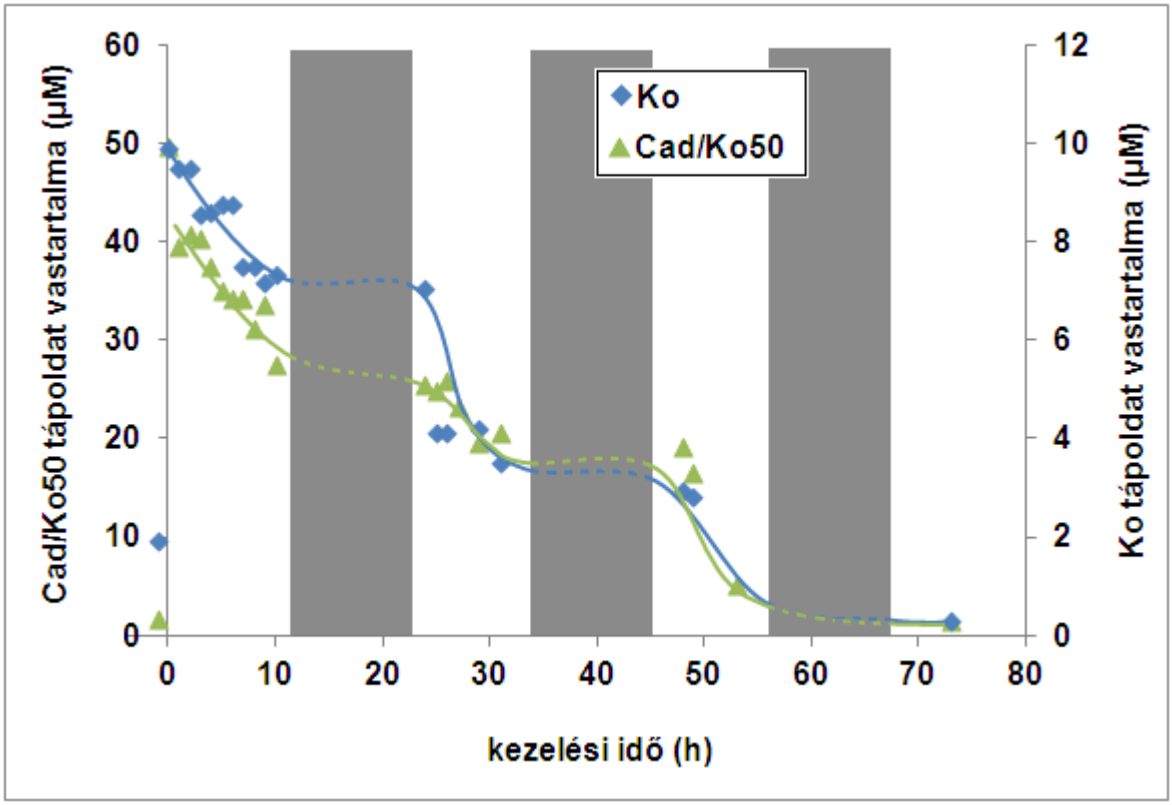
24. ábra: A levelek APX aktivitásának változása a kezelési idő alatt. Az értékek a kifejlett kontroll értékének (9,0±4,1 pmol aszkorbát µg protein^{-1} min^{-1}) %-ában vannak megadva.

2. Az akut kadmium-stressz tüneteinek regeneráltatása megemelt vasellátással

Mint az előzőekben látható volt, a Cad kezelés erősen csökkentette a kezelt növények leveleiben számos esszenciális tápelem mennyiségét, emellett erősen gátolta a fotoszintetikus apparátus fejlődését és működését. Mivel a fotoszintetikus apparátus felépülése és működése szempontjából a Cd-stressz alatt menyiségében leginkább csökkenő Fe szerepe kiemelten fontos, vizsgáltuk hogy a megemelt Fe ellátás hogyan befolyásolja a Cd-stressz tüneteinek helyreállítását. Az eredmények bemutatása során a ’Cad/Ko50’ jelölést, illetve a ’mesterségesen regeneráltatott növény’ kifejezést az egy héten át 10 μM $Cd(NO_3)_2$-ot tartalmazó tápoldatban nevelt, majd a kezelés 7. napjától Cd jelenléte nélkül, de emelt (50 μM) $Fe^{(III)}$-citrát koncentráció mellett regeneráltatott növényekre értjük.

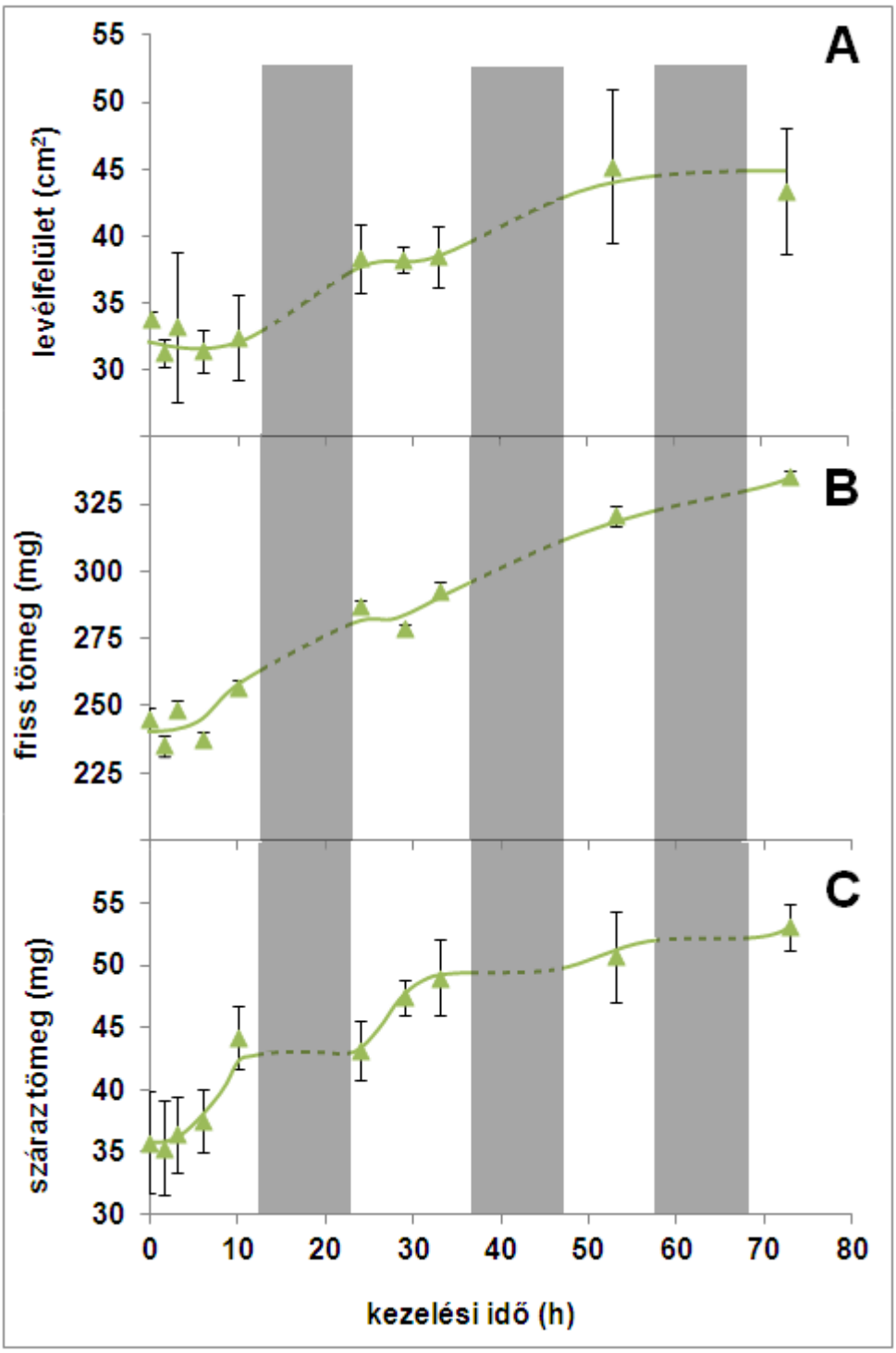
2.1. A vas és kadmium felvétele

Cad kezelés első hete alatt, ami a Chl-bioszintézis gátlásán túl a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működését is erősen csökkentette, drasztikusan csökkent a kezelés alatt fejlődött levelek vaskoncentrációja (akut kadmium-stressz). Az akut tüneteket mutató Cad kezelt növényeket Cd nélküli, ötszörösére emelt vaskoncentrációjú tápoldatra helyezve, intenzív vasfelvétel volt mérhető a tápoldatból, amit a tápoldat vastartalmának fogyásával jellemeztünk (25. ábra). A kontroll növényekhez hasonlóan, ebben az esetben is a tápoldat vastartalmának teljes felvételét tapasztaltuk 72 óra alatt. A tápoldatból történő vasfelvétel kinetikája is hasonló volt a kontroll, valamint a Cad/Ko50 növények esetében. A megvilágítás időtartama alatt a tápoldat vastartalmának erőteljes fogyását mértük, míg a sötétperiódus alatt a következő fényperiódus kezdetéig nem változott a tápoldat vas koncentrációja. A vasfelvétel relatív intenzitása a tápoldatcserét követő első nap volt a legmagasabb, majd a tápoldat csökkenő vaskoncentrációjával párhuzamosan a felvétel intenzitása is fokozatosan csökkent.



25. ábra: Kontroll és Cad/Ko50 növények (jellemző minták) tápoldatból történő vasfelvételének napi ciklusa. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

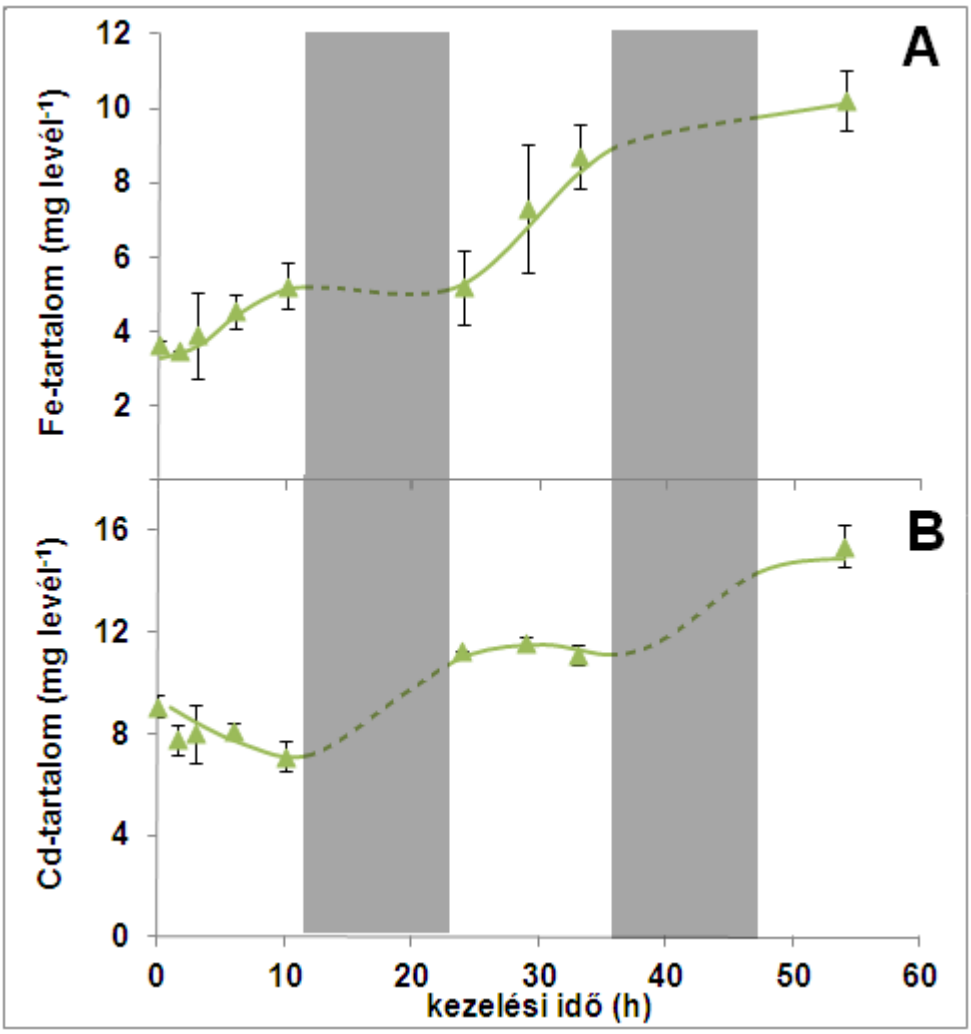
A Cad kezelt növények leveleinek tömeg- és felületnövekedése a kezelési idő 9-10. napja körül befejeződött. (ld. IV./1.1 fejezet) Ennek megfelelően a 7 napos Cad kezelést követően regeneráltatott növények +2 leveleiben is már csak kismértékben változott a levelek tömege és felülete. A levelek felületnövekedése napszakos ritmust mutatott, és egyértelműen a sötétperiódusokhoz kötődött (26./A ábra). A fény- és sötétperiódusok alatt egyenlő mértékű növekedés volt kimutatható a levelek frisstömegének változásában (26./B ábra). Ugyanakkor, a levelek száraztömeg-gyarapodása elsősorban a fényperiódus alatt volt mérhető (26./C ábra). Mind a felület- mind a száraztömeg-növekedés időben fokozatosan gyengülő intenzitást mutatott. Ennek eredményeként a regeneráltatási idő harmadik napjára a változás gyakorlatilag a nullához közelített (10. nap: a levelek növekedési periódusának a záródása).



26. ábra: Cad/Ko50 növények +2 leveleinek felületnövekedése (A), valamint friss- (B) és száraztömeg-gyarapodása (C) a regeneráltatás ideje alatt. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

A levelek vastartalma a tápoldat cseréjét követően ~3 órás lag-periódus után indult növekedésnek (27./A ábra), és jellegzetes napszakos ritmust mutatott. Emelkedés kizárólag a

fényperiódusok alatt volt megfigyelhető, míg a sötétperiódusok alatt a levelek vastartalma nem változott. A vastartalom emelkedése a regeneráltatás második napján volt a legintenzívebb (400,5±6,2 µg h^{-1}), míg az első fényperiódus alatt a vasfelvétel intenzitása a lag periódust követő időben valamelyest kisebb, 194,7±5,8 µg h^{-1} volt. A regeneráltatás alatt nem változott szignifikánsan a Cd levélbeli koncentrációja (nem mutatjuk). A levelek kismértékű tömegnövekedését figyelembe véve azonban ez kismértékű nettó Cd-tartalom gyarapodást jelentett (27./B ábra).

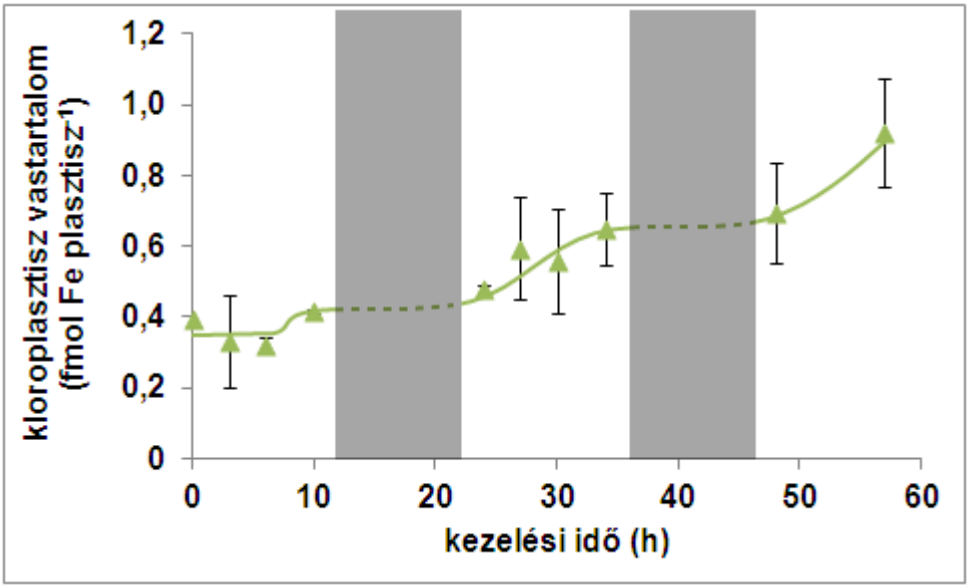


27. ábra:Cad/Ko50 növények +2 leveleiben a Fe- (A) és Cd-tartalom (B) változása a regeneráltatás alatt. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

A vastartalom növekedésétől eltérően a Cd levélbeli mennyisége alapvetően a sötétperiódusok alatt növekedett, míg a fényperiódusok alatt stagnált, vagy mennyiségének változása nem volt

szignifikáns. A tápoldat cseréjét követő rövid lag-periódus után, a növekedés megindulásával egyidejűleg kismértékű csökkenés volt mérhető a +2 levelek Cd-tartalmában.

Munkánk során vizsgáltuk a regenerálódó levelekből izolált kloroplasztiszok vastartalmát is a regeneráltatás kezdeti szakaszában (28. ábra). Az első napon a kloroplasztiszok vastartalmában csupán kismértékű változásokat mértünk. A regeneráltatás második napján azonban a kloroplasztiszok vastartalma erőteljesen emelkedett, és ez még intenzívebben, folytatódott a regeneráltatás harmadik fényperiódusában, aminek eredményeként megközelítette a kontroll szintjét.

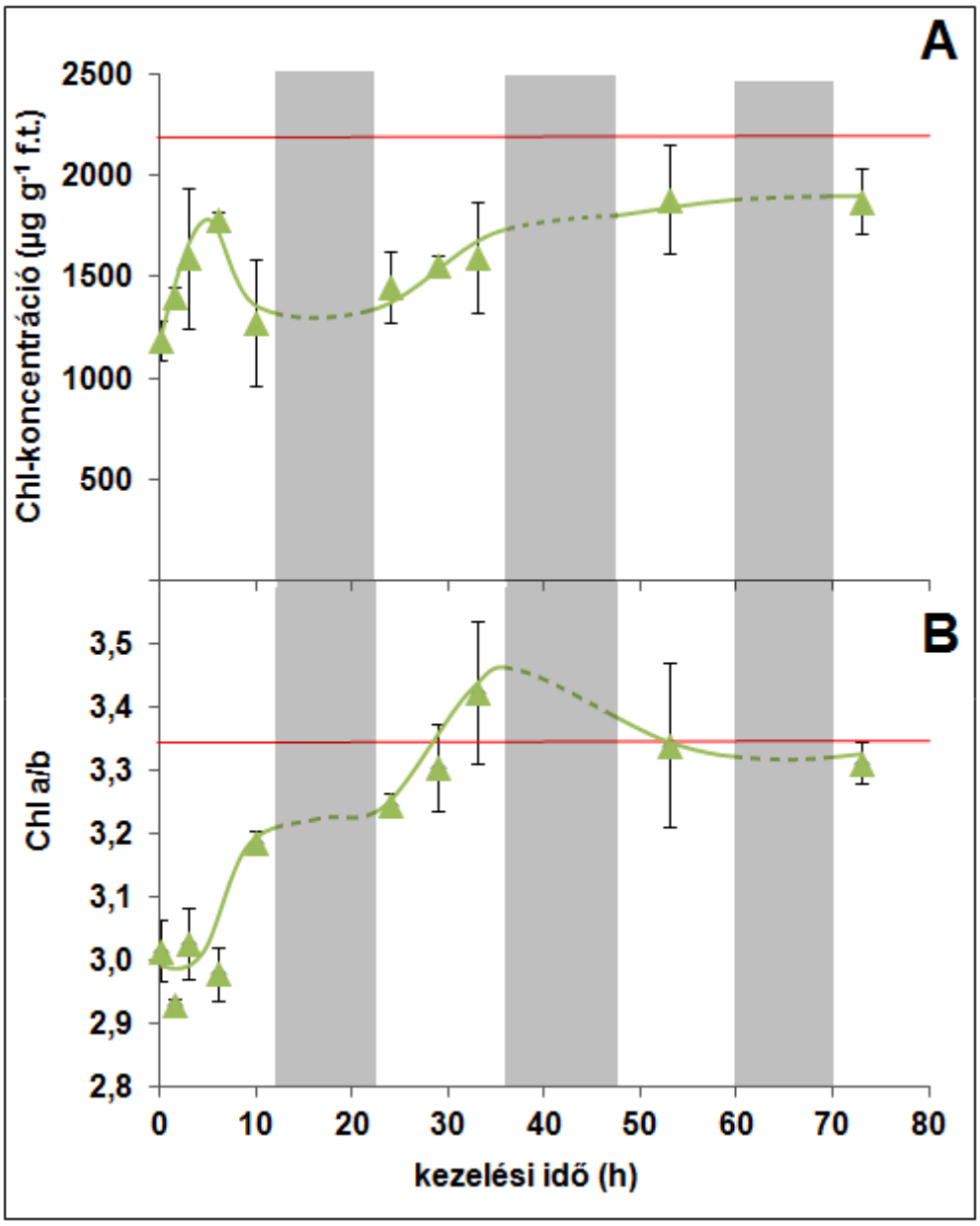


28. ábra: Cad/Ko50 növények +2 leveleiből izolált kloroplasztiszok vastartalmának változása a regeneráltatás során. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

2.2. A fotoszintetikus pigmentek változásai

A levelekben a fotoszintetikus pigmentek mennyisége érzékenyen reagált az egy hetes Cad kezelést követő tápoldat cserére. A Chl *a*+*b* koncentrációja (29./A ábra) a regeneráltatás megindítását követően azonnal növekedésnek indult, majd valamelyest visszaesett, párhuzamosan a friss tömeg gyarapodásának megindulásával. Az ezt követő regenerálódási periódusban, különösen a regeneráltatás második fényperiódusa alatt, a Chl-koncentráció

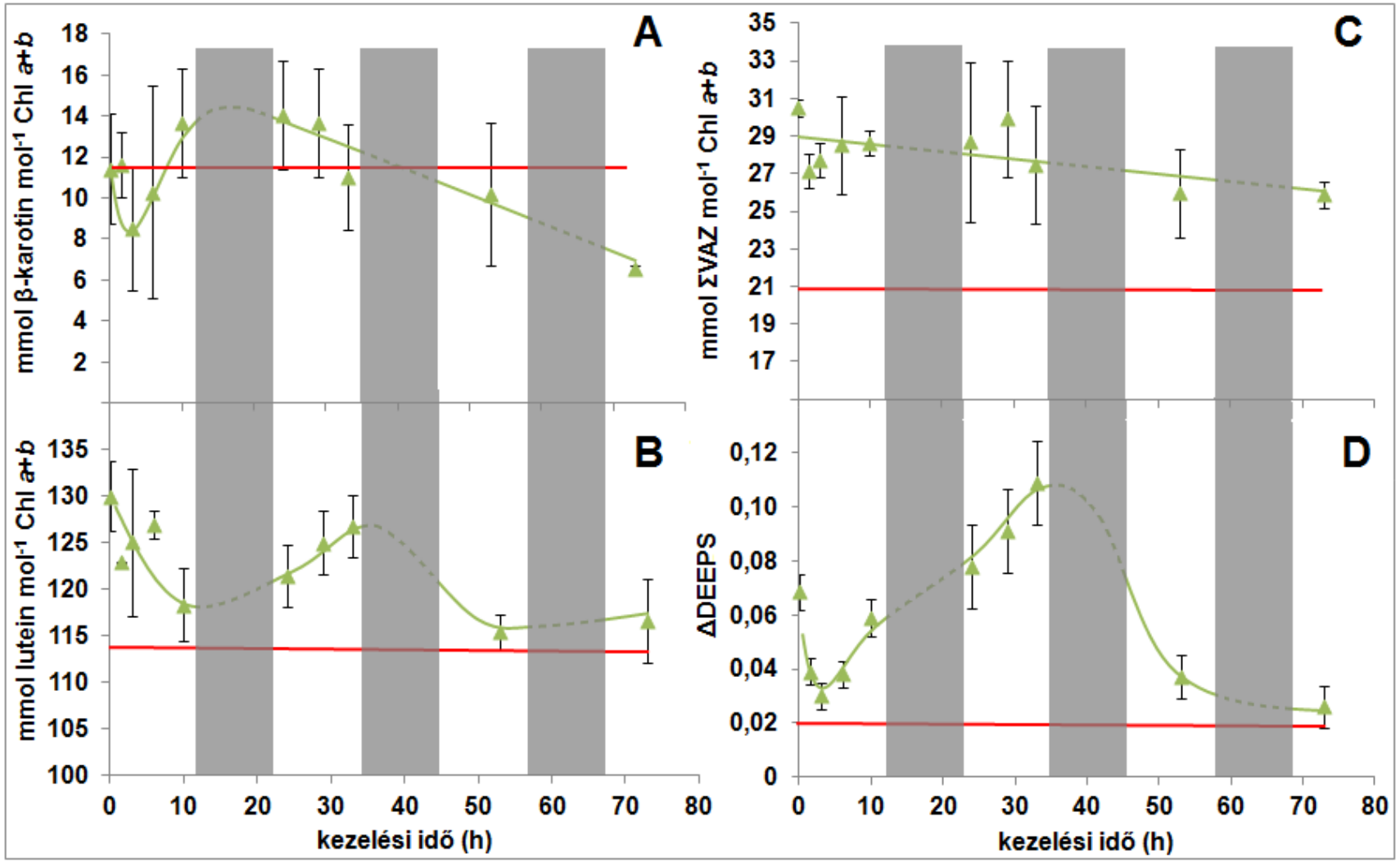
fokozatos növekedést mutatott. Ennek eredményeként a regeneráltatás negyedik napjára értéke megközelítette a kifejlett kontroll levelekben is mérhető Chl koncentrációt. A nem regeneráltatott, mindvégig Cad kezelt növények leveleiben szintén mérhető volt valamekkora Chl-tartalom gyarapodás ebben az időszakban, de messze elmaradt a regeneráltatott növényekben mért értéktől (v. ö. 10./A ábra).



29. ábra: A Chl-koncentráció (A) és a Chl *a*/*b* arány (B) változása Cad/Ko50 növények leveleiben a regeneráltatás ideje alatt. Piros vonal jelöli a kifejlett kontroll növények értékeit. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

A Chl *a/b* arány is markáns változásokat mutatott a regeneráltatás hatására (29./B ábra). Az egy hetes Cad kezelt növények leveleiben mérhető lecsökkent arány a regeneráltatás kezdetén megfigyelhető lag-periódus után erőteljesen emelkedett, és a regeneráltatás második napjának végére a Chl *a/b* arány a kontroll levelekben mérhető értéknél is magasabb maximumot ért el. Ezt követően a Chl *a/b* arány csökkent, és a regeneráltatás harmadik napján a kontroll levelekre jellemző értéket mutatott, és a továbbiakban állandó maradt. A sötétperiódusok alatt, Chl szintézis hiányában, az arány értékében változás nem mutatkozott.

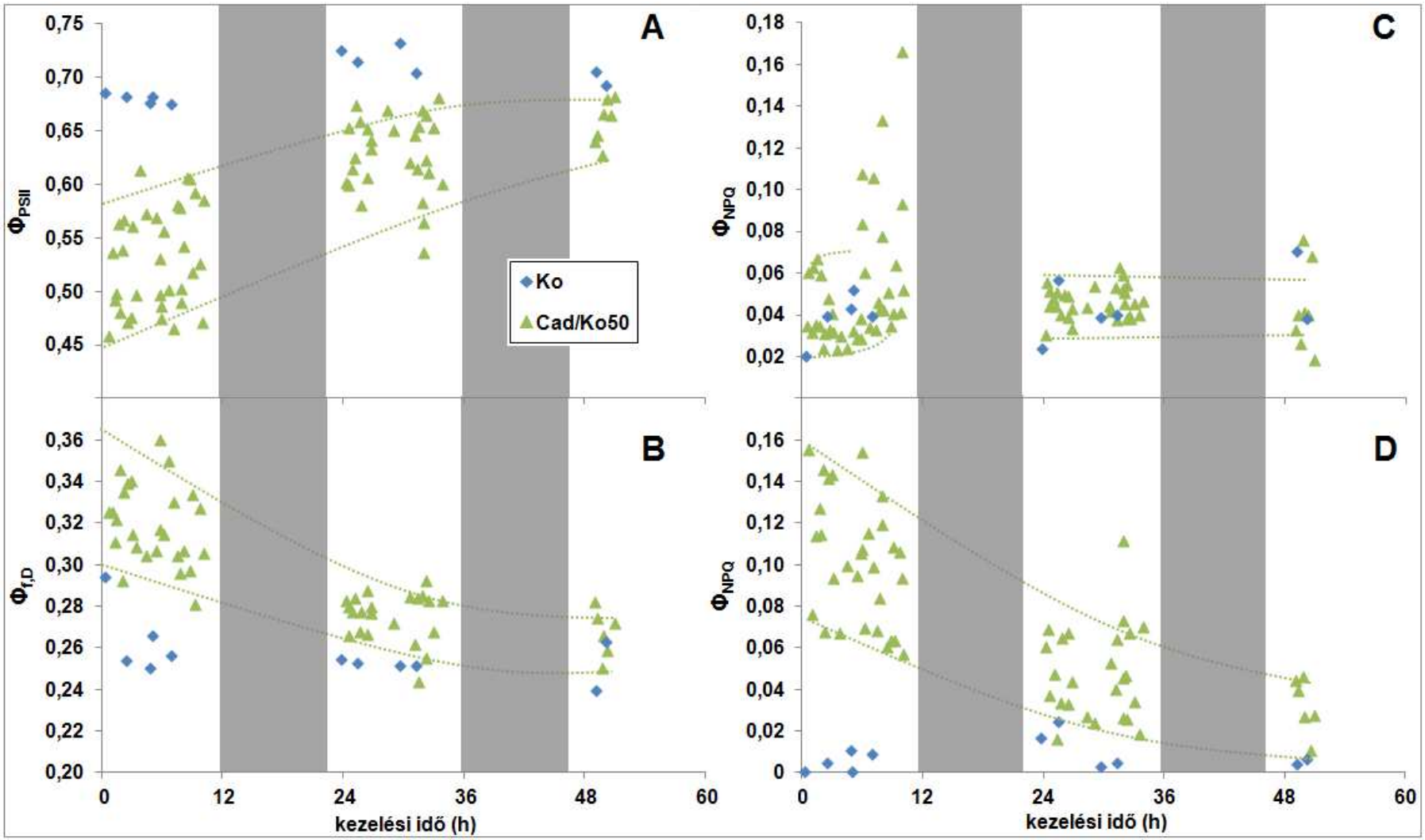
A karotinoidok Chl-hoz viszonyított mennyisége is jellegzetes változásokat mutatott a regenerációs periódus során. A *β*-karotin mennyisége némiképp a Chl *a/b* arány változását idéző módon változott, de azzal ellentétben az első sötétperiódus ideje környékén mutatott maximális értéket, majd csökkent a koncentrációja (30./A ábra). A lutein koncentrációja a *β*-karotintól eltérően a kezdeti, első fényperiódus alatt mért csökkenés után a második fényperiódus alatt erőteljesen emelkedett, majd a harmadik regeneráltatási napon a mennyisége újból lecsökkent és így felvette a kontroll levelekben is mérhető értéket (30./B ábra). A xantofill-ciklus pigmentjeinek összmennyisége (ΣVAZ) Cad kezelés hatására megemelkedett, mely megemelkedett szint a regeneráltatás alatt nem változott jelentősen. Meg kell jegyezni, hogy napi szinten nem szignifikáns emelkedések és csökkenések voltak mérhetők (30./C ábra). Hosszabb időtávon egy kismértékű, de folyamatos csökkenés figyelhető meg, s így valamelyest közeledett a kontroll levelekben mérhető értékhez. A xantofill-ciklus pigmentjei de-epoxidációs állapotának változását jelző ΔDEEPS paraméter – szemben a ΣVAZ értékével – erős változásokat mutatott a regeneráltatás hatására (30./D ábra). A változás időbeli lefutása leginkább a Chl *a*/*b* arány változásával mutatott egyezést.



30. ábra: A *β*-karotin (A), a lutein (B), a ΣVAZ (C) mennyiségében, valamint a ΔDEEPS (D) értékében mért változások a regeneráltatás ideje alatt. A kontroll levelek értékeit piros vonal jelöli. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

2.3. A fotoszintetikus elektrontranszport működése

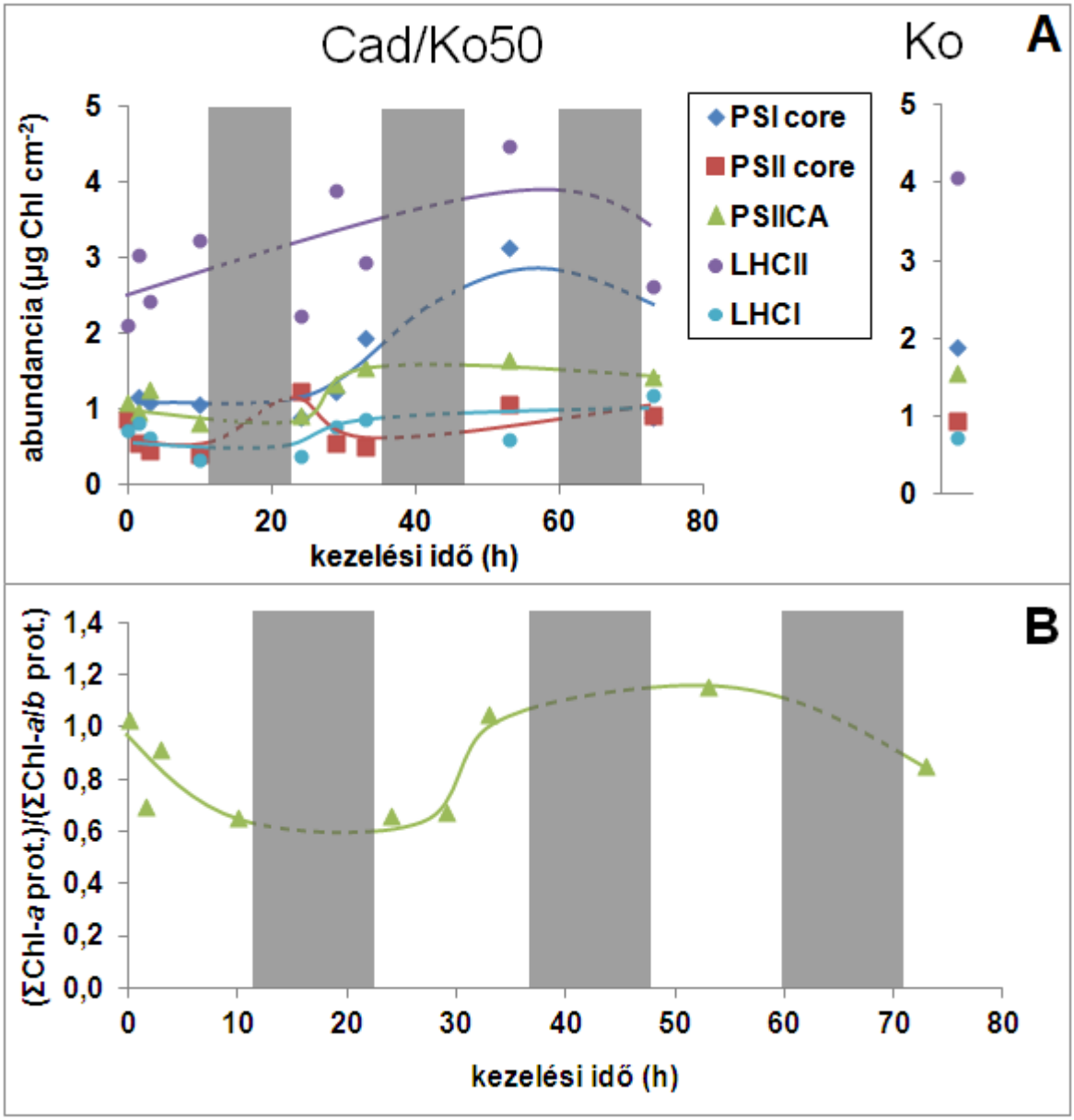
A fotoszintetikus elektrontranszportlánc állapotát jól jellemzi a PSII rekciócentrumok fényadaptált aktuális kvantumhasznosításának a mértéke. A Hendrickson *et al*. (2005) egyenletei alapján számolt fotokémiai kioltás (Φ_{PSII}), az antennarendszerhez kötődő nem-fotokémiai kioltás (Φ_{NPQ}), és a konstitutív energiadisszipáció ($\Phi_{f,D}$) mértéke állandó értékeket mutatott, és a nem funkcionális PSII reakciócentrumok hő-disszipációja (Φ_{NF}) definíció szerint 0 körüli értéken maradt a kontroll növények leveleiben a regenerációs periódus teljes időtartama alatt. Az egy hetes Cad kezelés hatására megváltozott paraméterekben (13. ábra) azonban a regeneráció erőteljes változásokat indukált. A regeneráltatás megkezdését követően a Φ_{PSII} lassan emelkedett, de az első napon még a kontroll leveleknél mért érték alatt maradt. A második fényperiódus alatt azonban már megközelítette és elérte a kontroll növényekben mért értékeket (31./A ábra). A harmadik fényperiódus alatt már nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt növények értékei között. A Φ_{PSII}-vel ellentétes tendenciájú, de azonos kinetikájú változás volt mérhető a $\Phi_{f,D}$, de különösen a Φ_{NF} paraméter értékében (31./B, D ábra). A kezdeti, jelentősen megemelkedett Φ_{NF} érték a regeneráltatás harmadik napjára teljesen kontroll szintre csökkent. A $\Phi_{f,D}$ paraméter esetében a változás kisebb mértékű, de ezzel teljesen egyező tendenciájú volt. Az eddig említett paraméterekkel szemben a Φ_{NPQ} értéke nem különbözött szignifikánsan a regeneráltatás elején a kontroll értékétől, azonban az első fényperiódus végén egy kiugró csúcs jelent meg a független mérésekben. Ez az érték a második fényperiódusra teljes mértékben a kontrollal megegyezővé vált, és nem mutatott további változásokat a regeneráltatás fennmaradó idejében (31./C ábra). A legnagyobb mértékű változások a regeneráltatás első fényperiódusa alatt következtek be, és két nap alatt maradéktalanul helyreállt a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése.



31. ábra: A Φ_{PSII} (A), $\Phi_{f,D}$ (B), Φ_{NPQ} (C) és Φ_{NF} (D) paraméterek értékének változása Ko és Cad/Ko50 növények leveleiben a regeneráltatás ideje alatt. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. A szaggatott trendvonalakkal határolt terület mutatja a változás fő irányát a mintapopulációban.

2.4. A tilakoidmembránok összetétele

A tilakoidmembránok összetétele egyheti Cad kezelés hatására már jelentős változásokat mutatott (14. ábra): a PSI core és LHCII komplex mennyisége erősen csökkent. A regeneráltatás első fényperiódusa alatt nem történt kimutatható változás a tilakoidmembrán összetételében. A második fotoperiódus kezdetére a PSII core mutatott némi, nem szignifikáns emelkedést. Mennyiségének emelkedése azonban átmenetinek bizonyult. Párhuzamosan a PSII core mennyiségével a PSII CA mennyisége is emelkedésnek indult. A második fényperiódus során a PSI core mennyisége mutatta a legerősebb emelkedést (32./A ábra), mely kinetikai szempontból egyezéseket mutat a kloroplasztiszok vastartalmának változásával (v. ö. 28. ábra). A PSI core mennyiségével együtt, de attól időben némileg elmaradva, emelkedést mértünk az LHCII komplexek mennyiségében is. A harmadik fényperiódus alatt a változások tendenciái folyamatosak maradtak, míg a negyedik fényperiódus alatt csak az LHCII komplexek mennyisége mutatott további fokozatos emelkedést. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő Chl-*a* és Chl-*a*/*b* pigment-protein komplexek hányadosát, a (PSI+PSII)/(LHCI+LHCII) mennyiségének arányát vizsgálva (32./B ábra), a hányados értéke az első fényperiódus alatt nem mutatott változást, majd a második fényperiódus kezdetétől erős emelkedésbe kezdett és a második fényperiódus végére elérte maximumát. Újabb változás csak a negyedik fényperiódus alatt történt megint, amikor szignifikánsan csökkent. Az arány változásainak jellegzetességei többé-kevésbé jó egyezést mutatnak a Chl *a/b* arány időbeli változásaival (v. ö. 29./B ábra).



32. ábra: Chl-ptotein komplexek mennyiségének alakulása Cad/Ko50 és kontroll (A) növények leveleiben a regeneráltatás ideje alatt. A (ΣChl-*a* protein)/(ΣChl-*a*/*b* protein) aránynak (Chl-*a* és Chl-*a*/*b* kötő fehérjék arányának) a változását Cad/Ko50 növények leveleiben a (B) ábrán mutatjuk. Sötét oszlopok jelölik a sötétperiódusokat. Az illesztett görbék mutatják a változás fő irányát.

V. Az eredmények megvitatása

A Cd a növények számára erősen mérgező nehézfém. Elsődleges jelentőségű a vasháztartásra gyakorolt zavaró hatása. Cd jelenlétében a hajtásba irányuló vas-transzlokáció jelentősen lecsökken, ami a vastartalmú fehérjék, fehérje-komplexek szintézisének, aktivitásának csökkenését vonja maga után. Korábbi eredményeink alapján ismert, hogy nyárfa növényekben a Cd-stressz már kialakult tünetei is helyreállíthatók a vasellátás megemelésével, mely folyamat során a levelekben jelentős vasfelhalmozódás volt megfigyelhető (Solti, 2008). Ezek a vizsgálatok rámutattak arra, hogy a regenerációs folyamatok okainak megértéséhez a változások kinetikájának részletesebb megismerése szükséges. Hosszabb idő után, a vasellátás változtatása nélkül, spontán módon is végbemegy a regeneráció a kadmium-stresszelt növényekben. Jelen dolgozatban a tápoldat vastartalmának növelését követően részletesebb időbeli felbontásban vizsgáltuk a gyors változásokat, illetve követtük ezeket a hosszú idejű Cd-stressz alatt az ok-okozati viszonyok feltárása érdekében. Mivel a levelek vastartalma jelentős részben a kloroplasztiszokban található meg és a Cd-stressz a fotoszintetikus struktúrák kialakulására és működésére jelentős hatást gyakorol, a különböző típusú regenerálódási folyamatokban vizsgáltuk a kloroplasztiszok vastartalmának növekedése és a regenerációs folyamatok kinetikája közötti összefüggéseket is.

1. Fe-Cd kölcsönhatás hatása a vasfelvételre, -transzlokációra és a sejtszintű vas-homeosztázisra

1.1. A vas felvétele

A Cd jelenléte ismereteink szerint kölcsönhat a gyökerek vasfelvételével és szállításával (Korshunova *et al*., 1999, Yoshihara *et al*., 2006, Hodoshima *et al*., 2007), így Cd-stressz hatására, a vashiányossá váló hajtás mellett, a gyökérben a vas koncentrációja jelentősen emelkedik (Fodor *et al*., 2002). A jelenség hátterében részben az állhat, hogy Cd-stressz hatására a gyökerek vasfelvételéért felelős IRT1 transzporter expressziója megnő (Hodoshima *et al*., 2007), míg a transzlokációban szerepet játszó FRD3 expressziója rendkívül lecsökken (Yamaguchi *et al*., 2010). Az akut Cd-stressz tüneteinek regeneráltatásakor a fényperiódus kezdetén alkalmazott megemelt vasellátás hatására - egy rövid idejű lag-periódustól eltekintve - a tápoldatból történő vasfelvétel azonnal megindult

(25. ábra). A transzporterek számának/aktivitásának növekedését alátámasztja, hogy ezek a növények ötszörösére emelt vasellátás mellett mutattak a kontroll növényekhez hasonló lefutású felvételi görbét, azaz a vasfelvétel intenzitása nagymértékben felülmúlta a kontrollok vasfelvételi intenzitását (v.ö. a két ordináta-beosztást). A nagy intenzitású vasfelvétel annak ellenére, illetve amellett volt megfigyelhető, hogy a Cd-stressz hatására már jelentős mennyiségű Cd, illetve Fe halmozódott fel a gyökerekben (Fodor *et al*., 2005). A tápoldatból történő vasfelvétel mértéke ezért mindenképpen kiemelt figyelmet érdemel a növénynevelés, illetve a tápoldat-frissítés gyakorisága szempontjából is. A tápoldatból történő vasfelvétel fényfüggését mutatja, hogy a tápoldat vastartalmának fogyása csak a fényperiódusok alatt volt megfigyelhető. A gyökerek vasfelvételének fényfüggésére közvetett magyarázatot adhat a stratégia-I növények gyökér-vasfelvételi rendszerében a FRO2 vas-kelát-reduktáz enzim cirkadián ritmusban változó expressziója (Vert *et al*., 2003) és működése, mely a ferri-kelátok redukálásához NADH-ról származó redukálókapacitást igényel. (Holden *et al*., 1991). A sötétperiódusok alatt az asszimilációból származó és a floémben transzlokálódó szerves energia- és redukálókapacitás-források valószínűleg nem elegendőek a ferri-kelátok nagymértékű redukciójához. Ezen túlmenően azonban maga a transzlokáció/beépülés (szintén nagy energiaigényű) csökkent mértéke is gátló tényező lehetett a vasfelvétel szoros regulációja miatt (Ramirez *et al*., 2011).

1.2. A kadmium-stressz által okozott zavarok a vas-transzlokációjában

Sok esszenciális és nem-esszenciális elem versenyben áll egymással a gyökérből a hajtásba történő transzlokáció során (Das *et al*., 1997, Shanker *et al*., 2005). A Cd, különösen a hajtásban, erőteljes vashiányt indukál (Siedlecka és Krupa, 1999), és a Ca- (Perfus-Barbeoch *et al*., 2002), valamint a K-, Zn-, Mn- és a Cu-metabolizmus (Sanitá di Toppi és Gabbrielli, 1999) is zavart szenved. Az esszenciális és nem esszenciális fémek levélbeli koncentrációinak változásait vizsgálva (1. táblázat) kimutattuk, hogy e zavarokat általában a megváltozott transzlokáció okozta. Az eredmények utaltak egyfelől a kadmiumnak a növényeken belüli transzlokációs mechanizmusára, valamint a Cd^{2+}- és egyéb fémion-transzlokáció kölcsönhatásának minőségére is (a fém-transzlokáció változásának jellegzetességeit és a belőle levont következtetések kifejtését ld. az Appendix B. részében). A Cd-stresszről is régóta ismert, hogy hatásainak jelentős részéért indirekt mechanizmusok, főképpen transzlokáció zavara által kiváltott indukált vashiány a felelős (Siedlecka és Krupa, 1999, Fodor, 2002). Jelen kísérleteinkben a Cd-stressz hatására a vas transzlokációja erősen

csökkent és a kezelés megkezdését követően a levélbeli vaskoncentrációban is csak kismértékű emelkedés volt mérhető, mely megerősít más, korábbi méréseket (Siedlecka és Krupa, 1996a, Solti, 2008).

Az akut Cd-mérgezési tünetek mutató növényeket mesterségesen regeneráltatva (Cad/Ko50), a vas 3 óra lag-periódus után jelent meg a levelekben, és hasonlóan a gyökerek vasfelvételéhez, erős napszakos ciklikusságot mutatott (27./A ábra). A fotoszintetikus apparátus felépülésében és működésében mért változásokhoz hasonlóan, a transzlokáció is egyértelműen fényfüggő folyamatnak bizonyult. A 3 órás lag-periódus különösen figyelemreméltó, hiszen a tápoldatból a gyökerek vasfelvétele azonnal megindul, valamint a Cd-stressz hatására a gyökerekben jelentős mennyiségű, a kontroll növényekben mért értéket bőven meghaladó mértékű vas-felhalmozás történik (Fodor *et al*., 2005). A vas xilémelemekbe juttatása és a hajtásba történő transzlokációja azonban a citrát jelenlététől is erősen függ (Rellán-Álvarez *et al*., 2010). A Cd-stressz a gyökér citrát-transzporterének, a FRD3-nak az expressziójában erőteljes csökkenést okoz (Yamaguchi *et al*., 2010). A Cd-stressz alatt stagnáló levél-Fe-koncentráció, valamint a gyökérben akkumulálódó Fe (Fodor *et al*., 2005) támogatja azokat az elképzeléseket, miszerint a Fe gátolt transzportjában a Cd, mint jelátviteli regulátor működik. A gátló hatás olyan, a gyökér-hajtás Fe-transzlokációban szerepet játszó fehérjék, mint például az FRD3 expressziójának változásán keresztül okozhat zavart a vas-homeosztázisban. A regeneráltatás során viszonylag hamar meginduló Fe-transzlokáció ellenben azt sejteti, hogy a regulációra mindenképpen hatással van a gyökér szimplasztban a Fe/Cd arány kismértékű megváltozása is. A regeneráltató tápoldat Cd-ot nem tartalmaz, így a gyökerek hamar beinduló vasfelvétele mellett a Cd utánpótlása megszűnik, mely önmagában is eltolja a Fe/Cd arányt. Ugyanakkor, a levelekben mért folyamatos Cd-transzlokáció (27./B ábra) a gyökér nettó Cd-tartalmát is csökkenti. Méréseink alapján arra következtetünk, hogy a gyökerek csökkenő Cd- és növekvő Fe-tartalma (növekvő Fe/Cd arány) együtt váltotta ki a Fe-transzlokáció gátlásának a feloldását. Ez bizonyára a FRD3 transzkripciójának megindulásával is összefüggésben van (Durrett *et al*., 2007). Kísérleteinkben a Cd-stressz regeneráltatásával együtt igen hamar meginduló Fe-transzlokációt tehát a Fe és a Cd gyökérbeli mennyiségének kismértékű változása, közvetlenül pedig valószínűleg egy NO-t is magában foglaló szignalizációs út aktiválódása eredményezhette, ami valószínűleg a transzkripciós mintázat megváltozásához vezet (Besson-Bard *et al*., 2009, Xiong *et al*., 2010, García *et al*., 2011, Thomine és Lanquar, 2011). A transzlokációhoz szükséges citrát a szénváz-igénye miatt csak a fényperiódusok alatt áll

rendelkezésre nagyobb mennyiségben. Így a sötétperiódusok alatt gátolt Fe-transzlokáció részben az asszimiláció stagnálásával, részben a sötétperiódusok alatti sztómazáródás következtében lecsökkenő xilémnedv-mozgással (Vert *et al*., 2003) is összefüggheet.

A viszonylag hamar beinduló Fe-transzlokáció következtében a vas megjelenik a levelekben, ami párhuzamot mutatott a levelek száraztömeg-gyarapodásának változásával is (26./C ábra). Meglepő módon, a Cd transzlokációja, szemben a vas transzlokációjával, de hasonlóan a levél frisstömegének gyarapodásához (26./B ábra), egyenletesnek mutatkozott, tehát a sötétperiódusok alatt is működött. Mindezek arra engednek következtetni, hogy egyrészt a gyökérnyomásnak jelentős szerepe van a nyárfa csemetéken belüli xilémnedv-áramban, másrészt a Cd^{2+} mozgására nincsenek hatással azok a tényezők, melyek a vas sötétperiódus alatti transzlokációját gátolják. Ez alátámasztja a vasfelvétel és –transzlokáció asszimilátumok mennyiségétől való függőségét.

Mindezek az eredmények, a fém-transzlokációban tapasztalt változásokkal együtt, alátámasztják azon elképzeléseinket, miszerint a Cd^{2+} a vas transzlokációs útvonalától függetlenül, de – legalább részben – a Ca^{2+} transzlokációjával (ld. Appendix B.) megegyező utakat használ.

1.3. A Cd-stressz hatása a kloroplasztiszok vastartalmára

A hajtásban a Fe esszenciális szereppel bír a Chl-bioszintézisben és a fotoszintetikus struktúrák kialakulásában és működésében. A hajtás vastartalmának jelentős része is a kloroplasztiszokban lokalizált (Morrissey és Guerinot, 2009). A mezofillum sejtjeinek, valamint kloroplasztiszainak vasfelvétele a hiánytüneteket mutató levelek Chl-tartalmának emelkedésével is követhető (Mikami *et al*., 2011). Cad kezelés hatására a levelek Fe- és Chl-tartalma is messze a kontroll levelekben mért értékek alatt volt. Mindannak ellenére, hogy a vastartalom alig emelkedett a levelekben, a hosszabb időtartamú kezelés eredményeként emelkedett a kloroplasztiszok vastartalma (9. ábra). A vas eloszlásában megfigyelt változás eredményezte, hogy a Chl-tartalom is fokozatosan emelkedett. Mindezek együttesen a spontán regeneráció jelentőségére hívják fel a figyelmet. Ezzel összhangban, mesterséges regeneráltatási kísérleteinkben is a kloroplasztiszok vastartalmának emelkedése volt a szükséges feltétel a helyreállás beindulásához (28. ábra). A Cd-mentes tápoldaton végzett regeneráltatás során a levelek vastartalma (27./A ábra) parallel módon nőtt a kloroplasztiszok vastartalmának a változásával (28. ábra), ami egyértelműen mutatja, hogy a legnagyobb vasigénnyel rendelkező kloroplasztiszokba irányuló vas-transzport erősen preferált. A

regeneráltatási kísérletek eredményei egyértelműen bizonyították, hogy a kloroplasztiszok vastartalmának növekedése időben megelőzi, vagy parallel fut minden, fiziológiai működés szempontjából fontos értékkel (Appendix, A/3 táblázat). A Ilyen a Chl-tartalom változása, a Chl *a*/*b* arány és a PSI core mennyiségének növekedése, de időbeli egyezést mutattunk ki a kloroplasztiszokban a vas megjelenésének kezdete, és a Φ_{NPQ} értékének erőteljes változása (hirtelen megugrása, majd csökkenése) között is. Mind a mesterséges, mind a spontán regeneráció alatt a levelek Cd-tartalma nagyjából állandó volt, így egyértelműen megállapíthatjuk, hogy a kadmium csak másodlagos szerepet játszik a levelek károsodásának kialakulásában. Eredményeink bizonyították, hogy a regeneráció hajtóereje mindkét esetben a kloroplasztiszok vastartalmának emelkedése. Ennek az oka a spontán regeneráció esetében – változatlan levél-vastartalom mellett – a Fe mezofillum-sejteken belüli átrendeződése/újraelosztása lehet. A szimplaszt vasháztartása (Abadía *et al*., 2011), ezen belül a kloroplasztiszok vasfelvétele és vasháztartása (Duy *et al*., 2007, Jeong *et al*., 2008) alig ismert. A Cd-stressz spontán helyreállása során a kloroplasztisz vastartalmában tapasztalt változások, valamint a kloroplasztiszok vasfelvételi rendszerében bekövetkező változások közötti összefüggések feltárása további kutatásokat igényel.

Összefoglalva, a kadmium-indukált vashiányért a vas gátolt transzlokációja tehető felelőssé, amivel együtt csökken a kloroplasztiszokba jutó vas mennyisége is. A vas-transzlokáció gátlása a gyökérben a Fe/Cd aránytól függ, amely befolyással lehet a vas-homeosztázisban döntő fontosságú szignál-transzdukciós útvonalak működésére. Az arány növekedése kiváltja a vas-transzlokáció beindulását. Változatlanul gátolt vas transzlokáció mellett a kloroplasztiszok vastartalmának növekedését a mezofillum-sejteken belüli vastartalom-átszerveződés okozza.

2. A fotoszintetikus struktúrák Cd-stressz-indukálta károsodása és helyreáll(ít)ása

2.1. Az akut Cd-stressz

Akut Cd-stressz hatására a hajtásban klorózis és fotoszintézis-gátlás alakul ki, melyek együtt a Cd-stressz egyik legfontosabb tünetcsoportját képviselik (Siedlecka és Krupa, 1999). A vas koncentrációjának csökkenésével együtt a vasfüggő Chl-bioszintézis is erőteljes csökkenést mutatott a Cad kezelés korai fázisában. A kezelés akut periódusában a Chl-ok

koncentrációjának és a Chl *a/b* arány értékének együttes csökkenése (10. ábra) mutatta, hogy a gátlás leginkább a Chl-*a* pigment-protein komplexeket, azaz a fotoszintetikus reakciócentrumot érintette. A tilakoidmembrán szerveződését vizsgálva megállapítottuk, hogy a reakciócentrumok közül a nagymennyiségű Fe-kofaktort kötő PSI core reakciócentrum (Amunts *et al*., 2010) szintézise károsodott leginkább (15. ábra), hasonlóan Fagioni *et al*. (2009) méréseihez. Ugyanakkor az indukált Fe-hiány miatt csökkent Chl-bioszintézis (Marschner, 1995) a PSII antennarendszerének felépülését is gátolta (Timperio *et al*., 2007). A Chl-tartalomra számolt összes xantofill és lutein mennyiségének emelkedése (11. ábra) az összes pigment-protein komplex pool-ban mért változásokra (a reakciócentrumok arányának nagyobb csökkenésére és az antennák arányának növekedésére) utal. Ellentétben Latowski *et al*. (2005) eredményeivel, az általunk vizsgált körülmények mellett a ΔDEEPS értéke a Cd-stressz akut fázisa alatt nem mutatott emelkedést (11./D ábra). Mindez összefüggést mutat a kontrollénál kisebb Φ_{NPQ} értékkel is (13./D ábra). A fényadaptált mintákban mért megemelkedett zeaxantin-mennyiség egyértelműen összefüggésbe hozható a Φ_{NPQ} tendenciózus növekedésével. Fontos azonban kiemelni, hogy a ΔpH-függő kioltási folyamat a kezelés közel teljes időtartama alatt alacsonyabb maradt, mint a kontroll mintákban. Ebben szerepet játszhatott a Cad kezelt növények fényérzékenysége miatt alkalmazott relatíve alacsony nevelési fényintenzitás is.

A fotoszintetikus apparátus biogenezisének zavaraival együtt a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése is jelentősen károsodott. A PSII reakciócentrumok működését és állapotát jelző maximális és aktuális kvantumhatékonyság értéke is erős csökkenést mutatott (12. ábra). A Fe mellett a Mn szerepe is kulcsfontosságú a PSII RC vízbontó komplexének felépüléséhez (Yano *et al*., 2006). Hiánya esetén mind a maximális kvantumhatékonyság, mind a nem-fotokémiai kioltás mértékében a Cd-stresszre is jellemző változások tapasztalhatóak (Papadakis *et al*., 2007, Husted *et al*., 2009). Cad kezelés hatására azonban csak kisebb mértékű Mn-hiányt észleltünk, mely a MnSOD aktivitását sem gátolta (22./A ábra), így önmagában nem magyarázza a csökkent PSII aktivitást. A PSII funkcionális változásainak okaira magyarázatot szolgáltathatnak a fluoreszcencia indukciós paraméterek változásai. Az F_v/F_m (a PSII maximális hatékonysága) csökkenésében mind az F_0, (alapfluoreszcencia) növekedése mind az F_m (maximális fluoreszcencia) csökkenése szerepet játszott. Az F_0 érték növekedésének oka valószínűleg összetett. A Cd jelenléte által gátolt működésű PSII RC (Sigfridsson *et al*., 2004, Faller *et al*., 2005) hatására a ROS termelése

megemelkedik, mely párhuzamosan növeli a D1 protein károsodásának esélyét, és a PSII RC fluoreszcencia emelkedését is kiváltja (La Porta *et al*., 2004). A másik lehetőség szerint – mely részben kapcsolatos az előzővel – a PSII RC és az antennák kapcsolódása lazábbá válik, avagy RC-hez nem kapcsolódó, erősen fluoreszkáló antennarendszerek alakulhatnak ki (Yamane *et al*., 1997, Pospíšil *et al*., 1998, Gáspár *et al*., 2006). Erre utal a Cad kezelés során tapasztalható, erősen emelkedő F_t értéke is. A Cd-stressz kezdeti szakaszában az F_0 növekedésénél még jellemzőbb volt az F_m csökkenése. Stresszkörülmények között kioltó mechanizmusok csökkenthetik az értékét (Baker, 2008). A kioltó mechanizmusok vizsgálatára Hendrickson *et al*. (2005) fotoinhibíció vizsgálatára kidolgozott formulái bizonyultak a legmegfelelőbbnek, melyek kísérleti bizonyítással is jól közelítik az inaktív PSII RC-ok energia-disszipációjának mértékét. Meglepő módon az antennarendszer nem-fotokémiai kioltásának részesedését jelző Φ_{NPQ} paraméter csökkent (13./D ábra). A Cd-stressznek ebben az akut szakaszában a gerjesztési energia disszipációjáért legnagyobb mértékben az inaktív PSII RC-ok kioltásának részesedését mutató Φ_{NF}, illetve részben a $\Phi_{f,D}$ paraméter értékének emelkedése volt felelős (13./B,C ábra). A $\Phi_{f,D}$ emelkedése – összhangban az F_0 szintjének megemelkedésével – arra utal, hogy Cad kezelés hatására a gerjesztési energia fluoreszcens kioltásának nagyobb szerepe van, mint a kontroll levelekben. A Φ_{NF} értékében tapasztalt erőteljes emelkedés az F_m és a Φ_{PSII} csökkenése mellett arra utal, hogy a Cd-stressz akut fázisában az inaktívvá vált PSII RC-k kioltása válik a legnagyobb mértékű kioltási mechanizmussá. A Cd-stressz akut fázisában a fényadaptált F_t az aktinikus megvilágítás kezdetét követően az F_0 fluoreszcencia szintje alá csökken. Hasonló jelenségek tapasztalhatók mutáns *Arabidopsis thaliana* növények esetében, is, ahol a funkcionálisan inaktív PSII RC-ok halmozódtak fel nagy mennyiségben a tilakoidmembránban (Meurer *et al*., 1996). A Cd-stressz kezdeti fázisában tehát az inaktívvá váló, részben oligomerizálódó PSII komplexeknek tulajdonítunk elsőrendű szerepet az energiadisszipációban (Solti *et al*., 2009). A gátolt PSII-működés (Sigfridson *et al*., 2004, Faller *et al*., 2005), valamint a csökkent intenzitású PSI-bioszintézis (Fagioni *et al*., 2009) együttesen eredményezik a fotoszintetikus elektrontranszportlánc jelentős gátlását. Ez jelentős részben hozzájárul a járulékos oxidatív stresszhez, melyet az emelkedő MDA-tartalom is jól mutat (20. ábra).

2.2. Az akut károsodások mesterséges helyreállítása

Regeneráltatási kísérleteinkben a Cd-stressz akut fázisában lévő növényeket mesterségesen regeneráltattunk a tápoldat vastartalmának jelentős növelésével. A kiváltott regenerációs effektus megmutatta a kadmium-stressz hatására gátolt fotoszintetikus aktivitás regenerációjának erőteljes vasfüggését is. A károsodások többségében a kadmiumnak csak közvetett hatása van, ugyanis a regeneráltatás alatt a levelek Cd-tartalma nem csökkent, sőt emelkedett (27./B ábra), mégis fiziológiai helyreállás ment végbe. A regeneráció korai stádiumában a Chl *a/b* arány és a *β*-karotin koncentrációjának együttes emelkedése a csak Chl-*a*-t kötő reakciócentrumok, nagyrészt a PSI RC-k arányának emelkedésével hozható összefüggésbe (Loll *et al*., 2005, Amunts *et al*., 2007). Az arány értékének második sötét- és harmadik fényperiódushoz köthető csökkenésének az okát főként a PSI akkumulációjának a leállásában, illetve az LHCII akkumulációjának a töretlen tovább folytatódásában kereshetjük (32. ábra). Mind a Chl-bioszintézis, mind a reakciócentrumok, különösen a számos Fe-S kofaktort kötő PSI szintézise jelentős vasigénnyel bír (Jensen *et al*., 2003). A PSI RC-ban a Fe-S oxidatív károsodásokra érzékeny, mely károsodások a PSI inaktivációjához és teljes lebontásához vezetnek (Scheller és Haldrup, 2005). A levelekben a megjelenő vas beépülése a transzlokációnál jelentősen több időt vett igénybe. Az időbeli késés mindenképpen következetesnek tekinthető, hisz a xilémelemekben a levelekbe szállított vas-komplexeket először a mezofillum sejtjeinek kell felvenniük. A Cd-stresszt követő regeneráltatás alatt a mezofillum-sejtek, valamint a kloroplasztiszok vastartalmának emelkedéséhez a felvételi rendszer aktivitásának fokozása is szükséges, mely összetett szignalizáció eredménye (Thomine és Lanquar, 2011). Ez magyarázhatja a kloroplasztiszok vastartalmának jelentős időbeli késéssel jelentkező emelkedését (28. ábra). Hasonlóképpen a gyökerek tápoldatból történő vasfelvételéhez, illetve a levelekbe történő vas-transzlokációhoz, a kloroplasztiszok vasfelvétele is egyértelmű fényfüggést mutatott: a sötétperiódusok alatt nem nőtt, hanem kismértékben (nem szignifikánsan) csökkent a vastartalmuk. A kloroplasztiszok vasfelvételi mechanizmusa alig ismert folyamat (Duy *et al*., 2011). Bughio *et al*. (1997) vizsgálataiban az izolált kloroplasztiszok vasfelvétele fényfüggést mutatott, nemcsak a fény hiánya (sötétperiódus), de DCMU fotoszintetikus elektrontranszportlánc-gátló jelenléte is megszüntette a plasztiszok vasfelvételét. Mikami *et al*. (2011) vizsgálatai szerint a vashiány a kloroplasztiszok vasfelvételét a vizsgált növényfajtól függően serkentheti, illetve gátolhatja, így az a mezofillumsejtek vasfelvételi rendszeréhez hasonlít. Kísérleteinkben a vastartalom növekedésére rendkívül érzékenyen reagáló Chl *a/b* arány emelkedése egyértelműen mutatja

az első fotoperiódus végén a kloroplasztiszokban megjelenő vasat. A stagnáló kloroplasztisz Fe-koncentráció, valamint a zárvatermők fényfüggő Chl-bioszintetikus aktivitása (Böddi *et al*., 2005) miatt a sötétperiódusban a Chl-*a*/*b* arány is változatlan maradt. A reakciócentrumok felépülésének ilyen formájú gátlása miatt azonban a fényt nem igénylő *β*-karotin-szintézis sem folytatódott. Az újonnan a kloroplasztiszokba kerülő vas rendkívül hamar és hatékonyan épült be a Cd-stressz jelenlétében kialakuló vashiány által leginkább érintett PSI core komplexekbe (Terry és Abadía, 1986, Timperio *et al*., 2007, v.ö. 32. ábra), s egyszersmind kiváltotta szintézisük erőteljes beindulását. Ezt követően indult meg a többi Chl-protein komplex, így a PSII core, a PSII CA, valamint az LHCI és később az LHCII antennakomplexek akkumulációja is (32./A ábra). A második fényperiódus kezdetére, a tilakoidmembrán szerveződésében tapasztalt változásokkal párhuzamosan ugrásszerűen megemelkedett az aktuális kvantumhatékonyság (31./A ábra), tehát a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése. A regenerációban fontos szerepet játszott PSI RC-ok biogenezisének beindulásán kívül a PSII működés helyreállása is, melyet az inaktív PSII RC-ok kioltásának csökkenése is mutatott (32./D ábra). Bár a Cd erősen gátolja a PSII felépülését és működését *in vitro* (Sigfridson *et al*., 2004, Faller *et al*., 2005), nem bizonyított a Cd nagymennyiségű jelenléte a kloroplasztiszokban (Ramos *et al*., 2002, Pietrini *et al*., 2003). A PSII károsodások jelentős részéért így a gátolt elektrontranszport-aktivitás és az oxidatív stressz lehet a felelős. Fagioni *et al*. (2009) spenóton (*Spinaca oleracea*) végzett vizsgálatai szerint Cd-stressz hatására sem speciális, újonnan megjelenő, sem specifikusan eltűnő fehérjék nem jellemzőek a fotoszintetikus apparátusokban, így a gátolt működésért a rendszer károsodása tehető felelőssé. Vizsgálataik szerint a Cit b_6/f és az ATP-szintáz komplex nem, míg a PSII core csak kismértékű mennyiségbeli változást mutatott, míg az Lhcb1.1 protein, az LHCI, illetve a PSI core érzékenyen, mennyiségi csökkenéssel reagált a stresszre. Eredményeik tehát teljes összhangban vannak az általunk, nyárfán mért változásokkal. Regeneráltatás hatására, párhuzamosan a PSI core mennyiségének jelentős emelkedésével együtt, a PSII core is mutatott kisebb mennyiségi növekedést (32./A ábra). A PSII működés kvantumhatékonyságának helyreállásában azonban a károsodott D1 proteinnel rendelkező inaktív PSII RC-ok javítása (Takahashi és Badger, 2010) jelentősebb szerepet játszhatott.

A regeneráció kiemelten fontos folyamata az akut Cd-stressz alatt csökkent jelentőségű, antennákhoz kötődő kioltás helyreállása. A regeneráltatás megkezdését követően hozzávetőlegesen 10 óra késéssel egy nagyon markáns kiugrás volt tapasztalható a Φ_{NPQ}

értékében (31./C ábra), hasonlóan a hosszú távú Cd-stressz során a regenerációs fázisban tapasztalt megnövekedő antenna-kioltás mértékéhez. A Φ_{NPQ} értékének kiugrása időben tökéletes egyezést mutat a Chl *a/b* arány és a *β*-karotin mennyisége emelkedésének kezdetével (29./B és 30./A ábrák). Ez arra utal, hogy a regenerálódás kezdőeseményei között nem csak a PSII RC-ok javítása, de részben *de novo* szintézisük eredményeképpen is, a PSII RC-antenna kapcsolatok helyreállása is hozzájárul. Cad kezelés hatására rozs növényekben az LHCII komplexek aggregációja csökkent, mely jelentősen rontotta mind a Chl-Chl, mind a Chl-karotinoid energiatranszfert is (Janik *et al*., 2010). Az aggregáció megváltozását elsősorban az Lhcb1 és 2 fehérjék csökkent mennyisége okozta (Janik *et al*., 2010). Mindezek az adatok, a kísérleteinkben tapasztalt helyreállás folyamatainak egymásutániságával együtt, magyarázatul szolgálnak a Cd-stressz alatt tapasztalt megemelkedett Chl-*a* fluoreszcencia F_0 szintre is. A megemelkedett F_0, illetve csökkent maximális kvantumhatékonyság okai között így jelentős szerepe lehetett az LHCII komplexek szerveződési változásai miatt emelkedő fluoreszcenciának (és csökkenő termális disszipációnak), így ezek a változások okozhatták a $\Phi_{f,D}$ értékének az emelkedését is. Mind spontán, mind mesterséges regeneráltatás során a helyreálláshoz kötődően emelkedett meg a ΔDEEPS értéke (11./D és 30./D ábrák), párhuzamosan a beinduló LHCII-szintézissel. E két esemény a párhuzamosan csökkenő Φ_{NF} értékével együtt a kioltási mechanizmusok átrendeződését is jelenti. Az antennák hő-disszipációjának (qE, Φ_{NPQ}) az alapja a xantofill-pigmentek de-epoxidációja (Ruban *et al*., 2001). A ΔDEEPS a regeneráltatás harmadik fényperiódusában csökkent újra a kontroll értékére, mely a reakciócentrumok mennyiségének, valamint a Φ_{PSII} értékének növekedésével együtt a teljes helyreállás egyik jele. A fiziológiai működés helyreállásával tulajdonképpen a fény relatív feleslege csökken, amely elleni védekezés a helyreállás folyamán különösen fontos, s így ez a kiugróan magas ΔDEEPS értékekben is jelentkezik. A ΔDEEPS értékének emelkedése majd csökkenése a regeneráció alatt, egyszerre támasztja alá a Cd-stressz során tapasztalható relatív fénystressz fennállását, valamint a Cd-stressz alatt lecsökkent antenna-kioltást. A két jelenség együtt járul hozzá a Cd kezelés során a normál növénynevelési fényintenzitás mellett tapasztalt, fotoinhibíció-jellegű tünetek kialakulásához is (Hendrickson *et al*., 2005).

2.3. Spontán helyreállás hosszú távú Cd-expozíció alatt

A mérsékelten toleráns nyár hosszabb Cad expozíciója során beinduló helyreállási fázisban hosszabb időtávon, de jellegét tekintve az akut Cd-stressz mesterséges regeneráltatásánál tapasztaltakhoz hasonlóan, a csökkenő Φ_{NF}, valamint az emelkedő F_v/F_m és Φ_{PSII} értékek (12, 13./A és 13./C ábrák) a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésének normalizálódására utalnak. Fontos hangsúlyozni, hogy a vas abszolút mennyisége nem emelkedett szignifikánsan a levelekben (1. táblázat), azonban a kloroplasztiszok vastartalmában, a Chl-tartalomhoz hasonló (10./A ábra) lassú, emelkedő tendencia volt megfigyelhető hosszabb expozíció alatt (9. ábra). Összevetve ezeket az eredményeinket a mesterséges regeneráltatási kísérleteinkkel kitűnik, hogy a Chl-tartalom növekedése a kloroplasztiszokban megjelenő vas mennyiségéhez kötött. A Chl-bioszintézis erősen vas-függő folyamat (Spiller *et al*., 1982, Terry és Low, 1982). A kloroplasztiszokban megjelenő vas – a mesterséges regeneráltatáshoz hasonlóan – kiváltotta a PSI core complexek szintézisét is, azonban a lineárisan emelkedő Chl-tartalommal ellentétben, a PSI core mennyisége hosszabb távon fluktuált (15./B ábra), mely szintén megerősíteni látszik a sejten belüli vastartalom újraelosztásának hipotézisét. Hosszabb távon vizsgálva a tilakoidmembránok összetételének változásait, a mesterséges regeneráltatáshoz hasonlóan kisebb emelkedés volt mérhető a PSII core mennyiségében is. Ez összhangban áll a *β*-karotin mennyiségének emelkedésével (11./A ábra), mely a megugró PSI core mennyiségével együtt hozzájárulhatott a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésének helyreállásához. A *β*-karotin mennyiségének emelkedése közvetve szerepet játszhatott a PSII-inaktiváció kivédésében is. A fotoszintetikus pigment-protein komplexek felépítésén kívül a *β*-karotin a ROS eliminálásában is részt vesz (Okamoto *et al*., 2001). Kimutatták továbbá alacsonyabbrendű növényekben, hogy stresszhatásokra emelkedik a koncentrációja (Shariati és Yahyaabadi, 2006). A helyreállási fázisban mért emelkedő koncentráció így részben összefüggésbe hozható a ROS-elleni védekezéssel is.

A Cd-stressz helyreállási fázisában az oxidatív stressz szintjét jelző MDA koncentráció-görbéje hasonló lefutású volt, mint az a Φ_{NF} értékének csökkenése (13./C v.ö. 20. ábra), mely az oxidatív károsodások és a PSII inaktiváció mértéke közötti szoros kapcsolatra utal. Erre utal továbbá az is, hogy az APX aktivitása a Φ_{NF} értékével időben ellentétes lefutással változott (13./C v.ö. 24. ábra). A kloroplasztiszokban a ROS-nak víz-víz ciklus általi eliminációja önmagát serkentő folyamat (Asada, 2006). A ROS mennyisége

csökkenésének hatására megnő az aktív PSII-k mennyisége (Kornyeyev *et al*., 2001). A fotoszintetikus elektrontranszportlánc aktivitása a ROS eliminálásához szükséges redukálókapacitás termelésében elengedhetetlen (Foyer és Shigeoka, 2011). Kísérleteinkben az APX aktivitás növekedése időben valamelyest megelőzte az inaktív PSII RC kioltás csökkenését, azaz a PSII aktivitás helyreállását. A Φ_{PSII} emelkedésével párhuzamosan mind a *β*-karotin/Chl, mind a Chl *a/b* arányok emelkedtek, mely az új, működőképes PSII reakciócentrumok megjelenésére is utal (Lichtenthaler *et al*., 2007). Ez egybecseng azokkal az eredményekkel, hogy a ROS akkumuláció gátolja az új, funkcionális PSII RC-ok szintézisét (Takahashi és Murata, 2008). A Φ_{PSII} növekedése feltételezi továbbá a teljes fotoszintetikus elektrontranszportlánc, köztük a PSI működésének a helyreállását is, mely szintén összefüggésben van a regenerálódás alatt tapasztalt ciklikusan és jelentősen megemelkedő PSI core mennyiséggel. A fotoszintetikus aktivitás növekedésével párhuzamosan emelkedést mértünk a xantofill pool és a ΔDEEPS értékében is (11./C,D ábrák). Aszkorbinsav-hiányos növényekben kimutatták, hogy az aszkorbinsavat igénylő violaxantin de-epoxidáz aktivitása drasztikusan csökken, így gátolja a ΔpH-függő nem-fotokémiai kioltást (Müller-Moulé *et al*., 2002). Chao *et al*. (2010) eredményei szerint rizs csíranövényekben az aszkorbinsav koncentrációja akut Cd-stressz hatására erősen csökken. Kísérleteinkben az APX aktivitása és a de-epoxidáció mértéke mutatott párhuzamos emelkedést, melyből arra következtethetünk, hogy mind az APX, mind a violaxantin de-epoxidáz (VDE) Cd-indukált gátlását részben az aszkorbinsav hiánya okozhatta. A helyreállási fázisban a Φ_{NPQ} és a ΔDEEPS emelkedése, valamint a Φ_{NF}, és részben a $\Phi_{f,D}$ csökkenése is azt jelzi, hogy a helyreállás során az antennákhoz kötődő nem-fotokémiai kioltás mindinkább dominánssá vált a károsodott PSII RC-okhoz köthető kioltással szemben. Ez együttesen mind a fotoszintetikus elektrontranszportlánc, mind az antennakomplexek fiziológiás működésének, így a xantofill-ciklus aktivitásának a helyreállását mutatja (Thiele *et al*., 1996).

Összegezve, a Cd-stressz a vashiányra legérzékenyebb PSI mennyiségét csökkentette legnagyobb mértékben, míg a PSII inkább működésében szenvedett zavarokat. Mind a spontán, mind a mesterségesen előidézett regeneráció első jeleként, a kloroplasztiszokban megjelenő vas hatására, a PSI szintézise reagált a legérzékenyebben. A fotoszintetikus aktivitás helyreállásában azonban úgy a pigment-bioszintézis, mint a PSII aktivitás és az antennák működésének helyreállása szerepet játszott.

3. Védekezés tartós Cd-expozíció alatt: az oxidatív károsodások elleni védelem

A mérsékelt stresszhatások tolerancia-mechanizmusok megjelenését indukálják az élőlényekben. A hosszú távú Cd-stressz esetében tapasztalt jelentős fiziológiai helyreállás nemcsak a plasztiszok vastartalmának emelkedésével, hanem más, védőmechanizmusok aktiválódásával összefüggő paraméterekkel is párhuzamot mutatott.

A Cd-stressz közvetve (vashiány, fotoszintetikus struktúrák felépülésének és az elektrontranszportlánc működésének a gátlása) erős oxidatív stresszt okozott a hajtásban. A Cd-stressz akut fázisában jelentősen megemelte az oxidatív membránkárosodások mértékét jelző MDA koncentrációját a levelekben, mely csak a kezelés harmadik hetében indult csökkenésnek (20. ábra). Cd-stressz hatására a H_2O_2 elsősorban sejtfalakban halmozódik fel, de a jelentős H_2O_2 felhalmozódása figyelhető meg a kloroplasztiszokban is (Zhang *et al*., 2009). A lipidperoxidáció és a Φ_{NF} értékének parallel változása is rámutat a PSII inaktiváció és az oxidatív stressz erőssége közötti szoros kapcsolatra. Egyéb antioxidáns védelem hiányában a β-karotin gyökfogóként szerepet játszhat az oxidatív stressz elleni védelemben (Okamoto *et al*., 2001), de a zöldalgáktól eltérően (Shariati és Yahyaabadi, 2006) nyárfa levelekben nem halmozódott fel a Cd-stressz akut fázisában.

A növényi sejtek antioxidatív védelmében számos enzim vesz részt. A kloroplasztiszok antioxidatív védelmében kiemelt szerepe van a SOD és APX izoformáinak (Asada, 2006, Giacomelli *et al*., 2007). A Cad kezelés akut fázisában mindkét enzimaktivitás csökkent. A részben kloroplasztiszban lokalizált APX aktivitása a Cd-stressz akut fázisát követően az elsők között kezdett emelkedni (24. ábra), így szerepe a H_2O_2 eltávolításában kiemelten fontos a regenerálódás beindulása szempontjából. A SOD izoformák közül a II., III. és IV. izoformák bizonyultak (részben) kloroplasztisz eredetű enzimeknek, de nem mutattak egyértelműen megemelkedett aktivitást Cd-stressz hatására. Bár a Zn, különösen a levélnövekedés periódusában, felhalmozódott a levelekben, a Cu jelenlétét is igénylő Cu/ZnSOD szintézise a csökkent Cu-transzlokáció miatt közvetlenül is gátlódhatott. Ez részben magyarázza, miért csökkent szignifikánsan a Cu/ZnSOD izoformák aktivitása. A nagyrészt mitokondriális MnSOD aktivitása a stressz hatására megemelkedett (22./A ábra). Vashiány hatására hasonlóképpen emelkedő MnSOD-aktivitás figyelhető meg, mely alapján valószínű a FeSOD-ok MnSOD-okkal való helyettesítése (Allen *et al*., 2007). A tisztán kloroplasztiszban előforduló FeSOD (Kleibenstein *et al*., 1998) aktivitása periodikus

változásokat mutatott mind a kontroll, mind a kezelt növények leveleiben (22./B ábra). Aktivitásának maximumát akkor mutatta, amikor az APX aktivitása elérte a kontrollnál mért értéket, valamint a Φ_{NF} értéke csökkenni kezdett (v.ö. 13./C, illetve 24. ábrákkal). Az APX és a FeSOD aktivitásának parallel futása a kloroplasztiszokban végbemenő víz-víz ciklus jelentőségére utal a Cd-stressz alatt termelődő ROS eliminálásában, és egyúttal bizonyítja az oxidatív stressz szerepét is a Cd-stressz fotoszintézisre gyakorolt hatásában. A FeSOD aktivitása és a szintén jelentős Fe-tartalommal rendelkező PSI core mennyiségi változása jellegzetesen hasonló lefutást mutatott (22./B v.ö. 15./B ábra), azaz a 15. nap körül rendelkezik maximummal. Összevetve ezen eredményeket a levelekben mért változatlan vastartalommal, feltételezzük a vastartalom átrendeződését a mezofillum-sejteken belül. A FeSOD hiánya esetén a PSII inhibíciójának a mértéke jelentősen emelkedik (Zhang *et al*., 2011), így arra a következtetésre jutottunk, hogy a FeSOD mennyiségi változása, valamint a PSII kvantumhatékonyságának csökkenése és emelkedése között is erős összefüggés lehet. Az APX hem kofaktora révén szintén vastartalmú enzim (Jones *et al*., 1998). Növekvő aktivitása, majd a növekvő FeSOD aktivitás és PSI core mennyiségek együtt a kloroplasztiszok vastartalmának jelentős növekedésére is utalnak a Cd-stressz akut fázisát követően. Izolált kloroplasztiszok vastartalmát vizsgálva a kloroplasztiszok vastartalma bizonyíthatóan emelkedik hosszabb távú Cd-stressz hatására, így a vastartalom átrendeződése egy fontos toleranciamechanizmus a hosszan tartó Cd-terhelés eltűrésében.

A H_2O_2 lebontásában, különösen a sejtfalban, jelentős szerepet játszanak a POX izoformák (Weil és Schaub, 1999). Nyárfa levelekből 12 POX izoformát különítettünk el. A magas mobilitású régióban a POX izoformák már a Cd-stressz kezdeti fázisában is megnövekedett aktivitást mutattak (23. ábra). Mint minden növényi peroxidáz, a POX izoformák is hem kofaktort igényelnek működésükhöz, ennek ellenére a vashiány látszólag nem akadályozta ezen izoformák aktivitását. Több, kisebb mobilitású POX izoformával szemben a nagyobb mobilitású peroxidázok, melyek fontos szerepet játszanak a lignin bioszintézisében (Ranieri *et al*., 2001), nem inaktiválódtak, sőt több közülük megnövekedett aktivitást mutatott. Ez összefüggésben állhat a Cd-stressz során tapasztalt extrém sejtfalvastagodással.

A Cd-stressz hatására megemelkedett oxidatív stressz és gátolt fotoszintetikus elektrontranszportlánc-aktivitás, valamint a csökkent Φ_{NPQ} fényérzékenységre, indukált fénystresszre is utal (Hendrickson *et al*., 2005, Solti *et al*., 2009), aminek a megszűnése is

hozzájárulhat a regenerációhoz. Az F_{520} értékében mért növekedés és a PSII funkció változásának párhuzamos lefutása (16. ábra) kapcsolatot sejtet a zöld fluoreszcenciát mutató anyagok szintézise és a Φ_{PSII} helyreállása között. Fontos megjegyezni, hogy az F_{520} értéke fénystressz (L250) kezelés hatására is hasonlóan változott. A kék-zöld tartományú fluoreszcenciát mutató anyagokról ismert, hogy stressz hatására mennyiségük növekszik a levelekben (Lichtenthaler és Babani, 2000). Közülük a zöld tartományú fluoreszcenciáért felelős anyagok elsősorban az epidermisz sejtfalában halmozódnak fel (így epifluoreszcenciájukat a klorofillok reabszorpciója nem befolyásolja), de a mezofillum sejtjeiben is akkumulálódhatnak (Mantha *et al*., 2000). Ugyanakkor a kontroll levelek zöld tartományú emissziója az epidermisz külső sejtfalrétegére korlátozódott, azaz eredetéért valószínűleg a kék emissziós maximummal rendelkező fenoloid(ok), így pl. a ferulasav lehet felelős (Morales *et al*., 1996). A zöld fluoreszcencia az L250 és a Cad növények leveleiben a mezofillum vakuolumaiban és kloroplasztiszaiban is megjelent (18. ábra). A fenoloidok egy csoportját alkotó flavonoidok közül a flavonolok a zöld hullámhossztartomány fő emitterei (Meyer *et al*., 2003, Morales *et al*., 1996, Roshal *et al*., 1999), míg a flavinok valamivel magasabb, némileg a sárga hullámhossztartományba eső emissziót mutatnak (Cerovic *et al*., 1994, Morales *et al*., 1994).

Az F_{520} emelkedéssel összhangban, mind a Cad, mind az L250 kezelés hatására az összfenoloid-tartalom jelentős emelkedését tapasztaltuk (19. ábra). Sok más stresszhez hasonlóan, a mezofill sejtek sejtfalában a polifenol, illetve fenoloid tartalom növekszik Cd-stressz hatására is (Vollenweider *et al*. 2006). A flavonoid eredetű pigmentek (pl. antociánok) nehézfémstressz hatására történő akkumulációjáról is vannak adatok (Krupa *et al*., 1996). Kimutatták továbbá a fenoloidok bioszintetikus útvonalában kulcsfontosságú enzim, a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) aktivitásnövekedését (Kováčik és Bačkor, 2007), valamint a kvercetin-bioszintézisben szerepet játszó flavonoid-3'-hidroxiláz expressziójának emelkedését is (Herbette *et al*., 2006) Cd-stressz hatására. Mindezzel összhangban a kalkon szintáz, a flavonoid bioszintézis kulcsenzimének konstitutív expressziója extrém mértékben fokozta *Arabidopsis* növények UV-toleranciáját (Bieza és Lois, 2001), valamint flavonoid-bioszintézis defektív mutánsok csökkent toleranciát mutattak Cd-stresszel szemben is (Keilig és Ludwig-Müller, 2009).

Kísérleteinkben mind az L250, mind a Cad kezelés esetében a zöld tartományú emisszió emelkedését tapasztaltuk, jóllehet a felhalmozódott flavonoidok kompozíciója

(spektruma) különbözik. A Cad kezelés hatására kiemelkedő halmozódást mutató F_{510} komponens (17./B ábra) spektrális tulajdonságai alapján flavonolnak tűnik (Cerovic *et al*., 2002, Morales *et al*., 1996), míg a sárga hullámhossztartományba eső F_{530}-F_{560} fluoreszcenciát mutató anyagok, melyek mindkét kezelés hatására akkumulálódtak, minden bizonnyal flavinok (Cerovic *et al*., 1994, Morales *et al*., 1994). A zöld fluoreszcenciát mutató flavonoidok tehát jelentős szerepet játszanak a fényvédelemben a beeső sugárzás árnyékolásával (Götz *et al*., 2010). Amíg az F_{530}-F_{560} tartományú fluoreszcenciát mutató anyagok szerepe egyértelműnek tűnik a fényvédelem szempontjából (17. ábra), addig az F_{510} komponens akkumulációja, mely domináns komponenssé válik Cd-stressz hatására, a Cd-stressz specifikus direkt/indirekt hatásai elleni szolgálhat védelmmel. A flavonoidok antioxidánsként is ismert vegyületek, melyek képesek gyököket, valamint reaktív oxigénformákat detoxifikálni, többek között a kloroplasztiszokban is (Agati *et al*., 2007). Mikroszkópos vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az F_{520} emelkedéséért részben a kloroplasztiszokban felhalmozódó anyagok felelősek. A flavonolok erőteljes fémkelátorok, melyek hatékonyan kötnek divalens átmenetifém-kationokat, mely fém-kelálás részben a spektroszkópiai tulajdonságaikat is megváltoztatja (Roshal *et al*., 1999). A flavonolok vas-komplexáló tulajdonsága így hozzájárul antioxidatív jellegükhöz (Sugihara *et al*., 2001). A Cd-stressz hatására tapasztalt erős flavonol-felhalmozódásnak így a szabad Fe vagy a Cd közvetlen detoxifikálásában is szerepe lehetett. Az F_{510} maximummal jellemezhető, Cd-stressz hatására akkumulálódó flavonolok az antioxidatív védelemben és/vagy a szabad Fe/Cd közvetlen detoxifikálásában játszhatnak szerepet.

Összegezve a spontán helyreállási folyamatokat, a regeneráció az APX aktivitásának növekedésével indul be. A FeSOD aktivitás változása, amely jellegzetesen hasonló lefutású, mint a PSI core mennyiségi változása, a vastartalom mezofillum-sejteken belüli átrendeződésével hozható kapcsolatba. A Cad kezelés hatására felhalmozódó F_{510} flavonol szerepe kiemelkedő az antioxidatív védelemben, de a szabad fém-kationok kelálásában is valószínűsíthető. A védőmechanizmusok működésének eredőjeképpen az oxidatív stressz szintjét jelző MDA koncentrációja lecsökken, és a fotoszintetikus aktivitás helyreáll.

4. A Cd-Fe interferencia összegzése

A Cd-stressz közvetett hatásai között igen jelentős az indukált vashiány szerepe, ami a Cd-stressz hatásainak tulajdonított fotoszintetikus tünetek jelentős részéért felelőssé tehető. Mivel a Cd hasonló módon gátolja minden, mozgásához kelátorokat igénylő átmeneti fém transzlokációját, erősen valószínűsíthető, hogy a Cd közvetett módon, a fém-kelátorok transzportjának/szintézisének gátlásával fejti ki a hatását. A Cd-Fe interferencia legjelentősebb mozzanata a Fe hajtásba, így a kloroplasztiszokba történő transzlokációjának a gátlása, aminek következtében a hajtásban, kiemelten a kloroplasztiszokban erős Fe-hiányt indukál (**i**). A Cd-stressz hosszú távú eltűréséhez, a párhuzamosan fellépő oxidatív- és fénystressz elleni védelmi mechanizmusok megjelenésén túl, szükségesnek látszik a mezofillumsejtek vastartalmának szimplaszton belüli átrendeződése is. A spontán helyreállás során a kloroplasztiszok vastartalmának növekedése, változatlan levélbeli vastartalom mellett, erőteljes kloroplasztisz irányú vas-transzportot feltételez a szimplaszton belül (**ii**). A kloroplasztiszokban megjelenő vas mesterséges regeneráltatás során is rendkívül hamar kiváltja a fiziológiai helyreállást. A jelenség magyarázata, hogy a beépülés célpontjai olyan jelentős vastartalommal rendelkező fehérjék, fehérjekomplexek, mint a PSI core komplexek, melyek mennyisége és működése döntő jelentőségű a fotoszintetikus aktivitásában. A kloroplasztiszok vastartalmának növekedése ezért elengedhetetlen feltétele, egyben a kezdő lépés a kadmium-stressz tüneteinek helyreállásában (**iii**). A gyökerek vasfelvételéhez és a vas transzlokációjához hasonlóan a kloroplasztiszok vasfelvétele is erős fotoperiodicitást mutat, így a regeneráció is fényperiódusokhoz kötődik. A hosszú távú spontán regeneráció során a kloroplasztiszok számára rendelkezésre álló vas mennyisége csak korlátozottan elegendő a nem-stresszelt állapotra jellemző fiziológiai aktivitás szintjének visszanyeréséhez. A szimplaszt vastartalmának többszöri átrendeződésére bizonyíték a vastartalmú komplexek, mint a PSI, vagy a FeSOD mennyiségének ciklikus változása. A hosszú távú spontán regeneráció okai egyrészt az oxidatív károsodások elleni védelem fokozásában, így az APX, egyes POX izoformák, MnSOD aktivitásának növekedésében, és más, nem-enzimatikus védőanyagok, így például flavonolok szintézisében (**iv**), másfelől a kloroplasztiszok vastartalmának emelkedésében közösen keresendők. A metabolikus változások oka tehát egyrészt a kadmium-stressz során fellépő oxidatív stresszre adott válasz, másrészt a mezofillum vastartalmának a reorganizációjából következő változás.

VI. Összefoglalás

A kadmium (Cd) erősen toxikus nehézfém növények, így nyárfák számára is, kisebb koncentrációban (10 μM) az okozott terhelés azonban hosszú távon is tolerálható szinten marad. A Cd-stressz akut hatásai között kiemelkedő jelentőségű a vas-anyagcsere, a vas (Fe) hajtásba történő transzlokációjának zavara, így a Cd vas-klorózishoz hasonló tünet-együttest produkál a hajtásban. A Cd közvetve és közvetlenül azonban számos egyéb károsodást is okoz, melyekben az oxidatív stressznek is kiemelt szerepe van. A vashiány, a gátolt klorofill-bioszintézis és az oxidatív stressz erősödése együtt jelentős fotoszintézisgátláshoz vezetnek, melyek együtt akut károsodásként jelentkeznek a növényben.

A szinte teljesen gátolt vas-transzlokáció ellenére a stressz akut fázisát követően, spontán regenerációra utaló változások indulnak be a levelekben. A regenerációt az aszkorbát-peroxidáz aktivitásának növekedése és egy 510 nm-en emittáló flavonol akkumulációja vezeti be. Ezt egyes nagy mobilitású peroxidázok aktivitásának emelkedése és a II. fotoszisztéma (PSII) reakciócentrumai működésének helyreállása követi. Végül, az oxidatív stressz erősségét jelző malondialdehid koncentrációjának csökkenése mérhető. A több hetes spontán regeneráció végeredményeképpen a fotoszintetikus elektrontranszportlánc aktivitása is maradéktalanul helyreáll. Az akut Cd-stressz tünetei mesterségesen megemelt vasellátással is regeneráltathatók. A megindítását követően a Fe transzlokációja órás időtartamban beindul, azonban a Fe növényen belüli mobilitása, így a regeneráció kinetikája is erős függést mutat a fényperiódusoktól.

Bár a spontán a regeneráció alatt a levelek vastartalma kevéssé változik csupán, a kloroplasztiszok vastartalma tendenciózus emelkedést mutat, amely hatással van a nagy vastartalmú fehérjék (PSI, Fe-szuperoxid diszmutáz) aktivitásának/mennyiségének növekedésére is. Mindehhez hasonlóan, a kloroplasztiszokban megjelenő Fe és a helyreállás kinetikája szoros összefüggést mutat mesterséges regeneráltatás során is. A kloroplasztiszok vastartalmának változása tehát, a Cd jelenlététől függetlenül, közvetlenül felelőssé tehető mind Cd-stressz alatt tapasztalt fiziológiai állapotromlásért (Fe-hiány), mind a fiziológiai paraméterek helyreállásáért (a Fe megjelenése a kloroplasztiszokban), egyben felhívja a figyelmet a mezofillum-sejtek vastartalom-átrendezésének a fontosságára a spontán regeneráció folyamatában.

VII. Summary

Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal for plants including *Populus* species. However, it remains tolerable for a long time at relatively low concentrations. Disturbances in the iron (Fe) homeostasis, particularly in Fe translocation and iron uptake into chloroplasts have high impact in the effects of Cd stress, thus leaves show iron chlorosis-like symptoms. Cd also causes other damage directly or indirectly, among which the oxidative stress is of primary importance. Altogether, the Cd-induced iron deficiency and strengthening of the oxidative stress lead to the inhibition of photosynthesis. All these effects cause acute stress damage of Cd treated plants.

Despite the Fe content of the shoot hardly changes, some autogenic recovery occurs in leaves following the acute stress phase under long-term treatment. The first signs of recovery are the increase in ascorbate peroxidase activity together with the accumulation of a 510-nm-emitting flavonol followed by the recovery of functional photosystem II (PSII) reaction centres. In parallel, the malonedialdehide content, a measure of oxidative stress, decreases. By the end of the recovery period, the function and activity of photosynthetic electron transport fully recovers. Recovery can also be achieved by artificial regeneration with elevated iron supply. After the removal of Cd and elevation of Fe supply, the uptake and translocation of iron started within hours, but the running of recovery processes are strongly affected by the light periods.

Increase in chloroplast Fe content correlated strongly with the process of recovery. During long-term treatment, re-distribution of the cell Fe content into the chloroplasts leads to the increase in the activity and content of iron-containing enzymes/complexes (PSI, Fe superoxide dismutase). Similarly, increase in chloroplast Fe content preceeded regeneration of Cd stress symptoms under artificial regeneration by elevated Fe supply. Thus, the change of chloroplast Fe content, independently on the presence of Cd, is responsible for both the decline in physiological parameters (Cd-induced Fe-deficiency) and their recovery (Fe appears in chloroplasts). Therefore, the reorganisation of the iron content in the mesophyll and the increased translocation induced by elevated Fe/Cd ratio have a high impact on the autogenic and artificial recovery in Cd-stressed poplar, respectively.

Köszönetnyilvánítás

Prof. Dr. Szigeti Zoltán, DSc, tanszékvezető egyetemi tanárnak,
hogy lehetővé tette,

valamint témavezetőimnek,
Dr. Sárvári Éva, CSc, egyetemi docensnek,
és
Dr. habil. Tamás László, PhD, egyetemi docensnek,

továbbá
Dr. habil. Fodor Ferenc, PhD, egyetemi docens, pályázatvezetőnek,

hogy tanácsaikkal segítették munkám elkészítését az
ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén.

Köszönöm továbbá:

Dr. Mészáros Ilona, Dr. Lévai László, Dr. Nyitrai Péter, Dr. Gáspár László, Dr. Vági Pál, Dr. Cseh Edit, Prof. Dr. Láng Ferenc, Basa Brigitta, Tóth Brigitta, Szőllősi Erzsébet, Szabó Krisztina, Ross Krisztina,

valamint
Ostorics Zsuzsanna
Segítségét/közreműködését a munka elkészítésében.

A kutatásokat az **OTKA NN-74045** számú pályázata, valamint az **ERA Chemistry – OTKA NN-84307** számú pályázata támogatta.

Köszönöm továbbá a segítséget, támogatást családomnak, amivel megteremtették számomra a munkámhoz szükséges nyugodt, kiegyensúlyozott hátteret.

Referenciák

Abadía A, Lemoine Y, Trémolieres A, Ambard-Bretteville F, Rémy R (1989): Iron deficiency in pea: effects on pigment, lipid and pigment-protein complex composition of thylakoids. *Plant Physiol. Biochem. 27: 659-687.*

Abadía J, Vázquez S, Rellán-Álvarez R, El-Jendoubi H, Abadía, A, Álvarez-Fernández A, López-Millán A-F (2011): Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol. Biochem. 49: 471-482.*

Agati G, Matteini P, Goti A, Tattini M (2007): Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytol. 174: 77–89.*

Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008): Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J. Plant Biol. 51: 167-173.*

Alcántara E, Romera FJ, Cañete M, De la Guardia MD (1994): Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus L.*) plants. *J. Exp. Bot. 45: 1893-1898.*

Alfonso-Prieto M, Biarns X, Vidossich P, Rovira C (2009): The molecular mechanism of the catalase reaction. *J. Am. Chem. Soc. 131: 11751–11761.*

Allen JF, Forsberg J (2001): Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci. 6: 317-326.*

Allen MD, Kropat J, Tottey S, Del Campo JA, Merchant SS (2007): Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiol. 143: 263-277.*

Amunts A, Drory O, Nelson N (2007): The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3,4 Å resolution. *Nature 447: 58-63.*

Amunts A, Toporik H, Borovikova A, Nelson N (2010): Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem. 285: 3478–3486.*

Andaluz S, López-Millán A-F, De las Rivas J, Aro E-M, Abadía J, Abadía A (2006): Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res. 89: 141–155*.

Apel K, Hirt H (2004): Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.*

Arora A (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci. 82: 1227-1238.*

Asada K (1992): Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant. 85: 235-241*.

Asada K (1999): The water-water cycle in chloroplasts: Scavanging active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant. Phys. Plant Mol. Biol. 50: 601-639.*

Asada K (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol. 141: 391–396*.

Atkinson A, Guerinot ML (2011): Metal transport. *In: Murphy AS, Schulz B, Peer W (eds.): The plant plasma membrane. Plant Cell Monographs 19: 303-330.*

Baker NR (2008): Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol. 59: 89–113.*

Balk J, Lobréaux S (2005): Biogenesis of iron–sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci. 10: 324-331*.

Barceló J, Poschenrieder C (1990): Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr. 13: 1-37*.

Bartosz G (1997): Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant. 19: 47-64.*

Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, Nagasaka S, Fujimoto M, Takanashi H, Tsutsumi N, An G, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011): The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nature Comm. 2:322 DOI: 10.1038/ncomms1326*

Belkhodja R, Morales F, Quílez R, López-Millán AF, Abadía A, Abadía J (1998): Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res. 56: 265–276.*

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005): Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol. 17: 21-34*.

Beniloch M, Moreno I, Rodriguez-Navarro A (1989): Two modes of rubidium uptake in sunflower plants, *Plant Physiol. 90: 939-942*.

Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N (2003): Crystal structure of plant photosystem I. *Nature 426: 630-635.*

Benz JP, Lintala M, Soll J, Mulo P, Bölter B (2010): A new concept for ferredoxin–NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends Plant Sci. 15: 608-613*.

Bernardi B, Nali C, Ginestri P, Pugliesi C, Lorenzini G, Durante M (2004): Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biol. Plant. 48: 41-48.*

Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens J-P, Bouchard C, Gueugniaud P-Y, Petit P, Delafosse B (2000): Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive Car. Med. 26: 800-803.*

Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou J-P, Pugin A, Wendehenne D (2009): Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Phys. 149: 1302–1315*.

Beyersmann D, Hechtenberg S (1997): Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells, *Toxicol. Appl. Pharm. 144: 247–261.*

Bieza K, Louis R (2001): An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol. 126: 1105-1115.*

Boulila-Zoghlami L, Djebali W, Chaïbi W, Ghorbel MH (2006): Physiological and structural modifications induced by cadmium-calcium interaction in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Compt. Rend. Biol. 329: 702-711*.

Böddi B, Loudèche R, Franck F (2005): Delayed chlorophyll accumulation and pigment photodestruction in the epicotyls of dark-grown pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant. 25: 365-372.*

Böttcher B, Gräber P (2008): The structure of the H^+-ATP synthase of chloroplasts. *In: Fromme P (ed.): Photosynthetic protein complexes: a structural approach. Wiley-VCH, pp. 201-216.*

Briat J-F, Curie C, Gaymard F (2007): Iron utilization and metabolism in plants, *Curr. Op. Plant Biol. 10: 276–282.*

Briat J-F, Duc C, Ravet K, Gaymard F (2010a): Ferritins and iron storage in plants. *Biochim. Biophys. Acta 1800: 806–814.*

Briat J-F, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F (2010b): New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann. Bot. 105: 811-822.*

Brudvig GW (2008): Water oxidation chemistry of photosystem II. *Phil. Trans. R. Soc. B 363: 1211-1219.*

Bughio N, Takahash M, Yoshimur E, Nishizawa N-K, Mori S (1997): Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts. *Plant Cell Physiol. 38: 101-105.*

Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009): Copper homeostasis, *New Phytol. 182: 799–816.*

Butler WL (1978): Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. 29: 345–78.*

Calliatte R, Lapeyre B, Briat J-F Mari S, Curie C (2009): The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem. J. 422: 217-228.*

Carillo N, Ceccarelli EA (2003): Open questions in ferredoxin-NADP(+) reductase catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem. 270: 1900–1915.*

Castagna A, Donnini S, Ranieri A (2009): Adaptation to iron-deficiency requires remodelling of plant metabolism: An insight in chloroplast biochemistry and functionality. *In: Ashraf M, Ozturk M, Athar H-u-R (eds.): Salinity and Water Stress, Springer Verlag, pp. 205-212.*

Cerovic ZG, Morales F, Moya I (1994): Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of leaves, mesophyll and chloroplasts of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochim. Biophys. Acta 1188: 58-68.*

Cerovic ZG, Ounis A, Cartelat A, Latouche G, Goulas Y, Meyer S, Moya I (2002): The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell Environ. 25: 1663-1676.*

Chao Y-Y, Hong C-Y, Kao CH (2010): The decline in ascorbic acid content is associated with cadmium toxicity of rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem. 48: 374-381.*

Chen RF, Shen RF, Gu P, Dong XY, Du CW, Ma JF (2006): Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. *Ann. Bot. 98: 389-395*.

Chow WS, Lee HY, He J, Hendrickson L, Hong YM, Matsubara S (2005): Photoinactivation of photosystem II in leaves. *Photosynth. Res. 84: 35-41.*

Cigler C, Olejnickova J, Hruby M, Csefalvay L, Peterka J, Kuzel S (2010): Interactions between iron and titanium metabolism in spinach: A chlorophyll fluorescence study in hydropony. *J. Plant Physiol. 167: 1592-1597.*

Clark RB (1996): Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species, *J. Plant Nutr. 19: 643 – 656.*

Clemens S, Palmgren MG, Krämer U (2002): A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci. 7: 309-315*.

Clemens S (2006): Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie 88: 1707–1719.*

Cobbett CS (2000): Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol. 123: 825-832*.

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat J-F, Walker EL (2001): Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature 409: 346-349.*

da Cunha KPV, do Nascimento CWA, de Mendonça-Pimentel RM, Ferreira CP (2008): Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a cadmium contaminated soil with and without liming. *J. Hazard. Material. 160: 228-234*.

Das P, Samantaray S, Rout GR (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environ. Poll. 98: 29-36.*

di Donato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Bosler Eisley R, Walker EL (2004): *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J. 39: 403-414*.

Dietz K-J (2003): Plant peroxiredoxins. *Annu. Rev. Plant Biol. 54: 93–107*.

Douchkov D, Gryczka C, Stephan UW, Hell R, Bäumlein H (2005): Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco, *Plant Cell Environ. 28: 365–374*.

Dube BK, Tewari K, Chatterjee J, Chatterjee C (2003): Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus, *Chemosphere 53: 1147–1153.*

Dučic T, Polle A (2005): Transport and detoxification of manganese and copper in plants, *Braz. J. Plant Physiol*. 17: 103-112.

Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE (2007): The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation, *Plant Physiol*. *144: 197-205*.

Duy D, Stübe R, Wanner G, Philippar K (2011): The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. *Plant Physiol. 155: 1709-1722.*

Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wirén N, Soll J, Philippar K (2007): PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell 19: 986–1006.*

Edreva A (2005): Generation and scavenging of reactive oxigen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agricult. Ecosyst. Environ. 106: 119-133.*

Elzam OE, Hodges TK (1967): Calcium inhibition of potassium absorption in corn roots, *Plant Physiol. 42: 1483-1488.*

Fagioni M, D'Amici GM, Timperio AM, Zolla L (2009): Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J. Prot. Res. 8: 310–326.*

Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszkay A (2005): Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site. *Biochim. Biophys. Acta 1706: 158– 164.*

Fodor F (2002): Physiological responses of vascular plants to heavy metals. *In: Prasad MNV, Strzalka K (eds.): Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 149-177*.

Fodor F, Gáspár L, Morales F, Gogorcena Y, Lucena JJ, Cseh E, Kröpfl K, Abadía J, Sárvári É (2005): The effect of two different iron sources on iron and cadmium allocation in cadmium exposed poplar plants (*Populus alba L.*). *Tree Physiol. 25: 1173-1180*.

Foyer CH, Shigeoka S (2011): Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Phys. 155: 93–100.*

Fromme P, Jordan P, Krauss N (2001): Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta 1507: 5-31*.

García MJ, Suárez V, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R (2011): A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant Phys. Biochem. 49: 537-544.*

Gáspár L, Sárvári É, Morales F, Szigeti Z (2006): Presence of 'PSI free' LHCI and monomeric LHCII and subsequent effects on fluorescence characteristics in lincomycin treated maize. *Planta 223: 1047–1057.*

Ghandilyan A, Vreugdenhil D, Aarts MGM (2006): Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition, *Physiol. Plant. 126: 407–417*.

Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ (2007): *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol 65: 627-644.*

Gluhić D, Petek M, Peršurić D, Sljunski S (2008): Relationship between plant and soil potassium on calcareous vineyard soils. *Cer. Res. Comm. 36: 451-454.*

Götz M, Albert A, Stich S, Heller W, Scherb H, Krinsh A, Langebartels C, Seidlitz HK, Ernst D (2010): PAR modulation of the UV-dependent levels of flavonoid metabolites in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. leaf rosettes: cumulative effects after a whole vegetative growth period. *Protoplasma 243: 95–103.*

Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005): Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol. 32: 481-494.*

Groth G, Pohl E (2001): The structure of the chloroplast F_1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J. Biol. Chem. 276: 1345–1352*.

Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W (2009): Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Struct. Mol. Biol. 16: 334-342*.

Halliwell B (1978): Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta 140: 81-88.*

Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S, Ahmad A (2009): Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *J. Environ. Biol. 30: 165-174*.

Haydon MJ, Cobbett CS (2007): Transporters of ligands for essential metal ions in plants, *New Phytol. 174: 499–506*.

Heath R, Packer L (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys. 125: 180-198.*

Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH (2004): Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell 16: 241–256*.

Hell R, Stephan UW (2003): Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta 216: 541-551*.

Hendrickson L, Förster B, Pogson BJ, Chow WS (2005): A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of Photosystem II. *Photosynth. Res. 84: 43–49.*

Herbette S, Taconnet L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette M-L-M, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou J-P, Vavasseur A, Leonhardt N (2006): Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie 88: 1751–1765.*

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001): A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol. 42: 462-468*.

Hodoshima H, Enomoto Y, Shoji K, Shimada H, Goto F, Yoshihara T (2007): Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley. *Physiol. Plant. 129: 622–634*.

Holden MJ, Luster DG, Chaney RL, Buckhout TJ, Robinson C (1991): Fe^{3+}-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. (Comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots). *Plant Phys. 97: 537-544.*

Horváth G, Droppa M, Oravecz Á, Raskin VI, Marder JB (1996): Formation of the photosynthetic apparatus during greening. *Planta 199: 238-243*.

Husted S, Laursen KH, Hebbern CA, Schmidt SB, Pedas P, Haldrup A, Jensen PE (2009): Manganese deficiency leads to genotype-specific changes in fluorescence induction kinetics and state transitions. *Plant Physiol. 150: 825–833.*

Janik E, Maksymiec W, Mazur R, Garstka M, Gruszecki WI (2010): Structural and functional modifications of the major light-harvesting complex II in cadmium or copper-treated *Secale cereale*. *Plant Cell Physiol. 51: 1330–1340*.

Jensen PE, Haldrup A, Rosgaard L, Scheller (1993): Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function. *Physiol. Plant. 119: 313–321*.

Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML (2008): Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 10619–10624*.

Jeong J, Connolly EL (2009): Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Sci. 176: 709–714*.

Jin C, You G, He Y, Tang C, Wu P, Zheng S (2007): Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiol. 144: 278-285.*

Joliot P, Joliot A (2006): Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim. Biophys. A. 1757: 362–368*.

Jones DK, Dalton DA, Rosell FI, Raven EL (1998): Class I heme peroxidases: Characterization of soybean ascorbate peroxidase. *Archiv. Biochem. Biophys. 360: 173-178.*

Junge W (2004): Protons, proteins and ATP. *Photosynth. Res. 80: 197–221*.

Junge W, Sielaff H, Engelbrecht S (2009): Torque generation and elastic power transmission in the rotary F_0F_1-ATPase. *Nature 459: 364-370*.

Kanter U, Hauser A, Michalke B, Draxl S, Schaffner AR (2010): Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects. *J. Exp. Bot. 61: 3995-4009*.

Karapetyan NV, Schlodder E, van Grondelle R, Dekker JP (2006): The long wavelength chlorophylls of photosystem I. *Adv. Photosynth. REspir. 24: 177-192.*

Kautsky H, Hirsch A (1931): Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwiss. 19: 964-964.*

Keilig K, Ludwig-Müller J (2009): Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Bot. Stud. 50: 311-318.*

Keyer K, Imlay JA (1996): Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *PNAS 93: 13635–13640*.

Kim SA, Guerinot ML (2007): Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett. 581: 2273–2280.*

Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML (2006): Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science 314: 1295-1298*.

Kirchsteiger K, Pulido P, González M, Cejudo FJ (2009): NADPH thioredoxin reductase C controls the redox status of chloroplast 2-Cys peroxiredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant 2: 298–307*.

Kirkham MB (2006): Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma 137: 19–32*.

Kiss AZ, Ruban AV, Horton P (2008): The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *J. Biol. Chem. 283: 3972-3978.*

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998): Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol. 118: 637-650.*

Kornyeyev D, Logan BA, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2001): Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiol. Plant 113: 323–331*.

Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999): The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range, *Plant Mol. Biol. 40: 37–44*.

Kothinti RK, Blodgett AB, Petering DH, Tabatabai NM (2010): Cadmium down-regulation of kidney Sp1 binding to mouse SGLT1 and SGLT2 gene promoters: Possible reaction of cadmium with the zinc finger domain of Sp1, *Toxicol. Appl. Pharmacol. 244: 254–262*.

Kováčik J, Bačkor M (2007): Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. *Water Air Soil Pollut. 185: 185-193*.

Krämer U, Talke IN, Hanikenne M (2007): Transition metal transport. *FEBS Lett. 581: 2263-2272*.

Krupa Z, Baranowska M, and Orzoł D (1996): Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? *Acta Physiol. Plant. 18: 147-151*.

Krupa Z, Baszyński T (1995): Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus - direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiologiae Plantarum 17: 177-190*.

Kurisu G, Zhang HM, Smith JL, Cramer WA (2003): Structure of the cytochromeb6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science 302: 1009–1014*.

Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, Trtílek M, Šetlík I (2007): Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol. 175: 655-674*.

La Porta N, Bertamini M, Nedunchezhian N, Muthuchelian K (2004): High irradiance induced changes of photosystem 2 in young and mature needles of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Photosynthetica 42: 263-271.*

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227: 680-685*.

Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel MM (2005): A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature 435: 42*.

Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Barbier-Brygo H, Thomine S (2005): Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J. 24: 4041-4051*.

Latowski D, Kruk J, Strzałka K (2005): Inhibition of zeaxanthin epoxidase activity by cadmium ions in higher plants. *J. Inorg. Biochem. 99: 2081-2087.*

Lee HY, Hong YN, Chow WS (2001): Photoinactivation of photosystem II complexes and photoprotection by non-functional neighbours in *Capsicum annuum* L. leaves. *Planta 212: 332-342.*

Lichtenthaler HK, Babani F (2000): Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem. 38: 889-895.*

Lichtenthaler HK, Babani F, Langsdorf G (2007): Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity in sun and shade leaves of trees. *Photosynth. Res. 93: 235–244.*

Loewen PC, Klotz MG, Hassett DJ (2000): Catalase - an 'old' enzyme that continues to surprise us. *ASM News 66: 76-82.*

Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J (2005): Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature 438: 1040-1044*.

Ma JF, Hiradate S (2000): Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheet (*Fagopyrum esculentum* Moench), *Planta 211: 355-360.*

Ma JF, Ueno D, Zhao F-J, McGrath SP (2005): Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta 220: 731-736.*

Mantha SV, Johnson GA, Day TA (2000): Evidence from action and fluorescence spectra that UV-induced violet–blue–green fluorescence enhances leaf photosynthesis. *Photochem. Photobiol. 73: 249-256.*

Marron N, Maury S, Rinaldi C, Brignolas F (2006): Impact of drought and leaf development stage of enzymatic antioxidant system of two *Populus deltoides* x *nigra* clones. *Ann. Forest Sci. 63: 323-327.*

Marschner H (1995): Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press, London*.

Martinez-Domínguez D, Córdoba-García F,Canalejo-Raya A, Torronteras-Santiago R (2010): Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in Spartina densiflora. *Physiol. Plant. 139: 289–302*.

Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Matthuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001): Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol. 126: 1646-1667*.

McCarthy I, Romero-Puertas MC, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LM (2001): Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell Environ*. 24: 1065–1073.

McMaster J, Oganesyan VS (2010): Magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the structures of the metal sites in metalloproteins. *Curr. Opin. Struct. Biol. 20: 615–622.*

Meda AR, Scheuermann EB, Prechsl UE, Erenoglu B, Schaaf G, Hayen H, Weber G, von Wirén N (2006): Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. *Plant Physiol. 143: 1761–1773*.

Mendoza-Cózatl DG, Butko E, Springer F, Torpey JW, Komives EA, Kehr J, Schroeder JI (2008): Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J. 54: 24*.

Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R (2005): Cd^{2+} transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Acta 1706: 88-97*.

Merchant S (2006): Trace metal utilization in chloroplasts. *In: Wise RR and Hoober KJ (eds.): The structure and function of plastids, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 199-218.*

Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P (1996): Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation. *Planta 198: 385-396.*

Meyer A, Cartelat A, Moya I, Cerovic ZG (2003): UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Exp. Bot. 54: 757-769.*

Mikami Y, Saito A, Miwa E, Higuchi K (2011): Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiol. Biochem. 49: 513-519.*

Mishliwa-Kurdziel B, Strzalka K (2002): Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. *In: Prasad MNV, Strzalka K (eds.): Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 201-227.*

Mitchell P. (1961): Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogene transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature 191: 144-148.*

Mittler R (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci. 7: 405-410.*

Morales F, Abadía A, Abadía J (1998): Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron-deficient sugar beet leaves. *Austral. J. Plant Physiol. 25: 403–412.*

Morales F, Cerovic ZG, Moya I (1996): Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta 1273: 251-262.*

Morales F, Cerovic, ZG, Moya I (1994): Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol. 106: 127-133.*

Morrissey J, Guerinot ML (2009): Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev. 109: 4553–4567*.

Moseley JL, Allinger T, Herzog S, Hoerth P, Wehinger E, Merchant S, Hippler M (2002): Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *EMBO J. 21: 6709-6720*.

Munekage Y, Shikanai T (2005): Cyclic electron transport through photosystem I. *Plant Biotechnol. 22: 361–369.*

Mukhopadhyay MJ, Sharma A (1991): Manganese in cell metabolism of higher plants. *Bot. Rev. 57: 117-149.*

Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K-I, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004): Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature 429: 579-582*.

Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2006): Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta 1767: 414-421*.

Müller-Moulé M, Conklin PL, Niyogi KK (2002): Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Phys. 128: 970-977.*

Myśliwa-Kurdziel B, Prasad MNV, Strzalka K (2002): Heavy metal influence on the light phase of photosynthesis. *In: Prasad MNV, Strzalka K (eds.): Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 229-255*.

Nakano Y, Asada K (1981): Hydrogen peroxid is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Phys. 22: 867-880.*

Nelson N, Ben-Shem A (2004): The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5: 971-982.*

Nelson N, Yocum CF (2006): Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol. 57: 521-565*.

Nikolić M, Römheld V (2007): The dynamics of iron in the leaf apoplast Significance for the iron nutrition of plants. *In: Sattelmacher B, Horst WJ (eds.): The apoplast of higher plants: Compartment of storage, transport and reactions (The significance of the*

apoplast for the mineral nutrition of higher plants), Springer Verlag, Section 5, pp. 353-371.

Niyogi KK. (2000): Safety valves for photosynthesis. *Curr. Op. Plant Biol. 3: 455-460.*

Ogo Y, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, Kobayashi T, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK (2007): The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *Plant J. 51: 366-377.*

Okamoto OK, Pinto E, Latrorre LR, Bechara EJH, Colepicolo P (2001): Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplast. *Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40: 18-24.*

Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E (2003): Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J. Exp. Bot. 54: 291-301.*

Öquist G, Chow WS, Anderson JM (1992): Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta 186: 450-460.*

Österås AH, Greger M (2006): Interactions between calcium and copper or cadmium in norway spruce. *Biol. Plant. 50: 647-652.*

Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK (1990): Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica 24: 399-405.*

Pagliano C, Raviolo M, Dalla Vecchia F, Gabbrielli R, Gonnelli C, Rascio N, Barbato R, La Rocca N (2006): Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa L.*). *J. Photochem. Photobiol. 84: 70-78.*

Papadakis IE, Giannokoula A, antonopoulou CP, Moustakas M, Avramaki E, Therios IN (2007): Photosystem 2 activity of *Citrus volkameriana* (L.) leaves as affected by Mn nutrition and irradiance. *Photosynthetica 45: 208-213.*

Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixera F, Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet l, Dunand C (2007): PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochem. 68: 1605-1611.*

Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002): Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J. 32: 539-548.*

Perron NR, Brumaghim JL (2009): A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys. 53:75–100*.

Pfannschmidt T (2003): Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci. 8: 33-41*.

Pich A, Scholz G (1996): Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants *(Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J. Exp. Bot. 47: 41-47.*

Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massacci A (2003): Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol. 133: 829-837.*

Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F (2009): Essential transition metal homeostasis in plants, *Curr. Op. Plant Biol. 12: 347–357*.

Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta. 1807: 989–998.*

Porra RJ, Thompson WA, Kriedman PE (1989): Determination of accurate excitation coefficient and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys.* Acta 975: 384-394.

Pospíšil P (2011): Enzymatic function of cytochrome b_{559} in photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 104: 341–347.*

Pospišil P, Skotnica J, Nauš J (1998): Low and high temperature dependence of minimum F_0 and maximum F_m chlorophyll fluorescence in vivo. *Biochim. Biophys. Acta 1363: 95–99.*

Prasad MNV (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot. 35: 525-545*.

Puig P, Peñarrubia L (2009): Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol. 12: 299–306*.

Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti MS, Tigier H, Valpuesta V (2000): A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Phys. 122: 1119-1127.*

Ramirez L, SimontacchiM, Murgia I, Zabaleta E, Lamattina L (2011): Nitric oxide, nitrosyl ironcomplexes, ferritin and frataxin: A well equipped team to preserve plant iron homeostasis. *Plant Sci. doi:10.1016/j.plantsci.2011.04.006*

Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Gárate A (2002): Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-/Mn interaction. *Plant Sci. 162: 761-76.*

Ranieri A, Castagna A, Baldan B, Soldatini GF (2001): Iron deficiency affects peroxidase isoforms in sunflover. *J. Exp. Bot. 52: 25-35.*

Raven JA, Evans MCE, Korb RE (1999): The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O_2-evolving organisms. *Photosynth. Res. 60, 111-149.*

Rellán-Álvarez R, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2008): Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectr. 22: 1553–1562.*

Rellán-Álvarez R, Andaluz S, Rodríguez-Celma J, Wohlgemuth G, Zocchi G, Álvarez-Fernández A, Fiehn O, López-Millán A, Abadía J (2010): Changes in the proteomic and metabolic profiles of Beta vulgaris root tips in response to iron deficiency and resupply. *BMC Plant Biol. 10: 120.*

Richter ML, Samra HS, Feng He, Giessel AJ, Kuczera KK (2005): Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr. 37: 467-473.*

Rochaix J-D (2011): Assembly of the photosynthetic apparatus. *Plant Phys. 155: 1493-1500.*

Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, del Río LA, Sandalio LM (2009): Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol. 150: 229-243.*

Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML (2000): Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12356–1236.*

Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Río MA, Sandalio LM (2004): Cadmium-induced subcellular accumulation of $O^{2\cdot-}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ. 27: 1122–1134.*

Roshal AD, Grigorovich AV, Doroshenko AO, Pivovarenko VG, Demchenko AP (1999): Flavonols as metal-ion chelators: complex formation with Mg^{2+} and Ba^{2+} cations in the excited state. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 127: 89–100.*

Römheld V, Marschner H (1986): Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol. 80: 175-180.*

Ruban AV, Pascal AA, Bruno Robert B, Horton P (2001): Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem. 277: 7785-7789.*

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Río LA (2001): Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot. 52: 2115-2126*

Sanità di Toppi L, Gabbrielli R (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot. 41: 105–130.*

Sárvári É, Nyitrai P (1994): Separation of chlorophyll-protein complexes by Deriphat polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis 15: 384-394.*

Sárvári É, Gáspár L, Solti Á, Mészáros I, Záray Gy, Fodor F (2010): Cd-Fe interactions: Comparison of the effects of iron deficiency and cadmium on growth and photosynthetic performance in poplar. *Acta Biol. Hun. 61(Suppl.): 136-148.*

Sárvári É, Solti Á, Basa B, Mészáros I, Lévai L, Fodor F (2011): Impact of moderate Fe excess under Cd stress on the photosynthetic performance of poplar (*Populus jaquemontiana var. glauca* cv. Kopeczkii). *Plant Physiol. Biochem. 49: 499-505.*

Sato K, Kohzuma T, Dennison C (2003): Active site structure and electron-transfer reactivity of plastocyanins. *J. Am. Chem. Soc. 2101-2112.*

Schaaf G, Schikora A, Häberle J, Vert G, Ludewig U, Briat J-F, Curie C, von Wirén N (2005): A putative function for the *Arabidopsis* Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol. 46: 762-774.*

Scheller HV, Haldrup A (2005): Photoinhibition of photosystem I. *Planta 221: 5–8.*

Scheller HV, Jensen PJ, Haldrup A, Lunde C, Knoetzel J (2001): Role of subunits in eukaryotic photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta 1507: 41-60.*

Scholz G, Becker R, Pich A, Stephan UW (1992): Nicotianamine – a common constituent of strategies I and II of iron acquisition in plants. *J. Plant Nutr. 15: 1649-1665*.

Schöttler MA, Albus CA, Bock R (2011): Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants. *J. Plant Physiol. 168: 1452– 1461*.

Selye H (1973): The evolution of the stress concept. *Am. Sci. 61: 692-699.*

Senior AE, Nadanaciva S, Weber J (2002): The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta 1553: 188-211*.

Seregin IV, Kozhevnikova AD (2004): Strontium transport, distribution, and toxic effects on maize seedling growth, *Russ. J. Plant Physiol. 51: 215–221*.

Seregin IV, Kozhevnikova AD (2006): Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol. 53: 257-277*.

Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005): Chromium toxicity in plants. *Environ. Internat. 31: 739– 753*.

Shariati M, Yahyaabadi S (2006): The effects of different concentrations of cadmium on the growth rate and beta-carotene synthesis in unicellular green algae *Dunaliella salina*. *Iran. J. Sci. Technol. Transact. A 30: 57-63.*

Shi R, Bäßler R, Zou C, Römheld V (2011): Is iron phloem mobile during senescence in trees? A reinvestigation of Rissmüller's finding of 1874. *Plant Physiol. Biochem. 49: 489-493.*

Shikanai T (2007): Cyclic electron transport around photosystem I: Genetic approaches. *Ann. Rev. Plant Biol. 58: 199-217*.

Shtangeeva I, Ayrault S, Jain J (2004): Scandium bioaccumulation and its effect on uptake of macro- and trace elements during initial phases of plant growth. *Soil Sci. Plant Nutr*. 50: 877-883.

Siedlecka A, Krupa Z (2002): Function of enzymes in heavy metal treated plants. *In: Prasad MNV, Strzałka K (eds.): Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 303-324.*

Siedlecka A, Krupa Z (1996a): Interaction between cadmium and iron. Accumulation and distribution of metals and changes in growth parameters of *Phaseolus vulgaris L.* seedlings. *Acta Soc. Bot. Polon*. 65: 277-282.

Siedlecka A, Krupa Z (1996b): Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem. 34: 833-841*.

Siedlecka A, Krupa Z (1999): Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthethic apparatus. *Photosynthetica 36: 321-331*.

Siedlecka A, Krupa Z, Samuelsson G, Öquist G, Gardeström P (1997): Primary metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. *Plant Physiol. Biochem. 35: 951-957.*

Sigfridsson KGV, Bernát G, Mamedov F, Styring S (2004): Molecular interference of Cd^{2+} with photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta 1659: 19–31*.

Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J (2005): Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem. 43: 437–444.*

Smeets K, Ruytinx J, Semane B, van Belleghem F, Remans T, van Saden S, Vangroensveld J, Cuypers A (2008): Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ. Exp. Bot. 63: 1–8.*

Solti Á (2008): A Cd okozta fotoszintézisgátlás kivéséde a vasellátás növelésével. *Szakdolgozat, ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék.*

Solti Á, Szűcs J, Basa B, Sárvári É (2009): Functional and organisational change of photosystem II in poplar thylakoids under Cd stress. *Cereal Res. Commun. 37(Suppl. 4): 525-528*.

Spiller SC, Castelfranco AM, Castelfranco PA (1982): Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. I. *In vivo* observations on iron and oxygen-deficient plants. *Plant Physiol. 69: 107-111*.

Standfuss J, Terwisscha van Scheltinga AC, Lamborghini M, Kuhlbrandt W (2005): Mechanism of photoprotection and nonphotochemical quencing in pea light-harvesting komplex at 2,5 Å resolution. *EMBO J. 24: 919-928*.

Stroebel D, Choquet Y, Popot J-L, Picot D (2003): An atypical haem in the cytochrome b_6f complex. *Nature 426: 413–418*.

Sugihara N, Ohnishi M, Imamura M, Furuno K (2001): Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidations in cultured hepatocytes. *J. Health Sci. 47: 99–106*.

Szigeti Z (2008): Physiological status of cultivated plants characterised by multi-wavelength fluorescence imaging. *Acta Agron. Hun. 56: 223–234.*

Takahashi S, Badger MR (2010): Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci. 16: 53-60.*

Takahashi S, Murata N (2008): How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci. 13: 178-182*.

Tanaka R, Tanaka A (2007): Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol. 58: 321-346.*

Terry N, Abadia J (1986): Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr. 9: 609-646*.

Terry N, Low G (1982): Leaf chlorophyll content and its relation to the intracellular localization of iron. *J. Plant Nutr. 5: 301-310*.

Thiele A, Schirwitz K, Winter K, Krause GH (1996): Increased xanthophyll cycle activity and reduced Dl protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Sci. 115: 237-250*.

Thomine S, Lanquar V (2011): Iron transport and signalling in plants. *In: Geiler M, Venema K (eds.): Transporters and pumps in plant signalling. Signalling and communication in plants 7, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 99-131*.

Tiffin LO (1966): Iron translocation. II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physiol. 41: 515-518*.

Timperio AM, D'Amici GM, Barta C, Loreto F, Zolla L (2007): Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J. Exp. Bot. 58: 3695-3710.*

Tóth VR, Mészáros I, Veres Sz, Nagy J (2002): Effects of the available nitrogen on the photosynthetic activity and xanthophyll cycle pool of maize in field. *J. Plant Physiol. 159: 627-634.*

Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005): Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr. Med. Chem. 12: 1161-1208*.

van Assche F, Clijsters H (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206.

Vazzola V, Losa A, Soave C, Murgia I (2007): Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in *Arabidopsis*. *FEBS Lett. 581: 667-672*.

Vázquez S, Fernández-Pascual M, Sánchez-Pardo B, Carpena RO, Zornoza P (2007): Subcellular compartmentalisation of cadmium in white lupins determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. *J. Plant Physiol. 164: 1235-1238*.

Verbost PM, Flik G, Pang PKT, Lock RAC, Wendelaar-Bonga SE (1989): Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem. 264: 5613-5615*.

Vert GA, Briat J-F, Curie C (2003): Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol. 132: 796–804.*

Vigani G (2012): Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *J. Plant Physiol. 169: 1– 11*.

Vollenweider P, Cosio C, Günthardt-Goerg MS, Keller C (2006): Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) Part II: Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Env. Exp. Bot. 58: 25–40.*

Walker DA (1965): Correlation between photosynthetic activity and membrane integrity in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol. 40: 1157-1161*.

Weber AP, Schwacke R, Flugge UI (2005): Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu. Rev. Plant Biol. 56: 133–164*.

Weber APM, Fischer K (2007): Making the connections – The crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Let. 581: 2215–2222*.

Webster EA, Webster GM (1996): Cadmium replaces calcium in the cell wall of *Ulva lactuca*. *BioMetals 9: 241-244.*

Weil M, Schaub H (1999): Influence of exhaust gas and ozone on extracellular peroxidase activity of *Helianthus annuus* L. leaves. *J. Plant Physiol. 154: 523-528*.

White PJ (2001): The pathways of calcium movement to the xylem. *J. Exp. Bot. 52: 891-899*.

Williams LE, Mills RF (2005): P_{1B}-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci. 10: 491-502*.

Wilson KE, Ivanov AG, Öquist G, Grodzinski B, Sarhan F, Huner NPA (2006): Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress. *Canad. J. Bot. 84: 1355-1370.*

Winterbourne CC (1995): Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction. *Toxicol. Lett. 82/83: 969-974.*

Wu F, YangW, Zhang J, Zhou L (2010): Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil. *J. Hazard. Mat. 177, 268–273.*

Wu H, Lihua L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling HQ (2005): Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol. 46: 1505-1514.*

Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C (2010): Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archiv. Biochem. Biophys. 497: 13-20.*

Yamaguchi H, Fukuoka H, Arao T, Ohyama A, Nunome T, Miyatake K, Negoro S (2010): Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. *J. Exp. Bot. 61: 423–437*.

Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K (1997): Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth. Res. 52: 57–64.*

Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ (2005): Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. J. *Trace Elem. Med. Biol. 18: 339–353*.

Yano J, Kern J, Sauer K, Latimer MJ, Pushkar Y, Biesiadka J, Lol B, Saenge W, Messinger J, Zouni A, Yachandra VK (2006): Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn_4Ca cluster. *Science 314: 821-825.*

Ye H, Pilon M, Pilon-Smits EAH (2006): CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. *New Phytol. 171: 285–292*.

Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, Shoji K, Shimada H, Goto F (2006): Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Rep. 25: 365–373*.

Yruela I (2005): Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol. 17: 145–146*.

Zhang F, Zhang H, Wang G, Xu L, Shen Z (2009): Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *J. Hazard. Material. 168: 76-84.*

Zhang Y, Ding S, Lu Q, Yang Z, Wen X, Zhang L, Lu C (2011): Characterization of photosystem II in transgenic tobacco plants with decreased iron superoxide dismutase. *Biochim. Biophys Acta 1807: 391–403.*

Zoghlami LB, Djebali W, Abbes Z, Hediji H, Maucourt M, Moing A, Brouquisse R, Chaïbi W (2011): Metabolite modifications in *Solanum lycopersicum* roots and leaves under cadmium stress. *African J. Biotechnol. 10: 567-579.*

Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P (2001): Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution. *Nature 409: 739-743.*

Appendix

A. A kísérletek értékeléséhez felhasznált eredmények

A/1. táblázat: Rövid (7 napos) és hosszabb (21 napos) Cd-stressz hatása az eredményekben értékelt paraméterekre. ***: P<0,001, **: P<0,05, *: P<0,1, ns.: nem szignifikáns különbség. A nyilak a 7 napos növények adataihoz képest történt elmozdulás irányát mutatják.

	7. nap			21. nap			
	Ko	Cad		Ko		Cad	
levél Cd-tartalom ($\mu g\ g^{-1}$ sz.t.)	2,4 ±0,8	268,0 ±14,8	***	1,6 ±0,4	↓	373,0 ±28,3	*** ↑
levél Fe-tartalom ($\mu g\ g^{-1}$ sz.t.)	107,0 ±1,4	45,9 ±4,2	***	149,0 ±8,7	↑	43,8 ±0,2	*** –
kloroplasztisz Fe-tartalom (fmol Fe plasztisz^{-1})	0,67 ±0,04	0,41 ±0,04	***	1,13 ±0,04	↑	0,86 ±0,18	*** ↑
Chl *a*+*b* ($\mu g\ cm^{-2}$)	19,5 ±1,9	10,9 ±0,9	***	27,9 ±9,6	↑	11,0 ±0,1	*** –
Chl *a*/*b*	3,61 ±0,18	3,30 ±0,10	***	3,41 ±0,10	↓	3,56 ±0,10	ns. ↑
β-karotin (mmol mol^{-1} Chl)	61,05 ±3,47	52,21 ±3,83	**	36,72 ±7,74	↓	68,38 ±2,13	*** ↑
lutein (mmol mol^{-1} Chl)	165,37 ±22,73	174,45 ±24,38	ns.	100,04 ±15,83	↓	150,94 ±9,94	*** –
VAZ (mmol mol^{-1} Chl)	25,4 ±3,5	34,7 ±1,4	***	24,7 ±4,5	–	34,2 ±1,9	*** –
ΔDEEPS	0,315 ±0,093	0,394 ±0,015	*	0,108 ±0,093	↓	0,409 ±0,150	*** ↑
F_v/F_m	0,799 ±0,007	0,691 ±0,048	***	0,797 ±0,019	–	0,752 ±0,012	** ↑
Φ_{PSII}	0,713 ±0,012	0,526 ±0,069	***	0,694 ±0,090	–	0,591 ±0,041	*** ↑
$\Phi_{f,D}$	0,248 ±0,040	0,320 ±0,015	**	0,270 ±0,010	–	0,304 ±0,014	*** –
Φ_{NPQ}	0,039 ±0,002	0,027 ±0,008	**	0,030 ±0,004	–	0,056 ±0,017	*** ↑
Φ_{NF}	0,000 ±0,017	0,127 ±0,066	***	0,006 ±0,011	–	0,049 ±0,032	*** ↓

A/1. táblázat (folytatás):

	7. nap				21. nap			
	Ko	Cad			Ko		Cad		
F_{520}	844,0 ±123,6	1655,5 ±1,2	***		691,2 ±63,8	↓	3293,1 ±281,9	***	↑
fenoloid (mg^{-1} sz.t.)	-	-			7,7 ±2,4		13,9 ±3,5	***	
MDA (nM g^{-1} f.t.)	61,6 ±31,2	56,4 ±13,4	ns.		82,6 ±21,5	↑	121,4 ±38,4	*	↑
FeSOD (g^{-1} f.t.)	131,5 ±108,4	91,1 ±6,8	ns.		219,5 ±21,3	↑	68,4 ±7,2	***	↓
MnSOD (g^{-1} f.t.)	33,5 ±5,1	38,6 ±5,1	ns.		93,2 ±2,8	↑	114,6 ±8,3	**	↑
Cu/ZnSOD-II (g^{-1} f.t.)	2615,1 ±444,9	395,0 ±51,4	***		3056,9 ±65,1	↑	328,9 ±175,8	***	–
$POX_{Rf\ 0,375}$ (g^{-1} f.t.)	370,6 ±118,2	12,1 ±7,0	***		957,9 ±403,7	↑	642,5 ±185,0	ns.	↑
$POX_{Rf\ 0,613}$ (g^{-1} f.t.)	2361,8 ±897,9	2424,6 ±508,0	ns.		8362,8 ±1540,3	↑	9754,3 ±2932,4	ns.	↑
$POX_{Rf\ 0,632}$ (g^{-1} f.t.)	9457,8 ±138,7	8552,6 ±267,9	**		12557,9 ±3963,8	↑	20136,5 ±3170,4	***	↑
APX (pmol Asc µg $protein^{-1}$ min^{-1})	2,89 ±1,20	1,85 ±0,11	ns.		12,07 ±1,26	↑	16,48 ±0,58	***	↑
PSI (µg Chl cm^{-2})	3,67 ±0,031	0,97 ±0,18	***		4,49 ±0,38	↑	1,51 ±0,07	***	↑
PSII (µg Chl cm^{-2})	0,92 ±0,05	0,72 ±0,07	***		1,02 ±0,17	–	1,50 ±0,05	**	↑
LHCII (µg Chl cm^{-2})	5,31 ±0,52	2,73 ±0,06	***		7,16 ±0,41	↑	3,53 ±0,55	***	↑

A/2. táblázat: Autogén regeneráció alatt mért változások első megjelenése, időbelisége (a változások irányát nyilak jelölik).

	változás kezdete	változás iránya
levél Fe-tartalom	-	–
lutein	-	–
VAZ	-	–
$\Phi_{f,D}$	-	–
Cu/ZnSOD-II	-	–
levél Cd-tartalom	kezdettől folyamatos	↑
LHCII	kezdettől folyamatos	↑
kloroplasztisz Fe-tartalom	~7. nap	↑
APX	~7. nap	↑
Φ_{NPQ}	kezelés első hete	↑
MnSOD	kezelés első két hete	↑
$POX_{Rf\ 0,375}$	kezelés első két hete	↑
$POX_{Rf\ 0,613}$	kezelés első két hete	↑
$POX_{Rf\ 0,632}$	kezelés első két hete	↑
F_v/F_m	~10. nap	↑
Φ_{PSII}	~10. nap	↑
Φ_{NF}	~10. nap	↓
F_{520}	~10. nap	↑
Chl *a*/*b*	~14. nap	↑
β-karotin	~14. nap	↑
ΔDEEPS	~14. nap	↑
MDA	~15. nap	↓
Chl *a*+*b*	~17. nap	↑

	változás intervalluma	változás iránya
FeSOD	10.-15. nap	↑
	15.-20. nap	↓
	20.-30. nap	↑
PSI	14.-15. nap	↑
	15.-23. nap	↓
	23.-25. nap	↑
	25.-30. nap	↓
PSII	14.-15. nap	↑
	15.-23. nap	↓
	23.-30. nap	↑

A/3. táblázat: Megemelt vasellátás mellett regeneráltatott növényekben mért változások első megjelenése, időbelisége, fény- és sötétperiódus-függése (a változások irányát nyilak jelölik).

	változás kezdete	1. nap		2. nap		3. nap	
		fény	sötét	fény	sötét	fény	sötét
friss tömeg	6^h-10^h	↑	↑	↑	↑	↑	↑
száraz tömeg	6^h-10^h	↑	→	↑	→	↑	→
levélfelület	$>10^h$	→	↑	→	↑	→	→
levél Cd-tartalom	6^h-10^h	↓	↑	→	↑	→	↑
levél Fe-tartalom	$\sim 3^h$	↑	→	↑	→	↑	→
kloroplasztisz Fe-tartalom	6^h-10^h	↑	→	↑	→	↑	→
Chl *a*+*b*	kezdetben (↑) 6^h-10^h (↓)	↑↓	→	↑	→	↑	→
Chl *a*/*b*	6^h-10^h	↑	→	↑	→	↓	→
β-karotin	6^h-10^h	↑	→	↓	→	↓	↓
lutein	kezdetben	↓	→	↑	↓	↓	→
VAZ	nincs változás	→	→	→	→	→	→
ΔDEEPS	6^h-10^h	↑	→	↑	→	↓	→
Φ_{PSII}	kezdetben	↑	→	↑	→	→	→
$\Phi_{f,D}$	kezdetben	↓	→	↓	→	→	→
Φ_{NPQ}	6^h (↑) 10^h (↓)	↑↓	→	↓	→	→	→
Φ_{NF}	kezdetben	↓	→	↓	→	→	→
PSI	$\sim 24^h$	→	→	↑	→	↑	→
PSII	III. fényperiódus	→	→	(→)	→	↑	→
LHCII	II.-III. fényperiódus	→	→	(↑)	→	↑	→

B. Hosszú távú Cd-stressz hatása a fémionok transzlokációjára: kompetitív és nem-kompetitív kölcsönhatások

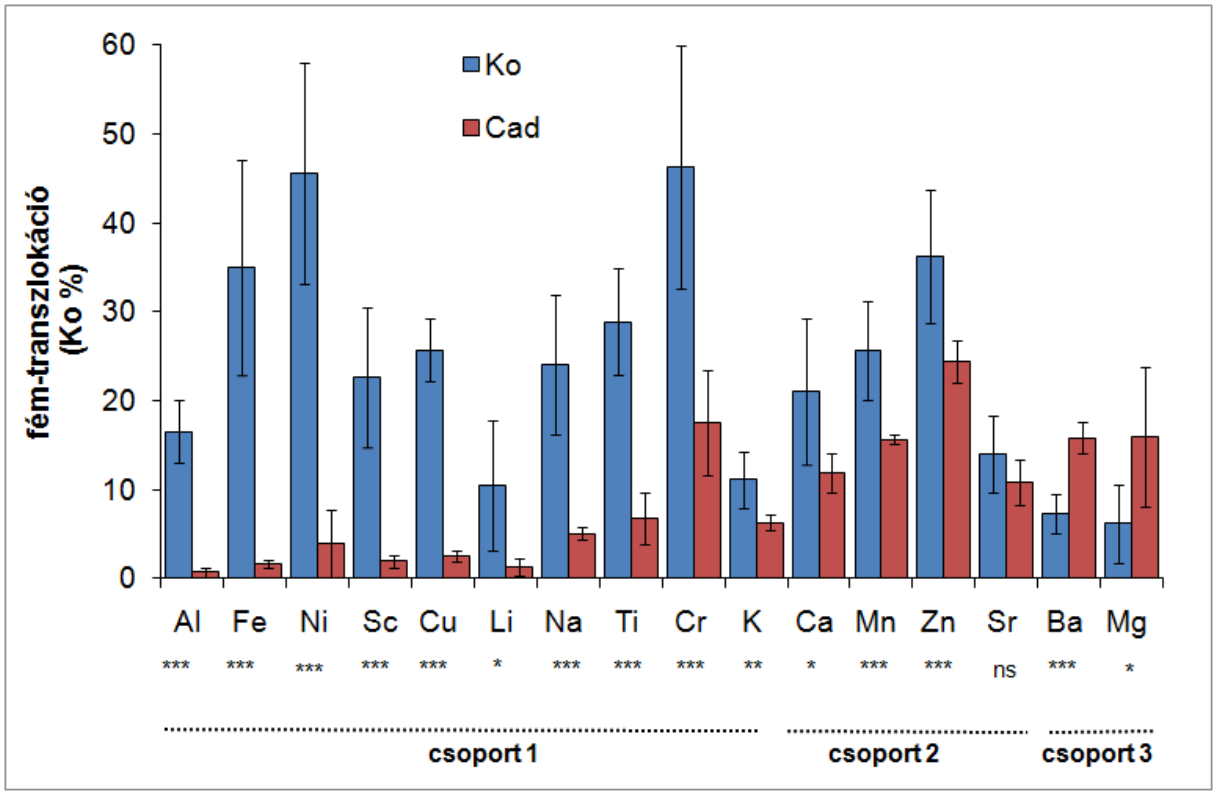
A növényi hajtás szöveteinek fémtartalmát a tápoldat ionösszetétele és a gyökerek, valamint a szállítóelemek felvételi és szállítási kapacitása alapvetően befolyásolja. Kísérleteinkben a hosszú távú Cd-stressz esetében vizsgáltuk, hogy a Cd jelenléte milyen mértékű zavarást, és milyen rendszerszintű változásokat okoz az egyéb fémek transzlokációjában. A változások jellegzetességei alapján következtetések vonhatók le egyéb tápelemek és más nem esszenciális/toxikus elemek felvételére és transzportjára gyakorolt hatására valamint a Cd transzportjára vonatkozóan. Az átmeneti fémek felvételének és transzlokációjának mechanizmusa és kontrollja különös fontossággal bír azért is, mivel nagy koncentrációban halmozódhatnak fel a növényi szövetekben, így az emberi szervezet számára különösen toxikussá válhatnak (Valko *et al*., 2005).

Az élő szervezetek, így a növények esszenciális fémek transzportjában szerepet játszó transzporterei és transzportmechanizmusai is képesek különbséget tenni a trivalens-divalens-monovalens, nagyobb vagy kisebb ionrádiusszal, hidrátburokkal, felületi töltéssel rendelkező fémionok között, amely kulcsfontosságú a differenciált transzlokációhoz. Sok, fizikai-kémiai szempontból nagy hasonlóságot mutató fémion között viszont nem, vagy nehezen képesek különbséget tenni, így ezek a földkéregben ritkán (ritkábban) előforduló fémek mérgezőek lehetnek az élő szervezetekre. A növényi transzporterek nem tesz különbséget a Ca^{2+} és Sr^{2+} ionok között (Kanter *et al*., 2010), amely rámutat arra, hogy az ionok közötti különbségtételnek leginkább a nagy mennyiségben előforduló esszenciális kationok közötti diszkriminációban (pl. Ca^{2+} - Mg^{2+}) van szerepe. Az esszenciális átmeneti fémek többnyire dedikált, nagy affinitású transzportereket és specializált transzport-útvonalakat használnak, mely során nemcsak a felvétel, de a xilémelemekbe történő betöltődés és a fém-komplexek összeállása is erős szabályozás alatt áll (Burkhead *et al*., 2009, Yamaguchi *et al*., 2010). A nem-esszenciális fémek nagy része, többnyire szerves komplexekként vagy szerves molekulákhoz kapcsolódva, szintén ezeket az esszenciális nehézfémek felvételéért felelős transzportereket, transzport-útvonalakat használja (Burkhead *et al*., 2009, Briat *et al*., 2007). A tápelemek talajban/tápoldatban történő koncentrációváltozása is erősen befolyásolja más elemek felvételét, transzlokációját és akkumulációját. Különösen hevesen befolyásolja

egymás transzlokációját néhány esszenciális és nem-esszenciális átmeneti fémion (Pilon *et al*., 2009), így a vas transzlokációját többek között a Cd^{2+}, Ni^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+} és az Al^{3+} (Chen *et al*., 2006, Dube *et al*., 2003, Douchkov *et al*., 2005). Számos nem-esszenciális fémion bizonyítottan más, esszenciális makro- és mikronutriens fém transzportjában szerepet játszó rendszert használ a hajtásba történő transzlokációhoz. Többek között a Sr^{2+} a Ca^{2+}-ionokkal (Seregin és Kozhevnikova, 2004), míg a Rb^{+} a K^{+}-ionokkal transzportálódik együtt (Beniloch *et al*., 1989). Egyes, nem esszenciális átmeneti fémionok, így a $Ti^{3+/4+}$, a Sc^{3+} és a $Co^{2+/3+}$ pedig nagyon kis rátával transzlokálódnak a gyökérből a hajtásba (Shtangeeva *et al*., 2004). Az átmeneti fémek közül a Fe^{2+} transzportjában olyan transzporterek vesznek rész a (ZIP transzporterek), melyeknek szerepe van a növényen belüli Mn^{2+} és Zn^{2+} transzportban is (Korshunova *et al*., 1999), azonban más fémek, így Cr^{3+}-ionok is feltételezhetően együtt transzportálódhatnak velük. A Ni^{2+} és Al^{3+} ionokról kimutatták, hogy a Fe^{3+} ionokkal kompetícióban vannak a komplexáló szerves molekulákért, elsősorban a citrátért, de mozgásukhoz más transzportereket használnak (Chen *et al*., 2006, Haydon és Cobbett, 2007). Tehát más átmeneti fémek jelenléte alapvetően befolyásol(hat)ja a hajtásba irányuló vas-transzlokációnak a hatékonyságát.

Eredmények

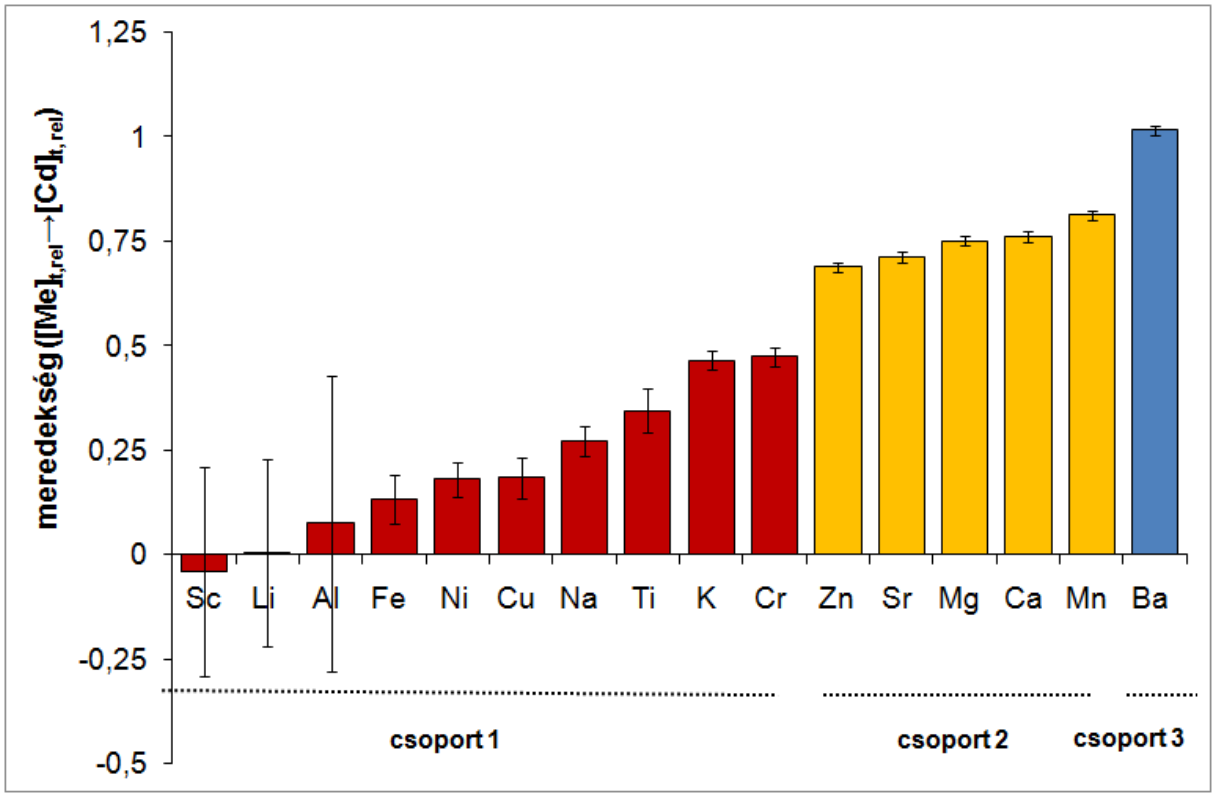
A vizsgálatokhoz a levelek teljes elemtartalmát analizáltuk a disszertációban leírtaknak megfelelően ICP-OES és ICP-MS készülékekkel, savas feltárás után. A +2 levelek kifejlődését követően a Cd koncentrációja a levelekben a kezelés végén mért Cd-koncentráció 28,15±5,69%-ával emelkedett, míg a Ko levelekben változatlan maradt. A fémes elemeket levélbeli koncentrációjuk Cd-indukált változása alapján különböző csoportokba lehetett sorolni (B/1. ábra). A levelek kifejlődését követő időszakban (7-21. kezelési nap) az alkáli- és átmeneti fémek (kivéve K, Mn Zn) koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb emelkedést mutatott (<Ko növények 50%-a), mint a Sr, Ca, K, Mn és Zn koncentráció emelkedése (> Ko növények 50%-a). A Ba és a Mg koncentrációjának emelkedése a kontroll levelekben mérhető értéknél is magasabb volt. Az egyes csoportokon belül a transzlokáció változásának hasonlósága szignifikánsan magasabbnak adódott, mint az egyes csoportok között mérhető hasonlóság mértéke.



B/1. ábra: A 7. és 21. kezelési nap között, a kontroll (Ko) és Cad kezelt növényekben a levelek fémtartalmában mért változások. A transzlokációt – a könnyebb összevethetőség érdekében – minden fém esetében a 21. napos Ko növények értékeire normáltuk (ld.: 1. táblázat). A kontrollhoz viszonyított különbségeket t-próbával elemeztük. ns: nem szignifikáns; *: P<0,1; **: P<0,05; ***: P<0,01.

A Cd-transzlokáció más elemek transzlokációjára kifejtett hatásának vizsgálatához időben vizsgáltuk a levelek elemtartalmát, amit a kezelt levelekben mérhető maximális fém-koncentrációk %-ában fejeztünk ki. Ezekhez az értékekhez rendeltük a minták Cd-koncentrációját ($[Me]_{t,rel} \rightarrow [Cd]_{t,rel}$), az adatpárok így vizsgált fémenként egy-egy egyenest adtak. A továbbiakban ezekre a pontokra lineáris regresszióval illesztett egyenesek meredekségét vizsgáltuk (B/2. ábra). Az összes esszenciális és nem esszenciális fémet vizsgálva, az egyenesek meredeksége alapján három csoportot tudtunk elkülöníteni. Az első csoportban, melybe minden vizsgált alkáli- és átmeneti fém (a Mn és a Zn kivételével) beletartozott, a meredekség minden esetben 0,5 alatt maradt, közülük az Al, a Li és a Sc

esetében a koncentráció alig emelkedett, vagy akár csökkent is, így az egyenesek meredeksége 0 körül szórt. A második csoportban, melybe a legtöbb alkáliföldfém, valamint a Mn és a Zn tartozott, az egyenesek meredeksége 0,5 fölött, de minden esetben 1,0 alatt alakult. A harmadik csoportban, melybe egyedül a Ba tartozott, az egyenes meredeksége 1,0 körül mozgott. A meredekségek variabilitása a csoportokon belül szignifikánsan alacsonyabb maradt (P<0,05), mint az egyes csoportok között, tehát az egyes, általunk elkülönített csoportok szignifikánsan különböztek egymástól. A legnagyobb csoporton belüli variabilitást az első csoportban mértük, köszönhetően az Al, a Li és a Sc esetében 0-tól szignifikánsan nem különböző meredekségeknek.



B/2. ábra: A fém- és Cd-akkumuláció korrelációja, melyet a $[Me]_{t,rel} \rightarrow [Cd]_{t,rel}$ függvény pontjai írnak le. Három csoport volt megkülönböztethető a fémek között aszerint, hogy a Cad kezelés milyen mértékben befolyásolta a transzlokációjukat. A Cd-indukált transzlokációs változások tekintetében három szignifikánsan különböző csoport ismerhető fel. ANOVA és Tukey-Kramer poszt-teszttel vizsgálva csoportokon belül a különbözőség nem, míg a csoportok között erősen szignifikáns (P<0.05)

Diszkusszió

A mérési eredmények és kiértékelésük alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a Cd nem ugyanolyan módon befolyásolja az egyes fémek hajtásbeli akkumulációját, valamint, hogy az akkumuláció gátlása alapján csoportosítva a csoportok jellegzetes egyezéseket mutatnak a fémek fizikai-kémiai tulajdonságaival.

Átmeneti és földfémek

A Cd-ról leírták, hogy jelenléte kölcsönhat a Ca-szignalizációs útvonalakkal (Verbost *et al*., 1989), valamint a Zn-finger-függő útvonalakkal (Kothinthi *et al*., 2010). Részben a Ca-szignalizációval történő interakciója tehető tehát felelőssé a transzporterek gátolt/csökkent expressziójáért, de egyben támogatja azokat az elképzeléseket is, melyek szerint az élő szervezet nem képes tökéletesen megkülönböztetni a Ca^{2+} és a Cd^{2+} kationokat, így a Cd^{2+} mintegy a Ca^{2+} analógjaként viselkedik számos élettani folyamatban. Azok a fémionok (Cu, Al, Cr, Ni), melyek többé-kevésbé hasonló módon transzportálódnak, mint a Fe, tehát citrát, vagy nikociánamin komplexeket képeznek a xilémnedvben, a Fe transzlokációs profiljához rendkívül hasonló változásokat mutattak transzlokációjukban Cd-stressz hatására. Az átmeneti fémek közül a Zn és a Mn transzlokációs profilja azonban jellegzetesen különbözött más átmeneti fémekétől. A Mn, eltérően a többi átmeneti fémektől, a xilémnedvben szerves, vagy foszfát-komplexeket képez (Dučic *et al*., 2005). A csak mérsékelten csökkent levélbeli Mn-akkumuláció azt jelzi, hogy a Mn komplexálódása/transzlokációja alapvetően különböző folyamat más, esszenciális átmeneti fémek, így a Fe és a Cu citrát-, illetve nikociánamin-komplex formálódásától/transzlokációjától (Yruela, 2005, Durett *et al*., 2007). A Zn képez ugyan Zn-NA komplexet – igaz, csak a szimplasztban, és nem a xilémnedvben (Ghandalyan *et al*., 2006). Cd-stressz alatt a hajtás Zn-tartalma emelkedik, de vizsgálataink alapján a megemelkedett transzlokációs aktivitás egyértelműen csak a levelek fejlődési fázisára jellemző, mely periódus után a transzlokáció jellege nem tért el más, általunk II. csoportba sorolt fémion transzlokációjától. Cd-stressz hatására kimutatták a gyökér Zn-felvételéért felelős ZIP9 transzporter expressziójának növekedését (Weber *et al*., 2005), mely magyarázata lehet a Cad kezelés kezdeti periódusában tapasztalt, a fejlődő levelekbe irányuló erőteljes Zn-transzlokációnak. Az olyan nem-esszenciális átmeneti fémek, mint a Ti és a Sc transzlokációs profiljai azt jelzik, hogy a transzlokációjuk egy hasonlóképpen kelátfüggő – avagy más ismertetett átmeneti fémekkel megegyező – útvonalat (Cigler *et al*., 2010) használ.

Az egyetlen általunk vizsgált földfém, az Al transzlokációja jelentősen visszaesett Cd-stressz hatására, hasonlóképpen az átmeneti fémek jelentős részéhez. Az Al transzlokációs profilja közeli rokonságot mutat olyan esszenciális nehézfémek, mint a Fe, a Ni és a Cu profilja. Az Al interakcióban van a Fe transzportjával azáltal, hogy szintén citrátkomplexet formál a xilémben, és így, komplexált formában jut fel a hajtásba is (Ma és Hiradate, 2000). Így a Fe és az Al transzlokációjában mutatkozó hasonlóságok megerősítik az elképzelést, miszerint a Cd Fe-transzlokációra gyakorol hatásainak jelentős részéért a citrát xilémbeli hiánya tehető felelőssé.

Alkálifémek

Cd-stressz hatására az összes vizsgált alkálifém transzlokációs profilja az átmeneti fémek többségével megegyező módon változott. Az alkálifémek azonban, az átmeneti fémektől eltérően, a növényekben szabad, egy vegyértékű kationokként mozognak. A K és Na-transzpoterek specifikusak, különbséget tesznek K^+ és Na^+ között. A Li^+ valószínűleg együtt mozog a Na^+-mal, melyet alátámaszt a Cd-stressz alatt mutatott transzlokációs-profil változása is. A Cd-stressz alkálifémionokra gyakorolt hatásai között sok általános hatás lehetett jelen. Divalens kationként a Cd^{2+} nem használhatja a monovalens kationok transzportjára dedikált transzportereket/csatornákat, így a Cd-alkálifém interakció, sokkal inkább, egyfajta nem-kompetitív gátlás eredménye lehet. A Ca-ról ismert, hogy interakcióban áll a K-felvétellel (Elzam és Hodges, 1967, Gluhić *et al*., 2008). Kísérleteink alapján feltételezve a Cd Ca-szerű viselkedését, minden bizonnyal a Cd is hasonló mechanizmusok révén gátolja az alkálifém-transzlokációt, mint azt a Ca is teszi.

Alkáliföldfémek

Az alkáliföldfémek szabad kationokként mozognak a növényekben, stabil komplexeket nem képeznek. A Cad kezelés zavarta – a Ba és a Mg kivételével - az alkáliföldfémek transzlokációját is. Az akkumuláció gátlásának mértéke azonban jelentősen kisebb volt, mint az átmeneti fémek többsége és az alkálifémek esetében. A Mg^{2+} felvétele és transzlokációja a többi alkáliföldfémtől különböző utakat használ, a Sr és a Ba azonban bizonyítottan interferál a Ca-transzporttal (Seregin és Kozhevnikova, 2004). Az alkáliföldfémek közül a Ba transzlokációjára nem volt hatással a Cd-kezelés. A Ba^{2+}, ellentétben a többi alkáliföldfémmel, kimutatottan csak az apoplasztban mozog, soha nem lép

be a szimplasztba (White, 2001), így a Cd^{2+} jelenléte nem befolyásolta a transzportját. A Mg^{2+} transzportjára sem volt jelentős hatással a Cd, ami azt mutatja, hogy a Mg felvételében és szállításában szerepet játszó transzporterek könnyedén különbséget tesznek Mg^{2+} és Cd^{2+} kationok között. A Sr-ról ismert, hogy Ca-mal együtt transzportálódik mind növényi, mind állati szervezetekben (Kanter *et al*., 2010). A Ca és a Sr akkumulációjának alkáli- és átmeneti fémekhez viszonyított közepesen erős gátlása (koncentráció-függvények 0,5-1 meredeksége) arra enged következtetni, hogy esetükben a transzlokáció gátlása sokkal inkább kompetitív jellegű. A Cd^{2+} nemcsak állati (Verbost *et al*., 1989), de növényi sztómazárósejtekben is (Perfus-Barbeoch *et al*., 2002) interferál a Ca^{2+} membránon keresztül történő transzportjával, mely egyben a Ca-függő jelátviteli útvonalak kompetitív zavarához is vezet. Állati sejtekben a Cd kimutatottan zavarokat okoz több aktivációs kaszkád működésében is, melynek az alapja a Ca^{2+}-Cd^{2+} ionok molekuláris szintű összetévesztése, és részben a Cd^{2+} Ca-kötő helyekre történő kötődése (Beyersmann és Hachtensberg, 1997). Növényekben a felvett és hajtásba transzlokált Cd jelentős része nem lép be a citoplazmába, hanem a sejtfalban kötötten marad. A Cd^{2+} képes helyettesíteni a Ca^{2+}-ot a sejtfalban azáltal, hogy a Ca-kötő helyekre kötődik (Webster és Gadd, 1996). Mindezek az adatok támogatják azt az elképzelést, hogy növényekben a Ca^{2+} és a Cd^{2+} egy közös transzportrendszeren osztozik, és a Cd jelenlétében tapasztalt egyes zavarok primer okaként a Cd Ca-metabolizmussal történő interakciója, illetve molekuláris szintű összetévesztése tehető felelőssé.

Összegzés

A transzlokációs profilok alapján a fémeket három csoportba lehetett sorolni, melyek közül két, főleg átmeneti, illetve főleg alkáliföldfémeket tartalmazó csoport transzlokációját befolyásolta a Cd^{2+} jelenléte. A Ca-jellegű transzlokációs rendszerű fémek esetében egy kompetitív típusú gátlás tételezhető fel, mely legvalószínűbben a transzporterek molekuláris működésének szintjén jelentkezik, és a Cd^{2+} esszenciális fém-kationokkal történő összetévesztésén alapul. A Fe-jellegű, kelátoroktól függő transzlokációs rendszert használó fémek transzlokációja sokkal inkább egy nem-kompetitív jellegű gátlást szenved Cd^{2+} jelenlétében, mely szintén kapcsolatban lehet a Ca-függő szignalizációval oly módon, hogy a Cd bizonyítottan csökkenti a xilémben a komplexálásárt felelős szerves molekulák xilémelemekbe jutását szolgáló transzporterek expresszióját.