

# 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: **2024-05-12**



**ODJELZA  
BIOLOGIJU**  
**Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku**

Repository / Repozitorij:

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



SVEU  
ILI<sup>TM</sup>TE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Tomislav <sup>TM</sup>Marec

UTJECAJ MANGANA, KOBALTA I ŠIVE NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU I  
LISTU GRA<sup>TM</sup>KA (*Pisum sativum* L.)

Diplomski rad

OSIJEK, 2012.

SVEU  
ILI<sup>TM</sup>TE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Tomislav <sup>TM</sup>Arec

UTJECAJ MANGANA, KOBALTA I fiIVE NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU I  
LISTU GRA<sup>TM</sup>KA (*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 flIVE NA OKSIDATIVNI STRES U KORIJENU I  
LISTU GRA<sup>T</sup>KA (*Pisum sativum* L.)**

Tomislav T<sup>M</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. Zabilješen 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 o-te enja. Vi-estruka povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima u korijenu uklonila su nastali ROS i sprječila pojavu 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, gračak, 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 T<sup>M</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 references:** 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>	1
1. 1. Cilj rada	7
<b>2. MATERIJALI I METODE</b>	8
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 peroksidida	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>	14
3. 1. Aktivnost enzima katalaze	14
3. 2. Aktivnost enzima askorbat peroksidaze	17
3. 3. Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze	21
3. 4. Koncentracija poteina	25
3. 5. Koncentracija askorbinske kiseline	27
3. 6. Koncentracija vodikovog peroksidida	29
3. 7. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije	31

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

## 1. UVOD

Te-ki metali su definirani kao elementi ija je gusto a ve a od  $5 \text{ g cm}^{-3}$  i iji je atomski broj ve i od 20. Te-ki metali su prirodne komponente tla, no njihove su koncentracije u tlu uglavnom niske. Imaju biolo-ku vaflnost u razvoju i rastu biljaka, gdje igraju klju nu ulogu utje u i na stani ne procese kao -to je homeostaza i fotosinteza. Mnogi stani ni procesi su regulirani enzimima ija je aktivnost ovisna o prisutnosti te-kih metala, kao -to su Fe, Mn, i Cu, u aktivnom mjestu ili drugoj poziciji vaflnoj za normlano funkcioniranje enzima. Neki od tih elemenata, kao -to su Zn, Cu, Mn, Ni, i Co, su mikronutrienti esencijalni za rast biljaka, dok drugi imaju jo- nepoznatu biolo-ku funkciju, kao Cd, Pb i Hg. Razumijevanje utjecaja te-kih metala na biljke i rizici biomagnifikacije toksikanata za kunzumente su vrlo zna ajni. Izme u razli itih modela dostupnih za prou avanje toksi nosti te-kih metala, biljke imaju odre ene zna ajke koje ih ine idealnima za ovakvu vrstu istraflivanja. Jedna od klju nih funkcija biljne stanice je mogu nost odgovora na promjene koje se doga aju u okoli-u (Grene, 2002). Kako biljke nisu u mogu nosti napustiti one i- eno podru je, razvile su odre ene mehanizme koji im omogu uju preflivljavanje izloflenosti razli itim toksikantima. Tako neke vrste mogu regulirati koli inu polutanta koji je primljen iz okoline i inaktivirati ga u substani nim kompartimentima. Toksi nost te-kih metala i njihovih spojeva uvelike ovisi o njihovoj dostupnosti, odnosno mehanizmima unosa kroz stani nu membranu, unutarstani noj distribuciji i vezivanju za stani ne makromolekule. Ulazak te-kih metala u stanicu može mobilizirati nekoliko metaboli kih i signalnih puteva te geneti kih procesa kako bi se neutralizirao izvor toksi nosti. Pove ane koncentracije te-kih metala snaflno utje u na rast i razvoj biljaka. Koliko e -tetno neki te-ki metal utjecati na biljku ovisi o genotipu biljke i uvjetima u tlu, odnosno vodi. Toksi ni u inci se o ituju kao produkcija ROS-a i razvoj oksidativnog stresa, inhibicijaenzimske aktivnosti zamjenom esencijalnih kofaktora, promjene u permeabilnosti membrana.

<sup>T</sup>etni okoli-ni imbenici i razvojne promjene, kao -to je razvoj sjemena, uklju uju formiranje reaktivnih kisikovih jedinki (eng. šReactive Oxygen Species- ROS) u biljnim stanicama (Grene, 2002). ROS su superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $OH^-$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Zajedni ki imbenik ve ine stresova je aktivno stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki. Poznato je da ROS nije samo -tetan za stanicu nego ima i vaflnu funkciju kao signalna molekula. Stvaranje ROS-a je regulirano u razli itim stani nim kompartimentima uklju uju i kloroplaste, peroksisome, mitohondrije. Stvaranje ROS-a tijekom izloflenosti abioti kom stresu, kao -to su te-ki metali, su-a, ekstremne temperature, je

glavni uzrok smanjenja prinosa, o-te enja i venu a biljke. U biljnim stanicama ROS neprekidno nastaje kao normalni sporedni produk stani nog metabolizma u razli itim stani nim procesima. Ravnotefta izme u nastalih i uklonjenih ROS-a mofle biti naru-ena od strane brojnih nepovoljnih okoli-nih imbenika. Kao rezultat unutarstani na razina ROS-a mofle 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 razli ite antioksidativne sustave. Difuzija ROS-a je odre ena njihovom visokom reaktivno- u. To svojstvo zahtjeva da se uklanjanje i detoksifikacija ROS-a odvija blizu ili na samom mjestu nastanka. Sveprisutnost antioksidativnih sustava je presudna za uspje-no sprije avanje i preflivljavanje oksidativnog stresa. Oksidativni stres je definiran kao poreme aj ravnotefta izme u oksidanata i antioksidanata. Ve ina antoksidativnih komponenti uklanja slobodne radikale. Vezanjem i inaktivacijom slobodnih radikala, antioksidansi sprije avaju pojavu oksidativnog stresa. Uska suradnja izme u enzimatskih i neenzimatskih antioksidativnih sustava osigurava stanici efikasno reguliranje razine ROS-a. Neenzimatski antioksidativni sustav uklju uje askorbinsku kiselinu (AsA), glutation (GSH), a- tokoferol. AsA i GSH su najzastupljeniji topljivi antioksidansi u biljkama i imaju klju nu ulogu u za-titi 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 -to ga direktno uklanjaju i pretvaraju u manje reaktivne i manje -tetne oblike. Mogu se smatrati unutarstani nim 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 uklju ena u redukciju i oksidaciju askorbata i glutationa, uskla uju i redoks stanje stanice. Neenzimatski i enzimatski antioksidansi ine kompleksan i raznolik antioksidativni sustav koji efikasno sudjeluje u kontroli prekomjernog stvaranja ROS-a i pojave oksidativnog stresa (Kumar Shanker i Venkateswarlu, 2011). Do toksi nosti kojoj su uzrok neesencijalni metali dolazi nakon zamjene esencijanog metala neesencijalnim unutar aktivnog mjesta enzima. Ioni  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Ag^{2+}$  tefle vezivanju za sulfhidrilne skupine, -to dovodi do inaktivacije razli itih enzima neophodnih za normalno funkcioniranje metabolizma biljke. Pri visokim koncentracijama i esencijalni i neesencijalni metali mogu o-tetiti stani ne membrane i stijenke, promijeniti aktivnost i funkciju enzima, poremetiti stani ne funkcije, o-tetiti strukturu DNA i dovest do oksidativnog stresa. Kako bi do-lo do fiziolo-kog ili toksi nog u inka, ioni metala moraju u i u stanicu. Ulaze u obliku struktorno sli nih kationa ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ). Biljke su razvile razli ite homeostatske mehanizme

kako bi odrflale pravilne koncentracije esencijalnih elemenata u razli itim stani nim kompartimentima. Isti mehanizmi osiguravaju pravilno primanje, distribuciju i detoksifikaciju vi-ka iona razli itih metala, bilo esencijalnih ili neesencijalnih (Jayakumar i Jaleel, 2009).

Kobalt je element koji se prirodno u malim koli inama nalazi u zraku, vodi, tlu, stijenama, biljkama i flivotinjama. Antropogenim djelovanjem njegove se koli ine u okoli-u pove avaju. Kobalt je sastavni dio mnogih legura, magneta i magnetnih ura aja 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 prehrabenoj industriji, pri sterilizaciji hrane i u nuklearnim elektranama. Kobalt je metal esencijalan organizmima koji fiksiraju du-ik, kao -to su slobodno flivu e bakterije, modrozelene alge (cijanobakterije) te simbiotski sustavi (bakterije roda Rhizobium i leguminoze). Kod vi-ih 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 utje e na rast i metabolizam biljaka, ovisno o koncentraciji i dostupnosti u tlu. Vi-e biljke kobalt primaju u obliku iona  $\text{Co}^{2+}$  aktivnim transportom kroz korijen odakle se transpiracijskom strujom putem ksilema transportira u nadzemne dijelove biljke. Toksi nost kobalta i njegovih spojeva ovisi o njegovoj koncentraciji i fizikalno-kemijskim svojstvima tla. U velikim koncentracijama postaje toksi an -to kao posljedicu ima opadanje listova, smanjenje mase izbojaka, obezbojenje lisnih filia.

Fliva se lako modificira u nekoliko oksidacijskih stanja i mofle se pro-iriti kroz sve ekosustave. Izdvaja se me u ostalim metalima zato -to je u okoli-u prona ena u nekoliko razli itih 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 lako a kojom Hg prelazi u plinovitu fazu su dva najzna ajnija svojstva ovog te-kog metala. Ta svojstva obja-njavaju sposobnost i efikasnost kojom fliva prelazi u razli ite ekosustave i za-to se dugo vremena zadrflava u atmosferi. Razvojem industrije pove ala se i upotreba flive, a samim time je do-lo do pove anja antropogenih emisija i pove anja prirodnih koncentracija u okoli-u. Fliva se koristi kao sastavni dio elektri nih ure aja, baterija i eksploziva. Zbog svoje velike gusto e se koristi u barometrima, manometrima i termometrima. Tako er se korisit u medicini, kozmeti koj industriji, te u poljoprivredi kao sastavni dio fungicida, hebicida i umjetnih gnojiva. Glavnina flive koja dospijeva u okoli- je rezultat izgaranja fosilnih goriva, proizvodnje elektroni ke opreme, kao nusproduk prilikom obrade razli itih metala, osobito plemenitih, proizvodnje boja. Sve te antropogene aktivnosti pove avaju koli inu flive koja se akumulira u kopnenim i vodenim ekosustavima, u kojima se mofle zadrflati i preko sto godina

nakon –to se izvor one i– enja ukloni. Kontaminacija tla flivom je obično posljedica upotrebe različitih umjetnih gnojiva, vapna, ulja i prirodnih gnojiva. Dinamika kojom biljke apsorbiraju Hg ovisi o nekoliko imbenika, kao –to su pH tla, prozračnost 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 dušikove ligande i ulazi u stanicu preko ionskih kanala te da je tako u kompeticiji s ostalim težkim metalima kao –to je Cd ili esencijalnim elementima kao –to su Zn, Cu i Fe. Na staničnom nivou težki metali utječu na različite molekule koje su neophodne za normalno funkcioniranje biljke kao –to su različiti enzimi i polinukleotidi, na transport esencijalnih iona, na zamjenu ili supstituciju metalnih iona u molekulama (Mg u klorofilu), denaturaciju i inaktivaciju proteina, disruptiju stanične membrane i organela. Fliva dovodi do promjena permeabilnosti staničnih 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 i na modulaciju nekih antioksidanata kao –to su superoksid-dismutaza, askorbat-peroksidaza i glutation-reduktaza. Izloženost flivi takođe dovodi do redukcije u fotosintezi, transpiraciji, primanju vode i sintezi klorofila. Fliva je opasan polutant koji se jednostavno –iri kroz ekosustave negativno utječe i 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 bioraspoljivost 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 težke 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 nađe u suvišku. Biljkama je dostupan u obliku Mn<sup>2+</sup> i kao takav ulazi u stanice korijena te biva prebačen u nadzemne djelove 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 ksilomonomerom te transpiracijskom strujom. Za transport unutar stanice su zaduženi različiti proteinski nosači. Visoke koncentracije mangana negativno utječu na rast i razvoj biljke tako što interferiraju s metaboličkim procesima (Shi i sur., 2005). Više akcija mangana u

biljkama može promijeniti mnoge procese kao što su aktivnost enzima, apsorpcija, translokacija i upotreba ostalih mineralnih elemenata (Ca, Mg, Fe i P), uzrokujući oksidativni stres. Koncentracija mangana koja dovodi do toksičnih učinaka i oksidativnog stresa ovisi o vrsti i kultivaru biljke te o genotipu unutar same vrste. Uz to, ono ima ulogu u fotosintezi, tako da je bitan pri sintezi ATP-a, kod reakcije 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-karbokiskinaza. Mangan je takođe esencijalan za biosintezu klorofila, aromatskih amino kiselina, te sekundarnih produkata kao što su lignin i flavonoidi. Uključen je 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 potrebni 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 (intervenitalna i rubna) te nekroza listova, takođe je kod nekih biljnih vrsta uobičajeno da dolazi do redukcije u fotosintezi, sadržajući klorofila a i b i njihovoj sintezi, kao i do smanjenja sinteze karotenoida. Toksičnost mangana može potaknuti oksidativni stres. Kao takav, moguće je izazvati metaboličke i makromolekularne promjene koje mogu narušiti homeostazu biljne stanice.

Model ovog istraživanja je bila vrsta *Pisum sativum*. Gračanik (*Pisum sativum*) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice mahunarki (Fabaceae). Jedna je od prvih kultiviranih biljaka. Arheološka istraživanja potvrđuju upotrebu gračanika 8 000 godina p.n.e. S obzirom na genetsku raznolikost, mjesto podrijetla gračanika nije točno određeno. Kao centri iz kojih potječe 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 gračanika, dok su sekundarni centri u jugnoj Aziji i na Mediteranu. Pretpostavlja se da su se prvi kultivari gračanika pojavili u zapadnoj Aziji, odakle su se dalje proširili po Evropi, Kini i Indiji. Danas je ova biljka široko rasprostranjena i uz to, se koristi u ljudskoj prehrani, jedna je od najznačajnijih leguminoza koja se koristi u poljoprivredi. Ova multifunkcionalna biljka se može koristiti kao sastojak na hrana, silafla, slama, u zelenoj gnojidbi. Gračanik je takođe subjektni genetičkih istraživanja još od eksperimenata Thomasa Andrew Knighta 1790-ih i Gregora Mendela 1860-ih (Mikić i sur., 2011). Gračanik raste na području jima 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 većih oštećenja mogu podnijeti temperature i do -8°C. S razvojem nadzemnog dijela biljke otpornost na niske temperature opada, tako da se 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 graka se u potpunosti zaustavlja. Graka je biljka dugog dana, iako su neki kultivari neutralni na duflinu dana. Raste na raličitim tipovima tala, prozračnim, dobro dreniranim i s vijednostima pH od 5.5 do 7.0. Neki kultivari toleriraju pH vrijednost tla i do 7,5. Optimalna količina padalina je između 800 i 1 000 mm godišnje. Stabljika je na poprečnom presjeku uglasta ili okrugla i usupljena, močvare se granati, ali i biti nerazgranata. Svjetlozelene je boje i visine do 2 metra. Karakteristike stabljike se razlikuju među kultivarima. Listovi su naizmjenični, sloflošeni, parno perasti sa jednim, dva ili tri para ovalnih liski. Par liski koji se nalazi najblježe vrhu lista je preobražen u razgranatu viticu koja biljci služi za prihvatanje za razlike potpornje. Listovi su flutozelene do svijetlozelene, sivozelene ili plavozelene boje, a površina listova je prekrivena vođicom prevlakom. Cvijet je leptirast, a ima pet latica i pet latica, dvije koje su leteće, dvije koje su krila i jedna zastavica. Nalazi se na dugo stopci i obično je bijele boje, ali močvare biti plave, ljubičaste, rufaste ili boje lavande, ovisno o kultivaru. Cvijet je dvospol i zigomorfan. Plodnica je nadrasla, a od deset pranika devet ih je sraslo dok je jedan slobodan. Za graka je karakteristična samooplodnja. Plod graka je mahuna dufline između 4 i 12 cm, a po etiku je usporediteno oblika, a daljnji razvojem poprima valjkasti oblik sa 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 graka močvare biti okruglo i glatko ili nepravilno okruglastog oblika i naborano, žutiložne ili zelene boje. Sjema lupina je bezbojna. Korijen graka je dobro razvijen i ima veliku apsorpciju mineralnih tvari i vode iz tla. Glavni korijen močvare naraste i do 1,5 m u dubinu, dok se glavnina postranog korijenja nalazi do dubine od 30 cm. Kao što je slučaj i kod drugih vrsta iz porodice Fabaceae tako i na korijenu graka bakterije induciraju stvaranje sitnih krvnfliča (noduli). To su specijalizirani organi biljke domaćina u kojima se nalaze bakterije roda *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*. Bakterije fiksiraju atmosferski dušik i prevode ga u oblik koji je kao takav dostupan biljkama ( $\text{NO}_3^-$ ).

### **1.1. Cilj rada**

Cilj ovog rada je utvrditi fiziolo-ke reakcija vrste *Pisum sativum* na povi-ene koncentracije managana, kobalta i flive u hranjivoj otopini. Cilj je tako er utvrditi dolazi li do pojave oksidativnog stresa i aktiviranja obrambenih antioksidativnih mehanizama u korijenu i listu biljke, te usporediti me usobne 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 ( $25\pm2^{\circ}\text{C}$ ). Nakon etiri dana proklijalo sjeme gra-ka premje-teno je u staklene epruvete na 60 ml svjefle 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 etraest dana u uvjetima dugog dana (16/8 h fotoperiod), pri sobnoj temperaturi  $25\pm2^{\circ}\text{C}$ , 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 etiri nasumi no 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 -est biljaka. Tretman se sastojao od izlaganja biljaka hranjivoj otopini s dodatkom flive, kobalta i mangana u obliku klorida. Kona na 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 kojma su uzgajane.



Slika 1. Biljke gra-ka u epruvetama obloženima folijom

### **2.2.1. ODREDIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA KATALAZE**

Aktivnost katalaze (CAT) određena je metodom prema Aebi (1984). Biljni materijal je homogeniziran u tekućem duiku 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 smjesi. 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 svjeftle tvari kao  $A_{230} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  SvM, a specifi na (CAT-s) po jedinici mase proteina kao  $A_{230} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  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 mijetanjem 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  $H_2O_2$ . U 820  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese je dodano 180  $\mu\text{L}$  enzymskog 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  $A_{290} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  SvM, dok je specifi na aktivnost askorbat-peroksidaze (APX-s) izraflena kao  $A_{290} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  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. Odvagano 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  $H_2O_2$ . 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  $A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  SvM, dok je specifi na aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPX-s) izraflena kao  $A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  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 vežle za proteine primjeru dolazi do promjene boje. Kompleks proteina i boje CBB ima maksimum apsorbancije pri 595 nm. Koncentracija proteina u uzorcima određena je prema bafidarnoj krivulji poznate koncentracije proteina (govećeg serumskog albumina) i izraflena kao  $\mu\text{g proteina g}^{-1}$  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 toga 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. Apsorbancija 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 Murkherjee i Choudhouri (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 miješanja 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 uzorka, 10 minuta pri 15 000 rcf, otopljen je dodatkom 1 mL 2M sumporne kiseline. Nakon ponovnog miješanja na vorteksu i centrifugiranja 10 minuta na 15 000 rcf pri 4°C, bistri dio je mikropipetom prebačen u kivetu sa suflenim dnem, te je mjereno

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> svjefle 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 slufli kao slijepa proba. Uzorci i slijepa proba su promije-anji 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 apsorbancija 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 graduirano kivetu od 15 mL, a uzorci reekstrahirani sa 2 ml acetona do obezbojenja tkiva. Supernatant je kori-ten za određivanje 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):

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

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

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

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

### **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 značnosti razlika pojedinih tretmana na razini  $p<0,05$  je korišten LSD test. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ( $x \pm SD$ ,  $n_{kontrola}=5$ ,  $n_{tretman}=3$ ).

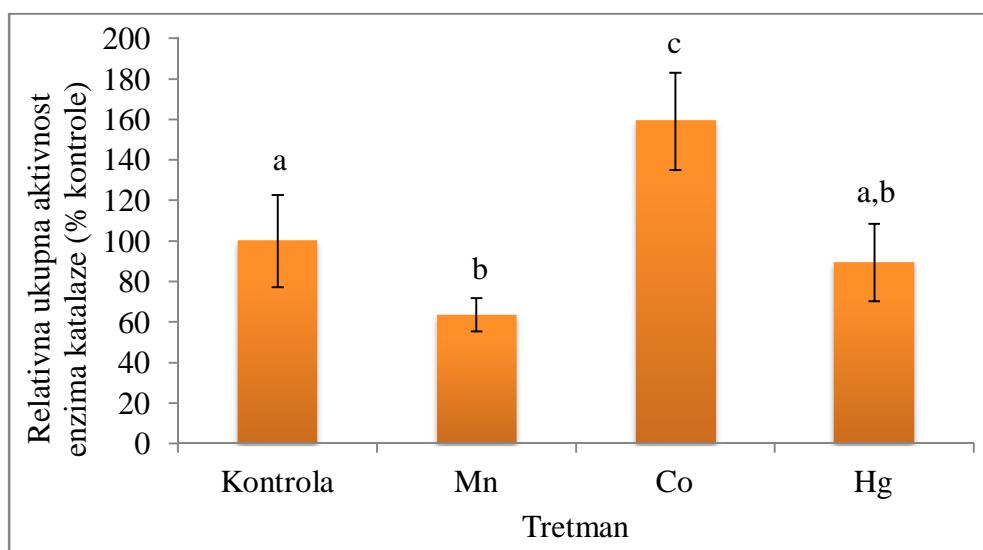
### 3. REZULTATI

#### 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 statistički značajno. Statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima od 36,4%, u odnosu na kontrolu, zabilježeno je u tretmanu s manganom. Značajan porast aktivnosti zabilježen je u korijenu biljaka tretiranim kobaltom (59,1%), slika 2.

Tablica 2. Vrijednosti ukupne aktivnosti katalaze ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svježe 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 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Tretman	Korijen					$\bar{x} \pm \text{SD}$
	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	-	-	$1,29 \pm 0,28$

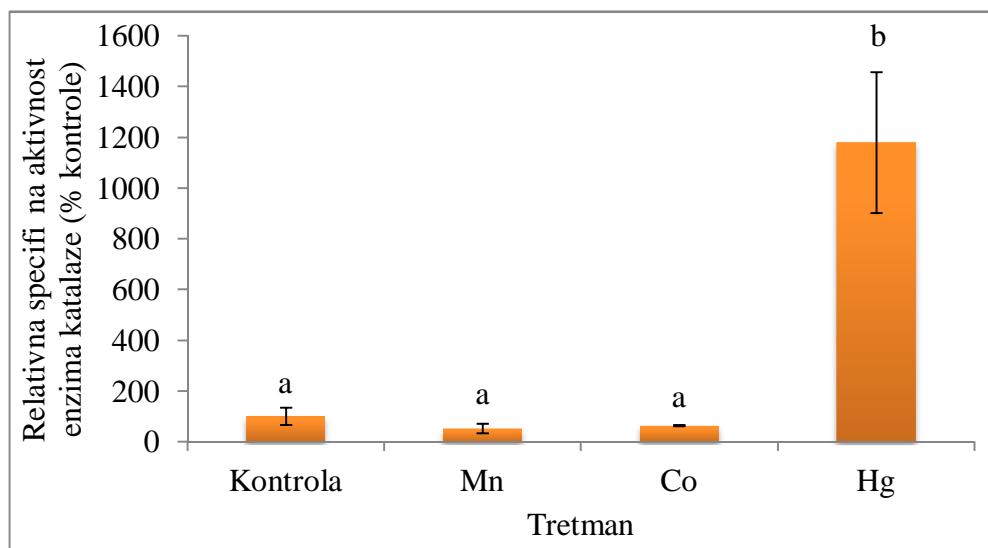


Slika 2. Ukupna aktivnost enzima katalaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju prema LSD testu ( $p=0,05$ ).

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 ( $x\pm SD$ ).

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

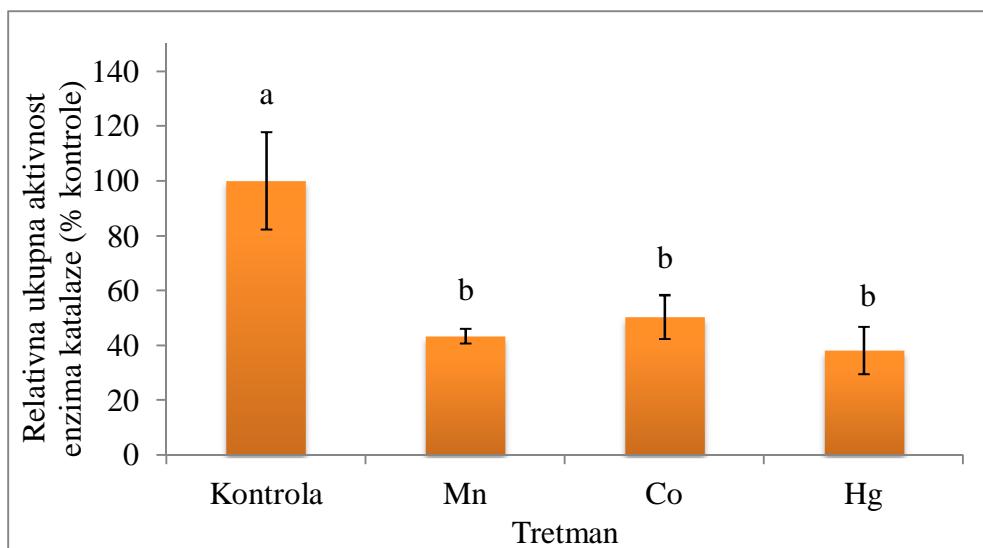


Slika 3. Specifi na aktivnost enzima katalaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

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% nifle u odnosu na kontrolne vrijednosti (slika 4).

Tablica 4. Vrijednosti ukupne aktivnosti katalaze ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svjeftle 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	
Kontrola	3,154	3,918	4,829	3,458	3,367	$3,745 \pm 0,666$
Mn	1,656	1,7	1,507	-	-	$1,621 \pm 0,100$
Co	1,983	2,123	1,548	-	-	$1,884 \pm 0,299$
Hg	1,057	1,584	1,646	-	-	$1,429 \pm 0,323$

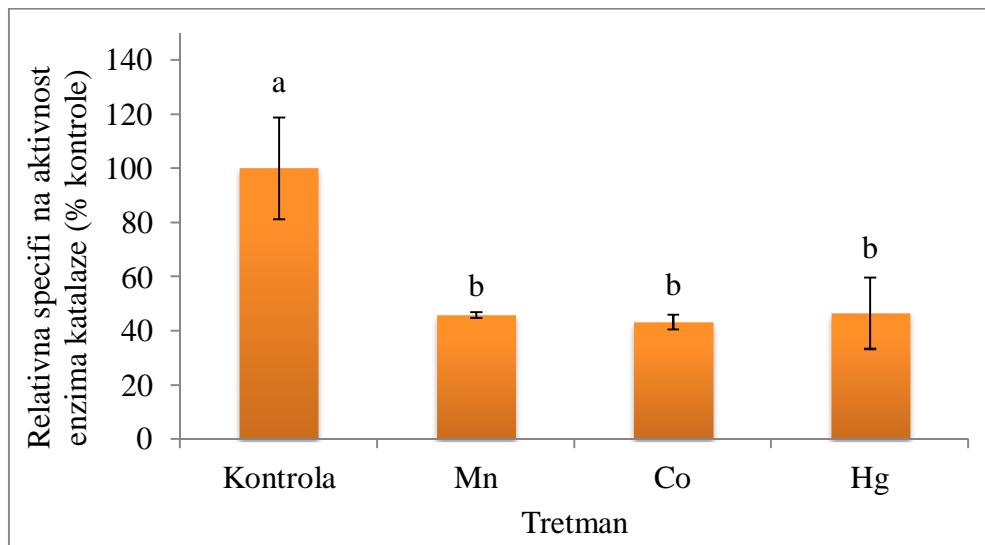


Slika 4. Ukupna aktivnost enzima katalaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost katalaze u listu se statistički značajno smanjila pri svim tretmanima 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 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	-	-	$0,255 \pm 0,072$



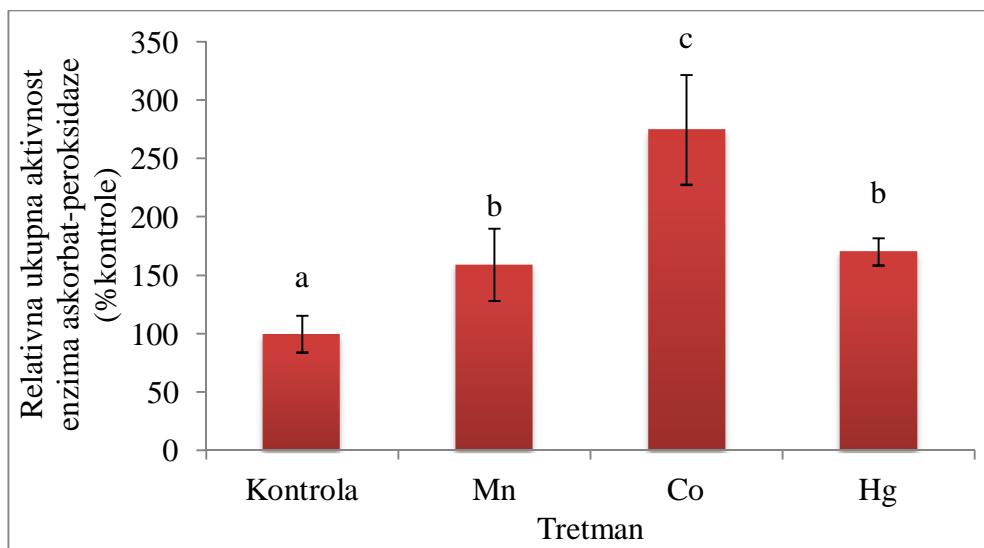
Slika 5. Specifična aktivnost enzima katalaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 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 flivom 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 najveću povećanje aktivnosti od 174,8% u odnosu na kontrolu (slika 6).

Tablica 6. Vrijednosti ukupne aktivnosti-askorbat peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svjeće 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 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

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

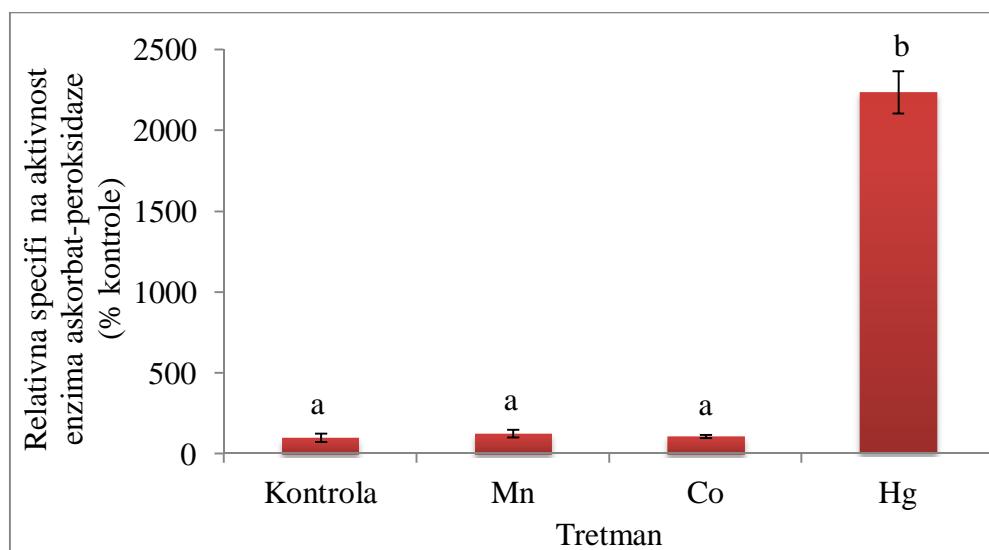


Slika 6. Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze u korijenu se nije statistički značajno promijenila kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom (tablica 7). Statistički značajno povećane 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 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

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

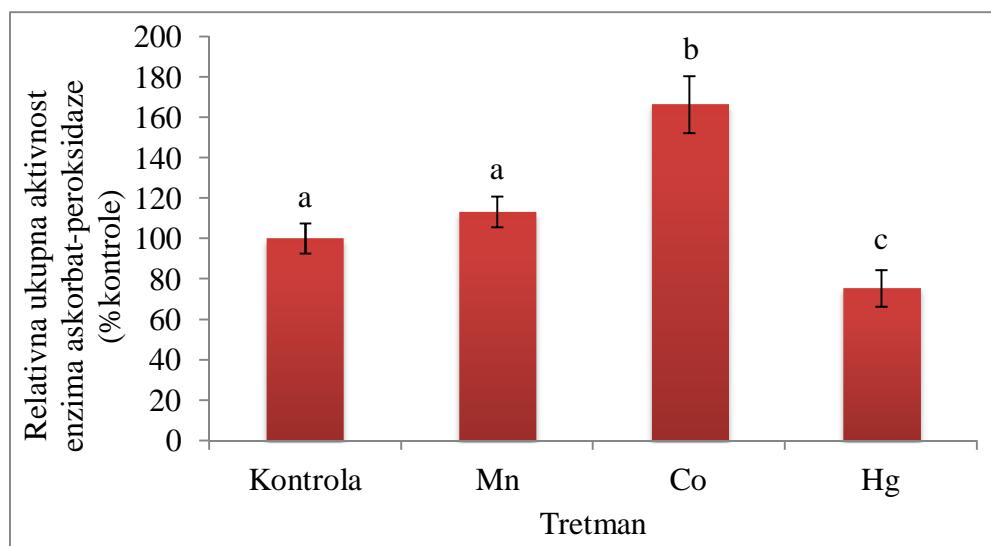


Slika 7. Specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$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

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

Tablica 8. Vrijednosti ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svjeftle 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	
Kontrola	2,411	2,225	2,605	2,462	2,171	$2,375 \pm 0,177$
Mn	2,874	2,686	2,509	-	-	$2,690 \pm 0,182$
Co	3,982	4,27	3,602	-	-	$3,951 \pm 0,335$
Hg	1,622	1,717	2,033	-	-	$1,791 \pm 0,215$

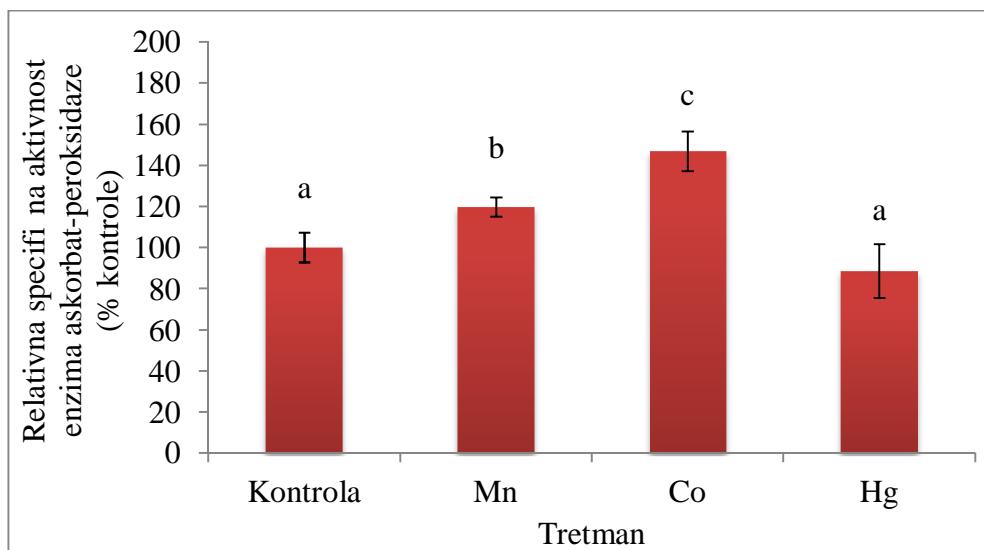


Slika 8. Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze u listu se statistički nije znatno razlikovala između biljaka tretiranih flivom i kontrolnih biljaka. Statistički znatno povećane 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 specifične aktivnosti askorbat-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  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>	0,358	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	-	-	$0,309 \pm 0,045$



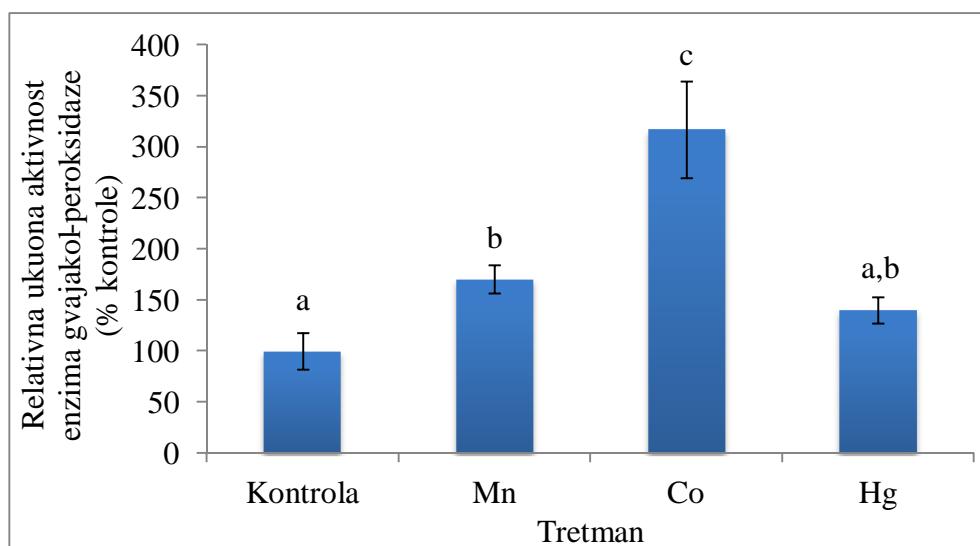
Slika 9. Specifična aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.3. AKTIVNOST ENZIMA GVAJAKOL-PEROKSIDAZE

Ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze u korijenu, bila je statistički značajno povećana 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 statistički značajne promjene aktivnosti u odnosu na kontrolu (slika 10).

Tablica 10. Vrijednosti ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svjeftle 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 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

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

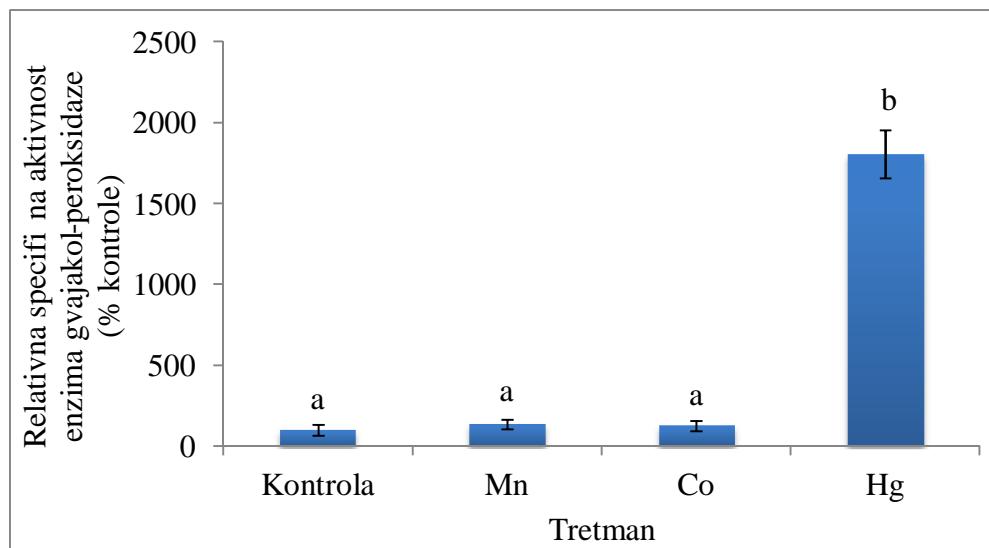


Slika 10. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ )

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 specifične aktivnosti gvajakol-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 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

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

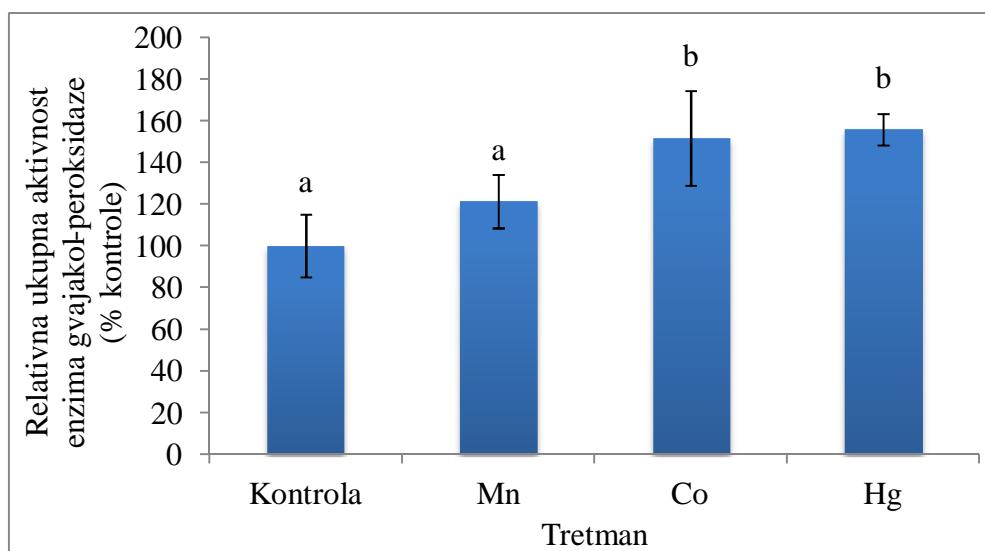


Slika 11. Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaze u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izraženi kao postotci i odnos na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu, nije se statistički značajno promijenila nakon tretmana manganom, iako je zabilježen porast od 21,2% u odnosu na kontrolu. Statistički značajno povećanje aktivnosti je utvrđeno u tretmanu kobaltom (51,8%) i flivom (55,8%) u odnosu na kontrolu (slika 12).

Tablica 12. Vrijednosti ukupne aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  svjeftle 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>	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	-	-	$0,757 \pm 0,036$

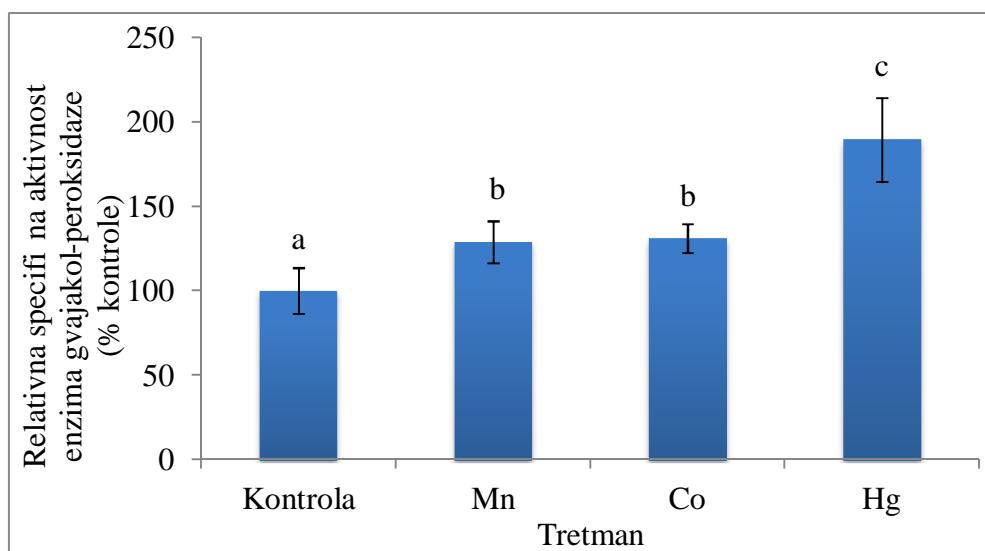


Slika 12. Ukupna aktivnost enzima gavjakol-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

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 specifične aktivnosti gvajakol-peroksidaze ( $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  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	
Kontrola	0,062	0,072	0,082	0,078	0,06	$0,071 \pm 0,009$
Mn	0,099	0,082	0,093	-	-	$0,091 \pm 0,008$
Co	0,1	0,091	0,088	-	-	$0,093 \pm 0,006$
Hg	0,118	0,153	0,132	-	-	$0,134 \pm 0,017$



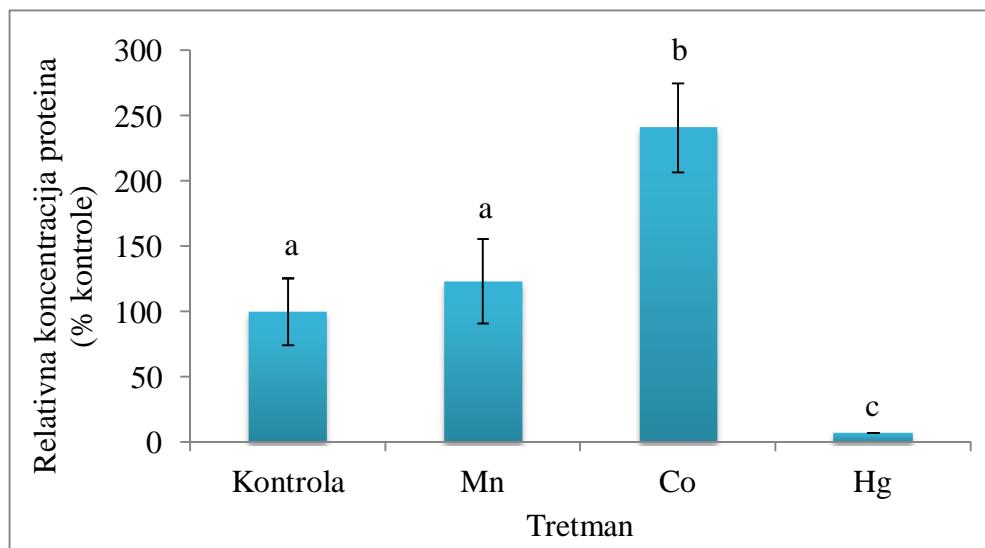
Slika 13. Specifična aktivnost enzima gavjakol-peroksidaze u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani označeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$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

### 3.4. KONCENTRACIJA PROTEINA

Koncentracija proteina u korijenu vrste *Pisum sativum* se nije statistički značajno promijenila pri tretmanu manganom u odnosu na netretirane biljke (tablica 14). Statistički znatna je porast koncentracije proteina (140,6%) u odnosu na kontrolu je zabilježena pri tretmanu kobaltom, dok je statistički znatna pad koncentracije (92,8%) utvrđena kod biljaka tretiranih flivom (slika 14).

Tablica 14. Koncentracija proteina (mg proteina g<sup>-1</sup> svjefti tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima razli itim 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

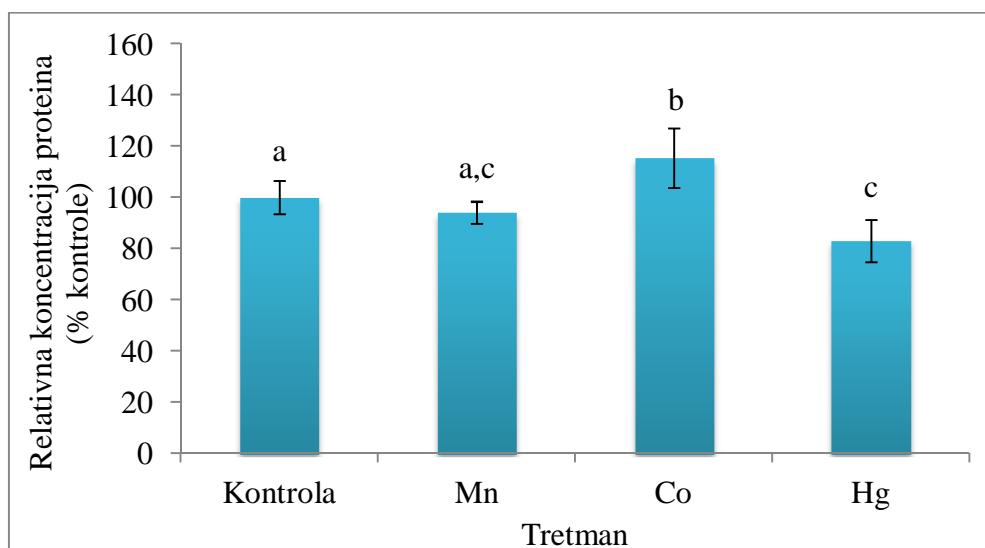


Slika 14. Koncentracija proteina u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu (p=0,05).

U listu se koncentracija proteina nije statisti ki zna ajno razlikovala izme u biljaka tretiranih manganom i netretiranih biljaka, budu i da je utvr eno smanjenje koncentracije od 5,9%. Statisti ki zna ajno pove anje koncentracije (15,4%) utvr eno je pri tretmanu kobaltom, dok je statisti ki zna ajno smanjenje koncentracije proteina od 17,0% zabiljefteno pri tretmanu flivom. Koncentracije proteina utvr ene kod biljaka tretiranih manganom i flivom nisu se razlikovale prema LSD testu (slika 15).

Tablica 15. Koncentracija proteina (mg proteina g<sup>-1</sup> svjefti tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima razli itim 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



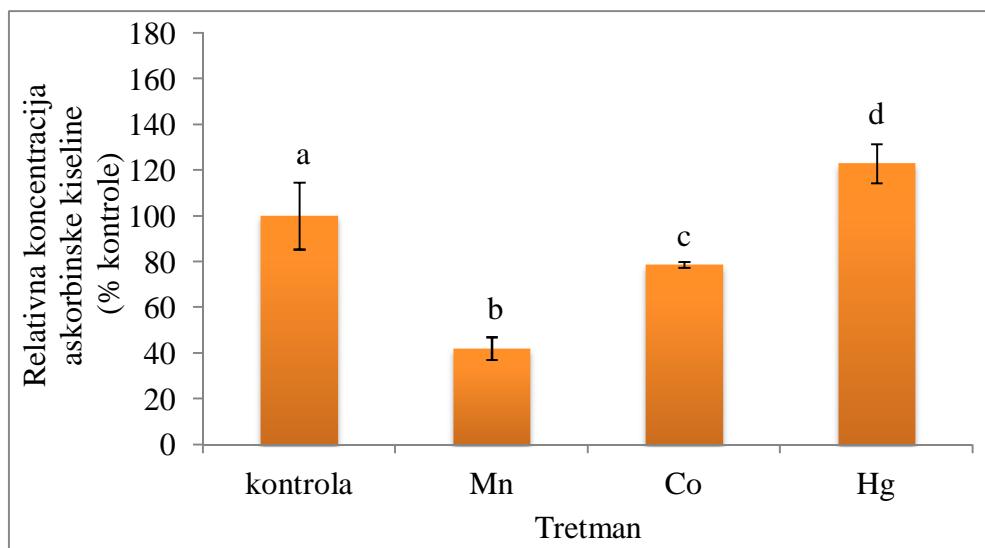
Slika 15. Koncentracija proteina u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima mangnom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu (p=0,05).

### 3.5. KONCENTRACIJA ASKORBINSKE KISELINE

Nakon tretiranja klijanaca gra-ka manganom i kobaltom u korijenu je do-lo do smanjenja koncentracije askorbinske kiseline u usporedbi s netretiranim biljkama (tablica 16). Najve e smanjenje (58%) utvr eno je pri tretmanu s manganom. U korijenu biljaka tretiranih flivom zabiljeflen je statisti ki zna ajan porast koncentracije askorbinske kiseline za 22,8% u odnosu na kontrolu (slika 16).

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

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

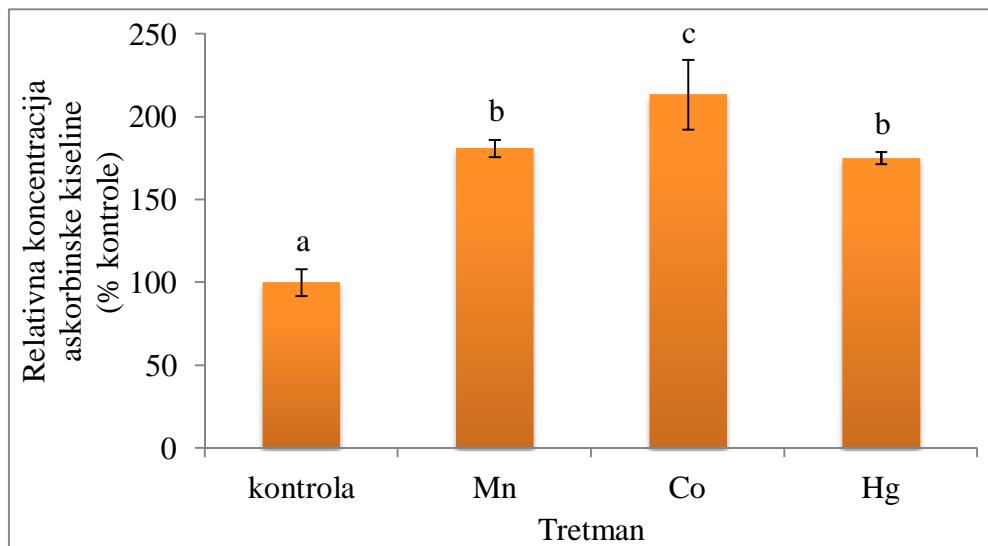


Slika 16. Koncentracija askorbinske kiseline u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Koncentracija askorbinske kiseline u listu se zna ajno pove ala pri sva tri tretmana. Najve e pove anje (113,3%) u odnosu na kontrolu je utvr eno kod biljaka tretiranih kobaltom. Tretmani manganom i flivom su tako er doveli do statisti ki zna ajnog pove anja koncentracije askorbinske kiseline od 80,9 odnosno 75,2% u odnosu na netretirane biljke (slika17).

Tablica 17. Koncentracija askorbinske kiseline ( $\text{nmol g}^{-1}$  svjeftle tvari) u listu vrste *Pisum sativum* 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	
Kontrola	102,198	126,996	116,947	115,824	122,363	$116,866\pm9,341$
Mn	205,235	211,931	217,205	-	-	$211,457\pm5,999$
Co	220,968	264,018	262,905	-	-	$249,297\pm24,539$
Hg	208,129	199,952	206,307	-	-	$204,796\pm4,292$



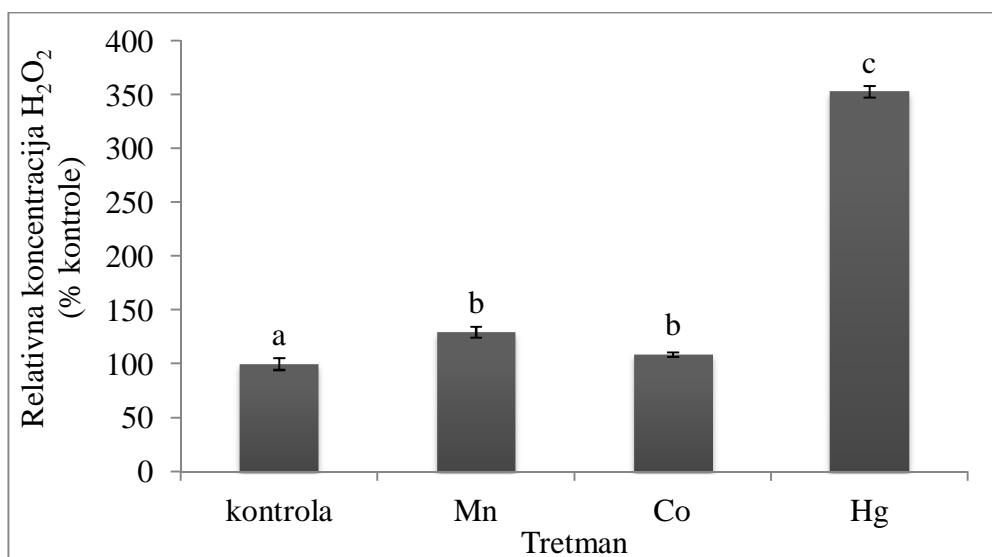
Slika 17. Koncentracija askorbinske kiseline u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

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

U korijenu svih tretiranih biljaka je utvr en porast koncentracije vodikovog peroksida u odnosu na kontrolu (tablica 18). Najve e pove anje je zabilješeno kod tretmana flivom, gdje je koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  bila za 252,9% ve a nego kod netretiranih biljaka. Pove anja koncentracije od 29,7 i 8,7% u odnosu na kontrolu (slika 18) su utvr ena pri tretmanu manganom, odnosno kobaltom.

Tablica 18. Koncentracija vodikovog peroksida ( $\text{nmol g}^{-1}$  svjeftle tvari) u korijenu vrste *Pisum sativum* 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>	1,062	1,178	1,193	1,075	1,172	$1,136\pm0,062$
<b>Mn</b>	1,539	1,428	1,455	-	-	$1,474\pm0,057$
<b>Co</b>	1,248	1,253	1,206	-	-	$1,236\pm0,025$
<b>Hg</b>	4,05	4,041	3,939	-	-	$4,010\pm0,061$

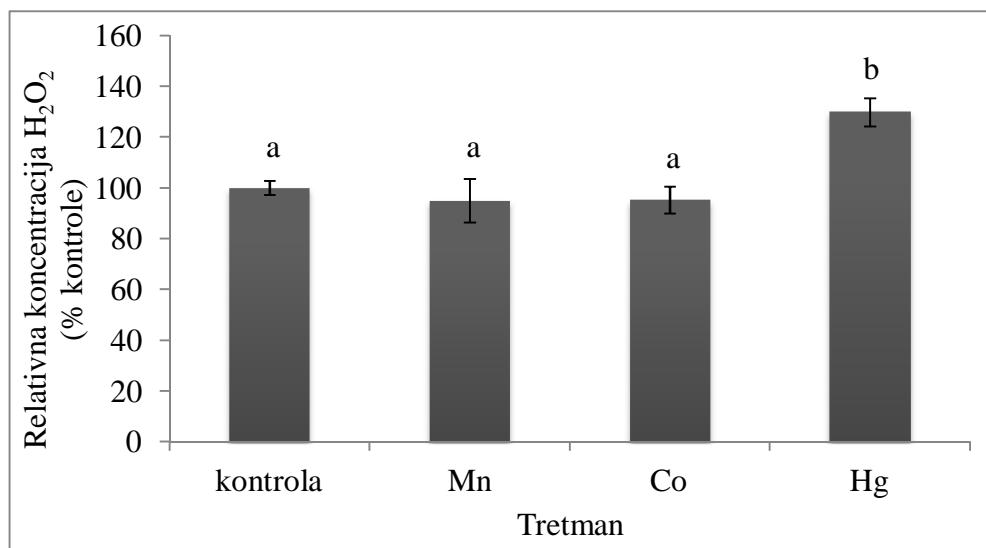


Slika 18. Koncentracija vodikovog perksida u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

U listu biljaka tretiranih flivom utvr en je statisti ki zna ajan porast koncentracije vodikovog peroksida u odnosu na kontrolu. Kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom do lo je do pada koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, te se ta dva tretmana prema LSD testu nisu me usobno razlikovala (slika 19).

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

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



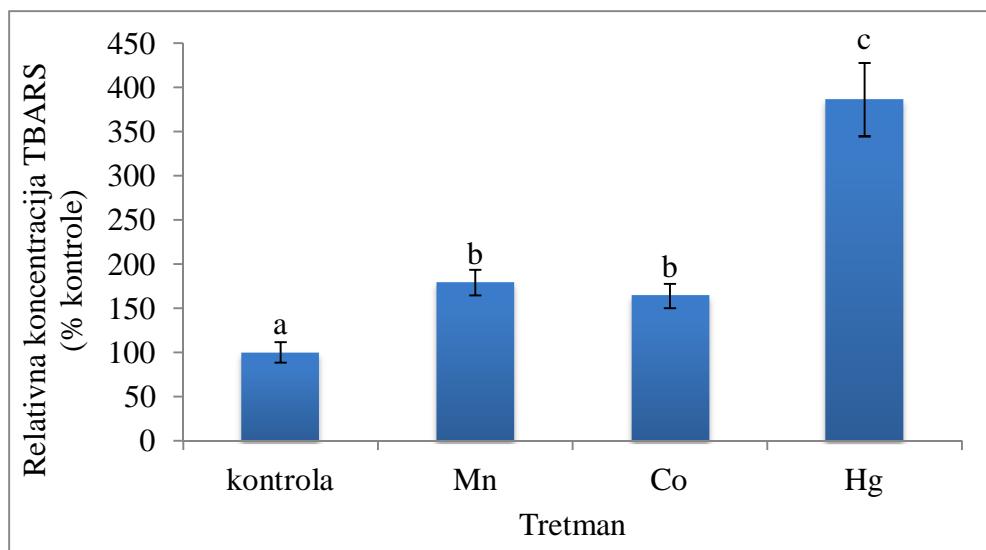
Slika 19. Koncentracija vodikovog peroksida u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.7. KONCENTRACIJA PRODUKATA LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije u korijenu vrste *Pisum sativum* se statisti ki zna ajno pove ala pri sva tri tretmana u odnosu na netretirane biljke (tablica 20). Najve i sadrflaj TBARS, 286,1% ve i nego kod kontrolnih biljaka, utvr en je kod biljaka tretiranih flivom, dok je najmanji sadrflaj TBARS utvr en u tretmanu kobaltom (slika 20).

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

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

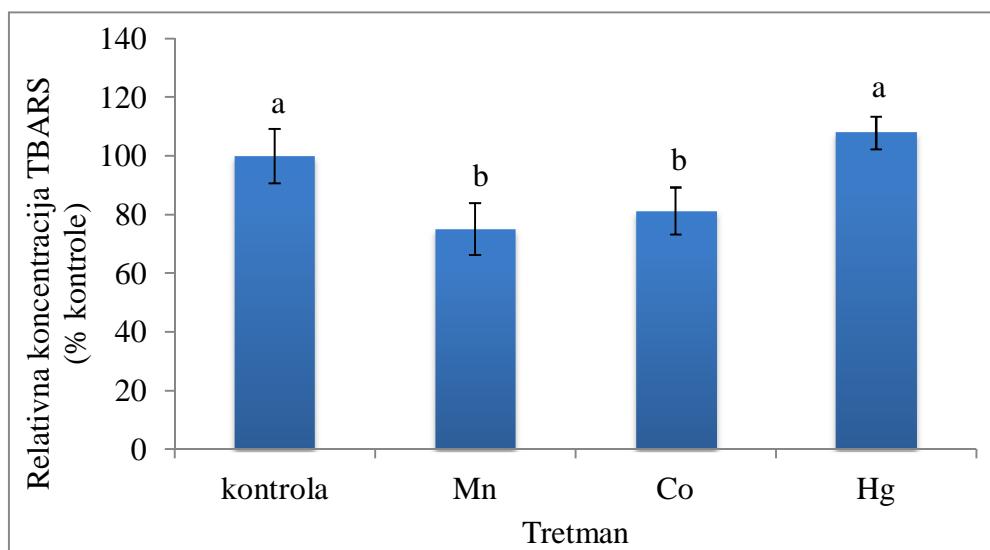


Slika 20. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije u korijenu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani oznaeni istim slovom se ne razlikuju po LSD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

U listu se koncentracija produkata lipidne peroksidacije poveala 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 ( $\text{nmol g}^{-1}$  svjeftle tvari) u listu vrste *Pisum sativum* pri tretmanima razliitim 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	
Kontrola	7,284	7,066	8,508	7,126	8,365	$7,670 \pm 0,706$
Mn	5,204	6,522	5,571	-	-	$5,766 \pm 0,679$
Co	6,945	5,897	5,858	-	-	$6,233 \pm 0,616$
Hg	8,597	7,783	8,439	-	-	$8,273 \pm 0,431$



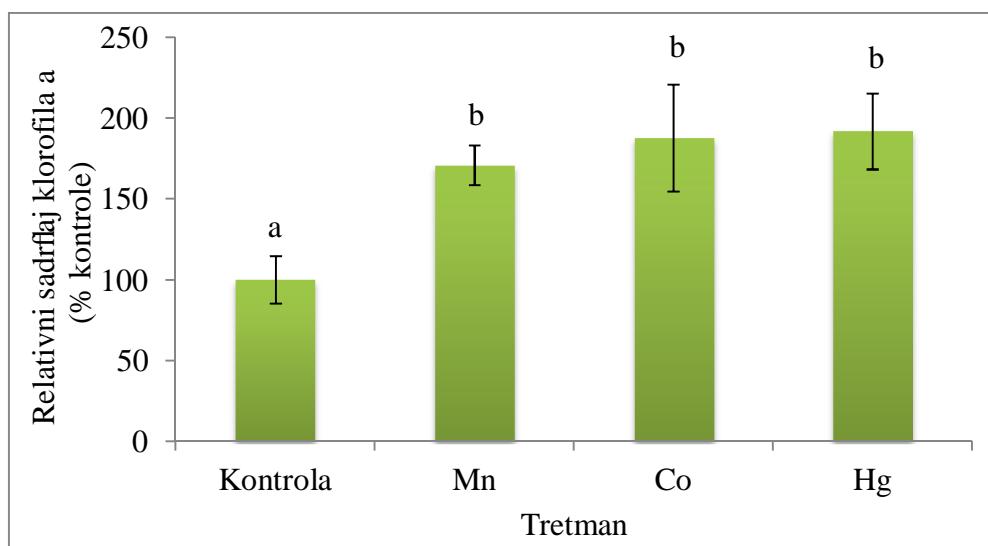
Slika 21. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafljeni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani oznaeni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

### 3.8. SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

Sadrflaj klorofila *a* u listu gra-ka se zna ajno razlikovao izme u tretiranih biljaka i kontrole (tablica 22). Do poveanja je do-lo kod sva tri tretmana, priemu je najvee zabiljefteno kod biljaka tretiranih flivom. Sadrflaj klorofila *a* se poveao 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 meusobno razlikovali (slika 22).

Tablica 22. Vrijednosti sadrflaja klorofila *a* ( $\text{mg g}^{-1}$  svjele tvari) u listu vrste *Pisum sativum* 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	Klorofil a					$x \pm \text{SD}$
	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	-	-	$1,244 \pm 0,152$

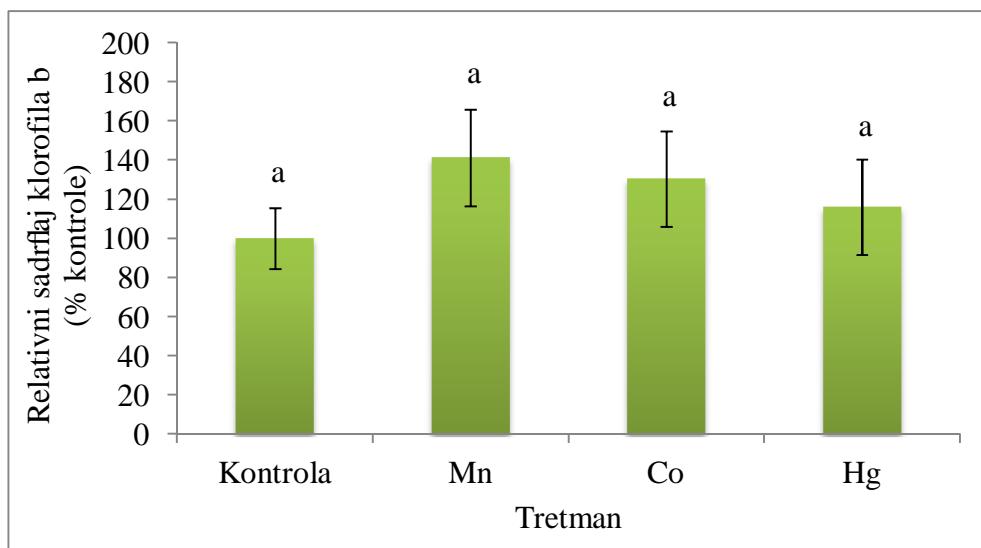


Slika 22. Sadrflaj klorofila *a* u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. Tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Primjenjeni tretmani nisu imali zna ajnog utjecaja na sadrflaj klorofila *b* i karotenoida u listu gra-aka. Kod svih tetiranih biljaka je utvr eno pove anje sadrflaja klorofila *b* (tablica 23). Najmanje pove anje od 15,8% je uzrokovao tretman flivom, dok je najve e (41,1%) zabiljefteno kod biljaka tretiranih manganom (slika 23).

Tablica 23. Vrijednosti sadrflaja klorofila *b* (Chl *b*) ( $\text{mg g}^{-1}$  svjefle tvari) u listu vrste *Pisum sativum* 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	Chl <i>b</i>					$\bar{x}\pm\text{SD}$
	1	2	3	4	5	
Kontrola	0,818	0,712	0,789	1,044	0,964	$0,865\pm0,135$
Mn	1,066	1,465	1,133	-	-	$1,221\pm0,213$
Co	1,04	0,975	1,369	-	-	$1,128\pm0,213$
Hg	1,187	0,773	1,048	-	-	$1,003\pm0,210$

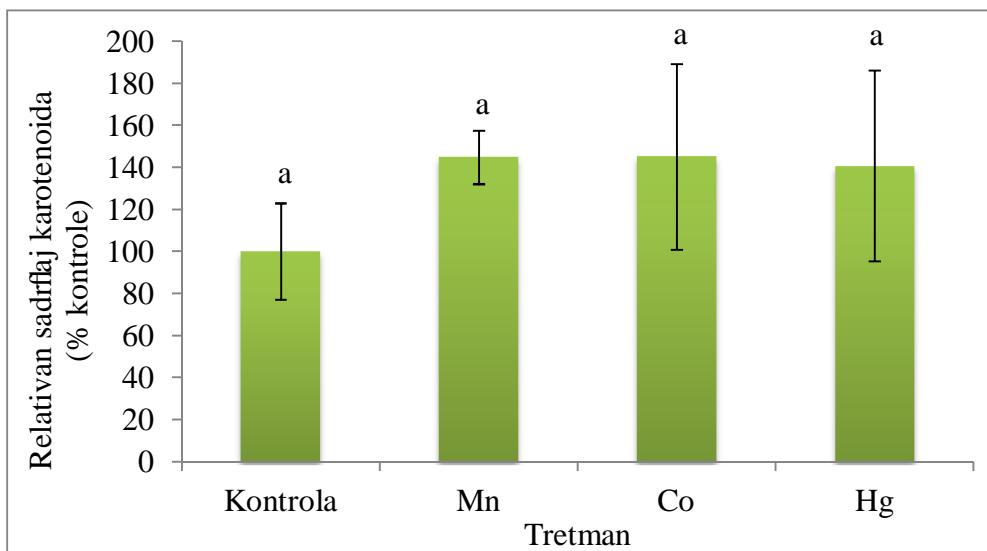


Slika 23. Sadrflaj klorofila *b* u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

I sadrflaj karotenoida se tako er pove ao u odnosu na netretirane biljke (tablica 24) . Kod biljaka tretiranih kobaltom je utvr en za 0,3% ve i sadrflaj karotenida, nego kod biljaka tretiranih manganom. Biljke tretirane flivom su imale 4,4% manji sadrflaj karotenoida u odnosu na biljke tretirane kobaltom. Tretmani se prema LSD testu nisu me usobno razlikovali (slika 24).

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

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

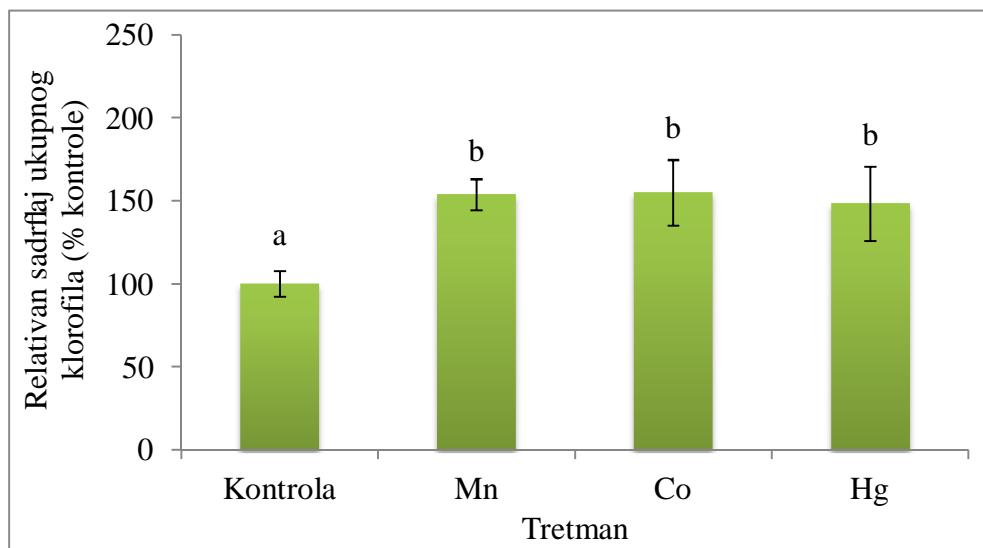


Slika 24. Sadrflaj karotenoida u listu vrste *Pisum sativum* L. pri tretmanima manganom, kobaltom i flivom. Rezultati su izrafleni kao postotci u odnosu na izmjerene vrijednosti u kontrolnim biljkama. <sup>a, b, c</sup> tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

Sadrflaj ukupnog klorofila (Chl  $a+b$ ) statisti ki se poveao kod sva tri tretmana u odnosu na netretirane biljke, pri emu je najve je poveanje zabiljefteno pri tretmanu manganom. Tretmani se prema LSD testu nisu znaju razlikovali (slika 25).

Tablica 25. Vrijednosti sadrflaja ukupnog kolorofila (Chl *a+b*) ( $\text{mg g}^{-1}$  svjeftle tvari) u listu vrste *Pisum sativum* 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	Ukupni klorofil					$\bar{x}\pm\text{SD}$
	1	2	3	4	5	
Kontrola	1,353	1,451	1,546	1,649	1,575	$1,515\pm0,114$
Mn	2,253	2,492	2,245	-	-	$2,330\pm0,140$
Co	2,492	2,003	2,547	-	-	$2,347\pm0,299$
Hg	2,452	1,857	2,434	-	-	$2,248\pm0,338$



Slika 25. Sadrflaj ukupnog klorofila 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. <sup>a, b, c</sup> tretmani ozna eni istim slovom se ne razlikuju po LSD testu ( $p=0,05$ ).

#### 4. RASPRAVA

Stres uzrokovani abioti kim imbenicima dovodi do prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) koje su visoko reaktivne i toksi ne. ROS dovodi do oksidativnog o-te enja proteina, lipida, nukleinskih kiselina i cjelokupnog metabolizma biljaka. Jedan od uzroka prekomjerne produkcije ROS-a u biljnim stanicama su i visoke koncentracije te-kih metala. Gra-ak je vaflan dio ljudske prehrane i esto kori-ten model u fiziolo-kim i molekularnim istraflivanjima (Hattab i sur., 2009).

Katalaza je enzim koji svojim oksidoreduktaznim djelovanjem razgra uje  $H_2O_2$  na vodu i elemetarni kisik i jedan je od klju nih enzima zaduflenih za uklanjanje toksi nih peroksida (Shi i sur., 2000). Zna ajno pove anje ukupne aktivnosti katalaze (CAT-u) u korijenu utvr eno 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 statisti ki zna ajno smanjanje aktivnosti CAT-u u odnosu na kontrolu. Tretman flivom uzrokovao je najve e smanjenje aktivnosti, iako se to smanjenje statisti ki ne razlikuje od utjecaja mangana na list. Chaoui i sur. (1997) su utvrdili da do smanjenje aktivnosti katalaze u listovima graha dolazi nakon pet dana izlofenosti 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 zabiljeflene smanjene aktivnosti katalaze može biti odgoda uklanjanja vodikovog peroksida od strane katalaze (Shi i sur., 2005). Osim smanjenja aktivnosti u literaturi je zabiljeflen i porast aktivnosti katalaze nakon izlaganja metalima. Tako su Singh i sur. (2010) te Prasad i sur. (1999) utvrdili pove anje aktivnosti CAT-u kod vrste *Brassica juncea* nakon tretmana bakrom i cinkom. U korijenu i listu raj ice izlagane flivi tako er dolazi do pove anja aktivnosti ovog enzima (Cho i Park, 2000). Kao mogu e obja-njenje pove anja aktivnosti navodi se smanjena produkcija vodikovog peroksida u stanci.

Zabiljeflena specifi na aktivnost enzima katalaze (CAT-s) u korijenu se uvelike razlikovala od ukupne aktinosti CAT. U odnosu na netretirane biljke samo je tretman flivom zna ajno pove ao specifi nu aktivnost katalaze u korijenu. Specifi na aktivnost katalaze u listu je pokazala sli an trend kao i ukupna. Kod sva tri tretmana je zabiljefeno zna ajno smanjenje aktivnosti CAT-s. Kao i kod ukupne aktivnosti u literaturi je zabiljefeno i smanjenje i pove anje specifi ne aktivnosti katalaze. Zhou i sur. (2008) utvrdili su pove anje 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 graška nakon tretmana manganom (50, 100 i 250 µM). Tewari i sur. (2001) utvrdili su porast aktivnosti CAT-s kod vrste *Phaseolus aureus* nakon tretmana s 50 µM Co te smanjenje aktivnosti pri višim koncentracijama (100, 200, 300 i 400 µM Co). Slično tome, Sharma i Dubey (2007) također izvještavaju o povećanju aktivnosti CAT-s kod rizle pri niskim 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 graška 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 sadržavaju proteaze, od kojih su neke uključene u senescenciju te je moguće da katalaza štakaje metađe proteazne aktivnosti u peroksisomima. Agraval 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 peroksidu i različitih reduksena (npr. fenola, prekurzora 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 peroksidu te imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od oksidativnog djelovanja ROS-a (Passardi i sur., 2005). Askorbat peroksidaza katalizira redukciju vodikovog peroksidu u vodu koristeći askorbinsku kiselinu kao elektron donor. Ima visoki afinitet za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ima sposobnost detoksificirati male količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mohan Murali Achary i sur., 2008). U korijenu graška je dobro dozna ajo povеćanje ukupne aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX-u) nakon tretmana tečkim 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 flivom povećali aktivnost ovog enzima za 59,4% odnosno 70,2%. Tretman kobaltom izazvao je i u listu najveće povećanje ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze. Za razliku od korijena, izlaganje flivi 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 flive je dobro dozna povećanje ukupne aktivnosti askorbat-peroksidaze u listu.

specifične aktivnosti enzima askorbat peroksidaze (APX-s) u korijenu tretiranih biljaka. Do najvećeg i statisti ki zna ajnog poveanja je do-lo 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 statisti ki zna ajno poveanje 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 građa tretiranog s  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , te Jung i sur. (2000) kod vrste *Cucumis sativus* tretirane  $15 \mu\text{M}$  norflurazonom. Poveana 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, takođe mogu dovesti do nastanka različitih oblika ROS-a, tzv. hidroksilni ciklus (Liszak i sur., 2003.; Passardi i sur., 2004). Djelovanjem metala na korijen građa do-lo je do poveanja ukupne aktivnosti gvajakol peroksidaze (GPX-u). Statisti ki zna ajno, i najveće, poveanje GPX-u utvrđeno je pri tretmanu kobaltom, dok tretman flivom nije imao zna ajnog u inka na GPX-u. Tretman manganom je zna ajno povećao aktivnost GPX-u u odnosu na kontrolu, te se nije prema LSD testu zna ajno razlikovalo od tretmana flivom. U listu su tretmani kobaltom i flivom utjecali na enzym zna ajnim poveanjem njegove ukupne aktivnosti u odnosu na kontrolne biljke te se nisu međusobno zna ajno razlikovali prema LSD testu. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze kod biljaka tretiranih manganom se takođe nije zna ajno razlikovala u odnosu na kontrolne biljke. U istraživanju Shi i sur. (2005) primjena mangana ( $600 \mu\text{M}$ ) u trajanju od pet i deset dana je dovela do poveanja aktivnosti GPX-u u listu krastavca. Prema istim autorima poveanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze može upravo ivati na povećanu produkciju ROS-a u stanici te da se poveanje aktivnosti može smatrati ne samo reakcijom na oksidativnu stres-tetu prouzrokovana te-kim metalima, nego i kao uobičajeni odgovor na različite tipove stresa. Singh i sur. (2010) su takođe utvrdili poveanje 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 rabićicom poveanje aktivnosti GPX-u u listu i korijenu nakon dvadeset dana izloženosti flivi ( $10$  i  $50 \mu\text{M}$ ). Isti autori navode da do povećane aktivnosti GPX-u dolazi nakon dufle izloženosti te pri većoj koncentraciji flive.

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

tretiranih flivom utvr en 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 istraflivanju u korelaciji s visokim koncentracijama primjenjenih metala u korijenu 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 uzrokovani 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 zabiljeflen 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 izloflenosti povi-enim koncentracijama metala bi se mogao objasniti pove anom sintezom stres-proteina kao -to su šheat-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 vaflan antioksidans koji uklanja ROS spontano kemijskim putem ili uz enzim askorbat peroksidazu. Prisutna je kod svih biljnih vrsta i u svim biljnim tkivima obavlja i klju nu ulogu u metabolizmu, rastu, razvoju, cvjetanju te odgovoru biljke na bioti ki i abioti ki stres (Proietti i sur., 2009). Najzastupljeniji je antioksidans u biljkama (Chao i sur., 2010) te je vaflna komponenta antioksidativne obrane i sluffi kao reducens kod peroksidativnog uklanjanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Guo i sur., 2005). Tako er je klju ni 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 utvr en je statisti ki zna ajan pad koncentracije askorbinske kiseline. Najve e smanjenje koncentracije askorbinske kiseline (58%), u odnosu na netretirane biljke, je utvr eno pri tretmanu manganom. Tretmani kobaltom i manganom su se prema LSD testu me usobno zna ajno razlikovali. Samo je kod biljaka tretiranih flivom zabiljeften statisti ki zna ajan porast koncentracije askorbinske kiseline u odnosu na kontrolu. Dok je u korijenu samo tretman flivom doveo do pove anja koncentracije askorbinske kiseline, u listu su sva tri tretmana dovela do statisti ki zna ajnog pove anja koncentracije, pri emu je najve e pove anje (113,3%) zabiljefteno u listu biljaka tretiranih kobaltom, dok se ostala dva tretmana prema LSD testu nisu zna ajno razlikovala. Pove anje koncentracije askorbinske kiseline je o ekivano s obzirom da je askorbinska kiselina vaflna komponenta antioksidativne obrane i jedan od klju nih metabolita askorbat glutation ciklusa.

Vodikov peroksid je toksi ni stani ni metabolit, aktivna kisikova jedinka koja reagira sa superoksidnim radikalima i formira reaktivnije hidroksilne radikale (El-Shora, 2003). Me utim, smatra se da u biljnim i flivotinjskim stanicama sluffi i kao signalna molekula. Do pove ane produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi u uvjetima abioti kog i bioti kog stresa, i neki autori navode da vodikov peroksid ima dvojaku ulogu u biljnim stanicama. Pri niflim koncentracijama ima ulogu signalne molekule uklju ene u aklimatizaciju i pokretanje tolerancije na razli ite abioti ke stresove, dok pri vi-im sudjeluje u programiranoj stani noj smrti (de Azevedo Neto i sur., 2005). Povi-ene razine vodikovog perokksida u stanicama su -tetne zbog raznih negativnih efekata me u kojima se isti e inicijacija lipidne peroksidacije. U korijenu svih tretiranih biljaka je utvr en statisti ki zna ajan porast koncentracije vodikovog perokksida u odnosu na kontrolu. Najve e pove anje (252,9%) je zabiljefteno u korijenu biljaka tretiranih flivom, u odnosu na netretirane biljke. Mohan Murali Achary i sur., (2008) su utvrdili da do porasta koncentracije vodikovog perokksida dolazi u korijenu luka tretiranog razli itim koncentracijama aluminija. U listu je jedino tretman flivom doveo do porasta koncentracije vodikovog perokksida. Utvr eni porast je bio statisti ki zna ajan u

odnosu na netretirane biljke. Kod biljaka tretiranih manganom i kobaltom do-lo je do pada koncentracije vodikovog peroksida te se ti tretmani i kontrola nisu me usobno razlikovali. U istraživanju utjecaja bakra na klijance rifle koje su proveli Thounaojam i sur. (2012) utvr ena je ve a koncentracija  $H_2O_2$  u korijenu nego u listu, -to upu uje na to da je korijen primarno mjesto formiranja ROS-a. U svome radu Eraslan i sur. (2007) izvje-tavaju o pove anju koncentracije  $H_2O_2$  u listu vrste *Lactuca sativa* nakon tretmana s  $300 \mu M$  B,  $40 mM$  NaCl, te kombiniranoj izloflenosti B+NaCl ( $300 \mu M$ ,  $40 mM$ ). Dobiveni rezultati ukazuju da je fliva najtoksi niji od primjenjenih metala te da je dovela do razvoja oksidativnog stresa u korijenu gra-ka. Koncentracije vodikovog peroksida izmjerene u korijenu i listu upu uju na to da je korijen primarno mjesto formiranja ROS-a i razvoja oksidativnog stresa.

Peroksidacija lipida se smatra jednim od naj-teftnijih procesa koji se doga aju u flivim organizmima (Gill i Tuteja, 2010). Lipidna peroksidacija dovodi do o-te enja membrana lan ano -ire i o-te enja. Promjene u stupnju lipidne peroksidacije slufle kao mjera oksidativne -tete 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 biolo-kim sustavima (Yannarelli i sur., 2007). Porast koncentracije TBARS-a je uobi ajeni simptom stresa uzrokovanih te-kim metalima (Cho i Seo, 2005). Sva tri tretmana su dovela do zna ajnog pove anja sadrflaja TBARS-a u korijenu gra-ka. Najve e pove anje (286,1%) u odnosu na kontrolu zabilješeno je u korijenu biljaka tretiranih flivom, dok se tretmani manganom i kobaltom nisu me usobno zna ajno razlikovali prema LSD testu. Ovi rezultati upu uju na to da su primjenjeni tretmani doveli do pojave oksidativnog stresa. U listu je pove anje koncentracije produkata lipidne peroksidacije utvr eno kod biljaka tretiranih flivom te se nije zna ajno razlikovalo od vrijednosti utvr enih kod netretiranih biljaka. Tretmani manganom i kobaltom su doveli do statisti ki zna ajnog pada sadrflaja TBARS-a u odnosu na kontrolne biljke. Uzimaju i u obzir dobivene rezultate te da su mangan, kobalt i fliva isklju ivo apsorbirani putem korijena u kojem je do-lo do razvoja oksidativnog stresa, možemo zaklju iti da primjenjeni metali imaju nizak stupanj transporta u nadzemne dijelove biljke. Shi i sur. (2005) utvrdili su porast sadrflaja TBARS-a u listu krastavca nakon tretmana manganom ( $600 \mu M$ ). Sharma i Dubey (2007) navode da je pove anjem koncentracije aluminija u hranjivom mediju do-lo do porasta koncentracije TBARS-a u korijenu i listu vrste *Oriza sativa* te da ti rezultati sugeriraju kako je toksi nost aluminija povezana s pojmom oksidativnog stresa u klijancima rifle. Do pove anja stupnja lipidne peroksidacije dolazi i u listu *Medicago sativa* nakon dvanaest dana izloflenosti flivi (Zhou i sur., 2007). Promjene do kojih je do-lo nakon izlaganja mangantu, kobaltu i flivi, u

koncentraciji vodikovog peroksida u korijenu i listu gra-ka pokazuju sličnosti s promjenama u koncentraciji produkata lipidne peroksidacije. U tretmanu sa sva tri metala porast koncentracije vodikovog peroksida pravilen 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 pravilno je povećanjem koncentracije TBARS-a od 4 puta. Iako je dobro do višestrukog povećanja aktivnosti enzima zadušenih za uklanjanje vodikovog peroksida iz stanice (CATs 12 puta, APXs 22 puta, GPXs 18 puta) razine ovog toksinog metabolita u korijenu biljaka tretiranih flivom višestruko su veće nego u kontrolnim biljkama.

ROS mogu oksidirati proteine, lipide i nukleinske kiseline što dovode i do promjena u strukturi stanice i do mutogeneze. 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 krotenoidi 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 šhvatači ROS-a u stanici, osobito singlentnog kisika (Tewari i sur., 2001). Isti autori navode da -interferencijom tečnih metala, uključujući i kobalt s normalnim metabolizmom fljeza dolazi do smanjene sinteze klorofila. Dokazano je da tečni metali utječu na biosintezu klorofila, bilo da je stimuliraju ili reduciraju (Yang i sur., 2010). Isti autori su u svojem eksperimentu sa p-enicom utvrdili da niskie koncentracije olova nisu znajućno utjecale na ukupni klorofil, uključujući klorofil *a* i *b*, dok su visike koncentracije olova dovele do znajućeg smanjenja sadržaja klorofila. Navode da olovo može reducirati klorofil inhibirajući biosintezu pigmenata 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 gra-ka sadržaj klorofila *a* se znajućno razlikovao između tretmana i kontrole. Pri svim tretmanima 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 znajućno promijenio nakon primjenjivanja tretmana. Kod svih tretiranih biljaka je zabilježeno povećanje sadržaja klorofila *b* i karotenoida, međutim to povećanje se nije statistički znajućno 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 –te klorofil od

fotooksidativne destrukcije, stoga zna ajna redukcija u koli ini karotenoida može imati ozbiljne posljedice na koli inu klorofila i tako dovesti do smanjene fotosintetske efikasnosti biljke (Prasad i sur., 2005). Isti autori su klijance soje izlagali različitim koncentracijama niklata Ni+UV-B i utvrdili zna ajno smanjenje sadršta kloroplastnih pigmenata (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 niklata. Agrawal i Mishra (2009) su proučavali utjecaj kadmija i UV-B na klijance gračaka te su tako utvrdili zna ajnu redukciju i klorofila i karotenoida. U ovom eksperimentu je utvrđeno da su primjenjeni tretmani zna ajno povećali sadršta ukupnog klorofila u odnosu na netretirane biljke. Kod biljaka tretiranih mangansom je utvrđeno najveće, dok je pri tretmanu flivom utvrđeno najmanje povećanje sadršta ukupnog klorofila. Tretmani se prema LSD testu međusobno nisu zna ajno razlikovali.

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je sedmodnevni tretman mladih biljaka graška povećao koncentracijama mangana, kobalta i flive u hranjivoj otopini uzrokovao aktivaciju antioksidativnih sustava i obrambenih fizioloških reakcija.

Najveće specifične aktivnosti enzima CAT, GPX i APX su utvrđene kod biljaka tretiranih flivom, 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 fliva jer je dovela do razvoja oksidativnog stresa.

Koncentracije vodikovog peroksida izmjerene u korijenu i listu upuštaju 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 više ROS-a i spriječili njihovo djelovanje 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. *Ecootoxicology 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.

Greene, 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 induces 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.

Liszkay, 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): Biocemical Responses of *Pisum sativum* L. Under Cadmium and Mercury Regimes. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 29: 379-382.

Miki , A., Mihailovi , V., upina, 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 Enviromental 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 expresion 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 plant, *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 if 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 ba 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.