

# UTJECAJ MANGANA, KOBALTA I ŽIVE NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU ILISTU GRAŠKA (Pisum sativum L.)

---

Šarec, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:769011>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



**ODJEL ZA  
BIOLOGIJU**  
Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Tomislav Marec

UTJECAJ MANGANA, KOBALTA I FIVE NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU I  
LISTU GRAŠKICA (*Pisum sativum* L.)

Diplomski rad

OSIJEK, 2012.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Tomislav Marec

UTJECAJ MANGANA, KOBALTA I FIVE NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU I  
LISTU GRAŠKA (*Pisum sativum* L.)

Diplomski rad

OSIJEK, 2012.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

---

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Odjel za biologiju**  
**Diplomski znanstveni studij biologije**

**Diplomski rad**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**  
**Znanstveno polje: Biologija**

**UTJECAJ MANGANA, KOBALTA I FIIVA NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU I  
LISTU GRAĐKA (*Pisum sativum* L.)**

Tomislav <sup>TM</sup>arec

**Rad je izrađen:** Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka  
**Mentor:** Dr.sc. Janja Horvati , izv.prof

### **Sažetak:**

Istraživan je utjecaj iste koncentracije Mn, Co i Hg na list i korijen biljaka vrste *Pisum sativum* L. Utjecaj metala istraživan je mjerenjem aktivnosti katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze kao i koncentracije proteina, fotosintetskih pigmenata, askorbinske kiseline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te produkata lipidne peroksidacije nakon sedam dana izlaganja. Zabilježen je različit intenzitet odgovora korijena i lista u ovisnosti o testiranom metalu. Dobiveni rezultati pokazali su da je korijen primarno mjesto formiranja ROS-a i oksidativnih oštećenja. Višestruka povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima u korijenu uklonila su nastali ROS i spriječila nastanak oksidativnog stresa u listove. Od tri testirana metala, fliva se pokazala kao najtoksičniji metal s izraženim djelovanjem i na list i na korijen.

**Broj stranica:** 51

**Broj slika:** 25

**Broj tablica:** 25

**Broj literaturnih navoda:** 52

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** mangan, kobalt, fliva, građak, stres

**Datum obrane:** 21. rujna 2012.

### **Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr.sc. Elizabeta Has-Schön, izv.prof
2. Dr.sc. Janja Horvati , izv.prof
3. Doc. dr. sc. Melita Mihaljevi

**Rad je pohranjen u:**

knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Department of Biology**  
**Graduate Study of Biology**

**MS thesis**

**Scientific Area: Natural science**  
**Scientific Field: Biology**

**THE EFFECTS OF MANGANESE, COBALT AND MERCURY ON OXIDATIVE STRESS  
IN THE ROOTS AND LEAVES OF PEA (*Pisum sativum* L.)**

Tomislav <sup>TM</sup>arec

**Thesis performed:** Department of plant biochemistry and ecophysiology  
**Supervisor:** Prof. Janja Horvati , PhD

### **Summary:**

The same concentration of Mn, Co, and Hg on the leaf and the root of the *Pisum sativum* L. species has been investigated. The influence of metal was investigated by measuring the activity of catalase, ascorbate-peroxidase, guaiacol-peroxidase as well as the concentration of protein, photosynthetic pigments, ascorbic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and lipid peroxidation products after seven days of exposure. The leaf and the root have been noted to respond differently depending on the metal tested. The results show that ROS and oxidative damage is primarily formed in the root. Multiple increases in antioxidative enzymes removed the ROS and prevented oxidative stress from spreading to the leaves. Three metals were tested, and mercury proved to be the most toxic of them, with major impact on both the leaf and the root.

**Number of pages:** 51  
**Number of figures:** 25  
**Number of tables:** 25  
**Number of referencis:** 52  
**Original in:** Croatian

**Key words:** manganese, cobalt, mercury, pea, stress

**Date of thesis defence:** 21<sup>st</sup> September 2012.

### **Reviewers:**

1. Prof. Elizabeta Has-Schön, PhD
2. Prof. Janja Horvati , PhD
3. Doc. dr. sc. Melita Mihaljevi

**Thesis deposited in:**  
Library of Department of Biology, University of J..J. Strossmayer in Osijek.

*Želim se zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Janji Horvatić što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada, te na brojnim stručnim savjetima i podršci prilikom izrade istog.*

*Zahvaljujem i asistentici Martini Jelošek na savjesnom i stručnom vođenju kroz sve segmente izrade ovog diplomskog rada, te na uloženom strpljenju i energiji, bezuvjetnoj i stručnoj pomoći i suradnji na nekim ključnim mjestima ovog rada.*

*Najveća zahvala ide mojim roditeljima i sestri Sanji koji su me usmjerili da postanem osoba kakva sam danas, omogućili mi studiranje u današnjim teškim uvjetima, te na pruženoj iznimnoj podršci i razumijevanju tokom studiranja.*

## **SADRŽAJ RADA**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1. 1. Cilj rada	7
<b>2. MATERIJALI I METODE</b>	<b>8</b>
2. 1. Uzgoj	8
2. 2. Tretman	9
2. 2. 1. Određivanje aktivnosti enzima katalaze	9
2. 2. 2. Određivanje aktivnosti enzima askorbat peroksidaze	10
2. 2. 3. Određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze	10
2. 2. 4. Određivanje koncentracije proteina	10
2. 2. 5. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline	11
2. 2. 6. Određivanje koncentracije vodikovog peroksida	11
2. 2. 7. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije	12
2. 2. 8. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	12
2. 10. Statistička analiza	13
<b>3. REZULTATI</b>	<b>14</b>
3.1. Aktivnost enzima katalaze	14
3. 2. Aktivnost enzima askorbat peroksidaze	17
3. 3. Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze	21
3. 4. Koncentracija proteina	25
3. 5. Koncentracija askorbinske kiseline	27
3. 6. Koncentracija vodikovog peroksida	29
3. 7. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije	31

3. 8. Koncentracija fotosintetskih pigmenta	33
<b>4. RASPRAVA</b>	<b>38</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>47</b>



## 1. UVOD

Teški metali su definirani kao elementi čija je gustoća veća od  $5 \text{ g cm}^3$  i čiji je atomski broj veći od 20. Teški metali su prirodne komponente tla, no njihove su koncentracije u tlu uglavnom niske. Imaju biološku važnost u razvoju i rastu biljaka, gdje igraju ključnu ulogu u procesima kao što je homeostaza i fotosinteza. Mnogi stanični procesi su regulirani enzimima čija je aktivnost ovisna o prisutnosti teških metala, kao što su Fe, Mn, i Cu, u aktivnom mjestu ili drugoj poziciji važnoj za normalno funkcioniranje enzima. Neki od tih elemenata, kao što su Zn, Cu, Mn, Ni, i Co, su mikronutrienti esencijalni za rast biljaka, dok drugi imaju još nepoznatu biološku funkciju, kao Cd, Pb i Hg. Razumijevanje utjecaja teških metala na biljke i rizici biomagnifikacije toksikanata za konzumente su vrlo značajni. Između različitih modela dostupnih za proučavanje toksičnosti teških metala, biljke imaju određene značajke koje ih čine idealnima za ovakvu vrstu istraživanja. Jedna od ključnih funkcija biljne stanice je mogućnost odgovora na promjene koje se događaju u okolišu (Greene, 2002). Kako biljke nisu u mogućnosti napustiti one određeno područje, razvile su određene mehanizme koji im omogućuju preživljavanje izloženosti različitim toksikantima. Tako neke vrste mogu regulirati količinu polutanta koji je primljen iz okoline i inaktivirati ga u substaničnim kompartmentima. Toksičnost teških metala i njihovih spojeva uvelike ovisi o njihovoj dostupnosti, odnosno mehanizmima unosa kroz staničnu membranu, unutarstaničnoj distribuciji i vezivanju za stanične makromolekule. Ulazak teških metala u stanicu može mobilizirati nekoliko metaboličkih i signalnih puteva te genetičkih procesa kako bi se neutralizirao izvor toksičnosti. Povećane koncentracije teških metala snažno utječu na rast i razvoj biljaka. Koliko je točno neki teški metal utjecati na biljku ovisi o genotipu biljke i uvjetima u tlu, odnosno vodi. Toksičnosti se očituju kao produkcija ROS-a i razvoj oksidativnog stresa, inhibicija enzimske aktivnosti zamjenom esencijalnih kofaktora, promjene u permeabilnosti membrana.

U čistoći okolišnim čimbenici i razvojne promjene, kao što je razvoj sjemena, uključuju formiranje reaktivnih kisikovih jedinki (eng. *Reactive Oxygen Species* - ROS) u biljnim stanicama (Greene, 2002). ROS su superoksidni radikal ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\text{OH}^-$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Zajednički čimbenik većine stresova je aktivno stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki. Poznato je da ROS nije samo štetan za stanicu nego ima i važnu funkciju kao signalna molekula. Stvaranje ROS-a je regulirano u različitim staničnim kompartmentima uključujući i kloroplaste, peroksisome, mitohondrije. Stvaranje ROS-a tijekom izloženosti abiotičkom stresu, kao što su teški metali, suha, ekstremne temperature, je

glavni uzrok smanjenja prinosa, oštećenja i venoza biljke. U biljnim stanicama ROS neprekidno nastaje kao normalni sporedni produkti mnogih metabolizma u različitim staničnim procesima. Ravnoteža između nastalih i uklonjenih ROS-a može biti narušena od strane brojnih nepovoljnih okolišnih čimbenika. Kao rezultat unutarstanične na razinu ROS-a može naglo porasti (Apel i Hirt, 2004). S obzirom na visoko reaktivnu prirodu, njihova produkcija i uklanjanje (detoksifikacija) su procesi koji moraju biti strogo kontrolirani. Biljke su razvile različite antioksidativne sustave. Difuzija ROS-a je određena njihovom visokom reaktivnošću. To svojstvo zahtjeva da se uklanjanje i detoksifikacija ROS-a odvija blizu ili na samom mjestu nastanka. Sveprisutnost antioksidativnih sustava je presudna za uspješno spriječavanje i preživljavanje oksidativnog stresa. Oksidativni stres je definiran kao poremećaj ravnoteže između oksidanta i antioksidanta. Većina antioksidativnih komponenti uklanja slobodne radikale. Vezanjem i inaktivacijom slobodnih radikala, antioksidansi spriječavaju pojavu oksidativnog stresa. Uska suradnja između enzimatskih i neenzimatskih antioksidativnih sustava osigurava stanici efikasno reguliranje razine ROS-a. Neenzimatski antioksidativni sustav uključuje askorbinsku kiselinu (AsA), glutation (GSH),  $\alpha$ -tokoferol. AsA i GSH su najzastupljeniji topljivi antioksidansi u biljkama i imaju ključnu ulogu u zaštiti biljke od oksidativnog stresa. Glavni elementi enzimatskog antioksidativnog sustava su enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APX) i gvajakol-peroksidaza (GPX). Kontroliraju razinu ROS-a tako što ga direktno uklanjaju i pretvaraju u manje reaktivne i manje štetne oblike. Mogu se smatrati unutarstaničnim senzorima slobodnih radikala s obzirom na njihovu direktnu interakciju s ROS. Druga grupa enzima, monodehidrogenaskorbat-reduktaza (MDAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutation-reduktaza (GR) je uključena u redukciju i oksidaciju askorbata i glutationa, usklađuju i redoks stanje stanice. Neenzimatski i enzimatski antioksidansi čine kompleksan i raznolik antioksidativni sustav koji efikasno sudjeluje u kontroli prekomjernog stvaranja ROS-a i pojave oksidativnog stresa (Kumar Shanker i Venkateswarlu, 2011). Do toksičnosti kojoj su uzrok neesencijalni metali dolazi nakon zamjene esencijalnog metala neesencijalnim unutar aktivnog mjesta enzima. Ioni  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Ag^{2+}$  teže vezivanju za sulfhidrilne skupine, što dovodi do inaktivacije različitih enzima neophodnih za normalno funkcioniranje metabolizma biljke. Pri visokim koncentracijama i esencijalni i neesencijalni metali mogu oštetiti stanične membrane i stijenke, promijeniti aktivnost i funkciju enzima, poremetiti stanične funkcije, oštetiti strukturu DNA i dovesti do oksidativnog stresa. Kako bi došlo do fiziološkog ili toksičnog uinka, ioni metala moraju ući u stanicu. Ulaze u obliku strukturno sličnih kationa ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ). Biljke su razvile različite homeostatske mehanizme

kako bi održale pravilne koncentracije esencijalnih elemenata u različitim stanišnim kompartmentima. Isti mehanizmi osiguravaju pravilno primanje, distribuciju i detoksifikaciju viška iona različitih metala, bilo esencijalnih ili nesencijalnih (Jayakumar i Jaleel, 2009).

Kobalt je element koji se prirodno u malim količinama nalazi u zraku, vodi, tlu, stijenkama, biljkama i životinjama. Antropogenim djelovanjem njegove se količine u okolišu povećavaju. Kobalt je sastavni dio mnogih legura, magneta i magnetnih uređaja za snimanje. Koristi se kao katalizator u kemijskoj i naftnoj industriji te pri izradi boja i lakova. Radioaktivni izotop kobalta  $^{60}\text{Co}$  se koristi u medicini i u prehrambenoj industriji, pri sterilizaciji hrane i u nuklearnim elektranama. Kobalt je metal esencijalan organizmima koji fiksiraju dušik, kao što su slobodno živuće bakterije, modrozelenoalge (cijanobakterije) te simbiotski sustavi (bakterije roda *Rhizobium* i leguminoze). Kod viših biljaka je esencijalan za leguminoze, dok se kod drugih vrsta biljaka smatra korisnim, prije nego esencijalnim. Kobalt je sastavni dio nekoliko enzima i koenzima. Dokazano je da utječe na rast i metabolizam biljaka, ovisno o koncentraciji i dostupnosti u tlu. Više biljke kobalt primaju u obliku iona  $\text{Co}^{2+}$  aktivnim transportom kroz korijen odakle se transpiracijskom strujom putem ksilema transportira u nadzemne dijelove biljke. Toksičnost kobalta i njegovih spojeva ovisi o njegovoj koncentraciji i fizikalno-kemijskim svojstvima tla. U velikim koncentracijama postaje toksičan što kao posljedicu ima opadanje listova, smanjenje mase izbojaka, obezbojenje lisnih filia.

Fliva se lako modificira u nekoliko oksidacijskih stanja i može se proiriti kroz sve ekosustave. Izdvaja se među ostalim metalima zato što je u okolišu pronađena u nekoliko različitih fizikalnih i kemijskih oblika: elementarna Hg, anorganska Hg ( $\text{Hg}^{2+}$ ), organska Hg ( $\text{CH}_3\text{-Hg}$ ), u obliku klorida ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ). Velika topljivost u vodi i lakoća kojom Hg prelazi u plinovitu fazu su dva najznačajnija svojstva ovog teškog metala. Ta svojstva objašnjavaju sposobnost i efikasnost kojom fliva prelazi u različite ekosustave i za to se dugo vremena zadržava u atmosferi. Razvojem industrije povećala se i upotreba flive, a samim time je došlo do povećanja antropogenih emisija i povećanja prirodne koncentracije u okolišu. Fliva se koristi kao sastavni dio električnih uređaja, baterija i eksploziva. Zbog svoje velike gustoće se koristi u barometrima, manometrima i termometrima. Također se koristi u medicini, kozmetici u industriji, te u poljoprivredi kao sastavni dio fungicida, herbicida i umjetnih gnojiva. Glavnina flive koja dospijeva u okoliš je rezultat izgaranja fosilnih goriva, proizvodnje elektroničke opreme, kao nusprodukt prilikom obrade različitih metala, osobito plemenitih, proizvodnje boja. Sve te antropogene aktivnosti povećavaju količinu flive koja se akumulira u kopnenim i vodenim ekosustavima, u kojima se može zadržati i preko sto godina

nakon što se izvor one ione ukloni. Kontaminacija tla flivom je obično posljedica upotrebe različitih umjetnih gnojiva, vapna, ulja i prirodnih gnojiva. Dinamika kojom biljke apsorbiraju Hg ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su pH tla, prozornost tla te vrsta biljke. Većina biljnih vrsta koje apsorbiraju flivu akumuliraju je u korijenu, dok su neke sposobne određenu količinu apsorbirati u izdanku. Sam mehanizam kojim fliva ulazi u korijen biljke nije još u potpunosti jasan. Smatra se da se fliva veže za sumporne i dušične ligande i ulazi u stanicu preko ionskih kanala te da je tako u kompeticiji s ostalim teški metalima kao što je Cd ili esencijalnim elementima kao što su Zn, Cu i Fe. Na staničnoj razini utječe na različite molekule koje su neophodne za normalno funkcioniranje biljke kao što su različiti enzimi i polinukleotidi, na transport esencijalnih iona, na zamjenu ili supstitucije metalnih iona u molekulama (Mg u klorofilu), denaturaciju i inaktivaciju proteina, disrupciju stanične membrane i organela. Fliva dovodi do promjena permeabilnosti stanične membrana, pokazuje visoki afinitet za sulfhidrilne (SH) skupine kao i za fosfatne, te dovodi do zamjene esencijalnih iona i utječe na funkciju proteina. Poznato je da Hg utječe na antioksidativni sustav, utječe na modulaciju nekih antioksidanata kao što su superoksid-dismutaza, askorbat-peroksidaza i glutation-reduktaza. Izloženost flivi također dovodi do redukcije u fotosintezi, transpiraciji, primanju vode i sintezi klorofila. Fliva je opasan polutant koji se jednostavno širi kroz ekosustave negativno utječe na mnoge biološke procese.

Mangan je deseti najzastupljeniji element u zemljinoj kori i uključen je u mnoge biološke procese (Gangwar i sur., 2010). U tlu je prisutan u nekoliko oksidacijskih stanja (0, II, III, IV, VI i VII), dok je u biološkim sustavima prisutan kao II, III i IV. Na bioraspoloživost mangana u tlu utječe pH i ostali uvjeti tla. Koncentracije mangana u vodi i tlu se povećavaju primjenom različitih pesticida u poljoprivredi, izgaranjem fosilnih goriva i razvojem teške industrije. Mangan je esencijalni mikronutrijent za većinu organizama. Kod biljaka sudjeluje u strukturi fotosintetskih proteina i enzima. Njegov manjak je opasan za kloroplaste zato što utječe na funkciju fotosistema II (PSII), koji osigurava neophodne elektrone za fotosintezu. Mangan ima dvije uloge u metabolizmu biljaka – kao esencijalni mikronutrient i kao toksični element kada se nalazi u suvišku. Biljkama je dostupan u obliku  $Mn^{2+}$  i kao takav ulazi u stanice korijena te biva prebačen u nadzemne dijelove gdje se akumulira. Putem aktivnog transporta ulazi u epidermalne stanice korijena i transportira se kao dvovalentni kation u samu biljku. Mangan od korijena do nadzemnih dijelova biljke putuje ksilemom kroz transpiracijsku strujom. Za transport unutar stanice su zadušeni različiti proteinski nosači. Visoke koncentracije mangana negativno utječu na rast i razvoj biljke tako što interferiraju s metaboličkim procesima (Shi i sur., 2005). Višak mangana u

biljkama može promijeniti mnoge procese kao što su aktivnost enzima, apsorpcija, translokacija i upotreba ostalih mineralnih elemenata (Ca, Mg, Fe i P), uzrokuju i oksidativni stres. Koncentracija mangana koja dovodi do toksičnosti u inak i oksidativnog stresa ovisi vrsti i kultivaru biljke te o genotipu unutar same vrste. Uz to što ima ulogu u fotosintezi, također je bitan pri sintezi ATP-a, kod reakcija RuBP karboksilaze, kod biosinteze masnih kiselina i proteina. Ima i primarnu ulogu pri aktivaciji i kao kofaktor približno 35 enzima u biljkama, kao što su Mn-SOD, Mn-CAT, piruvat-karboksilaza i fosfoenolpiruvat-karboksikinaza. Mangan je također esencijalan za biosintezu klorofila, aromatskih amino kiselina, te sekundarnih produkata kao što su lignin i flavonoidi. Uključuje se u metaboličke procese kao što su respiracija, fotosinteza, sinteza aminokiselina i aktivacija hormona. Kao kofaktor enzima superoksid-dismutaze, mangan sudjeluje u obrani biljke od oksidativnog stresa, koji je posljedica povećane količine aktiviranih oblika kisika i slobodnih radikala, koji su štetni za biljku. Budući da je esencijalni mikronutrijent, niske koncentracije mangana su neophodne za normalan rast i razvoj biljke. Ukoliko je prisutan u većim količinama postaje iznimno toksičan za biljne stanice. Uz smanjenje rasta, simptomi toksičnosti mangana su i kloroza listova (interveinalna i rubna) te nekroza listova, također je kod nekih biljnih vrsta moguće da dolazi do redukcije u fotosintezi, sadržaju klorofila a i b i njihovoj sintezi, kao i do smanjenja sinteze karotenoida. Toksičnost mangana može potaknuti oksidativni stres. Kao takav može izazvati metaboličke i makromolekularne promjene koje mogu narušiti homeostazu biljne stanice.

Model ovog istraživanja je bila vrsta *Pisum sativum*. Grašak (*Pisum sativum*) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice mahunarki (Fabaceae). Jedna je od prvih kultiviranih biljaka. Arheološka istraživanja potvrđuju upotrebu graška 8 000 godina p.n.e. S obzirom na genetsku raznolikost, mjesto podrijetla graška nije točno određeno. Kao centri iz kojih potječu se navode Mediteranska regija, zapadna i centralna Azija te Etiopija. Organizacija za prehranu i poljoprivredu pri UN-u (FAO) je odredila Etiopiju i zapadnu Aziju kao primarne centre razvoja graška, dok su sekundarni centri u južnoj Aziji i na Mediteranu. Pretpostavlja se da su se prvi kultivari graška pojavili u zapadnoj Aziji, odakle su se dalje proširili po Europi, Kini i Indiji. Danas je ova biljka široko rasprostranjena i uz to što se koristi u ljudskoj prehrani, jedna je od najznačajnijih leguminoza koja se koristi u poljoprivredi. Ova multifunkcionalna biljka se može koristiti kao stočna hrana, silaža, slama, u zelenoj gnojidbi. Grašak je također subjekt genetičkih istraživanja još od eksperimenata Thomasa Andrew Knighta 1790-tih i Gregora Mendela 1860-tih (Mikić i sur., 2011). Grašak raste na područjima gdje prevladava umjereno kontinentalna klima. Za rast i razvoj su najpovoljnije temperature između 4 i 24°C,

dok je optimalna 13-21°C. Optimalna temperatura klijanja je 20°C, dok je minimalna 5°C. Za razvoj vegetativnog dijela biljke optimalna temperatura je između 13 i 17°C, minimalna temperatura je 4°C. Mlade biljke bez veštice mogu podnijeti temperature i do -8°C. S razvojem nadzemnog dijela biljke otpornost na niske temperature opada, tako već pri 0,5°C dolazi do ireverzibilnog oštećenja biljke. Tijekom faze cvatnje optimalna temperatura je između 16 i 20°C, a za razvoj ploda je potrebna temperatura između 20 i 22°C. Temperature iznad 25°C stresno djeluju na biljku i pri takvim temperaturama zaustavlja se rast i razvoj cvijeta i ploda. Ukoliko temperature prije u 35°C rast graška se u potpunosti zaustavlja. Grašak je biljka dugog dana, iako su neki kultivari neutralni na dužinu dana. Raste na različitim tipovima tala, prozračnim, dobro dreniranim i s vlažnostima pH od 5.5 do 7.0. Neki kultivari toleriraju pH vrijednost tla i do 7,5. Optimalna količina padalina je između 800 i 1000 mm godišnje. Stabljika je na poprečnom presjeku uglavnom okrugla ili četvrtasta, može se granati, ali i biti nerazgranata. Svjetlozelene je boje i visine do 2 metra. Karakteristike stabljike se razlikuju među kultivarima. Listovi su naizmjenični, složeni, parno perasti s jednim, dva ili rijetko tri para ovalnih liski. Par liski koji se nalazi najbliže vrhu lista je preobraćen u razgranatu viticu koja biljci služi za prihvaćanje različitih potpornje. Listovi su plutozelene do svijetlozelene, sivozelene ili plavozelene boje, a površina listova je prekrivena voštanim prevlakom. Cvijet je leptirast, a ima pet lapova i pet latica, dvije koje su vanjske, dvije koje su unutarnje krila i jedna zastavica. Nalazi se na dugoj stabljici i obično je bijele boje, ali može biti plave, ljubičaste, ružičaste ili boje lavande, ovisno o kultivaru. Cvijet je dvospolan i zigomorfan. Plodnica je nadržala, a od deset praćnika devet ih je sraslo dok je jedan slobodan. Za grašak je karakterističan samooplodnja. Plod graška je mahuna dužine između 4 i 12 cm, u početku je četvrtastog oblika, a daljnjim razvojem poprima valjkasti oblik s tupim ili zaobljenim vrhom, glatke je površine i zelene boje. U mahuni se nalazi 5-15 sjemenih zametaka koji se u povoljnim uvjetima oplodnje razvijaju u zrno. Sjeme graška može biti okruglo i glatko ili nepravilno okruglastog oblika i naborano, žute ili zelene boje. Sjemeni lupina je bezbojna. Korijen graška je dobro razvijen i ima veliku sposobnost apsorpcije mineralnih tvari i vode iz tla. Glavni korijen može narasti i do 1,5 m u dubinu, dok se glavni postranog korijenja nalazi do dubine od 30 cm. Kao što je slučaj i kod drugih vrsta iz porodice Fabaceae tako i na korijenu graška bakterije induciraju stvaranje sitnih kvrčica (noduli). To su specijalizirani organi biljke-domaćina u kojima se nalaze bakterije rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*. Bakterije fiksiraju atmosferski dušik i prevode ga u oblik koji je kao takav dostupan biljkama (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

## 1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je utvrditi fiziološke reakcije vrste *Pisum sativum* na povišene koncentracije mangana, kobalta i flive u hranjivoj otopini. Cilj je također utvrditi dolazi li do pojave oksidativnog stresa i aktiviranja obrambenih antioksidativnih mehanizama u korijenu i listu biljke, te usporediti međusobne ovisnosti mjerenih parametara.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. UZGOJ

Netretirano sjeme gra-ka (*Pisum sativum* L. cv. Mali Provansalec) je sterilizirano 30 minuta u 3%-tnom vodikovom peroksidu i isprano nekoliko puta destiliranom vodom. Sjeme je zatim ostavljeno u mraku izme u dva namo ena filter papira pri sobnoj temperaturi ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Nakon etiri dana proklijalo sjeme gra-ka premje-teno je u staklene epruvete na 60 ml svjeffe pripremljene hranjive otopine (Hoagland i Arnon, 1950), tablica 1.

Tablica 1. Sastav hranjive otopine za uzgoj gra-ka

NUTRIENT	KONCENTRACIJA
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 mM
$\text{KNO}_3$	6 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	4 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2 mM
$\text{H}_3\text{BO}_4$	46 $\mu\text{M}$
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	9 $\mu\text{M}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	7,6 $\mu\text{M}$
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,3 $\mu\text{M}$
$\text{H}_2\text{MoO}_4$	0,1 $\mu\text{M}$
Fe EDTA	22,3 $\mu\text{M}$

Biljke su uzgajane etrnaest dana u uvjetima dugog dana (16/8 h fotoperiod), pri sobnoj temperaturi  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , uz osvjetljenje  $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotona. Epruvete su obloflene tamnom folijom da bi se sprije ilo izlaganje korijena svjetlosti i onemogu io razvitak algi (slika 2). Svakih 48 sati obnavljana je hranjiva otopina da bi se osigurale potrebne koli ine nutrijenata za rast i razvoj. Za pripremu hranjive otopine tijekom kultivacije i tretmana kori-tene su iste izvorne otopine nutrijenata.



## 2.2. TRETMAN

Eksperiment se sastojao od četiri nasumično odabrane grupe biljaka, tri grupe tretmana i jedne kontrolne grupe. Kontrolna skupina se sastojala od dvanaest biljaka dok se u svakoj skupini tretmana nalazilo po šest biljaka. Tretman se sastojao od izlaganja biljaka hranjivoj otopini s dodatkom flive, kobalta i mangana u obliku klorida. Koncentracija metala u hranjivoj otopini je bila 100  $\mu\text{M}$ . Trajanje tretmana je bilo sedam dana, a biljke su tretirane u istim uvjetima u kojima su uzgajane.



Slika 1. Biljke gra-ka u epruvetama obložene folijom

### 2.2.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA KATALAZE

Aktivnost katalaze (CAT) određena je metodom prema Aebi (1984). Biljni materijal je homogeniziran u tekućem mediju uz dodatak polivinilpirolidona (PVP). Odvagano je 0,2 g dobivenog praha u Eppendorf plastične kivete od 2 mL, te mu je dodan 1 ml 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0). Reakcijska smjesa se sastojala od 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) i 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcija je inicirana dodatkom 100  $\mu\text{L}$  uzorka u 1900  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese. Aktivnost je mjerena spektrofotometrom na valnoj duljini 230 nm, svakih 10 sekundi

tijekom 1 minute u kiveti od kvarcnog stakla. Ukupna aktivnost katalaze (CAT-u) je izraflena po jedinici mase svjeffe tvari kao  $A_{230} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ SvM}$ , a specifi na (CAT-s) po jedinici mase proteina kao  $A_{230} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteina}$ .

### **2.2.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA ASKORBAT-PEROKSIDAZE**

Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) mjerena je prate i protoklo prema Nakano i Asada (1981). Tkivo je homogenizirano u teku em du-iku uz dodatak PVP-a. Oko 0,2 g dobivenog praha preba eno u Eppendorf kivete od 2 mL, te ekstrahirano u 1 mL ekstrakcijskog pufera. Ekstarkcijski pufer je dobiven mije-anjem 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) s 5 mM Na-askorbatom i 1 mM EDTA. Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 50 mM askorbinske kiseline i 12 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U 820  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese je dodano 180  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta, te je spektrofotometrijski mjerena aktivnost na 290 nm, svaku sekundu kroz 2 minute u kiveti od kvarcnog stakla. Ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze (APX-u) je izraflena kao  $A_{290} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ SvM}$ , dok je specifi na aktivnost askorbat-peroksidaze (APX-s) izraflena kao  $A_{290} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteina}$ .

### **2.2.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA GVAJAKOL-PEROKSIDAZE**

Aktivnosti gvajakol-peroksidaze (GPX) mjerena je metodom prema Siegel i Galston (1967). Biljno tkivo je homogenizirano u teku em du-iku uz dodatak PVP-a. Odvavano je oko 0,5 g dobivenog praha i preba eno u Eppendorf plasti nu kivetu od 2 mL. U kivetu je dodan i 1 mL ekstrakcijskog pufera (100 mM Tris/HCl pufer pH 8,0). Reakcijska smjesa sastojala se od 5 mM gvajakola i 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese dodano je 200  $\mu\text{L}$  uzorka, te je kori-tenjem spektrofotometra mjerena aktivnost enzima pri 470 nm. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPX-u) je izraflena kao  $A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ SvM}$ , dok je specifi na aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPX-s) izraflena kao  $A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ proteina}$ .

### **2.2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA**

Koncentracija proteina u tkivu gra-ka mjerena je metodom prema Bradfordu (Bradford, 1976). Oko 0.2 g tkiva usitnjeno je u tarioniku uz dodatak teku eg du-ika. Proteini

iz tkiva ekstrahirani su 100 mM kalij-fosfatnim puferom uz dodatak PVP-a. U uzorak je dodana boja Comassie brilliant blue (CBB) koja se specifično veže za proteine pri čemu dolazi do promjene boje. Kompleks proteina i boje CBB ima maksimum apsorpcije pri 595 nm. Koncentracija proteina u uzorcima određena je prema standardnoj krivulji poznate koncentracije proteina (goveg serumskog albumina) i izražena kao  $\mu\text{g}$  proteina  $\text{g}^{-1}$  svježe tvari.

### **2.2.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ASKORBINSKE KISELINE**

Koncentracije askorbinske kiseline određena je prema Mukherjee i Choudhuri (1983). Biljno tkivo je homogenizirano u tekućem dušiku. Oko 40 mg dobivenog praha je odvagano u Eppendorf kivetu od 2 mL, u koju je zatim dodan 1 mL 6%-tne TCA. Jedan mililitar 6%-tne TCA bez biljnog tkiva se koristi kao slijepa proba i svi daljnji koraci provedeni su i sa slijepom probom. U kivete s uzorcima i slijepom probom je dodano 0,5 mL 2%-tnog dinitrofenilhidrazina (DNF) otopljenog u 50%-tnoj sumpornoj kiselini i jedna kap 10%-tne tiouree otopljene u 70%-tnom etanolu. Uzorci i slijepa proba su zatim stavljeni u kipu u vodenu kupelj 15 minuta. Nakon što su ohlađeni na sobnu temperaturu, centrifugirani su 10 minuta na 1 000 rcf pri 4°C. Dobiveni supernatant je prebačen u staklenu kivetu dok je talog resuspendiran dodavanjem dva puta po 750  $\mu\text{L}$  80%-tne sumporne kiseline. Otopljeni talog je spojen sa supernatantom. Apsoorbancija uzroka mjerena je pri 530 nm u plastičnim kivetama.

### **2.2.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VODIKOVOG PEROKSIDA**

Koncentracija vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mjerena je prema protokolu Mukherjee i Choudhuri (1983). Biljni materijal je homogeniziran u tekućem dušiku i oko 0,1 g dobivenog praha je prebačeno u Eppendorf kivetu od 2 mL. U kivetu je zatim dodan 1 mL hladnog acetona. Jedan mililitar hladnog acetona bez tkiva se uzima kao slijepa proba i svi daljnji postupci odnose se i na slijepu probu. Uzorci se nakon mijenjanja na Vorteksu centrifugiraju 3 minute na 1 000 rcf pri 4°C. Dobiveni supernatant je odvojen u drugu Eppendorf kivetu od 2 mL, uz dodatak 400  $\mu\text{L}$  titan-sulfata i 500  $\mu\text{L}$  koncentriranog amonijevog hidroksida. Talog dobiven centrifugiranjem uzoraka, 10 minuta pri 15 000 rcf, otopljen je dodatkom 1 mL 2M sumporne kiseline. Nakon ponovnog mijenjanja na vorteksu i centrifugiranja 10 minuta na 15 000 rcf pri 4°C, bistri dio je mikropipetom prebačen u kivetu sa sušenim dnom, te je mjerenje

apsorbancije vr-eno sa spektrofotometrom na 415 nm. Dobiveni rezultati su izrafleni u nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> svjeffe tvari.

### **2.2.7. ODREĐIVANJE STUPNJA LIPIDNE PEROKSIDACIJE**

Stupanj o-te enja membrana utvr en je kao koli ina produkata lipidne peroksidacije koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) metodom Verma i Dubey (2003). Biljni materijal je homogeniziran u teku em du-iku, te je odvagano oko 0,2 g dobivenog praha i preba eno u Eppendorf kivetu. U kivetu je zatim dodano 1 mL 0,1% trikloroctene kiseline (TCA). Sadrflaj kivete je vorteksiran i centrifugiran na 6 000 rcf pri 4°C, 5 minuta. Nakon centrifugiranja odvojeno je 0,5 mL supernatanta u kivetu s epom na navoj, te je dodano 1 mL 0,5% TBA u 20% TCA. Ista otopina sluffi kao slijepa proba. Uzorci i slijepa proba su promije-ani na Vorteksu i stavljeni u vodenu kupelj na 95°C, 30 minuta. Nakon toge su ohla eni na ledu i centrifugirani 15 minuta na 18 000 rcf pri 4°C. Dobiveni supernatant je presipan u plasti nu kivetu sa suflenim dnom, te se pomo u spektrofotometra mjerena apsorbanacija na 532 i 600 nm.

### **2.2.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA**

Odvagano je 0,1 g biljnog tkiva i preba eno u ledom ohla eni tarionik te homogenizirano uz dodatak magnezijevog-hidrogenkarbonata i 10 mL 80%-tnog acetona. Nakon ekstrakcije u mraku pri 4°C uzorci su centrifugirani na 5000 rcf 10 minuta. Dobiveni supernatanti su skupljani u plasti nu graduiranu kivetu od 15 mL, a uzorci reekstrahirani sa 2 ml acetona do obezbojenja tkiva. Supernatant je kori-ten za odre ivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata spektrofotometrijski u staklenim kivetama pri 470 nm, 644,8 nm i 661,6 nm. Koncenrtacija pigmenata u tkivu gra-ka je izra unata prema navedenim izrazima (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Klorofil } a \text{ (mg/g)} = (11,24A_{661,6 \text{ nm}} - 2,04 A_{644,8 \text{ nm}})V/m \times 10^3$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (mg/g)} = (20,13A_{644,8 \text{ nm}} - 4,19A_{661,6 \text{ nm}})V/m \times 10^3$$

$$\text{Ukupni klorofil (mg/g)} = (7,05A_{661,6 \text{ nm}} + 18,09A_{644,8 \text{ nm}})V/m \times 10^3$$

$$\text{-karoten (mg/g)} = (1000A_{470} \text{ nm} - 1,90 \times (11,24A_{661,6} \text{ nm} - 2,04 A_{644,8} \text{ nm}) - 63,14 \times (20,13A_{644,8} \text{ nm} - 4,19A_{661,6} \text{ nm}))V / 214 \times m \times 10^3$$

### 2.3. STATISTIČKA ANALIZA

Dobiveni podaci su statistički obrađeni aplikacijama Microsoft Office Excel 2007 i Portable Statistica 8. Provedena je analiza varijance (ANOVA), a za utvrđivanje značajnosti razlika pojedinih tretmana na razini  $p < 0,05$  je korišten LSD test. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n_{\text{kontrola}}=5$ ,  $n_{\text{tretman}}=3$ ).

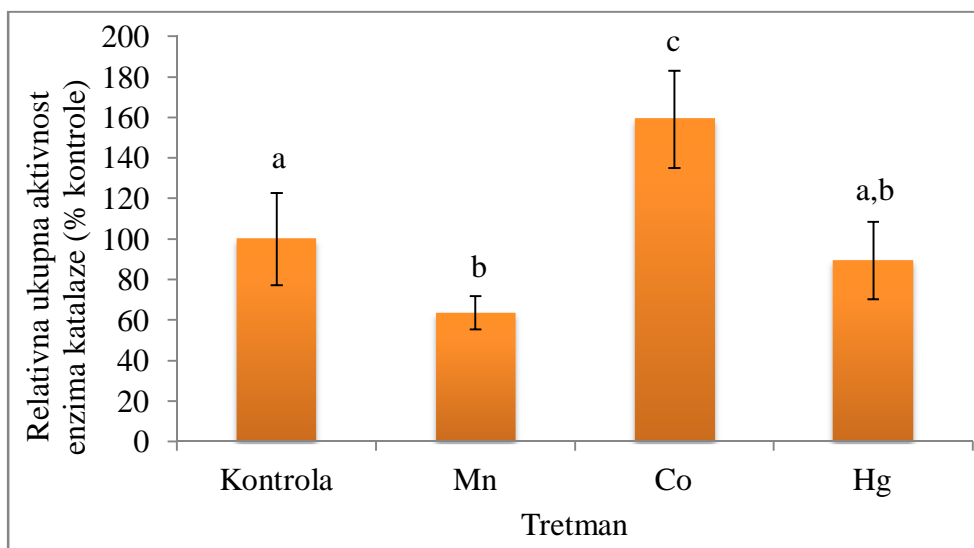
### 3. REZULTATI

#### 3.1. AKTIVNOST ENZIMA KATALAZE

Ukupna aktivnost enzima katalaze u korijenu biljaka tretiranih flivom smanjila se za 10,6% u odnosu na kontrolu, ali to smanjenje nije bilo statisti ki zna ajno. Statisti ki zna ajno smanjenje aktivnosti enzima od 36,4%, u odnosu na kontrolu, zabiljeffeno je u tretmanu s manganom. Zna ajan porast aktivnosti zabiljefflen je u korijenu biljaka tretiranih kobaltom (59,1%), slika 2.

Tablica 2. Vrijednosti ukupne aktivnosti katalaze ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svjeffe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanu manganom, kobaltom i flivom. Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
Kontrola	1,6	1,64	1,13	1,78	1,04	1,44 $\pm$ 0,33
Mn	0,85	0,85	1,05	-	-	0,92 $\pm$ 0,12
Co	2,2	2	2,67	-	-	2,29 $\pm$ 0,34
Hg	1,24	1,04	1,58	-	-	1,29 $\pm$ 0,28

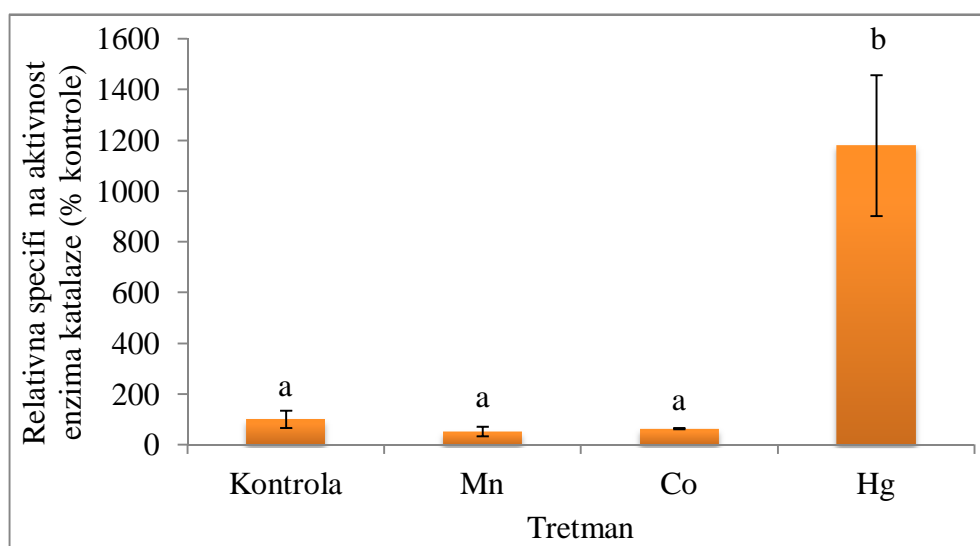


Slika 2. Ukupna aktivnost enzima katalaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izraffeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju prema LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifi na aktivnost enzima katalaze u korijenu se nije statisti ki zna ajno promijenila pri tretmanima manganom i kobaltom u usporedbi s netretiranim biljkama (tablica 3). Statisti ki zna ajno pove anje aktivnosti katalaze za 11 puta u odnosu na kontrolu, utvr eno je kod biljaka tretiranih flivom (slika 3).

Tablica 3. Vrijednosti specifi ne aktivnosti katalaze u korijenu ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina) vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanu manganom, kobaltom i flivom. Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,701	0,356	0,357	0,559	0,344	0,46 $\pm$ 0,16
<b>Mn</b>	0,231	0,163	0,33	-	-	0,24 $\pm$ 0,08
<b>Co</b>	0,301	0,282	0,293	-	-	0,29 $\pm$ 0,01
<b>Hg</b>	5,229	4,309	6,851	-	-	5,46 $\pm$ 1,29

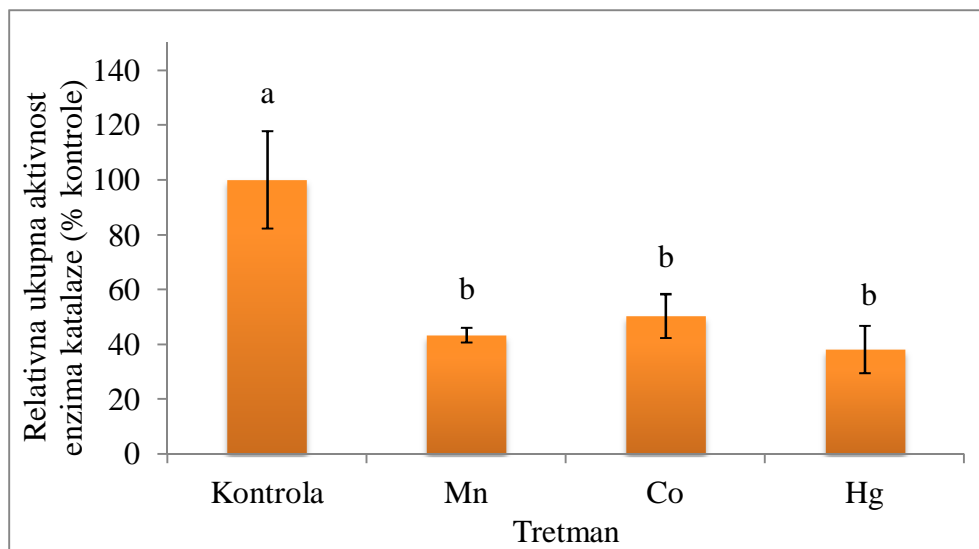


Slika 3. Specifi na aktivnost enzima katalaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Djelovanjem metala do-lo je do zna ajnog smanjenja ukupne aktivnosti enzima katalaze u listu. Najnifla vrijednost, za 61,9% nifla u odnosu na kontrolu, izmjerena je kod biljaka tretiranih flivom. Vrijednosti izmjerene kod biljaka tretiranih kobaltom i manganom su za 49,7% odnosno 56,8% nife u odnosu na kontrolne vrijednosti (slika 4).

Tablica 4. Vrijednosti ukupne aktivnosti katalaze ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	3,154	3,918	4,829	3,458	3,367	3,745 $\pm$ 0,666
<b>Mn</b>	1,656	1,7	1,507	-	-	1,621 $\pm$ 0,100
<b>Co</b>	1,983	2,123	1,548	-	-	1,884 $\pm$ 0,299
<b>Hg</b>	1,057	1,584	1,646	-	-	1,429 $\pm$ 0,323



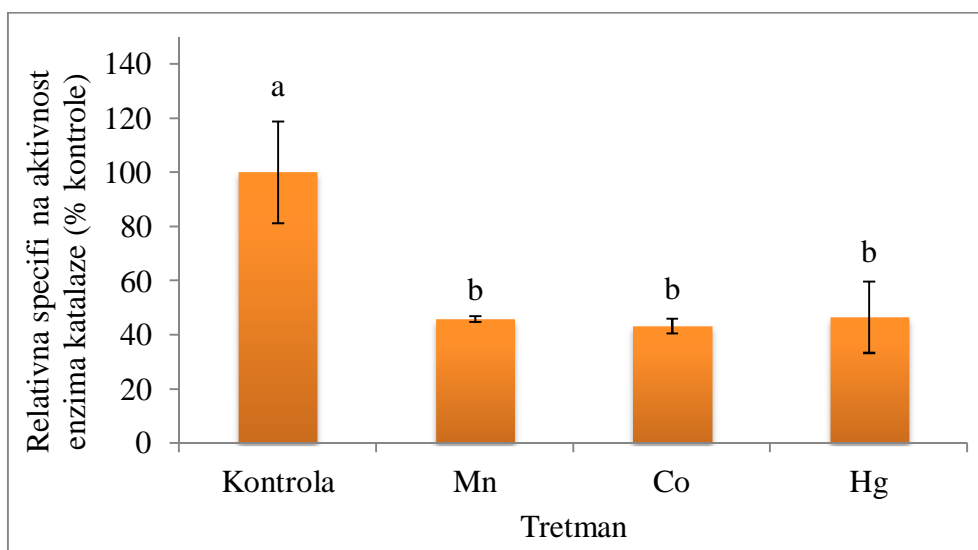
Slika 4. Ukupna aktivnost enzima katalaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost katalaze u listu se statistički značajno smanjila pri sva tri tretmana u odnosu na netretirane biljke (tablica 5). Tretman manganom smanjio je specifičnu aktivnost katalaze u listu za 54,3%, kobalt za 56,8% te fliva za 53,7% u usporedbi s kontrolnim biljkama. Sva tri tretmana međusobno se ne razlikuju (slika 5).



Tablica 5. Vrijednosti specifične aktivnosti katalaze ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina) u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,468	0,642	0,682	0,495	0,465	0,550 $\pm$ 0,103
<b>Mn</b>	0,25	0,258	0,247	-	-	0,252 $\pm$ 0,005
<b>Co</b>	0,239	0,252	0,222	-	-	0,238 $\pm$ 0,015
<b>Hg</b>	0,175	0,315	0,277	-	-	0,255 $\pm$ 0,072



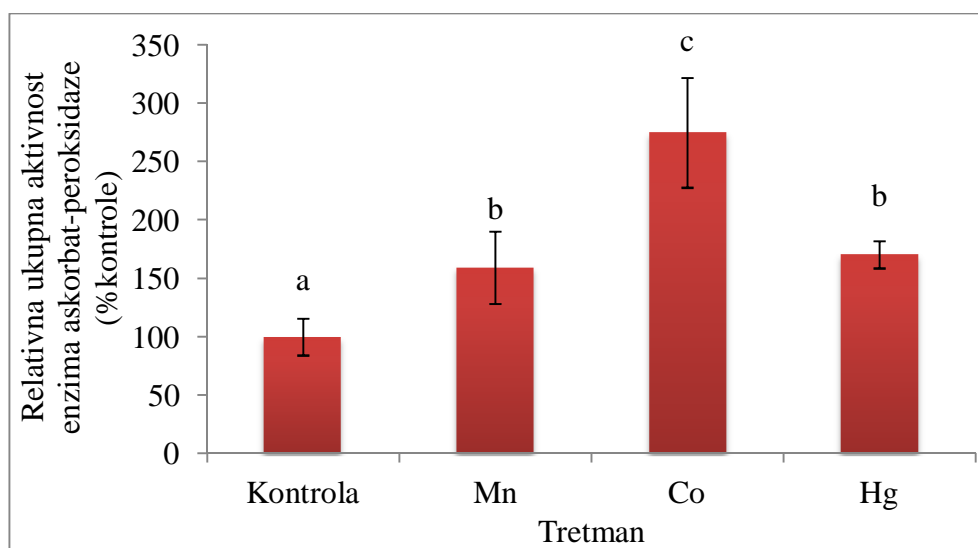
Slika 5. Specifična aktivnost enzima katalaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i živom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.2. AKTIVNOST ENZIMA ASKORBAT-PEROKSIDAZE

Ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze u korijenu se povećala nakon tretmana s metalima u usporedbi s kontrolnim biljkama (tablica 6). Tretmani manganom i živom su uzrokovali statistički značajno povećanje aktivnosti od 59,4% odnosno 70,2% u usporedbi s kontrolom, te se prema LSD testu međusobno ne razlikuju. Tretman kobaltom je uzrokovao najveće povećanje aktivnosti od 174,8% u odnosu na kontrolu (slika 6).

Tablica 6. Vrijednosti ukupne aktivnosti-askorbat peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	2,048	2,06	2,312	2,948	2,237	2,32 $\pm$ 0,36
<b>Mn</b>	3,001	4,441	3,663	-	-	3,70 $\pm$ 0,72
<b>Co</b>	6,507	5,233	7,403	-	-	6,38 $\pm$ 1,09
<b>Hg</b>	3,704	4,237	3,917	-	-	3,95 $\pm$ 0,26

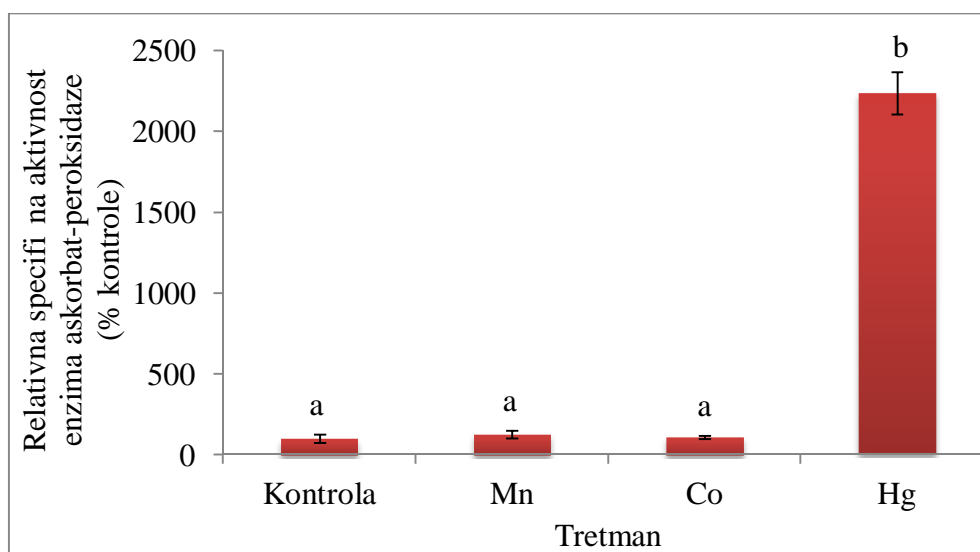


Slika 6. Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze u korijenu se nije statistički značajno promijenila kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom (tablica 7). Statistički značajno povećanje specifične aktivnosti askorbat-peroksidaze, 22 puta u odnosu na kontrolu, utvrđeno je kod biljaka tretiranih flivom (slika 7).

Tablica 7. Vrijednosti specifične aktivnosti askorbat-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,897	0,449	0,728	0,925	0,7386	0,75 $\pm$ 0,19
<b>Mn</b>	0,818	0,856	1,151	-	-	0,94 $\pm$ 0,18
<b>Co</b>	0,893	0,738	0,813	-	-	0,82 $\pm$ 0,08
<b>Hg</b>	15,657	17,56	16,951	-	-	16,72 $\pm$ 0,97

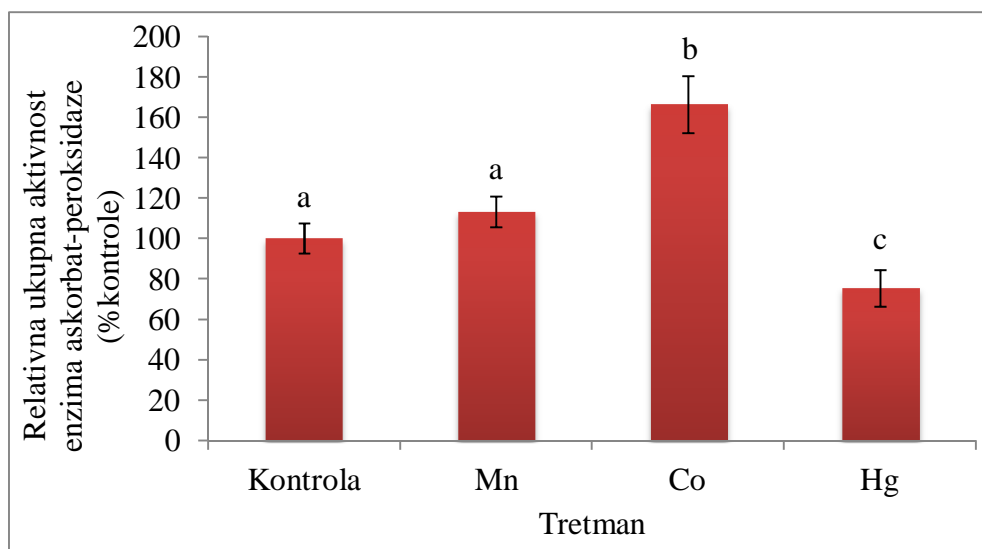


Slika 7. Specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze u listu se nije statistički značajno razlikovala kod biljaka tretiranih manganom i kontrolnih biljaka. Statistički značajno povećanje aktivnosti od 66,3% u odnosu na kontrolu zabilježeno je pri tretmanu kobaltom, dok je statistički značajno smanjenje aktivnosti od 24,6% utvrđeno pri tretmanu flivom (slika 8).

Tablica 8. Vrijednosti ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* L pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	2,411	2,225	2,605	2,462	2,171	2,375 $\pm$ 0,177
<b>Mn</b>	2,874	2,686	2,509	-	-	2,690 $\pm$ 0,182
<b>Co</b>	3,982	4,27	3,602	-	-	3,951 $\pm$ 0,335
<b>Hg</b>	1,622	1,717	2,033	-	-	1,791 $\pm$ 0,215

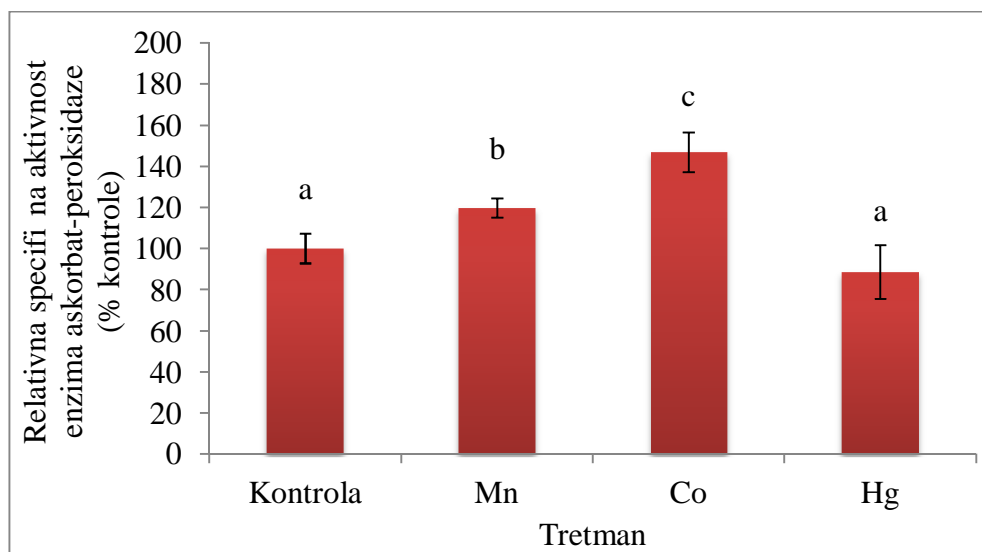


Slika 8. Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze u listu se statistički nije značajno razlikovala između biljaka tretiranih flivom i kontrolnih biljaka. Statistički značajno povećanje aktivnosti enzima od 19,7% utvrđeno je pri tretmanu manganom i od 46,7% pri tretmanu kobaltom u odnosu na kontrolu (slika 9).

Tablica 9. Vrijednosti specifi ne aktivnosti askorbat-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$ ) u listu vrste *Pisum sativum* L pri tretmanima razli itim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,358	0,363	0,365	0,354	0,305	0,349 $\pm$ 0,025
<b>Mn</b>	0,437	0,407	0,41	-	-	0,418 $\pm$ 0,016
<b>Co</b>	0,476	0,518	0,543	-	-	0,512 $\pm$ 0,033
<b>Hg</b>	0,257	0,339	0,332	-	-	0,309 $\pm$ 0,045



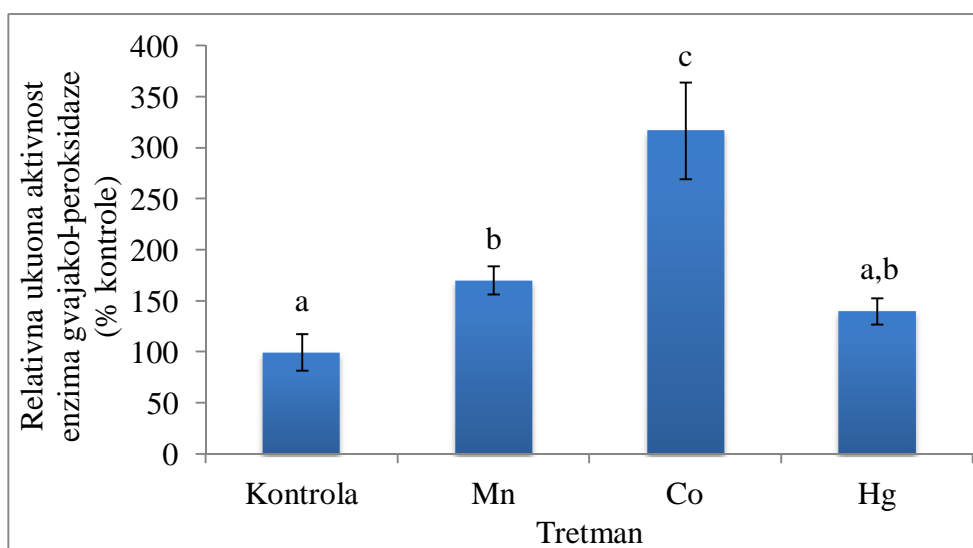
Slika 9. Specifi na aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.3. AKTIVNOST ENZIMA GVAJAKOL-PEROKSIDAZE

Ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u korijenu, bila je statisti ki zna ajno pove ana u tretmanu Mn i Co, aktivnost je porasla za 70,4%, odnosno 216,7% u odnosu na kontrolne biljke (tablica 10). Kod biljaka tretiranih flivom nije bilo statisti ki zna ajne promjene aktivnosti u odnosu na kontrolu (slika 10).

Tablica 10. Vrijednosti ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	1,714	1,242	1,884	1,877	1,393	1,622 $\pm$ 0,290
<b>Mn</b>	2,538	2,966	2,807	-	-	2,765 $\pm$ 0,224
<b>Co</b>	5,868	5,213	4,335	-	-	5,139 $\pm$ 0,769
<b>Hg</b>	2,477	2,288	2,061	-	-	2,275 $\pm$ 0,208

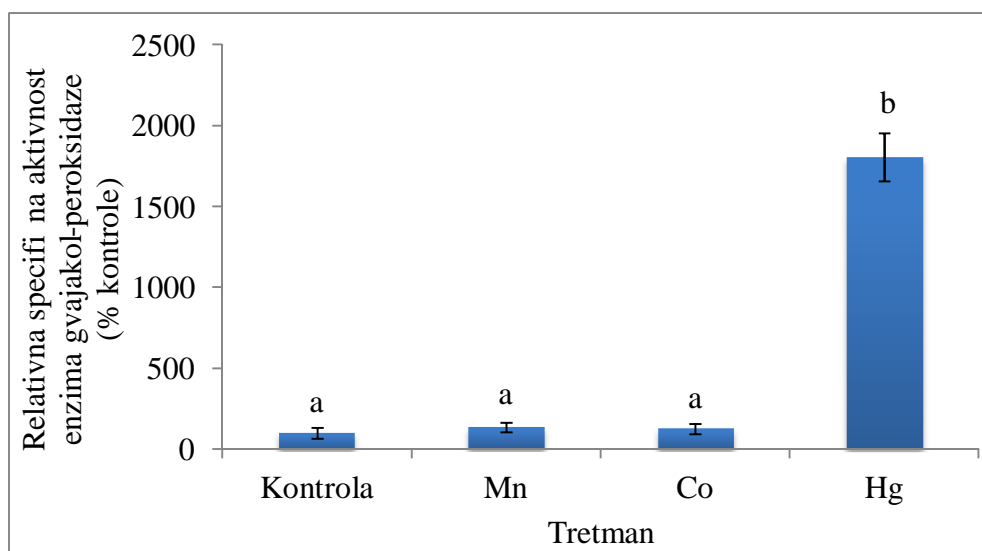


Slika 10. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ )

Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze u korijenu, nije se statistički značajno razlikovala između biljaka tretiranih manganom i kobaltom, te netretiranih biljaka (tablica 11). Do statistički značajnog povećanja aktivnosti (17 puta) u odnosu na kontrolu došlo je u tretmanu flivom ( $9,62 \pm 0,79 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteina), slika 11.

Tablica 11. Vrijednosti specifi ne aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima razli itim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x}\pm\text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$\bar{x}\pm\text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,751	0,272	0,593	0,589	0,46	0,53 $\pm$ 0,18
<b>Mn</b>	0,688	0,572	0,882	-	-	0,71 $\pm$ 0,16
<b>Co</b>	0,806	0,735	0,476	-	-	0,67 $\pm$ 0,17
<b>Hg</b>	10,471	9,483	8,919	-	-	9,62 $\pm$ 0,79

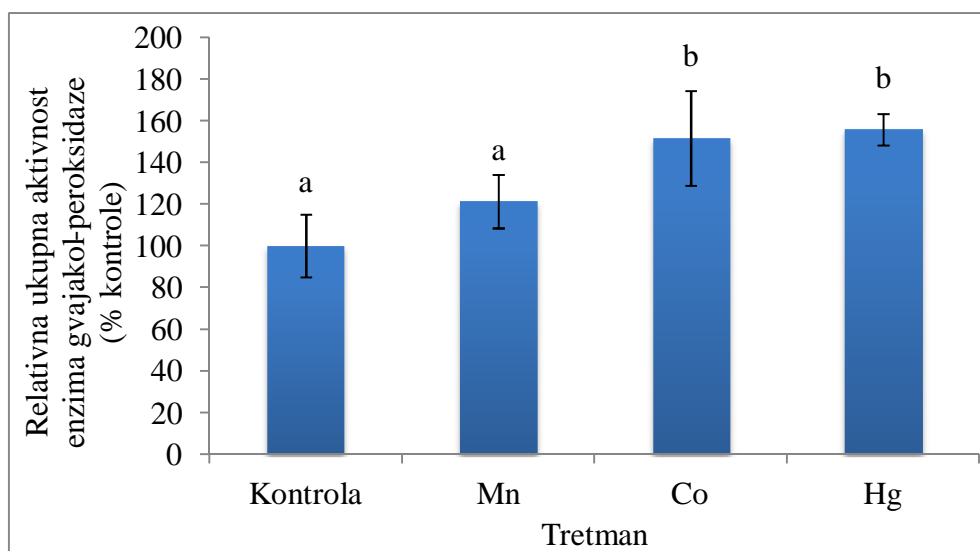


Slika 11. Specifi na aktivnost gvajakol-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci i odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna ni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu, nije se statisti ki zna ajno promijenila nakon tretmana manganom, iako je zabiljeflen porast od 21,2% u odnosu na kontrolu. Statisti ki zna ajno pove anje aktivnosti je utvr eno u tretmanu kobaltom (51,8%) i flivom (55,8%) u odnosu na kontrolu (slika 12).

Tablica 12. Vrijednosti ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,421	0,444	0,582	0,547	0,435	0,486 $\pm$ 0,073
<b>Mn</b>	0,659	0,54	0,568	-	-	0,589 $\pm$ 0,062
<b>Co</b>	0,828	0,767	0,614	-	-	0,737 $\pm$ 0,110
<b>Hg</b>	0,716	0,771	0,785	-	-	0,757 $\pm$ 0,036



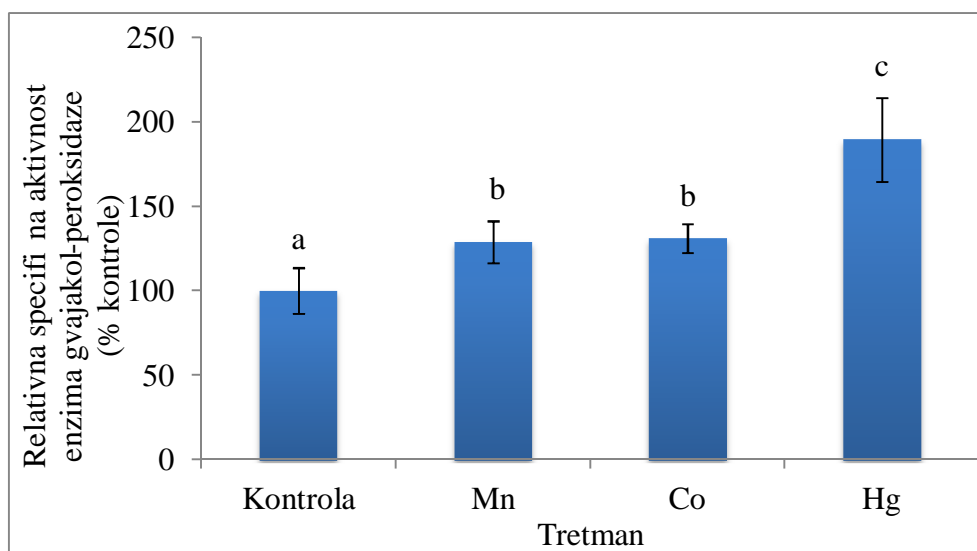
Slika 12. Ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu biljaka tretiranih metalima u usporedbi s kontrolnim biljkama (tablica 13). Statistički značajno povećanje aktivnosti (28,8%) je zabilježeno u tretmanu manganom, 30,8% u tretmanu kobaltom i povećanje od 89,2% u tretmanu flivom u odnosu na kontrolu, što je vidljivo na slici 13.



Tablica 13. Vrijednosti specifi ne aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina) u listu vrste *Pisum sativum* L pri tretmanima razli itim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,062	0,072	0,082	0,078	0,06	0,071 $\pm$ 0,009
<b>Mn</b>	0,099	0,082	0,093	-	-	0,091 $\pm$ 0,008
<b>Co</b>	0,1	0,091	0,088	-	-	0,093 $\pm$ 0,006
<b>Hg</b>	0,118	0,153	0,132	-	-	0,134 $\pm$ 0,017



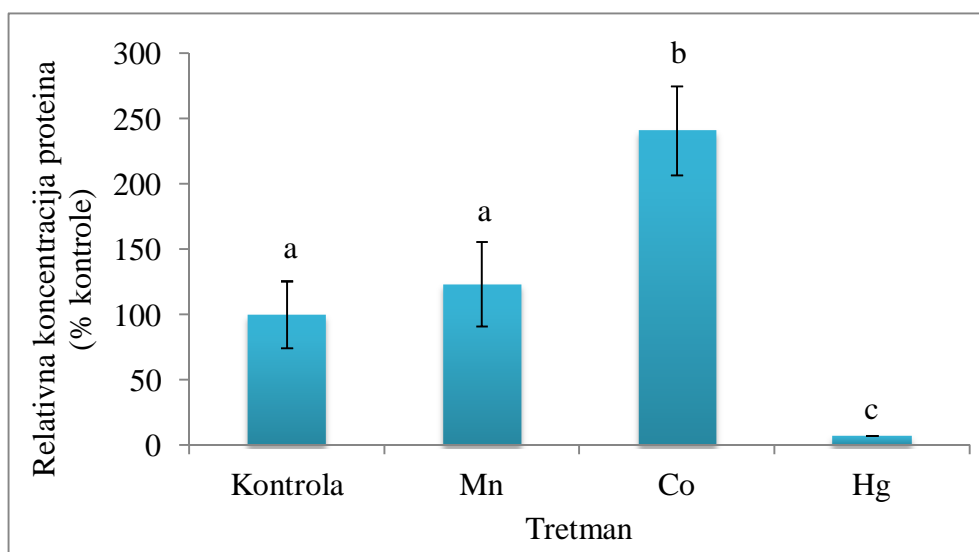
Slika 13. Specifi na aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.4. KONCENTRACIJA PROTEINA

Koncentracija proteina u korijenu vrste *Pisum sativum* se nije statisti ki zna ajno promijenila pri tretmanu manganom u odnosu na netretirane biljke (tablica 14). Statisti ki zna ajan porast koncentracije proteina (140,6%) u odnosu na kontrolu je zabiljefen pri tretmanu kobaltom, dok je statisti ki zna ajan pad koncentracije (92,8%) utvr en kod biljaka tretiranih flivom (slika 14).

Tablica 14. Koncentracija proteina (mg proteina g<sup>-1</sup> svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost ± standardna devijacija (x±SD).

Tretman	Korijen					x±SD
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	2,282	4,581	3,175	3,184	3,029	3,250±0,831
<b>Mn</b>	3,665	5,185	3,18	-	-	4,010±1,046
<b>Co</b>	7,28	7,089	9,096	-	-	7,822±1,107
<b>Hg</b>	0,236	0,241	0,231	-	-	0,236±0,005

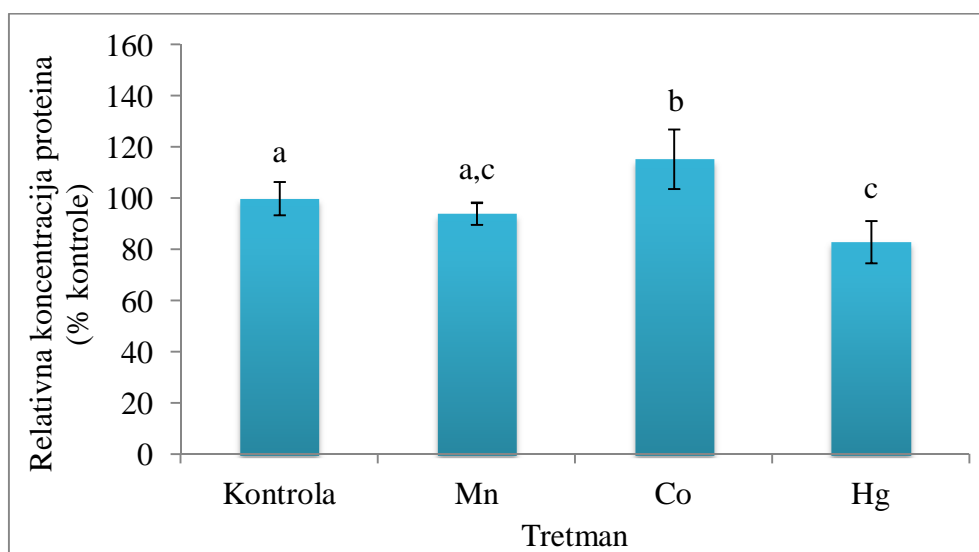


Slika 14. Koncentracija proteina u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu (p=0,05).

U listu se koncentracija proteina nije statistički značajno razlikovala između biljaka tretiranih manganom i netretiranih biljaka, budući da je utvrđeno smanjenje koncentracije od 5,9%. Statistički značajno povećanje koncentracije (15,4%) utvrđeno je pri tretmanu kobaltom, dok je statistički značajno smanjenje koncentracije proteina od 17,0% zabilježeno pri tretmanu flivom. Koncentracije proteina utvrđene kod biljaka tretiranih manganom i flivom nisu se razlikovale prema LSD testu (slika 15).

Tablica 15. Koncentracija proteina (mg proteina g<sup>-1</sup> svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost ± standardna devijacija (x±SD).

Tretman	List					x±SD
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	6,734	6,101	7,076	6,984	7,327	6,826±0,444
<b>Mn</b>	6,617	6,572	6,088	-	-	6,426±0,293
<b>Co</b>	8,288	8,393	6,958	-	-	7,880±0,800
<b>Hg</b>	6,039	5,02	5,94	-	-	5,666±0,561



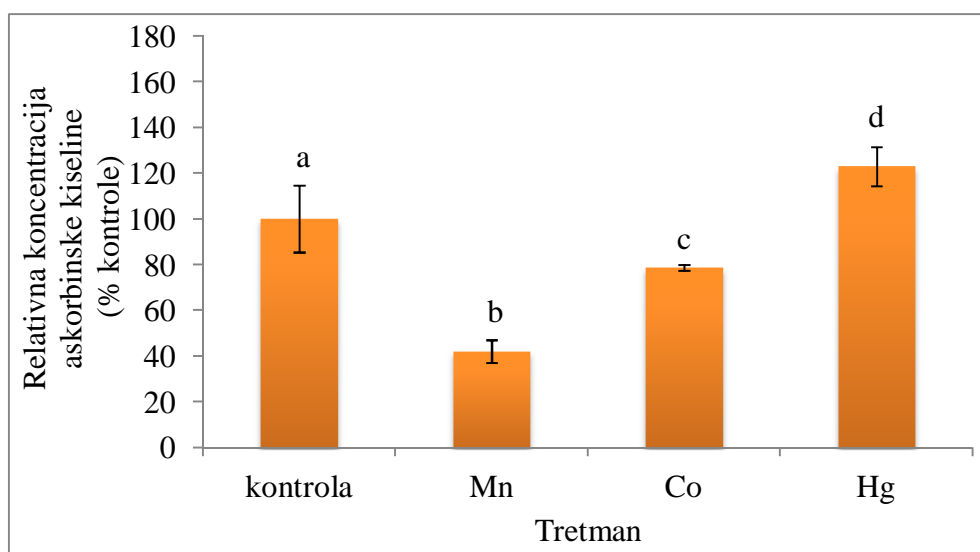
Slika 15. Koncentracija proteina u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima mangnom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu (p=0,05).

### 3.5. KONCENTRACIJA ASKORBINSKE KISELINE

Nakon tretiranja klijanaca graška manganom i kobaltom u korijenu je došlo do smanjenja koncentracije askorbinske kiseline u usporedbi s netretiranim biljkama (tablica 16). Najveće smanjenje (58%) utvrđeno je pri tretmanu s manganom. U korijenu biljaka tretiranih flivom zabilježen je statistički značajan porast koncentracije askorbinske kiseline za 22,8% u odnosu na kontrolu (slika 16).

Tablica 16. Koncentracija askorbinske kiseline ( $\text{nmol g}^{-1}$  svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	118,047	122,676	113,887	151,936	104,581	122,225 $\pm$ 17,897
<b>Mn</b>	51,133	45,34	57,535	-	-	51,336 $\pm$ 6,100
<b>Co</b>	94,789	95,661	97,825	-	-	96,092 $\pm$ 1,564
<b>Hg</b>	159,677	139,033	151,83	-	-	150,180 $\pm$ 10,420

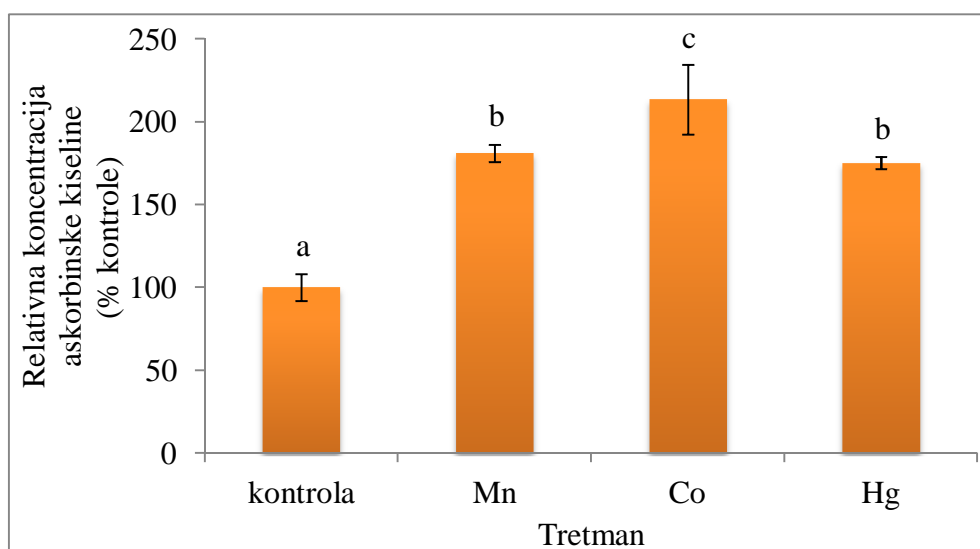


Slika 16. Koncentracija askorbinske kiseline u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Koncentracija askorbinske kiseline u listu se značajno povećala pri sva tri tretmana. Najveće povećanje (113,3%) u odnosu na kontrolu je utvrđeno kod biljaka tretiranih kobaltom. Tretmani manganom i flivom su također doveli do statistički značajnog povećanja koncentracije askorbinske kiseline od 80,9 odnosno 75,2% u odnosu na netretirane biljke (slika17).

Tablica 17. Koncentracija askorbinske kiseline ( $\text{nmol g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	102,198	126,996	116,947	115,824	122,363	116,866 $\pm$ 9,341
<b>Mn</b>	205,235	211,931	217,205	-	-	211,457 $\pm$ 5,999
<b>Co</b>	220,968	264,018	262,905	-	-	249,297 $\pm$ 24,539
<b>Hg</b>	208,129	199,952	206,307	-	-	204,796 $\pm$ 4,292



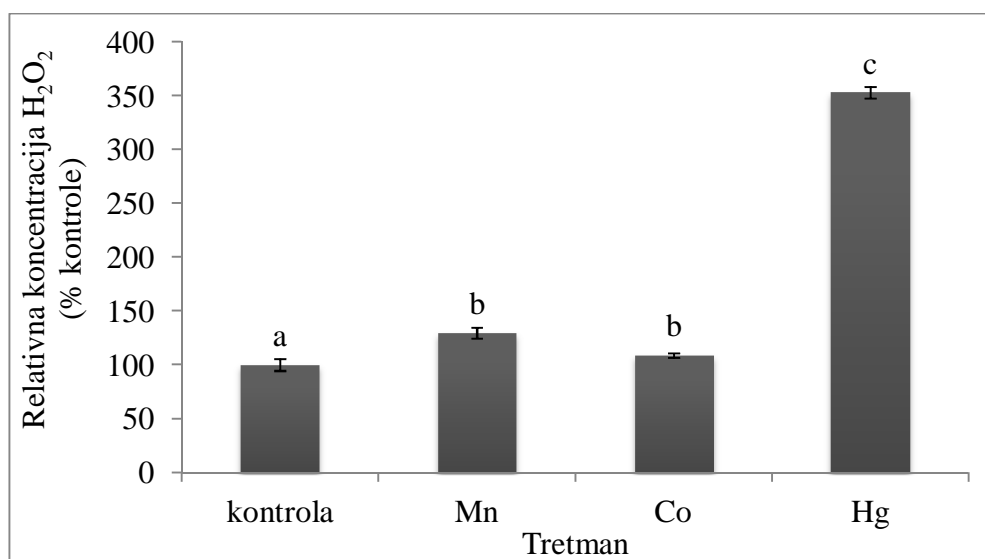
Slika 17. Koncentracija askorbinske kiseline u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.6. KONCENTRACIJA VODIKOVOG PEROKSIDA ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

U korijenu svih tretiranih biljaka je utvrđen porast koncentracije vodikovog peroksida u odnosu na kontrolu (tablica 18). Najveće povećanje je zabilježeno kod tretmana flivom, gdje je koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  bila za 252,9% veća nego kod netretiranih biljaka. Povećanja koncentracije od 29,7 i 8,7% u odnosu na kontrolu (slika 18) su utvrđena pri tretmanu manganom, odnosno kobaltom.

Tablica 18. Koncentracija vodikovog peroksida ( $\text{nmol g}^{-1}$  svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	1,062	1,178	1,193	1,075	1,172	1,136 $\pm$ 0,062
<b>Mn</b>	1,539	1,428	1,455	-	-	1,474 $\pm$ 0,057
<b>Co</b>	1,248	1,253	1,206	-	-	1,236 $\pm$ 0,025
<b>Hg</b>	4,05	4,041	3,939	-	-	4,010 $\pm$ 0,061

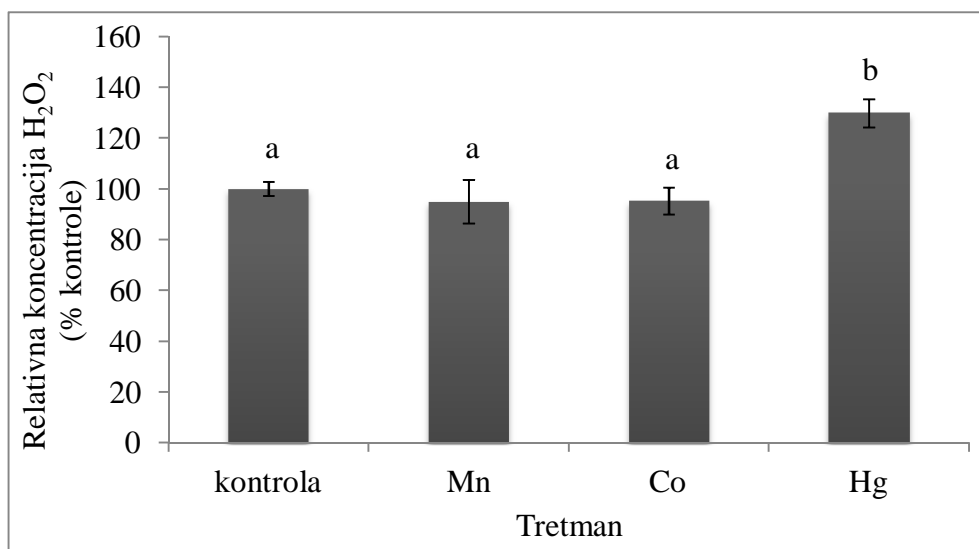


Slika 18. Koncentracija vodikovog peroksida u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

U listu biljaka tretiranih flivom utvrđeno je statistički značajan porast koncentracije vodikovog peroksida u odnosu na kontrolu. Kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom došlo je do pada koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, te se ta dva tretmana prema LSD testu nisu međusobno razlikovala (slika 19).

Tablica 19. Koncentracija vodikovog peroksida ( $\text{nmol g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	List					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	1,705	1,739	1,628	1,683	1,74	1,699 $\pm$ 0,046
<b>Mn</b>	1,524	1,782	1,532	-	-	1,613 $\pm$ 0,146
<b>Co</b>	1,601	1,716	1,532	-	-	1,619 $\pm$ 0,089
<b>Hg</b>	2,125	2,309	2,183	-	-	2,205 $\pm$ 0,093



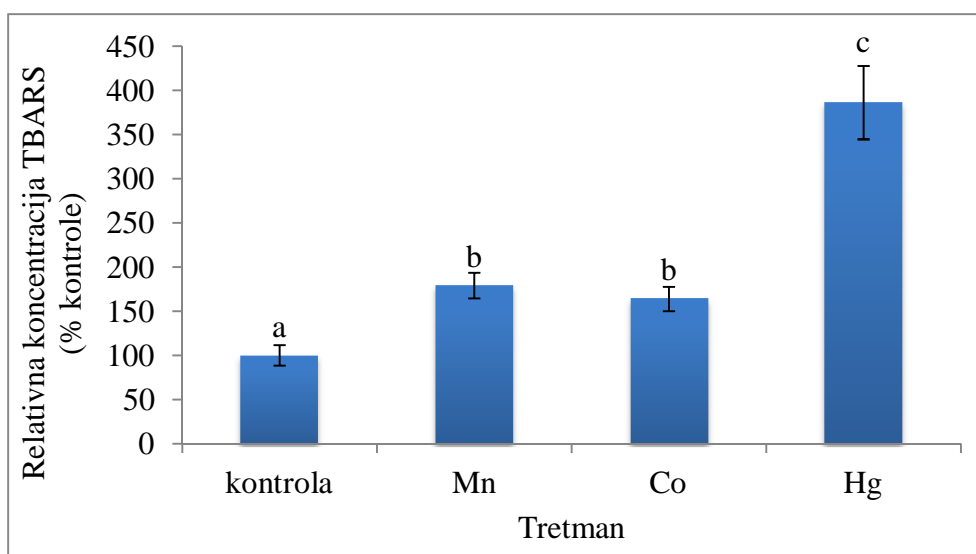
Slika 19. Koncentracija vodikovog peroksida u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i živom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.7. KONCENTRACIJA PRODUKATA LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije u korijenu vrste *Pisum sativum* se statistički značajno povećala pri sva tri tretmana u odnosu na netretirane biljke (tablica 20). Najveći sadržaj TBARS, 286,1% veći nego kod kontrolnih biljaka, utvrđen je kod biljaka tretiranih živom, dok je najmanji sadržaj TBARS utvrđen u tretmanu kobaltom (slika 20).

Tablica 20. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije ( $\text{nmol g}^{-1}$  svježe tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					x $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	2,65	2,644	3,36	3,089	3,323	3,013 $\pm$ 0,350
<b>Mn</b>	5,902	5,158	5,124	-	-	5,395 $\pm$ 0,439
<b>Co</b>	5,425	4,742	4,65	-	-	4,939 $\pm$ 0,423
<b>Hg</b>	10,243	12,662	12,003	-	-	11,636 $\pm$ 1,250



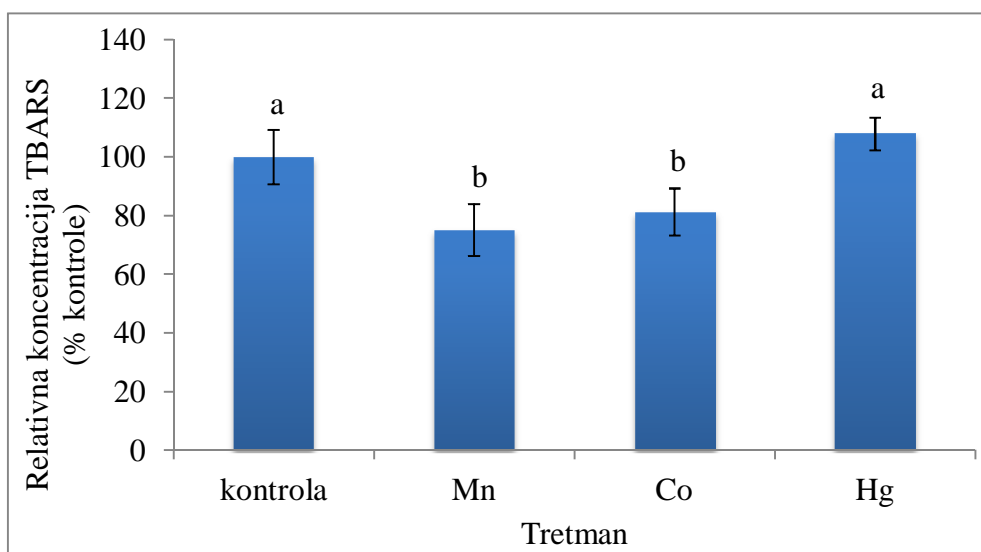
Slika 20. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

U listu se koncentracija produkata lipidne peroksidacije povećala pri tretmanu flivom i nije se prema LSD testu značajno razlikovala od koncentracije utvrđene kod netretiranih biljaka. Kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom je utvrđeno smanjenje sadržaja TBARS u odnosu na kontrolu, te se ta dva tretmana prema LSD testu nisu međusobno razlikovali (slika 21).



Tablica 21. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (nmol g<sup>-1</sup> svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost ± standardna devijacija (x±SD).

Tretman	List					x±SD
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	7,284	7,066	8,508	7,126	8,365	7,670±0,706
<b>Mn</b>	5,204	6,522	5,571	-	-	5,766±0,679
<b>Co</b>	6,945	5,897	5,858	-	-	6,233±0,616
<b>Hg</b>	8,597	7,783	8,439	-	-	8,273±0,431



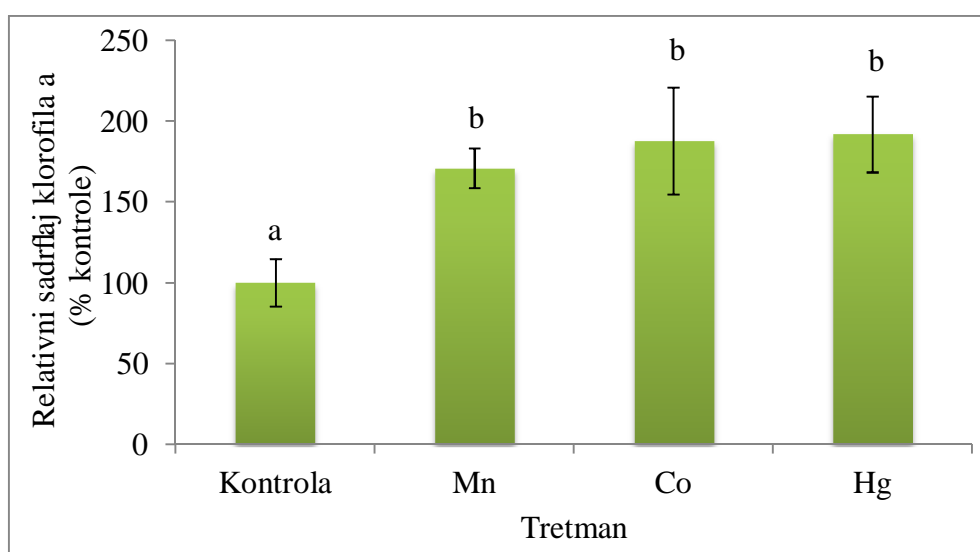
Slika 21. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu (p=0,05).

### 3.8. SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

Sadržaj klorofila *a* u listu graška se značajno razlikovao između tretiranih biljaka i kontrole (tablica 22). Do povećanja je došlo kod sva tri tretmana, pri čemu je najveće zabilježeno kod biljaka tretiranih flivom. Sadržaj klorofila *a* se povećao od 70,6%, kod biljaka tretiranih manganom, do 91,5% kod biljaka tretiranih flivom, u odnosu na netretirane biljke. Prema LSD testu tretmani se nisu međusobno razlikovali (slika 22).

Tablica 22. Vrijednosti sadržaja klorofila *a* ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Klorofil a					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
Kontrola	0,535	0,738	0,757	0,605	0,61	0,649 $\pm$ 0,094
Mn	1,187	1,027	1,111	-	-	1,108 $\pm$ 0,080
Co	1,452	1,027	1,177	-	-	1,219 $\pm$ 0,215
Hg	1,265	1,083	1,385	-	-	1,244 $\pm$ 0,152

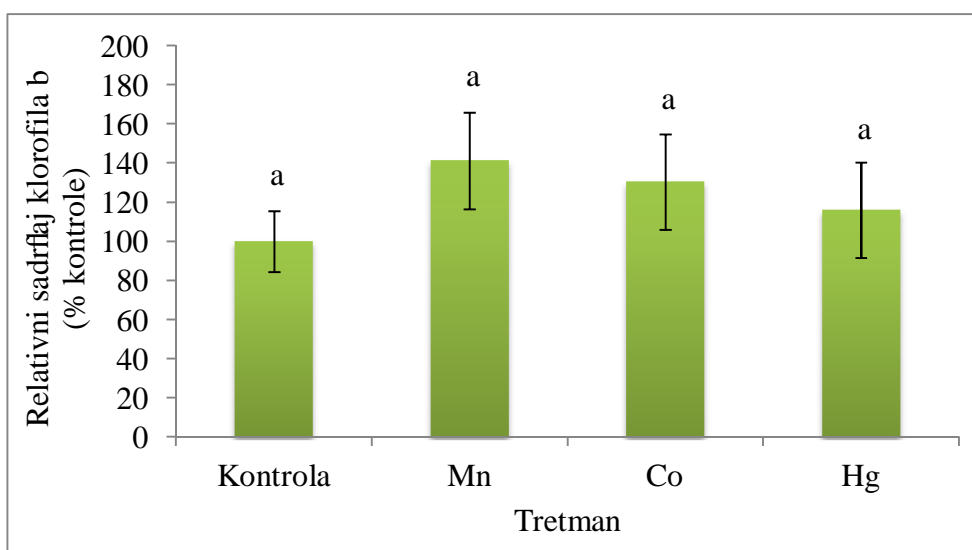


Slika 22. Sadržaj klorofila *a* u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i živom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Primjenjeni tretmani nisu imali značajnog utjecaja na sadržaj klorofila *b* i karotenoida u listu grahaka. Kod svih tretiranih biljaka je utvrđeno povećanje sadržaja klorofila *b* (tablica 23). Najmanje povećanje od 15,8% je uzrokovao tretman živom, dok je najveće (41,1%) zabilježeno kod biljaka tretiranih manganom (slika 23).

Tablica 23. Vrijednosti sadržaja klorofila *b* (Chl *b*) ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe tvari ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Chl <i>b</i>					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,818	0,712	0,789	1,044	0,964	0,865 $\pm$ 0,135
<b>Mn</b>	1,066	1,465	1,133	-	-	1,221 $\pm$ 0,213
<b>Co</b>	1,04	0,975	1,369	-	-	1,128 $\pm$ 0,213
<b>Hg</b>	1,187	0,773	1,048	-	-	1,003 $\pm$ 0,210

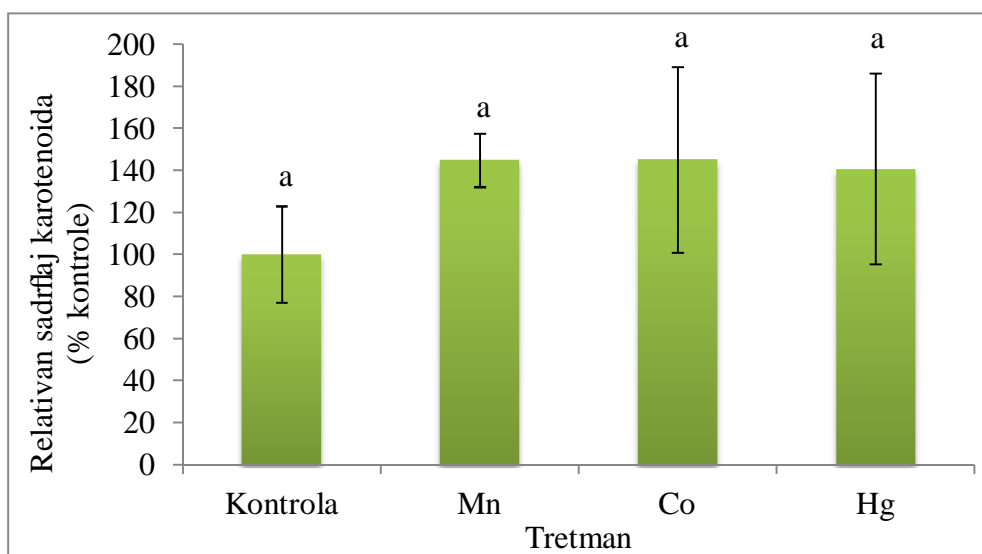


Slika 23. Sadržaj klorofila *b* u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrađeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

I sadržaj karotenoida se tako povećao u odnosu na netretirane biljke (tablica 24). Kod biljaka tretiranih kobaltom je utvrđeno za 0,3% veći sadržaj karotenida, nego kod biljaka tretiranih manganom. Biljke tretirane flivom su imale 4,4% manji sadržaj karotenoida u odnosu na biljke tretirane kobaltom. Tretmani se prema LSD testu nisu međusobno razlikovali (slika 24).

Tablica 24. Vrijednosti sadržaja karotenoida (Car) ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $x \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Car					$x \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	0,135	0,157	0,197	0,111	0,125	0,145 $\pm$ 0,033
<b>Mn</b>	0,23	0,193	0,208	-	-	0,210 $\pm$ 0,018
<b>Co</b>	0,285	0,174	0,173	-	-	0,211 $\pm$ 0,064
<b>Hg</b>	0,226	0,13	0,257	-	-	0,204 $\pm$ 0,066

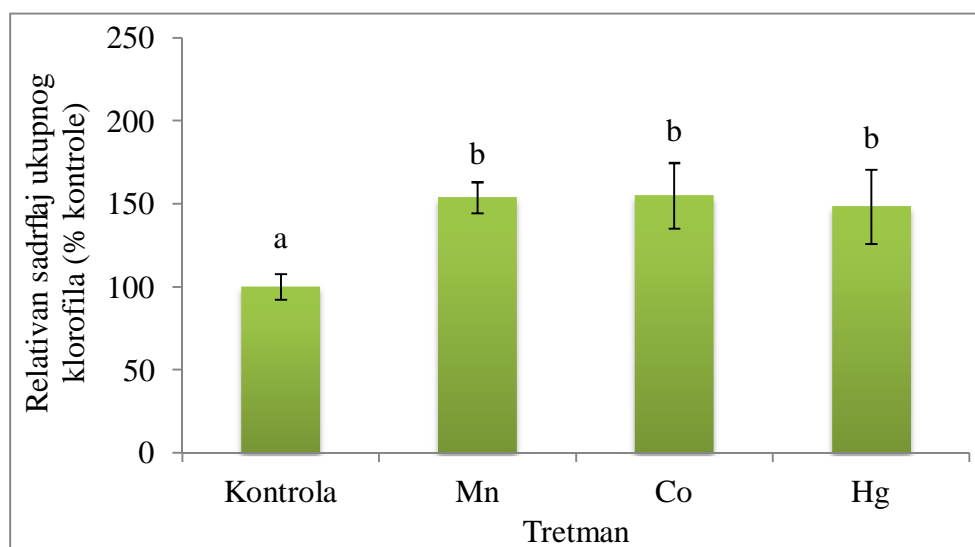


Slika 24. Sadržaj karotenoida u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i živom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Sadržaj ukupnog klorofila (Chl  $a+b$ ) statistički se povećao kod svih triju tretmana u odnosu na netretirane biljke, pri čemu je najveće povećanje zabilježeno pri tretmanu manganom. Tretmani se prema LSD testu nisu značajno razlikovali (slika 25).

Tablica 25. Vrijednosti sadržaja ukupnog klorofila (Chl  $a+b$ ) ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima različitim metalom (Mn, Co, Hg). Prikazani su rezultati tri (pet) ponavljanja te srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Ukupni klorofil					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	
<b>Kontrola</b>	1,353	1,451	1,546	1,649	1,575	1,515 $\pm$ 0,114
<b>Mn</b>	2,253	2,492	2,245	-	-	2,330 $\pm$ 0,140
<b>Co</b>	2,492	2,003	2,547	-	-	2,347 $\pm$ 0,299
<b>Hg</b>	2,452	1,857	2,434	-	-	2,248 $\pm$ 0,338



Slika 25. Sadržaj ukupnog klorofila u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i živom. Rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

#### 4. RASPRAVA

Stres uzrokovan abiotičkim imbenicima dovodi do prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih jedinica (ROS) koje su visoko reaktivne i toksične. ROS dovodi do oksidativnog oštećenja proteina, lipida, nukleinskih kiselina i cjelokupnog metabolizma biljaka. Jedan od uzroka prekomjerne produkcije ROS-a u biljnim stanicama su i visoke koncentracije teških metala. Gračak je važan dio ljudske prehrane i često korišten model u fiziološkim i molekularnim istraživanjima (Hattab i sur., 2009).

Katalaza je enzim koji svojim oksidoreduktaznim djelovanjem razgrađuje  $H_2O_2$  na vodu i elementarni kisik i jedan je od ključnih enzima zaduženih za uklanjanje toksičnih peroksida (Shi i sur., 2000). Značajno povećanje ukupne aktivnosti katalaze (CAT-u) u korijenu utvrđeno je pri tretmanu kobaltom, dok su tretmani manganom i flivom doveli do smanjenja aktivnosti CAT-u, u odnosu na netretirane biljke. U listu su sva tri tretmana uzrokovala statistički značajno smanjenje aktivnosti CAT-u u odnosu na kontrolu. Tretman flivom uzrokovao je najveće smanjenje aktivnosti, iako se to smanjenje statistički ne razlikuje od utjecaja mangana na list. Chaoui i sur. (1997) su utvrdili da do smanjenja aktivnosti katalaze u listovima graha dolazi nakon pet dana izloženosti cinku u koncentraciji od  $100 \mu M$  te kadmiju u koncentraciji od  $5 \mu M$ . Tretman manganom u koncentraciji  $600 \mu M$  uzrokovao je smanjenje aktivnosti katalaze u tkivu krastavca (Shi i sur., 2005). Jedan od razloga zabilježene smanjene aktivnosti katalaze može biti odgođeno uklanjanje vodikovog peroksida od strane katalaze (Shi i sur., 2005). Osim smanjenja aktivnosti u literaturi je zabilježen i porast aktivnosti katalaze nakon izlaganja metalima. Tako su Singh i sur. (2010) te Prasad i sur. (1999) utvrdili povećanje aktivnosti CAT-u kod vrste *Brassica juncea* nakon tretmana bakrom i cinkom. U korijenu i listu rajčice izlagane flivi također dolazi do povećanja aktivnosti ovog enzima (Cho i Park, 2000). Kao moguće objašnjenje povećanja aktivnosti navodi se smanjena produkcija vodikovog peroksida u stanici.

Zabilježena specifična aktivnost enzima katalaze (CAT-s) u korijenu se uvelike razlikovala od ukupne aktivnosti CAT. U odnosu na netretirane biljke samo je tretman flivom značajno povećao specifičnu aktivnost katalaze u korijenu. Specifična aktivnost katalaze u listu je pokazala sličan trend kao i ukupna. Kod sva tri tretmana je zabilježeno značajno smanjenje aktivnosti CAT-s. Kao i kod ukupne aktivnosti u literaturi je zabilježeno i smanjenje i povećanje specifične aktivnosti katalaze. Zhou i sur. (2008) utvrdili su povećanje aktivnosti CAT u listu vrste *Medicago sativa* nakon tretmana flivom. Suprotno tome, Gangwar

i sur. (2010) izvještavaju o smanjenju aktivnosti CAT-s u korijenu i listu gra-ka nakon tretmana manganom (50, 100 i 250  $\mu\text{M}$ ). Tewari i sur. (2001) utvrdili su porast aktivnosti CAT-s kod vrste *Phaseolus aureus* nakon tretmana s 50  $\mu\text{M}$  Co te smanjenje aktivnosti pri višim koncentracijama (100, 200, 300 i 400  $\mu\text{M}$  Co). Sli no tome, Sharma i Dubey (2007) također izvještavaju o povećanju aktivnosti CAT-s kod rife pri nižim te smanjenju aktivnosti pri višim koncentracijama aluminija. Inhibitorno djelovanje metala na mehanizam sinteze proteina može uzrokovati pad aktivnosti katalaze (Sharma i Dubey, 2007). Sandalio i sur. (2001) u svome radu također povezuju pad aktivnosti CAT kod gra-ka tretiranog kadmijem sa smanjenjem koncentracije proteina u stanici. Prema istim autorima jedan od mogućih razloga pada aktivnosti je i mjesto u stanici gdje se katalaza nalazi, a to su peroksisomi. Peroksisomi su organeli koji sadrže proteaze, od kojih su neke uključene u senescenciju te je moguće da katalaza špostaje metaol proteazne aktivnosti u peroksisomima. Agrawal i Mishra (2009) navode da u stresnim uvjetima tetramerne molekule katalaze degradiraju u monomere koji djeluju kao peroksidaze te da pad aktivnosti može biti i posljedica velike potrošnje i inaktivacije samog enzima.

Peroksidaze su enzimi koji kataliziraju redoks reakcije između vodikovog peroksida i različitih reducensa (npr. fenola, prekursora lignina, auksina, sekundarnih metabolita). Peroksidaze su u biljkama uključene u mnoge fiziološke i razvojne procese od klijanja do senescencije (npr. sudjeluju u biosintezi lignina, degradaciji indol-3-octene kiseline, biosintezi etilena itd.). S druge strane, sudjeluju u regulaciji razine vodikovog peroksida te imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od štetnog djelovanja ROS-a (Passardi i sur., 2005). Askorbat peroksidaza katalizira redukciju vodikovog peroksida u vodu koriste i askorbinsku kiselinu kao elektron donor. Ima visoki afinitet za  $\text{H}_2\text{O}_2$  i ima sposobnost detoksificirati male količine  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mohan Murali Achary i sur., 2008). U korijenu gra-ka je došlo do značajnog povećanja ukupne aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX-u) nakon tretmana teškim metalima. Dobiveni rezultati su u skladu rezultatima istraživanja Mohan Murali Achary i sur. (2008) te Darkó i sur. (2004). Najveći utjecaj na aktivnost askorbat peroksidaze je imao tretman kobaltom (povećanje od 174,8%), dok su tretmani manganom i fluorom povećali aktivnost ovog enzima za 59,4% odnosno 70,2%. Tretman kobaltom izazvao je i u listu najveće povećanje aktivnosti askorbat-peroksidaze. Za razliku od korijena, izlaganje fluoru uzrokovalo je smanjenje ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze u listu. Pad aktivnosti kod vrste *Cucurbita pepo* nakon tretmana bakrom u svome istraživanju navodi i El-Shora (2003). Kod biljaka tretiranih manganom je zabilježen blag porast aktivnosti koji se prema LSD testu nije značajno razlikovao od kontrole. Primjenom mangana, kobalta i fluora je došlo do porasta

specifične aktivnosti enzima askorbat peroksidaze (APX-s) u korijenu tretiranih biljaka. Do najveće i statistički značajnog povećanja je došlo kod biljaka tretiranih flivom. Aktivnost APX-s u korijenu tih biljaka je bila 22 puta veća od aktivnosti izmjerene u korijenu netretiranih biljaka. U listu je statistički značajno povećanje aktivnosti enzima utvrđeno kod biljaka tretiranih naganom i kobaltom, dok je kod biljaka tretiranih flivom zabilježen pad aktivnosti APX-s. Porast aktivnosti su utvrdili i Romero-Puertas i sur. (2006) u listu graška tretiranog s 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , te Jung i sur. (2000) kod vrste *Cucumis sativus* tretirane 15  $\mu\text{M}$  norflurazonom. Povećana aktivnost askorbat-peroksidaze je kompenzacijski mehanizam zbog niske aktivnosti katalaze (Jung i sur., 2000).

Gvajakol-peroksidaza kao donor elektrona koristi aromatske fenole. Biljne peroksidaze osim što kataliziraju redukciju vodikovog peroksida u tzv. peroksidativnom ciklusu, također mogu dovesti do nastanka različitih oblika ROS-a, tzv. hidroksilni ciklus (Liszakay i sur., 2003.; Passardi i sur., 2004). Djelovanjem metala na korijen graška došlo je do povećanja ukupne aktivnosti gvajakol peroksidaze (GPX-u). Statistički značajno, i najveće, povećanje GPX-u utvrđeno je pri tretmanu kobaltom, dok tretman flivom nije imao značajnog utjecaja na GPX-u. Tretman manganom je značajno povećao aktivnost GPX-u u odnosu na kontrolu, te se nije prema LSD testu značajno razlikovao od tretmana flivom. U listu su tretmani kobaltom i flivom utjecali na enzim značajnim povećanjem njegove ukupne aktivnosti u odnosu na kontrolne biljke te se nisu međusobno značajno razlikovali prema LSD testu. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze kod biljaka tretiranih manganom se također povećala, ali se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolne biljke. U istraživanju Shi i sur. (2005) primjena mangana (600  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od četiri i deset dana je dovela do povećanja aktivnosti GPX-u u listu krastavca. Prema istim autorima povećanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze može upućivati na povećanu produkciju ROS-a u stanici te da se povećanje aktivnosti može smatrati ne samo reakcijom na oksidativnu štetu prouzročenu teškim metalima, nego i kao uobičajeni odgovor na različite tipove stresa. Singh i sur. (2010) su također utvrdili povećanje aktivnosti GPX-u kod vrste *Brassica juncea* u listu i u korijenu nakon tretmana bakrom (100  $\mu\text{M}$ ). Dobiveni rezultati su djelomično u skladu s istraživanjem Cho i Park (2000), koji su utvrdili u eksperimentu s rajčicom povećanje aktivnosti GPX-u u listu i korijenu nakon dvadeset dana izloženosti flivi (10 i 50  $\mu\text{M}$ ). Isti autori navode da do povećanja aktivnosti GPX-u dolazi nakon duže izloženosti te pri višoj koncentraciji flive.

Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPX-s) može dati nešto drugačije rezultate s obzirom da se izražava po jedinici mase proteina. U korijenu, u odnosu na netretirane biljke, tretmani manganom i kobaltom nisu značajno povećali aktivnost GPX-s, dok je kod biljaka



tretiranih flivom utvr eno zna ajan porast aktivnosti. U listovima biljaka tretiranih manganom i kobaltom je do-lo do zna ajnog porasta aktivnosti u odnosu na kontrolu. Najve e pove anje aktivnosti je utv eno pri tretmanu flivom, me utim aktivnost je bila vi-estruko nifla u usporedbi s aktivnosti u korijenu. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Baccouch i sur. (1998) koji su tako er utvrdili porast aktivnosti GPX-s kod kukuruza tretiranog 250  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  u razdoblju od pet dana. O pove anju aktivnosti su tako er izvjestili Demirevska-Kepova i sur. (2002) kod je ma tretiranog razli itim koncentracijama bakra i mangana. Prema istim autorima pove anje aktivnosti gvajakol-peroksidaze je sveop i odgovor vi-ih biljaka na toksi ne koli ine te-kih metala, -to je u ovom istraffivanju u korelaciji s visokim koncentracijama primjenjenih metala u korjenu i listu gra-ka.

U biljkama je razgradnja proteina povezana s razli itim razvojnim stadijima kao -to su germinacija, diferencijacija i morfogeneza, senescencija i programirana stani na smrt. Oksidativni stres uzrokovan djelovanjem metala smanjuje sadrflaj proteina kroz razne kompleksne mehanizme. Neposredna o-te enja nukleinskih kiselina stvaranjem lezija sprje avaju sintezu novih proteina dok o-te enja membrana pove avaju propusnost i gubitak postoje ih proteina. Smanjenjem sadrflaja proteina u stanicama ujedno se smanjuje i sadrflaj antioksidativnih enzima, -to kao posljedicu mofle imati poja ane u inke oksidativnog stresa. U korijenu biljaka tretiranih flivom je utvr eno zna ajno smanjenje koncentracije proteina, koje je bilo za 92,8% manje u odnosu na kontrolu. Smanjenje koncnetracija proteina nije utjecalo na specifi ne aktivnosti CAT, GPX i APX, naprotiv zabiljefflen je zna ajni porast aktivnosti kod biljaka tretiranih flivom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se stanica bori protiv toksi nosti metala bez sinteze novih proteina, pa tako i enzima te da je postoje i sustav dovoljan za obranu stanice. Tretman kobaltom je pokazao potpuno druga iji u inak i doveo do zna ajnog porasta koncentracije proteina. Kod biljaka tretiranih manganom je do-lo do blagog porasta sadrflaja proteina. U listu je jedino tretman kobaltom doveo do porasta koncentracije proteina, koje je bilo statisti ki zna ajno u odnosu na kontrolu. Porast koncentracije proteina nakon izloffenosti povi-enim koncentracijama metala bi se mogao objasniti pove anom sintezom stres-proteina kao -to su sheat-shock proteini i fitohelatini (Lamhamdi i sur., 2011). Ostala dva tretmana su dovela do smanjenja sadrflaja proteina u listu gra-ka, pri emu je kod tretmana flivom utvr eno najve e smanjenje. Uz veliku toksi nost flive koja mofle dovesti do denaturacije i o-te enja proteina, jedan od razloga smanjenja sadrflaja proteina mofle biti pove ani stupanj lipidne peroksidacije koji za posljedicu ima o-te enja stani nih membrana i prema tome redukciju membranskih proteina (Zia-Ul-Haq i sur., 2007).

Askorbinska kiselina je važan antioksidans koji uklanja ROS spontano kemijskim putem ili uz enzim askorbat peroksidazu. Prisutna je kod svih biljnih vrsta i u svim biljnim tkivima obavljaju i ključnu ulogu u metabolizmu, rastu, razvoju, cvjetanju te odgovoru biljke na biotički i abiotički stres (Proietti i sur., 2009). Najzastupljeniji je antioksidans u biljkama (Chao i sur., 2010) te je važna komponenta antioksidativne obrane i služi kao reducens kod peroksidativnog uklanjanja  $H_2O_2$  (Guo i sur., 2005). Također je ključni metabolit askorbat-glutation ciklusa (ASC-GSH), jednog od glavnih sustava koji detoksificiraju ROS u biljnim stanicama (Perez i sur., 2002). U korijenu biljaka tretiranih manganom i kobaltom utvrđeno je statistički značajan pad koncentracije askorbinske kiseline. Najveće smanjenje koncentracije askorbinske kiseline (58%), u odnosu na netretirane biljke, je utvrđeno pri tretmanu manganom. Tretmani kobaltom i manganom su se prema LSD testu međusobno značajno razlikovali. Samo je kod biljaka tretiranih flivom zabilježen statistički značajan porast koncentracije askorbinske kiseline u odnosu na kontrolu. Dok je u korijenu samo tretman flivom doveo do povećanja koncentracije askorbinske kiseline, u listu su sva tri tretmana dovela do statistički značajnog povećanja koncentracije, pri čemu je najveće povećanje (113,3%) zabilježeno u listu biljaka tretiranih kobaltom, dok se ostala dva tretmana prema LSD testu nisu značajno razlikovala. Povećanje koncentracije askorbinske kiseline je otkriveno s obzirom da je askorbinska kiselina važna komponenta antioksidativne obrane i jedan od ključnih metabolita askorbat-glutation ciklusa.

Vodikov peroksid je toksični stanični metabolit, aktivna kisikova jedinica koja reagira sa superoksidnim radikalima i formira reaktivnije hidroksilne radikale (El-Shora, 2003). Međutim, smatra se da u biljnim i flivotinjskim stanicama služi i kao signalna molekula. Do povećane produkcije  $H_2O_2$  dolazi u uvjetima abiotičkog i biotičkog stresa, i neki autori navode da vodikov peroksid ima dvojakulogu u biljnim stanicama. Pri niskim koncentracijama ima ulogu signalne molekule uključene u aklimatizaciju i pokretanje tolerancije na različite abiotičke stresove, dok pri višim sudjeluje u programiranoj staničnoj smrti (de Azevedo Neto i sur., 2005). Povišene razine vodikovog peroksida u stanicama su štetne zbog raznih negativnih efekata među kojima se ističe inicijacija lipidne peroksidacije. U korijenu svih tretiranih biljaka je utvrđeno statistički značajan porast koncentracije vodikovog peroksida u odnosu na kontrolu. Najveće povećanje (252,9%) je zabilježeno u korijenu biljaka tretiranih flivom, u odnosu na netretirane biljke. Mohan Murali Achary i sur., (2008) su utvrdili da do porasta koncentracije vodikovog peroksida dolazi u korijenu luka tretiranog različitim koncentracijama aluminijskih soli. U listu je jedino tretman flivom doveo do porasta koncentracije vodikovog peroksida. Utvrđeni porast je bio statistički značajan u

odnosu na netretirane biljke. Kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom došlo je do pada koncentracije vodikovog peroksida te se ti tretmani i kontrola nisu međusobno razlikovali. U istraživanju utjecaja bakra na klijance rife koje su proveli Thounaojam i sur. (2012) utvrđeno je veća koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u korijenu nego u listu, što upućuje na to da je korijen primarno mjesto formiranja ROS-a. U svome radu Eraslan i sur. (2007) izvještavaju o povećanju koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listu vrste *Lactuca sativa* nakon tretmana s 300 μM B, 40 mM NaCl, te kombiniranoj izloženosti B+NaCl (300 μM, 40 mM). Dobiveni rezultati ukazuju da je fliva najtoksičniji od primjenjenih metala te da je dovela do razvoja oksidativnog stresa u korijenu graška. Koncentracije vodikovog peroksida izmjerene u korijenu i listu upućuju na to da je korijen primarno mjesto formiranja ROS-a i razvoja oksidativnog stresa.

Peroksidacija lipida se smatra jednim od najtetnijih procesa koji se događaju u živim organizmima (Gill i Tuteja, 2010). Lipidna peroksidacija dovodi do oštećenja membrana lani i oštećenja. Promjene u stupnju lipidne peroksidacije služe kao mjera oksidativne štete u stresnim uvjetima (Singh i sur., 2010). Formiranje TBARS-a je indikator produkcije slobodnih radikala u tkivima i može se koristiti kao pouzdan pokazatelj stupnja lipidne peroksidacije u biološkim sustavima (Yannarelli i sur., 2007). Porast koncentracije TBARS-a je uobičajeni simptom stresa uzrokovanog teškim metalima (Cho i Seo, 2005). Sva tri tretmana su dovela do značajnog povećanja sadržaja TBARS-a u korijenu graška. Najveće povećanje (286,1%) u odnosu na kontrolu zabilježeno je u korijenu biljaka tretiranih flivom, dok se tretmani manganom i kobaltom nisu međusobno značajno razlikovali prema LSD testu. Ovi rezultati upućuju na to da su primjenjeni tretmani doveli do pojave oksidativnog stresa. U listu je povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije utvrđeno kod biljaka tretiranih flivom te se nije značajno razlikovalo od vrijednosti utvrđenih kod netretiranih biljaka. Tretmani manganom i kobaltom su doveli do statistički značajnog pada sadržaja TBARS-a u odnosu na kontrolne biljke. Uzimajući u obzir dobivene rezultate te da su mangan, kobalt i fliva isključivo apsorbirani putem korijena u kojemu je došlo do razvoja oksidativnog stresa, možemo zaključiti da primjenjeni metali imaju nizak stupanj transporta u nadzemne dijelove biljke. Shi i sur. (2005) utvrdili su porast sadržaja TBARS-a u listu krastavca nakon tretmana manganom (600 μM). Sharma i Dubey (2007) navode da je povećanjem koncentracije aluminijsa u hranjivom mediju došlo do porasta koncentracije TBARS-a u korijenu i listu vrste *Oriza sativa* te da ti rezultati sugeriraju kako je toksičnost aluminijsa povezana s pojavom oksidativnog stresa u klijancima rife. Do povećanja stupnja lipidne peroksidacije dolazi i u listu *Medicago sativa* nakon dvanaest dana izloženosti flivi (Zhou i sur., 2007). Promjene do kojih je došlo nakon izlaganja manganu, kobaltu i flivi, u

koncentraciji vodikovog peroksida u korijenu i listu graška pokazuju sličnosti s promjenama u koncentraciji produkata lipidne peroksidacije. U tretmanu sa sva tri metala porast koncentracije vodikovog peroksida pratio je porastom intenziteta lipidne peroksidacije. Taj je trend najviše izražen u slučaju biljaka tretiranih flivom. Povećanje koncentracije vodikovog peroksida od 3,5 puta u odnosu na kontrolne biljke pratio je povećanjem koncentracije T-BARS-a od 4 puta. Iako je došlo do višestrukog povećanja aktivnosti enzima zaduženih za uklanjanje vodikovog peroksida iz stanice (CATs 12 puta, APXs 22 puta, GPXs 18 puta) razine ovog toksičnog metabolita u korijenu biljaka tretiranih flivom višestruko su veće nego u kontrolnim biljkama.

ROS mogu oksidirati proteine, lipide i nukleinske kiseline što dovodi do promjena u strukturi stanice i do mutageneze. Kloroplasti imaju kompleksan sustav membrana bogatih nezasićenim masnim kiselinama koje su potencijalna meta peroksidacije (Hattab i sur., 2009). To može djelomično objasniti negativan utjecaj povećane koncentracije različitih metala, esencijalnih ili neesencijalnih. Klorofil i karotenoidi su centralni dio energetskog sustava svake zelene biljke i svaka značajna promjena se negativno odražava na cijeli metabolizam biljke (Agrawal i Mishra, 2009). Karotenoidi su potencijalni štovari ROS-a u stanici, osobito singletnog kisika (Tewari i sur., 2001). Isti autori navode da interferencijom teških metala, uključujući i kobalt s normalnim metabolizmom željeza dolazi do smanjene sinteze klorofila. Dokazano je da teški metali utječu na biosintezu klorofila, bilo da je stimuliraju ili reduciraju (Yang i sur., 2010). Isti autori su u svojem eksperimentu sa pjenicom utvrdili da niske koncentracije olova nisu značajno utjecale na ukupni klorofil, uključujući u klorofil *a* i *b*, dok su više koncentracije olova dovele do značajnog smanjenja sadržaja klorofila. Navode da olovo može reducirati klorofil inhibirajući biosintezu pigmenta i smanjujući fotosintetski transport elektrona. Gopal i Rizvi (2008) u eksperimentu s rotkvicom i različitim koncentracijama olova također izvještavaju o smanjenju sadržaja klorofila *a* i *b*. U ovom eksperimentu u listu graška sadržaj klorofila *a* se značajno razlikovao između tretmana i kontrole. Pri sva tri tretmana je zabilježeno povećanje sadržaja klorofila *a*. Tretman flivom je doveo do najvećeg, dok je kod biljaka tretiranih manganom utvrđeno najmanje povećanje sadržaja klorofila *a*. Ipak, prema LSD testu tretmani se nisu međusobno razlikovali. Sadržaj klorofila *b* i karotenoida se nije značajno promijenio nakon primjenjenih tretmana. Kod svih tretiranih biljaka je zabilježeno povećanje sadržaja klorofila *b* i karotenoida, međutim to povećanje se nije statistički značajno razlikovalo od vrijednosti utvrđenih kod netretiranih biljaka. Najveće povećanje sadržaja i klorofila *b* i karotenoida je zabilježeno pri tretmanu manganom, dok je najmanje kod biljaka tretiranih flivom. Karotenoidi štite klorofil od

fotooksidativne destrukcije, stoga značajna redukcija u količini karotenoida može imati ozbiljne posljedice na količinu klorofila i tako dovesti do smanjene fotosintetske efikasnosti biljke (Prasad i sur., 2005). Isti autori su klijance soje izlagali različitim koncentracijama nikla te Ni+UV-B i utvrdili značajno smanjenje sadržaja kloroplastnih pigmenta (klorofila *a*, *b*, *a+b*, karotenoida). Kao uzrok tome navode inhibiciju određenih enzima koji sudjeluju u sintezi klorofila te kao što je i slučaj kod drugih metala, navode zamjenu centralnog atoma klorofila atomom nikla. Agrawal i Mishra (2009) su proučavali utjecaj kadmija i UV-B na klijance graška te su također utvrdili značajnu redukciju i klorofila i karotenoida. U ovom eksperimentu je utvrđeno da su primjenjeni tretmani značajno povećali sadržaj ukupnog klorofila u odnosu na netretirane biljke. Kod biljaka tretiranih manganom je utvrđeno najveće, dok je pri tretmanu sivičom utvrđeno najmanje povećanje sadržaja ukupnog klorofila. Tretmani se prema LSD testu međusobno nisu značajno razlikovali.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je sedmodnevni tretman mladih biljaka gra-ka povećanim koncentracijama mangana, kobalta i cinka u hranjivoj otopini uzrokovao aktivaciju antioksidativnih sustava i obrambenih fizioloških reakcija.

Najveće specifične aktivnosti enzima CAT, GPX i APX u korijenu su utvrđene kod biljaka tretiranih cinkom, dok su najveće ukupne aktivnosti enzima zabilježene u tretmanu kobaltom. U listu su se aktivnosti enzima međusobno razlikovale, ovisno o primjenjenom tretmanu. Zaključujemo da primjenjeni metali imaju različito djelovanje na vrstu *Pisum sativum*. Kao najtoksičniji od primjenjenih metala pokazala se cinka jer je dovela do razvoja oksidativnog stresa.

Koncentracije vodikovog peroksida izmjerene u korijenu i listu upućuju na to da je korijen primarno mjesto formiranja ROS-a i razvoja oksidativnog stresa, što je i očekivano s obzirom da je korijen bio u izravnom doticaju s metalima u hranjivoj otopini.

Iz izmjerenih koncentracija kloroplastnih pigmenata se može zaključiti da u listu nije došlo do formiranja ROS-a i oksidativnog stresa te da su antioksidativni mehanizmi u korijenu uklonili višak ROS-a i spriječili ili njihovo stvaranje u nadzemne dijelove biljke.

## 6. LITERATURA

Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S. (2008): Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. *Journal of Plant Biology*, May 2008, 51: 167-173.

Alexander, P.D., Alloway, B.J., Dourado, A.M. (2006): Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grow vegetables. *Environmental Pollution* 144:736-745.

Apel, K., Hirt, H. (2004): reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.

Agrawal, S.B., Mishra, S. (2007): Effects of supplemental ultraviolet-B and cadmium on growth, antioxidants and yield of *Pisum sativum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 610-618.

Baccouch, S., Chaoui, A., El Ferjani, E. (1998): Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 689-694.

Bahemuka T.E., Mubofu E.B. (1999): Heavy metals in edible green vegetables grown along the sites of the Sinza and Msimbazi rivers in Dar es Salaam, Tanzania. *Food Chemistry* 66: 63-66.

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

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, MH., El Ferjani, E., (1997): Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139-147.

Cho, U-H., Park, J-O. (2000): Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* 156: 1-9.

Cho, U-H., Seo, N-H. (2005): Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168: 113-120.

Darkó, E., Ambrus, H., Stefanovits-Banyai, E., Fodor, Jozsef., Bakos, F., Barnabas, B. (2003): Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotypr and in Al-tolerant lines. *Plant Science* 166: 583-591.

- Demirevska- Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., Feller, U. (2002): Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* 52: 253-266.
- Dias de Azevedo Neto, A., Tarquinio Prisco, J., Eneas-Filho, J., Rolim Medeiros, J-V., Gomes-Filho, E. (2005): Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 162: 1114-1122.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2000): Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1101-1109.
- El-Shora, H.M. (2003): Activities of antioxidative enzymes and senescence in detached *Cucurbita pepo* under Cu and oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Becth. Mock. Yh-Ta*, 44: 66-71.
- Eraslan. F., Inal, A., Savasturk, O., Gunes, A. (2007): Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 114: 5-10.
- Gajewska, E., Sklodowska, M. (2010): Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 996-1003
- Gangwar, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Maurya, J.N. (2010): Modulation of manganese toxicity in *Pisum sativum* L. seedlings by kinetin. *Scientia Horticulturae* 126: 467-474.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gopal, R., Rizvi, A.H. (2008): Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere* 70: 1539-1544.
- Grene, R.: Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, 2002., Virginia Tech, Blacksburg.
- Guo, Z., Tan, H., Zhu, Z., Lu, S., Zhou, B. (2005): Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 955-962.



Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Kheder, M.B., Bousetta, H. (2009): photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences* 21: 1552-1556.

Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1950): The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.

Jayakumar, K., Jaleel, C.A., (2009): Uptake and accumulation of cobalt in plants: a study based on exogenous cobalt in soybean. *Botany Research International* 2: 310-314.

Jung Sunyo, Jin Seog Kim, Kwang Yun Cho, Gun Sik Tae, Bin G. Kang, (2000): Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. *Plant Science* 153: 145-154.

Kumar Shanker, A., Vankateswarlu, B.: Reactive oxygen in abiotic stress perception- from genes to proteins. In: Abiotic stress response in plants- Physiological, biochemical and genetic perspectives. 2011., InTech, Rijeka.

Lamhamdi, M., Bakrim, A., Arab, A., Lafont, R., Sayah, F. (2011): Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *C. R. Biologies* 334: 118-126.

Liszak, A., Kenk, B., Schopfer, P. (2003.): Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217: 658- 667.

Mahmood, S., Farzana, K., Zia-ul-haq, M., Ahmad, S., Raiz, F., Abaidullah (2007): Biochemical Responses of *Pisum sativum* L. Under Cadmium and Mercury Regimes. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 29: 379-382.

Miki, A., Mihailovi, V., Lupina, B., Kosev, V., Warkentin, T., McPhee, K., Ambrose, M., Hofer, J., Ellis, N. (2011): Genetic Background and Agronomic Value of Leaf Types in Pea (*Pisum sativum*). *Field Veg. Crop Res.* 48: 275-284.

Mohan Murali Achary, V., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B. (2008): Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 300-310.

Naidu, R., R.S. Kookuna, D.P. Oliver, S. Rogers M.J. McLaughlin: Contaminants and the soil environment in the Australasia-Pacific Region. 1996., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Paivoke, A.E.A., Simola, L.K. (2001): Arsenate Toxicity to *Pisum sativum*: Mineral Nutrients, Chlorophyll Content and Phytase Activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 111-121.

Palma, J.M., Sandalio, L.M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., del Rio, L.A. (2002): Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 521-530.

Perez, F.J., Villegas, D., Mejia, N. (2002): Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in grapevine leaves. *Phytochemistry* 60: 573-580.

Prasad, K.V.S.K., Paradha Saradhi, P., Sharmila, P. (1999): Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* 42: 1-10.

Prasad, S.M., Dwivedi, R., Zeeshan, M. (2005): Growth, photosynthetic electron transport, and antioxidant responses of young soybean seedlings to simultaneous exposure of nickel and UV-B stress. *Photosynthetica* 43: 177-185.

Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004.): Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9: 534-540.

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005.): Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24: 255-265.

Proietti, S., Moscatello, S., Famiani, F., Battistelli, A. (2009): Increase of ascorbic acid content and nutritional quality in spinach leaves during physiological acclimation to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 717-723.

Romero- Puertas, M.C., Corpas, F.j., Rodriguez-Serrano, M., Gomez, M., del Rio, L.A., Sandalio, L.M. (2006): Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* 164: 1346-1357.

- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Del Rio, L.A. (2001): Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, *Journal of Experimental Botany* 52: 2115-2126.
- Sharma, P., Dubey, R.S. (2007): Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentration of aluminum. *Plant Cell Rep* 26: 2027-2038.
- Shi, Q., Zhu, Z., Xu, M., Qian, Q., Yu, J.(2005): Effects of excess manganese on antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities. *Environmental and Experimental Botany* 58: 197-205.
- Shi, Q., Zhu, Z., Bao, Z., He, Y., Qian, Q., Yu, J. (2000): Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 66: 1551-1559.
- Singh, S., Singh, S., Ramachandran, V., Eapen, S. (2010): Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in axenically grown *Brassica juncea* (L.) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1975-1981.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., Bisht, S.S. (2001): Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* 162: 381-388.
- Thounaojam, T.C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L., Panda, S.K. (2012): Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 33-39.
- Yang, T., poovaiah, B.W., (2001): Hydrogen peroxide homeostasis. Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *PNAS* 99: 4097-4102.
- Yannarelli, G.G., Fernandez-Alvarez, A., Santa-Cruz, D.M., Tomaro, M.L., (2007): Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68: 505-512.
- Zhou, Z.S., Jing Wang, S., Yang, Z.M., (2008): Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* 70: 1500-1509.