

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

**A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin hatása a
vízínövények növekedésére, proteáz és nukleáz enzimeik
aktivitására**

**The effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on
the growth and protease and nuclease enzyme activities of
aquatic plants**

Jámbrik Katalin

Témavezetők: Dr. Mikóné dr. Hamvas Márta
Dr. Borbély György



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2011

1. Bevezetés és célkitűzések

A cianobaktériumok sokféle szekunder metabolit szintézisére képesek, amelyek hatásairól, funkciójáról keveset tudunk. Tömeges elszaporodásuk a vízterekben az ún. vízvirágzás, egyre gyakoribb, globális jelenség. A cianobakteriális vízvirágzások sok esetben felelőssé tehetőek a környezetükben élő vad- és háziállatok, halak, vízimadarak pusztulását, valamint a lakosság körében előforduló egészségügyi problémákért (Codd és mtsai. 1994, Falconer és mtsai. 1983).

Hazánkban, a Balaton és a Velencei-tó eutrofizációja okozta a legnagyobb gondot, melynek során potenciálisan toxintermelő cianobaktérium fajok (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii* és *Microcystis aeruginosa*) tömeges elszaporodása volt jellemző (Vörös és mtsai. 1983, Padisák és mtsai. 1984, Gorzó 1985, Törökné és mtsai. 2000, Reskóné mtsai. 2001). 1991-ben a Velencei-tavon, egysejtű, kolóniákat alkotó cianobaktérium, a *Microcystis aeruginosa* tömegprodukciója és a vízben felhalmozódó toxikus anyagcseretermékek az ún. mikrocisztinek hívták fel a figyelmet a cianobakteriális vízvirágzás hazai veszélyeire (Kós és mtsai. 1995, Reskóné mtsai. 2001). A mikrocisztinek (MCY) endotoxinok, magas koncentrációjuk elsősorban a vízterek parti régiójában alakulhat ki, ahol a vízvirágzások során nagy mennyiségű cianobaktérium tömeg verődik össze, majd a sejtek elpusztulnak, lizálódnak. A sejtekből kiszabaduló mikrocisztinek stabil ciklikus heptapeptid szerkezetüknek köszönhetően még sokáig kimutathatók a vízmintákból (Bourne és mtsai. 1996, Lahti és mtsai. 1997, Manage és mtsai. 1999).

A vízinövények, különösen a parti régió növényei, a *M. aeruginosa* által okozott vízvirágzások során érintkezésbe kerülhetnek a mikrocisztinokkal, képesek annak felvételére (Pflugmacher 2004). A mikrocisztinek az eukarióta sejtek PP1 és PP2A típusú protein-foszfataáz enzimeinek specifikus gátlószerei. Befolyásolják a sejtek növekedését, a sejtciklust, stresszenzimeket indukálnak és hatással lehetnek a programozott sejthalál folyamatára is (MacKintosh és mtsai. 1990, McDermott és mtsai. 1998, Mankiewicz és mtsai. 2001, Lankoff és mtsai. 2003). Különböző vízinövény fajokban bizonyították a cianotoxinok növekedésgátló hatását (Mitrovic és mtsai. 2005, Saqrane és mtsai. 2007), a

stresszenzimek közül, az RN-áz, glutation-S-transzferáz, szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz enzimek aktivitásának emelkedését detektálták MCY-LR kezelések hatására (Pflugmacher és mtsai. 2004, Mitrovic és mtsai. 2005).

A cilindropermopszin (CYN) alkaloid típusú, kémiai szerkezetében és hatásmechanizmusában is eltér a cianobaktériumok által termelt hepatotoxinok többi tagjától. Szintézisükre a *Cylindropermopsis raciborskii*-n kívül még számos cianobaktérium genusz (pl. *Aphanizomenon* sp.) törzsei is képesek (Banker és mtsai. 1997). Bizonyított, hogy a CYN képes befolyásolni a vízi életközösségek egyes állatfajainak egyedfejlődését, életképességét (Kinneer és mtsai. 2007, White és mtsai. 2007). A vízi növények közül a nádban morfológiai-, szövet- és sejtszintű elváltozásokat idézett elő (Beyer és mtsai. 2009). A CYN hatásmechanizmusa kevésbé tisztázott, a fehérjeszintézis folyamatát gátolta állati és növényi tesztrendszerekben (Froschio és mtsai. 2001, 2003, 2008; Metcalf és mtsai. 2004).

A természetben, a vízinövény-cianotoxin kölcsönhatás a cianobaktériumok tömeges elszaporodása, az ún. vízvirágzás során ténylegesen megvalósul, hiszen az elpusztuló cianobaktérium sejttömegből kiszabaduló cianotoxinok (CYN és MCY) a mikrobiális lebontó folyamatok ellenére hetekig, vagy akár hónapokig is viszonylag magas koncentrációban jelen lehetnek a vizekben (Jones és Orr 1994, Kós és mtsai. 1995, Bourne és mtsai. 1996, Lahti és mtsai. 1997, Manage és mtsai. 1999). A vízinövények, cianotoxikus vízvirágzás alkalmával folyamatosan ki vannak téve a cianotoxinok hatásainak, amelyek képesek bejutni és eltérő mértékben akumulálódni a vízi makrofita szervezetekben (Kinneer és mtsai. 2007a, b; 2008). Terepi megfigyelések bizonyítják, hogy a cianobakteriális vízvirágzások következtében a vízi növények egyedszámában és a vízi növényközösség diverzitásában is csökkenés következhet be (Harper 1992, Saqrane és mtsai. 2007). Az ennek hátterében álló cianotoxinok okozta növényfiziológiai- és biokémiai folyamatok azonban messze nem tisztázottak.

Vizsgálataink során a két fentebb említett cianotoxin, a MCY-LR és a CYN különböző, a vizek parti régiójában jellegzetes vízinövény fajokra, a vízfelszínen lebegő apró békalencsére (*Lemna minor*) és vízidarára (*Wolffia arrhiza*), az alámerülő érdes tócsagazra (*Ceratophyllum demersum*) valamint a

parti régióban gyökerező nádra (*Phragmites australis*) gyakorolt hatásait elemeztük, és vetettük össze a szakirodalomban található eredményekkel. Az általunk kiválasztott fajok fontos tagjai a vízinövény közösségeknek és bizonyítottan érzékeny bioindikátorok (Pflugmacher 2004, Mitrovic és mtsai. 2005).

A cianotoxinok vízinövényekre gyakorolt hatásait két megközelítésben vizsgáltuk:

(1) a kezelések során tisztított MCY-LR és CYN vizes oldatait alkalmazva, -amelytől a cianotoxinok hatásmechanizmusára vonatkozóan vártunk új adatokat-, illetve

(2) a *Microcystis aeruginosa* és *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek liofilizátumaiból készült MCY-LR, illetve CYN tartalmú vizes extraktumokat használva, ami lehetővé tette a természetben lejátszódó jelenségek modellezését. Kísérleteink során olyan toxinkoncentrációkat alkalmaztunk, amelyek vízvirágzások idején a parti sávban felhalmozódó, majd elpusztuló sejtömegekből kiszabadulhatnak (Máthé és mtsai. 2007, Sivonen és Jones 1999).

Célkitűzések

a.) A MCY-LR növekedésgátló hatásainak elemzése *Lemna minor*, *Wolffia arrhiza* és *Ceratophyllum demersum* tenyészetekben. A „nyers toxintartalmú kivonat” (*M. aeruginosa* tenyészet/sejtek MCY-LR tartalmú extraktumai) és a tisztított toxin (*M. aeruginosa* tenyészetből tisztított MCY-LR) növekedésgátló hatásainak összevetése.

b.) Poliakrilamid enzim-aktivitásgéleken annak vizsgálata, hogy a tisztított MCY-LR, valamint a nyers MCY-LR tartalmú *M. aeruginosa* extraktumok előidéznek-e enzimszintű változásokat? A stresszválaszokban kulcsfontosságú hidrolázok közül az egyes növényfajokra jellemző proteázok-, és az egyfonalú, valamint a duplaszálú DNS-t hasító nukleázok (ssDN-ázok és ds DN-ázok) MCY-LR okozta aktivitásváltozásainak elemzése a fentebb említett fajokban.

Az enzimaktivitás- és enzimmintázat-változások eredményeinek összevetése a sejt strukturális változásaival a *Phragmites australis* és a *Ceratophyllum demersum* növényekben.

c.) A hatásmechanizmusát tekintve kevésbé vizsgált CYN növekedésgátló hatásainak elemzése *Lemna minor* és *Wolffia arrhiza* tenyészetekben. A nyers CYN tartalmú cianobaktérium extraktumok és a tisztított toxin növekedésgátló hatásainak összevetése.

d.) A tisztított CYN-nel és a CYN tartalmú nyers *Aphanizomenon ovalisporum* extraktumokkal történő kezelések okozta proteáz és nukleáz enzimintázat- és aktivitás-változások vizsgálata poliakrilamid aktivitásgeleken.

e.) A két hatásmechanizmusában eltérő cianotoxin, a MCY-LR és a CYN okozta növekedésbeli és enzimszintű (proteáz, nukleáz) változások összevetése.

2. Anyag és módszer

2.1. *Microcystis aeruginosa* tenyésztése, a toxintartalmú nyers kivonatának előállítása, a mikrocisztin-LR tisztítása

A vizsgálataink során használt *Microcystis aeruginosa* törzs az 1991. évi velencei-tavi toxikus vízvirágzásból származó izolátum (BGSD-243). Erről a törzsről bizonyított, hogy cianotoxinokat termel, amelyek közül a MCY-LR a domináns (Kós és mtsai. 1995, Vasas és mtsai. 2004).

A *Microcystis aeruginosa* tenyésztése Allen tápoldatban történt (Allen 1968, Vasas és mtsai. 2004). A stationer fázisban lévő tenyészeteket centrifugáltuk, majd az összegyűjtött sejtüledéket liofilizáltuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az ezekből készült vizes extraktumok MCY-LR tartalmát kapilláris elektroforézis segítségével határoztuk meg (Vasas és mtsai. 2004). A MCY tartalmú nyers kivonatok toxintartalmát, a szakirodalomnak megfelelően, MCY-LR ekvivalens értékekben adjuk meg (Saqrane et al. 2007).

A tisztított cianotoxin előállítása a tenyészetek összegyűjtött sejtüledékeiből Kós és mtsai. (1995) módosított eljárása alapján (Vasas és mtsai. 2002, 2004) történt. A cianotoxin tisztaságát fotometriásan, HPLC és kapilláris elektroforézis módszerek segítségével ellenőriztük (Vasas és mtsai. 2002, 2004).

2.2. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyésztése, toxintartalmú nyers kivonatának előállítása, a cilindropermopszin tisztítása

A vizsgálataink során használt *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti, ILC-164, BGSD-423) törzs az 1994. évi izraeli kinneret-tavi toxikus vízvirágzásból származó izolátum (Banker és mtsai. 1997).

A vizsgálatainkhoz szükséges tenyészetek fenntartása, tenyésztése Allen tápoldatban történt (Allen 1968, Vasas és mtsai. 2004). A nyers kivonatok előállítása: az exponenciális növekedési fázisban lévő *A. ovalisporum* tenyészetet centrifugáltuk, az összegyűjtött sejtüledéket fagyasztás után liofilizáltuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A liofilizátum vizes extraktumának CYN tartalmát kapilláris elektroforézis módszerével határoztuk meg (Vasas és mtsai. 2002, 2004).

A tisztított CYN kinyerése: az *A. ovalisporum* tenyészetet centrifugáltuk, majd az összegyűjtött üledéket felhasználásig -20°C-on tároltuk. A cianotoxin tisztítása Vasas és munkatársai által kidolgozott módszerrel történt (Vasas és mtsai. 2002, 2004).

2.3. Növénytesztek

A kísérletekhez *Lemma minor*, *Wolffia arrhiza*, *Ceratophyllum demersum* és *Phragmites australis* vízinövények axenikus tenyészeit használtuk. A *L. minor*, *W. arrhiza*, *C. demersum* törzstenyészetek nevelése Allen tápoldatban (Allen 1968), fotoperióduson (14/10h), 21°C-on, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitácson, 25 és 100 ml-es tenyészedenyekben történt.

A kezelésekhöz alkalmazott *P. australis* növények embriogén kalluszokból regenerált „mini nádnövények” voltak (Máthé és mtsai. 2007, 2009). A nád esetében módosított MS táptalajt használtunk (Gamborg és mtsai. 1968, Murashige és Skoog 1962).

2.3.1. A növények cianotoxin kezelése

A *L. minor* és *W. arrhiza* esetében 3 ml-es steril teszt lemezeket (Titer-Tech® lemez) használtunk, míg *Ceratophyllum demersum* esetében a kísérletet 2 ml-es tesztrendszerben, kémcsövekben végeztük. A kezeléseket során a növényeket 0,01-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tisztított

cianotoxinnal ekvivalens MCY-LR, illetve CYN tartalmú sejtmentes extraktumot vagy a tisztított MCY-LR és CYN oldatait tartalmazó Allen tápoldatba (Allen 1968, Jámbrik és mtsai. 2010, Szigeti és mtsai. 2010) helyeztük. A *L. minor*-t, a *W. arrhiza*-t és a *C. demersum*-ot 5 napig, a fentebb leírt körülmények között neveltük. A *C. demersum*-ot csak tisztított MCY-LR-el kezeltük 5, 10, és 20 napig.

A *P. australis* kezelése is tisztított MCY-LR-el történt, 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -től 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ig terjedő toxinkoncentráció-tartományban 5-20 napig (Máthé és mtsai. 2007, 2009).

2.3.2. A tesztek kiértékelése

A növények nedves tömegét a kezelések indításakor és a kísérlet végén mértük. A *L. minor* és a *W. arrhiza* egyedszámát, a levélkeszerű tagok számát és a *C. demersum* örveinek a számát naponta regisztráltuk, a növekedés jellemzéséhez a kezelés utolsó napján mért adatokból kivontuk a kiindulási értékeket.

A kontroll és a cianotoxin kezelt növények növekedési értékei közötti szignifikáns különbséget ANOVA módszerrel analizáltuk. Az eredményeket a Sigma Plot 11.0 program statisztikai és grafikai alkalmazásával értékeltük, ábráztuk.

2.4. Enzimaktivitás vizsgálatok

2.4.1. Növénykivonatok készítése

Az enzimaktivitások kimutatásához a kontroll és a cianotoxin (MCY-LR és CYN) kezelt növényekből kivonatokat készítettünk (Schlereth és mtsai. 2000). A kivonatokat centrifugáltuk, majd a felülúszókat felhasználásig kis térfogatokban, -20°C -on tároltuk. A kivonatok fehérjetartalmát Bradford (1976) módszerével határoztuk meg.

2.4.2. A proteáz enzimek aktivitásának vizsgálata egydimenziós poliakrilamid-gélelektroforézissel

A vízinövények proteáz enzimeinek kimutatásához szubsztrátként zselatint tartalmazó 10%-os poliakrilamid aktivitás géleket

alkalmaztunk (Schlereth és mtsai. 2000). A felülrétegző gél mintahelyeire egyenlő fehérjetartalmú 2% SDS-t tartalmazó mintapufferrel elegyített mintamennyiségeket vittünk fel (Laemmli 1970). A mintákkal párhuzamosan a molekulatömeg meghatározásokhoz markert is futtattunk.

Proteáz gél esetében az elektroforézist követően a géleket steril desztillált vízzel, majd pufferekkel mostuk. Az inkubálás 6 órán át, sötétben, 37 °C-on történt. A géleken az enzimaktivitással rendelkező fehérjék sávjait, ún. negatív festéssel tettük láthatóvá, a proteáz gélek esetében Coomassie Brilliant Blue oldatot alkalmazva (Schlereth és mtsai. 2000, Jámbrík és mtsai. 2010).

2.4.3. Az egy- és a duplaszálú DNS-t hasító izoenzimek aktivitásának kimutatása poliakrilamid-gélelektroforézissel

Az egyfonalú DNS-t hasító fehérjék kimutatása egyfonalú csirke vér DNS-t tartalmazó géleken történt (Laemmli 1970, M-Hamvas és mtsai. 2003). A felülrétegző gél mintahelyeire egyenlő fehérjetartalmú mintamennyiségeket vittünk fel, melyekhez 2% SDS-t tartalmazó mintapuffert adtunk.

A DN-áz gélek elektroforézise is 4°C-on történt. Az elektroforézist követően a géleket steril desztillált vízzel, majd pufferekkel történő mosásnak vetettük alá. A géleket 39°C-on, 24-72 órán át inkubáltuk. A DN-áz géleknél ethídium-bromidos festést követően, 254 nm hullámhosszú UV fénnel tettük láthatóvá a DNS-t tartalmazó gélen a DN-áz aktivitású fehérjék által kiemésztett sávokat (Gersten és Gabriel 1992).

2.4.4 A poliakrilamid gélek kiértékelése

A géleken detektált enzimek molekulatömegének meghatározása az UVI-TEC[®] programmal, míg az enzimaktivitásokkal arányos sávintenzitások mérése CpAtlas[®] program segítségével történt. Az eredményeket a Sigma Plot 11.0 program statisztikai és grafikai alkalmazásával értékeltük és ábráztuk.

3. Új tudományos eredmények

a.) A mikrocisztin-LR növekedésgátló hatása a vizsgált vízínövény fajokra

Az általunk vizsgált vízínövényfajok MCY-LR-el történő kezelése során megállapítható volt, mind a tisztított MCY-LR, mind a MCY-LR tartalmú nyers extraktum növekedésgátló hatása.

A növekedési paraméterek (hajtásszám, nedvestömeg) alapján a két vízfelszínen lebegő vízínövény faj közül a *Wolffia arrhiza* bizonyult érzékenyebbnek az 5 napig tartó MCY-LR kezelésekkel szemben. A *W. arrhiza* tenyészetek növekedését már $0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR tartalmú nyers extraktum szignifikánsan gátolta, míg a *L. minor* esetében ez a cianotoxin koncentráció $\geq 5 \mu\text{g ml}^{-1}$ volt. Mind a *L. minor*, mind a *W. arrhiza* esetében elmondható, hogy a tisztított MCY-LR kisebb koncentrációban nem okozott szignifikáns gátlást, ugyanakkor 10 és $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációtartományban a gátlás mértéke jóval nagyobb volt, mint a nyers extraktumokkal történt kezeléseknél.

A *C. demersum* tisztított MCY-LR-el történő rövidtávú (5 napos) kezelése során csak a magas ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) MCY-LR koncentrációk okoztak szignifikáns növekedésgátlást. Hosszútávú kísérletekben már alacsonyabb cianotoxin koncentráció is hatékony gátlószernek bizonyult (Szigeti és mtsai. 2010). A növekedési paraméterek alapján a lebegő hínárok a MCY-LR-el szemben kevésbé voltak érzékenyek, mint a kallusztenyészetekből regenerált „mini nádnövények” (Máthé és mtsai. 2009 és a jelen dolgozat).

b₁.) A mikrocisztin-LR hatása a vízínövények proteáz enzimeinek aktivitására és izoenzim-mintázatára

Szubsztrátként zselatint tartalmazó poliakrilamid gélelektroforézis módszerével savas és bázikus proteáz enzimaktivitásokat detektáltunk *Lemna minor* (tíz „LmP” jelzésű izoenzim) és *Wolffia arrhiza* (tíz „WaP” jelzésű izoenzim) növények kivonataiban. Mind a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal, mind a tisztított MCY-LR-el történő kezelés változást okozott a növények izoenzim mintázatában és az enzimek specifikus aktivitásában. A *Lemnaceae* fajok

kivonataiban a savas proteázok magas aktivitása jellemző. A nyers MCY-LR tartalmú kivonat több izoenzim esetében indukált aktivitásemelkedést, mint a tisztított MCY-LR.

A MCY-LR-el történő kezelés mindkét fajban új izoenzim megjelenését eredményezte. A tisztított MCY-LR-el kezelt *L. minor* növények kivonataiban két új savas proteáz (LmP32 és LmP26) megjelenését mutattuk ki. A MCY-LR-el kezelt *W. arrhiza* kivonatokból egy új bázikus proteázt (WaP84), valamint csak a tisztított MCY-LR kezelés hatására megjelenő savas proteáz (WaP36) izoenzimet detektáltunk. Ezeknek az enzimeknek az aktivitása a kezelésekhez alkalmazott cianotoxin koncentrációjának függvényében emelkedést mutatott. A két faj közül a MCY-LR kezelések hatására, a *W. arrhiza* kivonataiban mértünk nagyobb proteáz összaktivitás emelkedést.

A tisztított MCY-LR-el kezelt *C. demersum* kivonatokból savas pH-n inkubált géleken már igen kis toxinkoncentrációban sikerült kimutatni változásokat a proteáz enzimek mintázatában és aktivitásában. $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ tisztított MCY-LR-el kezelt *C. demersum* növényekben két magas molekulatömegű (CdP87 és CdP80) savas proteáz megjelenését detektáltuk.

b₂.) A mikrocisztin-LR hatása a vízinövények nukleáz enzimeinek aktivitására és izoenzim-mintázatára

A vizsgálataink eredményei mutatták, hogy a növényi stressz-enzimekhez tartozó ssDN-áz izoenzimintázatok a *Lemnaceae* fajokban igen eltérőek. A *L. minor* kivonatokból több ssDN-áz enzimet detektáltunk, amelyek közül kettő (LmD89, LmD79) csak a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal történő kezelés hatására indukálódott.

A *W. arrhiza* kivonatokban csak egy karakteres izoenzim (WaD38) hasítja az egyfonalú DNS-t, amelynek aktivitása mind a nyers kivonattal, mind a tisztított cianotoxinnal kezelt növényekben kis ($0,1$ és $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) cianotoxin koncentrációknál enyhe emelkedést, magasabb ($5-20 \mu\text{g ml}^{-1}$) toxinkoncentrációknál pedig csökkenő tendenciát mutatott.

A növekedésében gátolt *C. demersum* kivonataiban egy 51 kDa molekulatömegű (CdD51) ssDN-áz izoenzimet detektáltunk,

amely aktivitása a tisztított MCY-LR-el kezelt növényekben a kezelés 5. napján szignifikáns emelkedést mutatott.

A kutatásainkba bevont *Phragmites australis* növényekben a tisztított MCY kezelésekre hatására bekövetkező strukturális eltérések (Máthé és mtsai. 2007, 2009) háttérében álló biokémiai változásokat elemeztük a szimplaszálú-, és duplaszálú DNS-t hasító nukleázok vizsgálatával, a növények hajtás-, és gyökérkivonataiban. Az 5, 10 és 20 napos kontroll *P.australis* növények hajtásaiból és gyökereiből karakterisztikus DN-áz („PaD” jelzésű izoenzimek) izoenzimeket detektáltunk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a tisztított MCY-LR hatása a kezelt növények kivonataiból detektált nukleáz izoenzimek aktivitására „kor- és szerv” függő. A nád növények hajtás és gyökér kivonataiból detektálható ssDN-áz izoenzimek aktivitásai a rövid, 5 napos MCY-LR-el történő kezeléseket követően emelkedtek. Magasabb cianotoxin koncentrációknál ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) a dsDN-áz aktivitás a kisebb toxinkoncentrációknál ($0,5\text{-}5 \mu\text{g ml}^{-1}$) mérhető emelkedő aktivitás után csökkent, de még fölötté maradt a kontroll értéknek. Ezek az aktivitásemelkedések a nád szövetekben a MCY-LR hatására bekövetkező programozott sejthalállal hozhatók összefüggésbe. A hajtásokban, 10 napos kezelésekor a MCY-LR gátolta az ssDN-ázok aktivitását. A gyökerekben az aktivitások változatlanok maradtak. Noha a 10 napos MCY-LR kezelésekor gátolták a dsDN-áz izoenzimek aktivitását a hajtásokban és emelték a gyökerekben, ezek a változások csak hosszú inkubálási idő után voltak kimutathatóak. A 20 napos MCY-LR kezelést követően az ssDN-áz aktivitásokra nézve gátló hatást figyelhattunk meg mind a két szervben. A dsDN-áz aktivitást a kontroll és cianotoxinnal kezelt növényekben a gélek 24 órás inkubálása után sem detektáltunk.

c.) A cilindrospormopszin növekedésgátló hatása a *Lemnaceae* fajokra

A CYN vízinövényekre gyakorolt hatásának vizsgálatára irányuló kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a növénytesztek során alkalmazott CYN tartalmú nyers extraktum valamint a tisztított CYN gátolja a vízinövények (*Lemna minor* és a *Wolffia arrhiza*) növekedését; a kísérletek 5. napján a növények

nedves tömeg és hajtásszám adatai is szignifikáns csökkenést mutattak.

A CYN kezelésekben a két *Lemnaceae* faj közel azonos érzékenységet mutatott. A *L. minor* esetében a nyers kivonat és a tisztított toxin ($1\text{--}20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációknál) a hajtásszám szignifikáns csökkenését okozta. A tisztított CYN-el kezelt békalencsék hajtásszámában ez a szignifikáns csökkenés már $0,01\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ toxin koncentrációtól mérhető. A nedvestömeg kevésbé érzékeny paraméternek bizonyult, ugyanis mind a nyers CYN tartalmú extraktummal, mind pedig a tisztított CYN-el kezelt a növények jelentős növekedésgátlását 10 és $20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációk hatására tapasztaltuk.

10 és $20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN tartalmú nyers kivonattal kezelt *W. arrhiza* növények hajtásszáma és nedvestömege szignifikánsan csökkent a kezelés $5.$ napján. A tisztított CYN-el szemben nagyobb érzékenységet mutattak a növények, már kis cianotoxin koncentrációktól ($0,1$ és $0,01\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN) szignifikánsan csökkentek a növekedési paraméterek.

d₁.) A cilindropermopszin hatása a *Lemnaceae* fajok proteáz enzimeinek aktivitására és izoenzim-mintázatára

A CYN tartalmú nyers kivonat, valamint a tisztított cianotoxin a proteáz enzimek mintázatában és specifikus aktivitásaikban eltérő változásokat indukáltak. A *L. minor* kivonatokban kilenc („LmP” jelzésű), a *W. arrhiza* kivonatok esetében pedig tíz („WaP” jelzésű) zselatinbontó izoenzimet detektáltunk.

A CYN tartalmú nyers extraktummal kezelt *L. minor* kivonatokból egy új, savas proteáz izoenzim (LmP32) megjelenését detektáltuk. A nyers kivonatokkal kezelt *W. arrhiza* kivonataiban új, 44 kDa molekulatömegű (WaP44) bázikus proteáz izoenzimet detektáltunk.

d₂.) A cilindropermopszin hatása a *Lemnaceae* fajok nukleáz enzimeinek aktivitására és izoenzim-mintázatára

A CYN kezelés eltéréseket okozott a *L. minor* és *W. arrhiza* kivonataiból detektált ssDN-ázok aktivitásában is.

Elsősorban a CYN tartalmú nyers extraktummal kezelt *L. minor* növények kivonataiban detektáltunk újonnan megjelenő ssDN-áz izoenzimeket. 10 és 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációknál jelentek meg az LmD89, LmD79, LmD16, LmD15 jelzésű ssDN-áz izoenzimek. Tisztított cianotoxin hatására ezeket az izoenzimeket nem detektáltuk. A növényekben a 16 és 15 kDa molekulatömegű (LmD16 és LmD15) ssDN-ázok megjelenését kizárólag a CYN tartalmú nyers extraktummal történő kezelések indukálták. Specifikus aktivitásukban emelkedő tendenciát detektáltunk.

A *W. arrhiza* növények CYN-el történő kezelése során egy 38 kDa molekulatömegű (WaD38) izoenzimet detektáltunk. Ez az izoenzim nyers extraktum hatására enyhén emelkedő, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációnál már szignifikáns növekedést mutatott. 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációnál, feltételezhetően a sejtek pusztulásával, a nukleáz aktivitása már jelentősen lecsökkent. A tisztított CYN kezeléseknél is detektált 38 kDa molekulatömegű ssDN-áz aktivitása, a toxinkoncentráció emelkedésével arányosan, növekvő tendenciát mutatott, szignifikáns változást 10 és 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációknál detektáltunk.

e.) A mikrocisztin-LR és a cilindropermopszin hatásainak összevetése a *Lemnaceae* tesztekben

Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy toxikus vízvirágzás során, a vizekbe jutó és felhalmozódó MCY-LR és CYN (mind a sejtmentes, nyers cianotoxin tartalmú kivonat, mind pedig a tisztított toxin) bejutva az általunk vizsgált vízinövényekbe (*Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*) szignifikáns növekedésgátlást okozott, amelyet a hajtásszám és nedvestömeg paraméterekben detektáltunk.

A vízinövények tisztított MCY-LR-el és CYN-el történő kezelése során, a CYN nagyobb mértékű növekedésgátlást idézett elő. Már 0,01 és 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cianotoxin koncentrációknál szignifikáns csökkenést mértünk, míg a MCY-LR $\geq 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ toxinkoncentrációknál okozott szignifikáns csökkenést. A *M. aeruginosa* MCY-LR tartalmú nyers kivonata toxikusabbnak bizonyult a *Lemnaceae* fajokra, mint a CYN tartalmú nyers extraktum. Szignifikáns növekedésgátlást már 0,01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR koncentrációnál detektáltunk.

Más növényfajokon mind a CYN, mind a MCY-LR esetében megfigyeltek szembetűnő morfológiai változásokat (nekrotikus foltok megjelenése, kalluszképződés, M-Hamvas és mtsai. 2003, Máthé és mtsai. 2007, 2009). A *L. minor* és a *W. arrhiza* növényeken ilyen elváltozásokat a cianotoxin kezelések során nem találtunk.

Ugyanakkor megállapítottuk, hogy mindkét cianotoxin változást eredményez a növényi stresszválaszokban kulcsfontosságú proteázok és nukleázok enzimintázataiban és azok specifikus aktivitásában. Mind a MCY-LR, mind a CYN kezelt növények kivonataiban enzimaktivitás emelkedéseket detektáltunk (LmP 100, 89, 83, 71, 60 valamint a WaP 94, 84 kDa molekulatömegű proteázok és az LmD 43, 26 kDa molekulatömegű nukleázok). Csak a tisztított MCY-LR indukálta a két savas proteáz megjelenését a növényi kivonatokban (LmP26 valamint a WaP36). Az LmD89 és 79 jelzésű ssDN-ázok mind a MCY-LR, mind a CYN tartalmú nyers extraktum hatására megjelentek, ugyanakkor a tisztított cianotoxinok nem váltották ki a megjelenésüket. Csak a nyers CYN tartalmú kivonatokkal történő kezelések hatására váltak detektálhatóvá a WaP44 bázikus proteáz, valamint LmD16 és LmD15 ssDN-ázok.

A nyers toxintartalmú kivonatok és a tisztított cianotoxinok hatásainak eltérései felhívják a figyelmet arra, hogy a cianobaktériumok okozta vízvirágzások során kiszabaduló endotoxinok mellett több száz vegyület kerülhet ki a környezetbe (Welker és von Döhren 2006). Ezek között lehetnek olyanok, amelyek tápanyagként szolgálhatnak más élőlények számára, serkentve növekedésüket. *Microcystis aeruginosa* extraktumok esetében a MCY-LR mellett más cianotoxin variánsok (MCY-RR, MCY-YR) is előfordulhatnak, amelyek hozzájárulhatnak a MCY-LR hatásához. Egyre több szakirodalmi adat bizonyítja, hogy a cianotoxinok mellett egyéb, kismolekulájú szerves vegyületek (pl. enziminhibitor peptidek) is szintetizálódnak a cianobaktériumok sejteiben (Welker és von Döhren 2006). Ezek pontos biokémiai funkciója nem ismert, de feltételezhető, hogy hozzájárulhatnak a toxinok biológiai hatásaihoz.

Eredményeink megerősítették a cianotoxinok növényekre gyakorolt hatásainak vizsgálata során a kétféle megközelítés fontosságát.

1. Introduction and aims of study

Cyanobacteria are one of the most diverse groups of gram-negative photosynthetic prokaryotes (Codd 1995). Eutrophication of water bodies has led to increases in number of blooms of cyanobacteria (blue-green algae) and they are now common in many freshwater bodies throughout the world (Skulberg et al. 1984, Carmichael 1992, Codd 1995). The presence of toxic cyanobacterial blooms in natural and artificial water bodies has been reported frequently. The cyanotoxins are secondary metabolites, which can be produced by strains of cyanobacteria (Wiegand and Pflugmacher 2005, Rajesh et al. 2009). The cyanotoxins are a diverse group of natural toxins, both from the chemical and the toxicological points of views. These substances are natural endotoxins and the cyanotoxin concentration of surface water bodies under bloom conditions may increase consequence of the lysis of cyanobacterial cells. Cyanotoxins can have adverse effects on humans and other mammals including sheep, cattle, horses, birds (Carmichael 1992, 2001; Onodera et al. 1997), fish (Liu et al. 2002), invertebrates (Delaney and Wilkins, 1995) and zooplankton (Rohrlack et al. 2001). Although the toxic effects to these organisms are well-known. There is an increasing number of studies examining the potential effects of cyanotoxins on aquatic plants, but their cellular and biochemical effects on those organisms are still less understood (Pflugmacher et al. 1999; 2001).

The aim of this study was to investigate the cytotoxic effects of two cyanotoxins, microcystin-LR (MCY-LR) and cylindrospermopsin (CYN) in aquatic plants, such as *Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*, *Ceratophyllum demersum*, *Phragmites australis*. These cyanotoxins are the most frequently detectable toxins produced by cyanobacteria in fresh waters (Rastogi et al. 2009). There are two approaches in experiences focusing on the effects of cyanotoxins on plants. The first applies purified cyanotoxins for laboratory experiments, while the second investigates the “real-life” situation of a cyanobacterial lysis event with crude extracts (Beyer et al. 2009; Kinnear et al. 2007, 2008). The comparison of the results of different approaches has been missing in the literature of MCY-LR, CYN and plant relation. This thesis presents a study concerning the influence of MCY-LR and CYN upon the growth, protein content and protease / nuclease activity of four aquatic plant species. Our results

allow comparing the effects of MCY-LR and CYN in cell free extracts of *Microcystis aeruginosa* (BGSD-243) and *Aphanizomenon ovalisporum* (BGSD-423) culture to the effects of purified MCY-LR and CYN on plants.

Several freshwater bloom-forming cyanobacterial genera including *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, and *Nodularia* produce **microcystin-LR (MCY-LR)** (Chorus and Bartram 1999; Codd and Carmichael 1982). *Microcystis* is one of the most common freshwater bloom-forming cyanobacterial genera throughout the world (Carmichael 1992). Microcystin-LR is the most frequently occurring and well studied variant (Carmichael et al. 1992). MCY-LR is a well-known cyanobacterial toxin, frequently present in eutrophicated freshwaters (Carmichael 1992). It is a cyclic heptapeptide, a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatases in eukaryotic organisms. Due to this property, the cyanotoxin interferes with a wide range of cellular processes, involving cell cycle regulation, signal transduction and the regulation of enzyme activities (MacKintosh and MacKintosh 1994, Luan 2003). With respect to vascular plants, a variety of toxin effects have been described. These include histological and cell cytoskeletal alterations (Máthé et al. 2007, 2009; Szigeti et al. 2010), interference with photosynthesis (Abe et al. 1996), and the induction of oxidative stress and of corresponding defense enzyme activities (Pflugmacher 2004). Growth inhibition by microcystins has been proven for several aquatic macrophytes (Mitrovic et al. 2005, Máthé et al. 2009, Weiss et al. 2000, Romanowska-Duda et al. 2002).

The toxin **cylindrospermopsin (CYN)** is produced by a variety of cyanobacterial genuses: *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Umezakia*, *Raphidiopsis* (Wiegand et al. 2005), which became prevalent from tropical regions towards temperate climatic zones in natural lakes or in newly built reservoirs (Padisák 1997). In an aquatic ecosystem lysis of cyanobacterial blooms leads to the release of a mixture of cyanotoxins and other cyanobacterial components into water, acting on aquatic organisms. Stability of these blooms, the extent of CYN release from cells depends on various environmental factors such as light intensity and water temperature, etc. (Pietsch et al. 2001, Preußel et al. 2009). CYN is a tricyclic guanidine derivative containing a hydroxymethyl-uracil group (Ohtani et al. 1992). CYN is a highly water-soluble molecule

with a relatively low molecular mass of 415 Da (Shaw et al. 1999, Sivonen et al. 1999). It is an inhibitor of eukaryotic protein synthesis, although the molecular mechanism is yet to be established (Metcalf et al. 2004, Frosio et al. 2008). In addition, the inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis by CYN was reported in mouse liver cell-free extracts (Reisner et al. 2004). It is known that CYN does not inhibit protein phosphatases (Chong et al. 2002) but interferes with glutathione metabolism, inhibits protein synthesis, disrupts the actin cytoskeleton and causes DNA damage in mammalian experimental systems (Wiegand 2005). In contrast to animals, there are only a limited number of studies on the effects of CYN on plants.

The objectives of the study are as follows:

- a.) The analysis of the growth inhibitory effects of MCY-LR on *Lemna minor*, *Wolffia arrhiza* and *Ceratophyllum demersum* plant cultures. The comparison of the growth inhibitory effects of “cyanotoxin containing crude extracts” (MCY-LR containing extracts of *M. aeruginosa* culture/cells) and purified toxins (purified MCY-LR from *M. aeruginosa* culture).
- b.) The analysis of purified MCY-LR and MCY-LR containing crude *M. aeruginosa* extracts can cause enzyme-level changes investigated by polyacrilamide activity gels. We examined those hydrolases which have key functions in stress responses, the proteases and the single- and double stranded DNA cleaving nucleases (ssDNase or dsDNase).
- c.) The study of growth inhibitory effects of CYN in *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* cultures. The comparison of the crude CYN containing cyanobacterial extracts and the growth inhibitory effects of purified toxins.
- d.) The analysis of the alterations in plant enzyme patterns and activity of proteases and nucleases on polyacrilamide activity gels caused by the treatment of purified CYN and CYN containing crude *Aphanizomenon ovalisporum* extracts.
- e.) The comparison of the two cyanotoxins with different mode of action, of the alterations caused by MCY-LR and CYN in plant growth and enzyme (proteases, nucleases) activities.

2. Materials and Methods

2.1. *Microcystis aeruginosa* culture, preparation of crude cyanobacterial extract and purification of microcystin-LR

Microcystin-LR (MCY-LR) was purified from a *Microcystis aeruginosa* (strain BGSD 243) culture isolated from Lake Velencei (Hungary) in 1991 (Kós et al. 1995, M-Hamvas et al. 2003). *M. aeruginosa* was grown as described (Allen 1968; Vasas et al. 2002, 2004).

For the preparation of crude cyanobacterial extract: a stationary phase culture *M. aeruginosa* culture was centrifuged (6000×g, 10 min, Beckman Avanti J-25 centrifuge) at 4°C, then cell pellets were freeze-dried and stored at –20°C until further experiments. The freeze-dried cyanobacterial cell mass was resuspended in sterile distilled water; the cells were disrupted by freezing and thawing several times (4×). The suspension was centrifuged (6000×g, 10 min, 4°C, Beckman Avanti J-25 centrifuge) and the pellet- and cell-free supernatant was used as crude extract for the treatments. The MCY-LR content of the supernatant was determined with the help of capillary electrophoresis as described in our laboratory earlier (Vasas et al. 2002, 2004).

MCY-LR purification method has been described previously (Kós et al. 1995). In brief, cyanotoxin was extracted from cells with 5% (v/v) acetic acid, purified on a DE-52 column (Whatman) and desalted on Waters Sep-Pak® cartridges. The purity of MCY-LR was ≥90% as checked by HPLC and capillary electrophoresis (Vasas et al. 2004).

2.2. *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) culture, preparation of crude cyanobacterial extract and purification of cylindrospermopsin

Cylindrospermopsin (CYN) producing *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) strain ILC-164 isolated from Lake Kinneret, Israel in 1994 (Banker et al. 1997; in our collection BGSD-423) was grown as described (Allen 1968; Vasas et al. 2002, 2004).

For the preparation of crude cyanobacterial extract: 14 days old culture of *A. ovalisporum* was centrifuged (6000×g, 10 min,

Beckman Avanti J-25 centrifuge) at 4°C, then cell sediments were freeze-dried and stored at -20°C until further experiments. The freeze-dried cyanobacterial cell mass was resuspended in sterile distilled water; the cells were disrupted by freezing and thawing several times (4×). The suspension was centrifuged (6000×g, 10 min, 4°C, Beckman Avanti J-25 centrifuge) and the pellet- and cell-free supernatant was used as crude extract for the treatments. The CYN content of the supernatant was determined with the help of capillary electrophoresis as described earlier (Vasas et al. 2002, 2004).

For CYN purification cyanobacterial filaments were harvested by centrifugation and kept at -20°C until use. The thawed cell pellet was extracted by 90% methanol; the methanolic extract was evaporated to dryness and then resuspended in 50% ethanol. The extract was loaded onto toyopearl HW-40 size exclusion column and further purified by semi preparative HPLC (Supercosil TM SPLC-18 column, Supelco, Bellefonte, USA; Vasas et al. 2002, 2004).

2.3. Plant material

Experiments were performed on axenic clones of *Lemna minor* L., *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel (Lemnaceae), *Ceratophyllum demersum* L. and *Phragmites australis* (Cav./Trin. Ex Steud.) plants. Axenic stock cultures were maintained on Allen medium (Allen 1968) and *P. australis* was cultivated in liquid MS medium (Murashige and Skoog 1962). These test organisms were grown in sterilized Erlenmayer fasks, on 21°C and photoperiod (14/10h).

2.3.1. Cyanotoxin treatments

Plant cultures were aseptically transferred to Allen medium (1968) into 3-ml sterile wells (Titer-Tech® test plates). Nine (3×3) fronds of *L. minor* were placed in wells containing MCY-LR and CYN extract or purified MCY-LR and CYN with equal MCY-LR and CYN (0.01, 0.1, 1, 10 and 20 µg ml⁻¹ corresponding to 0.024–96.4 µM, respectively) in Allen medium (1968). In the case of *W. arrhiza* the experiments were carried out in the same way as for *L. minor* with 20 fronds as an initial number. Four independent experiments were performed and each bioassay has been made with four replicates for every MCY-LR and CYN concentration. Plant growth was estimated

by counting frond numbers and measuring fresh weight of the initial population and the plant cultures after 5 days of exposure.

For cyanotoxin exposure of *C. demersum* plants, we used shoots with apical meristems. Shoots were of 24.5 ± 0.4 (SE) mm length and containing 5-6 leaf whorls. *C. demersum* was treated with purified MCY-LR for 5 days. Cyanotoxin exposures were made in test tubes containing 5 ml Allen medium (Allen 1968). The concentration regimes used was $0.01\text{--}20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($0.01\text{--}20.1 \mu\text{M}$) MCY-LR.

Phragmites australis (common reed) plantlets were regenerated from stem nodal embryogenic calli (Máthé et al. 2000). Cyanotoxin treatments were performed essentially as described previously (Máthé et al. 2007, 2009). Plantlets of 60 ± 3.2 (SE) mm height with well-developed shoot and root systems were used for the purified MCY-LR treatments. The cyanotoxin was added to 2 ml of liquid modified MS medium (Murashige and Skoog 1962) in a concentration range of $0.5\text{--}40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($0.5\text{--}40.2 \mu\text{M}$). Toxin exposure times were 5, 10, 20 days.

2.3.2. Statistical methods

The significance of differences between growth of controls and cyanotoxins (MCY-LR and CYN) treatments was analyzed by one-way ANOVA (Sigma Plot 11.0 software, USA). Results were presented with the aid of graphical and statistical programs of Sigma Plot 11.0 software (USA).

2.4. Enzyme activity measurements

2.4.1. Preparation of plant extracts

For the determination of enzyme activities, control and cyanotoxin (MCY-LR and CYN) treated plants were collected, pulverized in liquid nitrogen and homogenized with 100 mm Tris-HCl buffer, pH 8.0 (Sigma-Aldrich) containing 150 mM NaCl (Reanal, Budapest, Hungary) and $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). The homogenates were sonicated and shaken to disintegrate remaining organelles as described by Schlereth et al. (2000). After centrifugation ($13,000 \times g$, 2×5 min, Biofuge) the supernatants were

used as crude protein extracts. Protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.4.2. Gelatin zymography

Protease activity analysis of crude protein extracts of aquatic plants (10–20 μ l of 10 μ g protein) was carried out by using gelatine-containing SDS slab gels according to Schlereth et al. (2000). Protein samples were dissolved in SDS-sample buffer without heating and loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels (Laemmli 1970) containing 0.04% gelatine.

The gels were run at 4°C in dark. To renature proteolytic enzymes, SDS was removed from gels by two 10 min washes in 20% (v/v) 2-propanol containing reactivating buffer (M.-Hamvas et al. 2003, Schlereth et al. 2000). The gels were incubated for 5 hours at 37°C in reactivating buffer (0.1 M sodium phosphate buffer (Reanal, Budapest, Hungary), pH 5.0 or 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0, both with 5 mM β -mercaptoethanol) in the dark. For characterisation of proteases, the gels were incubated in absence and presence of β -mercaptoethanol and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), respectively (data not shown). Local gelatine degradations were visible after Coomassie Blue staining (Coomassie Brilliant Blue R250) and revealed the sites of active proteinases (Schlereht et al. 2000).

2.4.3. Nuclease activity gels

The detection of single-strand preferring nuclease (SSP nuclease) activities on protein gels was performed by the methods of Blank and McKeon (1989), Wood et al. (1998) and M-Hamvas et al. (2003). 13 μ g protein was loaded onto each well of 10% SDS-polyacrylamide gels containing 10 μ g ml⁻¹ heat denatured (for ssDNase activities) or intact chicken blood DNA (for dsDNase activities). Gel electrophoresis was performed according to Laemmli (1970). Reed shoot and root samples were loaded along with a molecular weight marker (Sigma–Aldrich, Budapest, Hungary).

After electrophoresis, enzymes were renatured for 30 min in water, then by three washes in a buffer containing 10 mM Tris–HCl, pH 6.8 and 20% (v/v) 2-propanol, followed by washing in Tris–HCl,

pH 6.8. For the detection of SSP nuclease isoenzymes, gels were incubated (generally for 24 h, 39°C) in Tris-HCl, pH 6.8. After incubation, gels were stained with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ethidium bromide (Sigma–Aldrich, Budapest, Hungary). Nuclease isoenzymes were detected as clear, unstained bands, due to DNA hydrolysis. All experiments concerning the analysis of SSP nuclease isoenzymes were performed at least three times and representative results are presented.

2.4.4. Methods of polyacrylamide gel pattern evaluation

Relative molecular mass and band intensity of polyacrylamide gel separated proteins were evaluated by UVI-TEC[®] and CpAtlas[®] softwares. All the measured parameters were analyzed with Sigma Plot 11.0 software.

3. New scientific results

a.) The growth inhibitory effects of MCY-LR on the studied aquatic plants

Both purified MCY-LR and the MCY-LR containing crude extract inhibited the growth of the studied plant species.

Based on the growth parameters (frond number and fresh weight) from the two aquatic plants floating on the water surface, *Wolffia arrhiza* proved to be more sensitive to the 5 day-long treatments of MCY-LR. The growth of *W. arrhiza* was yet inhibited significantly by 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of MCY-LR containing crude extracts while in the case of *Lemna minor* this cyanotoxin concentration was $\geq 5 \mu\text{g ml}^{-1}$. In both cases (*L. minor* and *W. arrhiza*) purified low concentrations of MCY-LR did not cause significant inhibition. On the other hand in the concentration range of 10-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ the rate of the inhibition was far higher than after the crude extract-treatment.

During the short-term (5 days) treatment of *C. demersum* with purified MCY-LR only the high (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) MCY-LR concentrations caused significant growth inhibition. In long-term experiments even lower cyanotoxin concentrations were enough to be effective in the growth inhibition (Szigeti et al. 2010). On the

basis of the growth parameters the floating aquatic plants were less sensitive to the MCY-LR than the “mini reed” (*Phragmites australis*) plants regenerated from callus cultures (Máthé et al. 2009).

b₁.) The effects of microcystin-LR on the activity of protease enzymes and isoenzyme-patterns of aquatic plants

By gelatin, as substrate containing polyacrylamide gel electrophoresis we detected acidic and alkaline protease enzyme activities in the extracts of *Lemna minor* (ten isoenzymes marked as “LmP”) and *Wolffia arrhiza* (ten isoenzymes marked as “WaP”). Treatment with both the MCY-LR containing crude extracts and the purified MCY-LR caused changes in the isoenzyme patterns and in the specific activities of the enzymes of the investigated plants. The high activity of the acidic proteases is characteristic in the extracts of *Lemnaceae* species. The crude MCY-LR containing extracts induced activity increase in more isoenzymes, than purified MCY-LR.

The treatment with MCY-LR caused the appearance of new isoenzymes in both species. In the extracts of *L. minor* treated with purified MCY-LR we found the appearance of two new protease isoenzymes (LmP32 and LmP26). In the *W. arrhiza* extracts exposed to MCY-LR we found a new alkaline protease (WaP84) and an acidic protease isoenzyme (WaP36) which only appears in purified MCY-LR exposed plants. The activities of these isoenzymes show a concentration dependent increase. From these two species we measured higher protease activity in *W. arrhiza*.

We could find alterations in the patterns and activities of protease isoenzymes at even very low toxin concentrations in the *C. demersum* extracts treated with purified MCY-LR in gels incubated on acidic pH. In *C. demersum* plants treated with 20 µg ml⁻¹ purified MCY-LR we detected the appearance of two acidic proteases with high molecular mass (CdP87 and CdP80).

b₂.) The effects of microcystin-LR on the nuclease enzyme activity and isoenzyme patterns in aquatic plants

Plant stress enzymes, like ssDNase isoenzyme patterns are really different in *Lemnaceae* species. We detected several ssDNase isoenzymes from the extracts of *L. minor* of which two (LmD89,

LmD79) were induced only when treated with MCY-LR crude extracts.

In *W. arrhiza* extracts there is only one characteristic isoenzyme (WaD38) cleaving the single-stranded DNA, which shows mild increase in case of low (0.1 and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) cyanotoxin concentration both at treatment with crude toxin extracts and purified toxins and shows decreasing tendency at high (5-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) cyanotoxin concentrations.

In the growth inhibited *C. demersum* extracts we detected an ssDNase isoenzyme with 51 kDa molecular mass (CdD51) with an activity that showed a significant increase in plants on the 5th day of treatment with purified MCY-LR.

In *Phragmites australis*, purified MCY-LR treatments caused histological and cytological changes (Máthé et al. 2007, 2009). In this study, we investigated in plants in question the single and double stranded DNA splitting activities. We detected characteristic DNase enzymes (isoenzymes marked as “PaD”) from the 5, 10 and 20 day-old control *P. australis* roots and shoots. An age and organ dependent alterations of nucleases were detected in purified MCY-LR exposed reed plants. The activity of ssDNase isoenzymes detected from the shoot and root extracts of reed plants were increasing even after a short, 5 day long MCY-LR treatment. At lower cyanotoxin concentrations (0.5-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) dsDNase activity increased and at higher concentrations (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) it decreased, but it was above the control values. In case of 10 day-long treatments the MCY-LR inhibited the activity of ssDNases in shoots. The activity in roots was constant. Although the 10 day-long MCY-LR treatments inhibited the activity of dsDNase isoenzymes in shoots and increased them in roots, these changes were observable only after long-term incubation of activity gels. After a 20 day-long MCY-LR treatment inhibition of ssDNase isoenzymes was obtained in both organs. At 24 hour incubation of gels we could not detect dsDNase activities in extracts of control and cyanotoxin treated plants. The explanation for that is the reduction of viability of plant tissues and the development of necrosis on plant organs.

c.) The growth inhibitory effects of cylindrospermopsin on *Lemnaceae* species

Crude CYN containing extracts and purified CYN inhibit the growth of aquatic plants (*L. minor* and *W. arrhiza*). On the 5th day of the CYN exposure, frond numbers and fresh weight showed significant decrease. The two species of *Lemnaceae* family showed nearly the same sensitivity to the CYN treatments. In case of *L. minor* the crude extract and the purified toxin caused significant decrease in frond number at the concentration range of 1-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. For the frond number of duckweeds treated with purified CYN this significant decrease was measurable even at 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ toxin concentration. The increase of fresh weight proved to be a less sensitive growth parameter, because both the crude CYN containing extracts and the purified CYN treated plants showed its inhibition at the concentration range of 10 and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

The frond number and the fresh weight of *W. arrhiza* treated with crude CYN containing extract significantly decreased on the 5th day of the treatment. They showed higher sensitivity to the purified CYN, the growth parameters significantly decreased at smaller (0.1 and ≥ 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN) cyanotoxin concentrations.

d₁.) The effects of cylindrospermopsin on the protease enzyme activity and isoenzyme patterns of *Lemnaceae* species

The CYN containing crude extracts and the purified cyanotoxin induced different changes in the patterns and specific activity of protease enzymes. In *L. minor* extracts 9 ("LmP" marked), in *W. arrhiza* extracts 10 ("WaP" marked) gelatin degrading isoenzymes were detected. A new acidic protease isoenzyme (LmP32) from the CYN containing crude extract treated *L. minor* extracts was detected. On addition we detected a new, 44 kDa (WaP44) alkaline protease isoenzyme from the *W. arrhiza* treated with crude cyanotoxin extracts.

d₂.) The effects of cylindrospermopsin on the nuclease enzyme activity and isoenzyme patterns of *Lemnaceae* species

Treatment with CYN caused alterations in the activity of ssDNase detected from *L. minor* and *W. arrhiza* extracts. First of all we detected newly appearing ssDNase isoenzymes in the *L. minor* treated with CYN containing crude extracts. The LmD89, LmD79, LmD16, LmD15 marked ssDNase isoenzymes appeared at 10 and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cyanotoxin concentrations. We could not detect these isoenzymes after the treatment with purified cyanotoxin. The appearance of 15 and 16 kDa molecular mass ssDNase isoenzymes were only detectable in plants after CYN containing crude extract treatment. We detected an increase in their specific activity.

Concerning *W. arrhiza* we detected a 38 kDa isoenzyme (WaD38) in the CYN exposed plants. This enzyme (WaD38) shows mild increase exposed in crude extract treated plants, but at 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cyanotoxin concentration significant increase was observed. At 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ toxin concentration, the activity of nucleases decreased significantly, probably as a consequence of plant cell death. The ssDNase of 38 kDa detected at the treatments with purified CYN showed increasing tendency with the increase of toxin concentration. We could detect these significant changes at 10 and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN.

e.) The comparison of the effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on *Lemnaceae* species

Our results unambiguously proved that in water blooms MCY-LR and CYN released to the water and accumulated (both for cell free, crude cyanotoxin containing extracts and the purified toxins) cause significant growth inhibition in the examined aquatic plants (*Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*), which can be detected by the assay of frond number and fresh weight. During the treatment of these plants with purified MCY-LR and CYN, latter caused more pronounced changes in growth inhibition. We measured significant inhibition even at 0.01 and 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cyanotoxin concentrations while MCY-LR caused significant inhibition at $\geq 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ concentrations. The MCY-LR containing crude extract of *M. aeruginosa* proved to be more toxic to the *Lemnaceae* species than the CYN containing crude extract. We

detected significant growth inhibition at the concentration of 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of MCY-LR.

In other cyanotoxin exposed plant species, striking morphological changes were obtained (the appearance of necrotic spots, callus forming, M-Hamvas et al. 2003, Máthé et al. 2007, 2009). We did not see these types of alterations during our experiments on *L. minor* and *W. arrhiza* plants.

However, we found that both toxins cause changes in protease and nuclease enzyme patterns and their specific activity which are of a key importance in stress responses. We detected the increase of enzyme activity in the extracts of plants treated with MCY-LR and CYN (LmP100, 89, 83, 71, 60 and the WaP94, 84 kDa molecular mass proteases and the LmD43, 26 kDa molecular mass nucleases). Only the purified MCY-LR induced the appearance of two acidic proteases in the plant extracts (LmP26 and WaP36). The LmD89 and 79 marked ssDNases were induced by MCY-LR- and even by CYN containing crude extracts; however the purified toxins did not induce their appearance. The WaP44 alkaline protease and the LmD16 and LmD15 ssDNases were only detectable after a treatment with crude CYN containing extracts.

The differences between the effects of crude cyanotoxin containing extracts and the purified toxins draw the attention on the fact that besides the endotoxins released into water blooms of cyanobacterial origin several hundreds of chemical compound can get into the environment from the same cells (Welker and von Döhren 2006). Among these one can find chemicals that serve as nutrients for other organisms, stimulating their growth. In the case of *Microcystis aeruginosa* extracts besides MCY-LR other cyanotoxin variants (MCY-RR, MCY-YR) can occur that can contribute to the effects of MCY-LR. More and more data from literature prove that besides cyanotoxins other small molecular mass organic compounds (i.e. enzyme inhibitory peptides) are synthesized in the cells of cyanobacteria (Welker and von Döhren 2006). The exact biochemical function of these chemicals is not known yet but it is presumable that they contribute to the biological effects of investigated cyanotoxins.

Our results confirmed that it is important to have the suggested two kinds of approach in the analysis of the effects of cyanotoxins on plants, including the aquatic ones.

Irodalomjegyzék / References

- Allen M.M. (1968) Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4: 1-4.
- Arnon D.I. (1949) Copper enzymes in chloroplasts: polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Banker R., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R., Sukenik A. (1997) Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.* 33, 613-616.
- Beyer D., Surányi G., Vasas G., Roszik J., Erdidi F., M-Hamvas M., Bácsi I., Bátori R., Serfőző Z., M-Szigeti Zs., Vereb G., Demeter Z., Gonda S., Máthé C. (2009) Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon* 54: 440-449.
- Blank A., McKeon T.A. (1989) Single-strand preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3169-3173.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L., Jones A., Negri A.P., Riddles P. (1996) Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin Microcystin-LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4086-4094.
- Carmichael W.W. (1992) Cyanobacterial secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bact.* 72: 445-459.
- Carmichael W.W., Skulberg O. M. (1992) Algal toxin seafood and drinking water. Academic Press. pp. 145-205.
- Carmichael W.W. (1994) The toxins of cyanobacteria. *Scientific American.* 64-72.
- Carmichael W.W., Azevedo S. M. F. O., An J. S., Molica R. J. R., Jochimsen E. M., Lau S., Rinehat, K. L., Shaw G. R., Eaglesham G. K. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspec* 109: 663-668.
- Chorus I., Bartram J. (1999) Toxin cyanobacteria in water—A guide to their public health consequences monitoring and management. E & FM Spon London.
- Chong M.W.K., Wong P.K.S., Shaw G.R., Seawright A.A. (2002) Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 40: 205–211.
- Codd G.A., Carmichael W.W. (1982) Toxicity of a clonal isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from Great Britain. *FEMS Microbiol. Lett.* 13: 409–411.
- Codd G.A., Steffensen D.A., Burch M.D., Baker P.D. (1994) Toxic blooms of cyanobacteria in Lake Alexandria, South Australia-learning from history. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 45: 731-736.
- Codd G.A. (1995) Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci. Technol.* 32: 149-156.
- Delaney J.M., Wilkins R.M. (1995) Toxicity of microcystin LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon* 33: 771–778.

- Falconer I.R., Beresford A.M., Runnegar M.T.C. (1983) Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Med. J. Aust. 1: 511-514.
- Froschio S.M., Humpage A.R., Burcham P.C., Falconer I.R. (2001) Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. Environmental Toxicology 16: 408-412.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R. (2003) Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environmental Toxicology, 18: 243-251.
- Froschio S.M., Humpage A.R., Wickramasinghe W., Shaw G., Falconer I.R. (2008) Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. Toxicon 51: 191-198.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension 610 cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151–158.
- Gersten D.M., Gabriel O. (1992) Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. II. Enzymes modifying nucleic acids. Analytical Biochemistry 203: 181-186.
- Gorzó Gy. (1985) Hidrobiológiai Közlöny 65: 357-359.
- Harper D. (1992) The ecological relationships of aquatic plants at Lake Naivasha, Kenya. Hydrobiologia 232: 65-71.
- Jones G.J., Orr P.T. (1994) Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. Water Res. 28: 871-876.
- Kinnear S.H.W., Duivenvoorden L.J., Fabbro L.D. (2007) Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. Harmful Algae 6: 642-650.
- Kinnear S.H.W., Fabbro L., Duivenvoorden L.J. (2008) Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. Arch. Environ. Contam. Toxcol. 54: 187–194.
- Kós P., Gorzó Gy., Surányi Gy., Borbély Gy. (1995) Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). Analytical Biochemistry 225: 49-53.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lahti K., Rapala J., Färdig M., Niemelä M., Sivonen K. (1997) Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particular material and dissolved in lake water. Water Res. 31: 1005-1012.
- Lankoff A., Banasik A., Obe G., Deperas M., Kuzminski K., Tarczynska M., Jurczak, T. Wojcik A. (2003) Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 189: 204–213.
- Liu Y., Song L., Li X., Liu T. (2002) The toxic effects of microcystin-LR on embryonal and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunthe. Toxicon 40: 395–399.
- Luan S. (2003) Protein phosphatases in plants. Annu Rev Plant Biol. 54: 63-92.
- MacKintosh C., MacKintosh R.W. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. Trends Biochem. Sci. 19: 444-448.

- Manage P.M., Kawabata Z., Nakano S. (1999) Seasonal changes in densities of cyanophage infectious to *Microcystis aeruginosa* in a hypereutrophic pond. *Hydrobiologia* 411: 211-216.
- Mankiewicz J., Tarczyn´ska M., Fladmark K.E., Doskeland S.O., Walter Z., Zalewski M. (2001) Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environ. Toxicol.* 16 (3): 225-233.
- Máthé C., M-Hamvas M., Grigorszky I., Vasas G., Molnár E., Power JB, Davey MR, Borbély G. (2000) Plant regeneration from embryogenic cultures of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. (common reed). *Plant Cell Tiss Organ Cult*; 63:81-84.
- Máthé C., M-Hamvas M., Vasas G., Surányi G., Bácsi I., Beyer D., Tóth S., Tímár M., Borbély G. (2007) Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytology*; 176: 824-835.
- Máthé C., Beyer D., Erdődi F., Serfőző Z., Székvölgyi L., Vasas G., M-Hamvas M., Jámbrík K., Gonda S., Kiss A., Szigeti Z.M., Surányi G. (2009) Microcystin-LR induces abnormal root development by altering its microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquatic Toxicology*; 92: 122-130.
- McDermott C.M., Nho C.W., Howard W., Holton B. (1998) The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* Vol. 36. No. 12. pp. 1981-1996.
- MacKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P., Codd G.A. (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264: 187-192.
- Metcalfe J.S., Barakat A., Codd G.A. (2004) Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters* 235: 125-129.
- M-Hamvas M., Máthé Cs., Molnár E., Vasas G., Grigorszky I., Borbély Gy. (2003) Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic Toxicology* 62: 1-9.
- Mitrovic S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J. (2005) Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 61: 345-352.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- Onodera H., Oshima Y., Hendrisen P., Yasumoto T. (1997) Confirmation of anatoxin-a(s) in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii* as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 35: 1645-1648.
- Padisák J., G.-Tóth L., Vörös L. (1984) *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. bloom in Lake Balaton in the summer and autumn of 1982. *BFB-Bericht* 51: pp. 77-81.
- Padisák J. (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol. / Suppl.* 4:563-593.
- Pflugmacher S., Codd G.A., Steinberg C.E.W. (1999) Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environ. Toxicol.* 14: 111-115.

- Pflugmacher S., Wiegand C., Beattie K.A., Krause E., Steinberg C.E.W., Codd G.A. (2001) Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (CAV.) Trin. Ex Steud. Environ. Toxicol. Chem. 20: 846-852.
- Pflugmacher S. (2004) Promotion of oxidative stress in aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. Aquatic Toxicology. 70: 169-178.
- Pietsch J., Fichtner S., Imhof L., Schmidt W., Brauch H.d. (2001) Simultaneous Determination of Cyanobacterial Hepato- and Neurotoxins in Water Samples by Ion-Pair Supported Enrichment and HPLC-ESI-MS-MS. Chromatographia. 54: 339-344.
- Preußel K., Wessel G., Fastner J., Chorus I. (2009) Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. Harmful Algae 8: 645–650.
- Rajesh P.R., Rajeshwar P.S. (2009) Biotechnological and industrial significance secondary metabolites. Biotechnology Advances 27: 521-539.
- Rastogi R.P., Sinha R.P. (2009) Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 27: 521–539.
- Reisner M., Carmeli S., Werman M., Sukenik A. (2004) The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. Toxicological Sciences 82: 620-627.
- Reskóné N.M., Ponyi J., Szító A., Kiss G., Ács É., Borsodi A. (2001) A Velencei-tó biológiai állapota. Hidrológiai Közlöny 81/5-6: 448-451.
- Rohrback T., Dittmann E., Borner T., Christffersen K. (2001) Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. J. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3523–3529.
- Romanowska-Duda Z., Tarczyska M. (2002) The influence of microcystin-LR and hepatotoxic extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. Environment Toxicology 17: 434-440.
- Saqrane S., El ghazali I., Ouahid Y., El Hassni M., El Hadrami L., Bouarab L., del Campo F.F., Oudra B., Vasconcelos V. (2007) Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction, Aquatic Toxicology 83; pp. 284–294.
- Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Müntz K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryogenic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). Journal of Experimental Botany 51 (349): 1423-1433.
- Shaw G.R., Sukenik A., Livne A., Chiswell R. K., Smith M. J., Seawright A. A., Norris R., L., Eaglesham, G. K., Moore, M. R. (1999) Blooms of the hepatotoxic cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in newly constructed lakes, Queensland, Australia. Environ. Toxicol. 14: 167-177.
- Skulberg O.M., Codd G.A., Carmichael W.W. (1984) Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. Ambio. 13: 244-247.
- Sivonen K., Jones G. (1999) In: (ed) Chorus I., Bartman J. Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management E&FN Spon, London and New York. P. 41-111.
- Szigeti Z.M., Jámbrík K., Roszik J., M-Hamvas M., Tándor I., Beyer D., Vasas G., Vereb G., Surányi G., Máthé C. (2010) Cytoskeletal and developmental

- alterations in *Ceratophyllum demersum* induced by microcystin-LR, a cyanobacterial toxin. *Aquatic Botany*; 92: 179-184.
- Törökné K.A., László E., Chorus I., Fastner J., Heinz R., Padisák J., Barbosa F.A.R. (2000) Különböző országokból származó cianobaktérium populációk toxicitása. *Hidrológiai Közlöny* 80/5-6: 350-351.
- Vasas G., Padisák J., M-Hamvas M., Máthé Cs., Molnár E., Surányi Gy., Grigorszky I., Borbély Gy. (2002a) A cilindropermopszin termelés analitikai vizsgálata *Cylindropermopsis raciborskii* izolátumokban. *Hidrológiai Közlöny* 82: 143-144.
- Vasas G., Gáspár A., Surányi G., Batta G., Gyémánt Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Grigorszky I., Molnár E., Borbély G. (2002b) Capillary Electrophoretic assay and purification of cylindropermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by plant test (Blue-Green Sinapis Test). *Analytical Biochemistry* 302: 95-103.
- Vasas G., Gáspár A., Páger C., Surányi G., Máthé C., M-Hamvas M., Borbély G. (2004) Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindropermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25: 108-115.
- Vörös L., Vízkelet É., Tóth F., Németh J. (1983) Trofitás vizsgálatok a Balaton Keszthelyi-medencéjében. *Hidrológiai Közlöny* 63:(9) pp. 390-398.
- Weiss J., Liebert H.P., Braune W. (2000) Influence of microcystin-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor* L. *J. Appl. Bot.-Angew. Bot.* 74: 100-105.
- Welker M., von Döhren H. (2006) Cyanobacterial peptides-nature's shown combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 30: 530-563.
- White S.H., Duivenvoorden L.J., Fabbro L.D., Eaglesham G.K. (2007) Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindropermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures. *Environmental Pollution* 177: 158-167.
- Wiegand C., Pflugmacher S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 203: 201-218.

A jelölt tudományos tevékenységének jegyzéke

1. Az értekezés témakörében megjelent közlemények jegyzéke

Jámbrik K., Máthé C., Vasas G., Beyer D., Molnár E., Borbély G., M-Hamvas M. (2011) Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-preferring nuclease activity in *Phragmites australis*. Journal of Plant Physiology. 168: 678–686.

IF: 2,677

Jámbrik K., Máthé C., Vasas G., Bácsi I., Surányi G., Gonda S., Borbély G., M-Hamvas M. (2010) Cylindrospermopsin inhibits growth and modulates protease activity in the aquatic plants *Lemna minor* L. and *Wolffia arrhiza* (L. Hoerke). Acta Biologica Hungarica 61 (Supl.), pp. 77-94.

IF: 0,793

Szigeti Z.M., **Jámbrik K.**, Roszik J., M-Hamvas M., Tándor I., Beyer D., Vasas G., Vereb G., Surányi G., Máthé C. (2010) Cytoskeletal and developmental alterations in *Ceratophyllum demersum* induced by microcystin-LR, a cyanobacterial toxin. Aquatic Botany 92: 179-184.

IF:2,087

Jámbrik K., Mikóné Hamvas M., Máthé Cs., Beyer D., Bácsi I., Koncz G., Tóth Sz., Surányi Gy., Borbély Gy. (2009) Vízínövények cilindrospermopsinnal szembeni érzékenységeinek vizsgálata. Hidrológiai Közlöny 89 (6): 122-125.

Mikóné Hamvas M., **Jámbrik K.**, Beyer D., Máthé Cs., Vasas G., Bácsi I., Borbély Gy. (2008) A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatásai különböző vízínövényfajokra. In: Orosz Z., Szabó V., Molnár G., Fazekas I. (szerk.) IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia kiadványa. Debrecen, 2008. ISBN 978-963-06-4626-0. pp. 247-253.

2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények jegyzéke

Máthé C., Beyer D., Erdődi F., Serfőző Z., Székelyvölgyi L., Vasas G., M-Hamvas M., **Jámbrik K.**, Gonda S., Kiss A., Szigeti Z.M., Surányi G. (2009) Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. Aquatic Toxicology 92: 122-130.

IF: 3,12

M-Hamvas M., Máthé C., Vasas G., **Jámbrik K.**, Papp M., Beyer D., Mészáros I., Borbély G. (2010) Cylindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis. Acta Biologica Hungarica 61 (Suppl.), pp. 35-48.

IF: 0,793

Mikóné Hamvas M., Vasas G., Tomku E., **Jámbrik K.**, Máthé Cs., Beyer D., Bácsiné Béres V., Borbély Gy. (2009) Proteáz aktivitás kimutatása vízvirágzásokat okozó cianobaktérium fajokból. Hidrológiai Közlöny 89 (6): 149-152.

3. Egyéb közlemények jegyzéke

M-Hamvas M., Papp M., Máthé Cs., **Jámbrik K.**, Koncz G. (2006) Endodermisz- vagy Phi-sejtek? In: Mihalik E. (szerk.) XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére. ISBN 963 482 767 5. pp. 49-53.

Szilágyi M., Kwon N-J, Bakti F., M-Hamvas M., **Jámbrik K.**, Park H.S., Pócsi I., Yu J-H., Emri T. (2011) Extracellular proteinase formation in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures – physiological function and regulation. Journal of Basic Microbiology. (közlésre elfogadva)

IF: 1,395

K-Koncz N., Szabó L.J., Máthé C., **Jámbrik K.**, M-Hamvas M. (2011) Histological study of quercus galls of *Neuroterus*

quercusbaccarum (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Cynipidae). Acta Biologica Szegediensis. (közlésre elfogadva)

4. Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

Jámbrik K., Mikóné Hamvas M., Máthé Cs., Beyer D., Tóth Sz., Surányi Gy., Borbély Gy. (2008) Vizinövények cilindrospormopszinnal szembeni érzékenységeinek vizsgálata. *L. Hidrobiológus Napok. Tihany*, 2008. október 1-3. Poszterelőadás.

Jámbrik K., M-Hamvas M., Beyer D., Máthé Cs., Vasas G., Bácsi I., Borbély Gy. (2008) A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatásai különböző vizinövényfajokra. *IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia. Debrecen*, 2008. március 28-29. Poszterelőadás.

5. Egyéb előadások, poszterek

M-Hamvas M., Papp M., Máthé Cs., **Jámbrik K.**, Koncz G. (2006) Endodermisz- vagy Phi-sejtek? *XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére. Budapest*, 2006. június 22-23. Előadás.

Mikóné Hamvas M., Tomku E., **Jámbrik K.**, Máthé Cs., Beyer D., Béres V., Borbély Gy. (2008) Proteáz aktivitás kimutatása vízvirágzásokat okozó cianobaktérium fajokból. *L. Hidrobiológus Napok. Tihany*, 2008. október 1-3. Poszterelőadás.

Mikóné Hamvas M., Kovácsné Koncz N., **Jámbrik K.**, Szabó L.J. (2010) A *Neuroterus quercusbaccarum* (Cynipidae) tölgygubacsok szövettani vizsgálata. *XIII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Greguss Pál emlékére. Szeged*, 2010. október 21. Poszter.

Vasas G., M-Hamvas M., Máthé Cs., Surányi Gy., Tóth Sz., **Jámbrik K.**, Beyer D., Bácsi I., Borbély G. (2007) Microcystin-LR inhibits the growth and xylem tissue development of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *7th International Conference on Toxic*

Cyanobacteria 5-10 August, 2007, Rio de Janeiro State–Brazil.
Poster. Official Program and Abstract Book: p. 120.

Szőllősi E., Oláh V., Kanalas P., **Jámbrik K.**, Mészáros I.
(2009) A fotoszintetikus pigmentek és a fotoszintetikus aktivitás
térbeli mintázata és időbeli fluktuációja cseres-tölgyes erdő
állományban. *Magyar Ökológus Kongresszus*. Szeged, 2009.
augusztus 26-28.

6. TDK, OTDK és Diplomadolgozat

Jámbrik K. (2006) Vízínövények mikrocisztin-LR-el szembeni
érzékenységének összehasonlító vizsgálata. Intézményi
Tudományos Diákköri Konferencia. Debrecen.

Jámbrik K. Vízínövények mikrocisztin-LR-el szembeni
érzékenységének összehasonlító vizsgálata. OTDK dolgozat.

Jámbrik K. (2007) Vízínövények mikrocisztin-LR-el szembeni
érzékenységének összehasonlító vizsgálata. XXVIII.
Országos Tudományos Diákköri Konferencia. Debrecen.

Jámbrik K. A mikrocisztin-LR hatása vízínövényekre.
Diplomadolgozat.