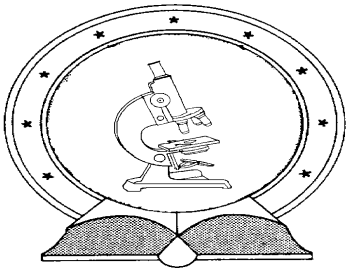
DE-TTK



1949

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

Doktori (PhD) értekezés

Jámbrik Katalin

Témavezetők: **Dr. Mikóné dr. Hamvas Márta**

Dr. Borbély György

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2011

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 20

….……

jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Jámbrik Katalin doktorjelölt 2007-2010. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 20

……..

témavezető aláírása

Tanúsítom, hogy Jámbrik Katalin doktorjelölt 2007-2010. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 20

……..

témavezető aláírása

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

Értekezés a doktori (Ph.D) fokozat megszerzése érdekében
a Biológia tudományágban

Írta: Jámbrik Katalin okleveles biológus/ökológus,
biológia-környezettan tanár

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája
(Biológia programja) keretében

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Barta Zoltán	…..……
tagok:	Dr. Grigorszky István	……...……
	Dr. Szabó Sándor	…..……

A doktori szigorlat időpontja: 2010. december 03.

Az értekezés bírálói:

Dr. ……	….……
Dr. ……	……..
Dr. ……	……..……

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. …….	……
tagok:	Dr. …….	……
	Dr. …….	….……
	Dr. …….	….……
	Dr. …….	….……

Az értekezés védésének időpontja: 20…….....

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések 1

2. Irodalmi áttekintés 4

2.1. A cianobaktériumok és a vízvirágzás 4
2.2. A cianotoxinok 5
2.3. A *Microcystis aeruginosa* és toxinja a mikrocisztin 6
2.3.1. A mikrocisztinek kémiai szerkezete, bioszintézise, lebontása 7
2.3.2. A mikrocisztin-LR állati szervezetekre gyakorolt hatásai 9
2.3.3. A mikrocisztinek növényekre gyakorolt hatásai 10
2.3.3.1. A mikrocisztinek hatása a szárazföldi növényekre 11
2.3.3.2. A mikrocisztinek hatása a vízinövényekre 11
2.4. Az *Aphanizomenon ovalisporum* és toxinja a cilindrospermopszin 12
2.4.1. A cilindrospermopszin kémiai szerkezete 13
2.4.2. A cilindrospermopszin állati szervezetekre gyakorolt hatásai 14
2.4.3. A cilindrospermopszin szárazföldi növényekre gyakorolt hatásai 15
2.4.4. A cilindrospermopszin vízinövényekre gyakorolt hatásai 15
2.5. A növényi hidrolázok rövid jellemzése 15
2.5.1. A növényi proteázok 16
2.5.2. A növényi nukleázok 18
2.6. A vizsgált vízinövények jellemzése 19

3. Anyag és módszer 22

3.1. *Microcystis aeruginosa* tenyésztése, a nyers toxinkivonat előállítása, a mikrocisztin-LR tisztítása 22
3.2. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyésztése, a nyers kivonat előállítása, a cilindrospermopszin tisztítása 23
3.3. Növénytesztek 24
3.3.1. A növények cianotoxin kezelése 25
3.3.2. A tesztek kiértékelése 26
3.4. Enzimaktivitás vizsgálatok 26
3.4.1. Növénykivonatok készítése 26
3.4.2. Enzimaktivitás vizsgálatok gélelektroforézissel 26
3.4.2.1. A proteáz enzimek aktivitásának vizsgálata egydimenziós poliakrilamid-gélelektroforézissel 27
3.4.2.2. Az egy- és a duplaszálú DNS-t hasító izoenzimek aktivitásának kimutatása poliakrilamid-gélelektroforézissel 28
3.4.2.3. A poliakrilamid gélek kiértékelése 28

4. Az eredmények és megvitatásuk 30

4.1. A mikrocisztin-LR hatásai a vizsgált kísérleti növényekre 30
4.1.1. A mikrocisztin-LR hatása a *Lemnaceae* családba tartozó fajok tenyészeteire 30
4.1.1.1. A növekedésvizsgálatok eredményei 31
4.1.1.2. A mikrocisztin-LR kezelések hatása a vízinövények fehérjetartalmára 33
4.1.1.3. A mikrocisztin-LR hatása a proteáz enzimek aktivitására 34

4.1.1.4. A mikrocisztin-LR hatása az ssDN-áz enzimek aktivitására 42
4.1.2. A mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* tenyészetekre 45
4.1.2.1. A mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* növekedésére 46
4.1.2.2. A mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* proteáz enzimeinek aktivitására 46
4.1.2.3. A mikrocisztin-LR hatása az ssDN-áz enzimek aktivitására 48
4.1.3. A nukleáz enzimek aktivitásának változása a mikrocisztin-LR kezelt *Phragmites australis* (nád) növényekben.....53
4.1.3.1. A kontroll *Phragmites australis* növények nukleáz enzimei 55
4.1.3.2. A mikrocisztin-LR hatása a *Phragmites australis* nukleáz izoenzimeinek aktivitásaira 56
4.2. A cilindrospermopszin hatásainak vizsgálata a kísérleti növényekben 63
4.2.1. A cilindrospermopszin növekedésgátló hatása.....64
4.2.1.1. A cilindrospermopszin kezelések hatására bekövetkező változások a fehérjetartalomban 66
4.2.1.2. A cilindrospermopszin hatása a proteáz izoenzimek aktivitására.....67
4.2.1.3. A cilindrospermopszin hatása az ssDN-áz enzimek aktivitására.....74
4.3. A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin kezelések hatásainak összevetése 77

5. Összefoglalás 84

6. Summary 90

7. Köszönetnyilvánítás 95

8. Irodalomjegyzék 96

9. A jelölt tudományos tevékenységének jegyzéke.....113

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

A_{260}: fényelnyelés 260 nm-en 1 cm-es kvarcküvettában

ADDA: 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10fenildeka-4,6-diénsav

BGST: (Blue Green Sinapis-Test) a mustár csíranövény-teszt

Chl-a: klorofill-a

Chl-b: klorofill-b

CTAB: hexadeciltrimetilammónium-bromid

CYN: cilindrospermopszin(ok)

dsDNS: natív (kettős szálú) dezoxiribonukleinsav molekula

EP: endoproteinázok (proteinázok)

HPLC: magas nyomású folyadékkromatográfia

IC_{50}: a növények növekedésének 50%-os gátlását előidéző koncentráció

i.p.: intraperitonálisan, azaz a hasüregben történő befecskendezés

kDa: kilodalton

LD_{50}: 50%-os letális dózis, az a toxinkoncentráció, amely a kísérleti állatok legalább 50%-ának az elhullását okozza

M. aeruginosa: *Microcystis aeruginosa*

MDHA: N-metildehidroalanin

MCY: mikrocisztin(ek)

MCY-LR: mikrocisztin-LR

MLD: minimális letális dózis, az a legkisebb toxinkoncentráció, amely még a kísérleti állatok pusztulását okozza

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

POD: peroxidáz enzim

PP1: protein foszfatáz 1

PP2A: protein foszfatáz 2A

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SOD: szuperoxid-dizmutáz enzim

ssDNS: egyszálú dezoxiribonukleinsav molekula

TE puffer: Tris-EDTA puffer (Tris-HCl+EDTA)

Tris: trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán

1. Bevezetés és célkitűzések

A cianobaktériumok sokféle szekunder metabolit szintézisére képesek, amelyek hatásairól, funkciójáról még keveset tudunk. Ezeken belül egyre bővülnek ismereteink azokról a kémiailag eltérő szerkezetű vegyületcsoportokról, ún. cianotoxinokról, amelyekre a cianobakteriális vízvirágzásokat gyakran kísérő tömeges állatelhullások (pl. halak, madarak, emlősök pusztulásai) és járványszerű emberi megbetegedések hívták fel a figyelmet (Codd és mtsai. 1994, Falconer és mtsai. 1983).

Hazánkban az 1960-as évek végétől a Balaton és a Velencei-tó eutrofizációja okozta a legnagyobb gondot, melynek során potenciális 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 anyagcseretermékeik 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, lizálnak. 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 mikrocisztinekkel, képesek annak felvételére (Pflugmacher 2004). A mikrocisztinek az eukarióta sejtek PP1 és PP2A típusú protein-foszfatáz enzimeinek specifikus gátlószereiként a fehérjefoszforilációval szabályozott anyagcsereutakkal és szignál transzdukciós útvonalakkal interferálnak. Ezáltal befolyásolják a sejtek növekedését, a sejtciklust, stresszenzimeket indukálnak, és továbbá 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 mtsia. 2005, Saqrane és mtsai. 2007), a stresszenzimek közül az RN-áz, glutation-S-transzferáz, szuperoxid-dizmutáz és peroxidáz enzimek aktivitásának emelkedését detektálták MCY-LR kezelések hatására (Pflugmacher és mtsai. 2004, Mitrovic és mtsai. 2005).

A cilindrospermopszin (CYN) alkaloid tipusú kémiai szerkezetében és hatásmechanizmusában is eltér a cianobaktériumok által termelt hepatotoxinok, mint cianotoxin csoport többi tagjától. Szintézisükre a *Cylindrospermopsis 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 (Kinnear 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 (Froscio 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 kb. egy-két hétig, vagy akár hónapokig is viszonylag magas koncentrációban jelen lehetnek a vízterekben (Jones és Orr 1994, Bourne és mtsai. 1996, Lahti és mtsai. 1997, Manage és mtsai. 1999). A vízinövények, a cianotoxikus vízvirágzás alkalmával folyamatosan ki vannak téve a cianotoxinok hatásainak, amelyek képesek bejutni, és eltérő mértékben akkumulálódni a vízi makrofita szervezetekben (Kinnear és mtsai. 2007a, b, 2008). A cianotoxinok-vízi növények kölcsönhatásaira vonatkozó eddigi vizsgálati eredmények egy toxin esetében is különböző növényi adaptációs, illetve védekezési mechanizmusokra utalnak (Pflugmacher 2004, Kinnear és mtsai. 2007b). Terepi megfigyelések bizonyítják, hogy a cianobaketriális vízvirágzások következtében a vízi növények egyedszámában és a vízi növényközösség diverzitásában is csökkenés következhet be (Harper 1992, Abe és mtsai. 1996, Saqrane és mtsai. 2007). Az ennek hátterében álló cianotoxinok okozta növényfiziológiai- és biokémiai folyamatok azonban messze nem tisztázottak.

Vizsgálataim során a két fentebb említett cianotoxin, a MCY-LR és a CYN különböző, a vízterek 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 elemeztem, és vetettem 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, 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. Axenikus növényi tesztrendszereket alkalmaztunk, ami kizárta az egyéb biogén eredetű hatásokat (M-Hamvas és mtsai. 2003, Máthé és mtsai. 2007, Jámbrik és mtsai. 2010, 2011). Kísérleteink során olyan toxinkoncentrációkat alkalmaztunk, amelyek vízvirágzások idején a parti sávban felhalmozódó, majd elpusztuló sejttömegből 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 aktivitásgéleken annak vizsgálata, hogy a tisztított MCY-LR, valamint a nyers MCY-LR tartalmú *Microcystis aeruginosa* extraktumok előidéznek-e enzimszintű változásokat a növényekben? A stresszválaszokban kulcsfontosságú hidrolázok közül 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 CYN tartalmú nyers 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 enzimmintázat- és aktivitás-változások vizsgálata poliakrilamid aktivitásgéleken.

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

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A cianobaktériumok és a vízvirágzás

A *Cyanobacteria*-fajok, magyarul cianobaktériumok, régi nevükön kékalgák az Eeubacteria regnumba tartozó fotoszintetizáló prokarióta szervezetek. A cianobaktériumok a vízi életközösségek fontos tagjai, gyakorlatilag minden víztípusban megtalálhatók, de előfordulnak talajokban, illetve extrém élőhelyeken, pl.: havon, forró vizű forrásokban, sőt növényekben is. Levegőmintákban is találtak cianobaktériumokat. A Földön az élet kialakulásában, az evolúció folyamatában a cianobaktériumok jelentőségét az adja, hogy őseik tették lehetővé az élet magasabb szervezettségű formáinak a kialakulását azáltal, hogy oxigéntermelő fotoszintézisük révén nagy mennyiségű oxigént juttattak a légkörbe (Kiss 1998).

A felszíni vizekben a cianobaktériumok planktonikusak és bentikusak is lehetnek (Kiss 1998). Jellegzetességük, hogy obligát fotoautotrófok. Fontos szerepet játszanak az oxigéntermelésben és a nitrogénkötésben (Kaebernick és Neilan 2001). Mind morfológiájukat, mind pedig anyagcsere-folyamataikat tekintve az egyik legváltozatosabb Gram-negatív (penicillinérzékeny peptidoglükán sejtfal) baktérium csoport. A fotoszintetikus tilakoidok, az úszó- és lebegőképességüket szabályozó gázvakuólumok, az atmoszférikus nitrogén megkötésére szolgáló heterociszták, illetve a kitartóképletek, a vastag falú akinéták, nem szükségszerűen ugyanazon a fajon, egyaránt jellemző anatómiai bélyegeik. Az életfolyamataikhoz szükséges energiát a mindkét reakciócentrummal rendelkező fotofoszforilációs rendszer biztosítja. Ezen tulajdonságaik óriási evolúciós jelentőséggel bírnak. Sejtjeik színét fehérjéhez kötött pigmentek, az ún. fikobilinek (fikocianin a kék, fikoeritrin a vörös színeződést okozza) határozzák meg, elnyomva a klorofill zöld színét (Farkas 1984). Egysejtűek, de gyakran sejtcsoportokat, fonalakat képezhetnek.

A cianobaktériumok számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek (tartaléktápanyag granulumok, nitrogénkötő képesség, lebegést elősegítő gázvakuólumok megléte, kromatikus adaptációs képesség, különböző hatású és kémiai szerkezetű bioaktív molekulák szintézise), amelyek alkalmassá teszik őket arra, hogy bizonyos körülmények között az adott vízi életközösség többi tagját háttérbe szorítva elszaporodjanak (Bryant 1994, Kiss 1998, Chorus 1999, Kaebernick és Neilan 2001). Felszaporodásuk következménye a vízvirágzás, amelynek szoros kapcsolata van az eutrofizáció folyamatával. Hazánkban sekély tavak és az ún. kisvizek fordulnak elő. Ezek, kevés kivételtől eltekintve, gyakran eutrófok, tápanyagban bőven ellátottak és a fotoszintetizáló szervezetek, a

cianobaktériumok, az algák és a makrofitonok nagy mennyiségben vannak jelen. Eutrofizáció az a folyamat, melynek során a tápanyagdúsulás hatására a vízben élő elsődleges termelők elszaporodnak. A folyamat egyaránt bekövetkezhet természetes és antropogén hatások következményeként (Smayda 2008). A cianobaktériumok tömeges elszaporodásának feltételeként az elegendő tápanyagon túl további három kritériumot állapítottak meg: szélcsendes vagy enyhén szeles idő, 15-30^{o}C közötti vízhőmérséklet, a víz pH 6 és 9 közötti értéke (Carmichael 1994). Tömeges elszaporodásukra elsősorban szervetlen tápanyagokban gazdag, műtrágyával szennyezett tavakban, tározókban, halastavakban, pocsolyákban, szennyvíztelepeken van meg a kedvező feltétel, mert a tápanyagok közül elsősorban foszfort, valamint nitrogént igényelnek. Ráadásul számos cianobaktérium faj, a légköri nitrogén kötésére képes, amely lehetővé teheti elszaporodásukat nitrogénforrás hiányában is. Vízvirágzáskor szabad szemmel a cianobaktériumok telepei a víz felszínén úszó habnak, vagy a felszín alatt lebegő zöld, kék vagy kékeszöld csomóknak látszanak. Gyors szaporodásuk következtében, olyan magas egyedszámot érhetnek el, hogy szinte „hermetikusan" lezárják a víztükröt. Azért veszélyes minden vízvirágzás, mert a gyors szaporodással együtt jár a növekvő tápanyag-felhasználás és a vízterület fényviszonyai megváltoznak, csökkennek, így rendkívül rövid idő alatt képesek az életközösség többi tagját teljesen háttérbe szorítani. Toxikus vízvirágzásról akkor beszélünk, ha a vízvirágzásban előforduló planktonszervezetek egértesztben toxikusnak minősülő anyagcseretermékeket, ún. toxinokat termelnek (Carmichael és Skulberg 1993). A toxikus vízvirágzást előidéző fajok az eukarióta algák (*Dinoflagellata, Chrysophyta, Bacillariophyceae*) és a prokarióta cianobaktériumok közül kerülnek ki. A cianobaktériumok közül, mely több mint 50 genust számlál, számos faj toxintermelő képességgel rendelkezik, mint például az *Anabaena, Aphanizomenon, Coelosphaerium, Microcystis, Nodularia, Nostoc, Cylindrospermopsis, Plankthotrix* fajok (Reynolds és Walsby 1975, Fay és Baalen 1986, Carmichael és Skulberg 1993).

2.2. A cianotoxinok

A cianotoxinok mind kémiai, mind toxikológiai szempontból a természetes toxinok egy igen változatos csoportját képviselik (1. táblázat). A cianobakteriális toxinok biológiai hatásuk alapján a következő csoportokba sorolhatók, úgymint hepatotoxinok (mikrocisztinek, nodularinok, cilindrospermopszinok), neurotoxinok (szaxitoxin, anatoxinok), dermatotoxinok (aplysiatoxinok, lyngbyatoxin), irritatív hatású toxinok (lipopoliszacharidok) (Codd és mtsai. 2005, Wiegand és Pflugmacher 2005, Rajesh és mtsai. 2009, Vasas és mtsai. 2010). Kémiai szerkezetük alapján a

cianotoxinok lehetnek ciklikus peptidek, alkaloidok és lipopoliszacharidok (LPS) (Chorus és Bartam 1999).

1. Táblázat A cianobakteriális és az alga toxinok és lehetséges hatásaik*

Toxin csoport	Termelő szervezet	Hatása	Vegyület típusa
Mikrocisztinek	*Microcystis Anabaena Plankthotrix*	protein foszfatáz (PP1 és PP2A) gátlók	hepatotoxikus ciklikus peptidek
Nodularinok	*Nodularia*	protein foszfatáz (PP1 és PP2A) gátlók	hepatotoxikus ciklikus peptidek
Szaxitoxinok	Dinoflagellata (*Protogonyaulax, Alexandrium, Gymnodinium, Pyrodinium*); Cianobaktérium (*Aphanizomenon, Anabaena, Lynghya, Cylindrospermopsis*)	blokkolják az idegsejtek nátriumcsatornáit	neurotoxikus alkaloidok
Anatoxinok	*Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Planktothrix, Oscillatoria, Mycrocystis*	irreverzibilisen blokkolják a acetilkolin receptorokat	neurotoxikus alkaloidok
Cilindrospermopszin	*Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia, Raphidiopsis, Anabaena*	fehérjeszintézis gátló, DNS töréseket okozó	citotoxikus alkaloidok
Lipopoliszacharidok (LPS)	Cianobaktériumok	irritatív hatású	lipopoliszacharid

*Wiegand és Pflugmacher 2005, Rajesh és mtsai. 2009, nyomán

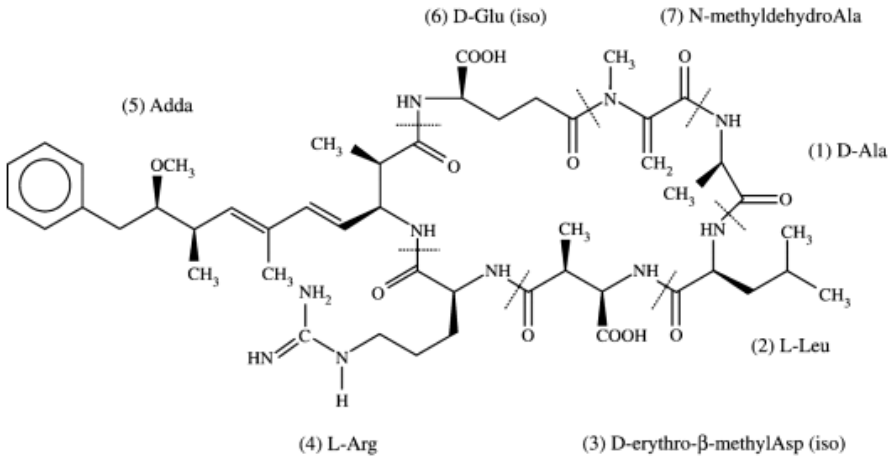
2.3. A *Microcystis aeruginosa* és toxinja a mikrocisztin

Az utóbbi évtizedekben a cianobakteriális vízvirágzás, illetve azon belül a *Microcystis aeruginosa* tömegprodukciója világviszonylatban (McDermott és mtsai. 1998, Haider és mtsai. 2003) és hazánkban is egyre gyakoribb jelenség (Kós és mtsai. 1995, Padisák 1997, Reskóné 1998, Törökné és mtsai. 2000, Vasas és mtsai. 2002, 2004). A *Microcystis aeruginosa* által okozott vízvirágzások kialakulásáért elsősorban a tavakban feldúsuló nitrogén és foszfor vegyületeket teszik felelőssé (Branco és Sienna 1994). A legnagyobb jelentőségű hazai vízvirágzás 1991-ben a Velencei-tavon következett be, egy egysejtű, sokezres kolóniát alkotó cianobaktérium, a *Microcystis aeruginosa* elszaporodása miatt (Kós és mtsai. 1995, Reskóné és mtsai. 2001).

A *Microcystis aeruginosa* a Cyanophyceae osztályon belül a Chroococcales rend, *Microcystoideae* család, *Microcystis* genus tagja (Skulberg és mtsai. 1993, Kiss 1998, Komárek és Anagnostidis 1999). A *Microcystis aeruginosa,* egysejtű, sokezres kolóniákat képző faj. Sejtfaluk külső rétege nyálkát termel, ezáltal tartja össze a sejteket egy közös kocsonyaburokban. A faj számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, mely kompetíciós előnyt jelent számára más fajokkal szemben: a lebegést elősegítő gázvakuólumok, a tartaléktápanyag granulumok, a kromatikus adaptációs képesség és a pH pufferoló képesség (Kiss 1998, Kaebernick és Neilan 2001). A fent említetteken kívül azonban van még egy olyan tulajdonsága, mely az adott élettérben növeli a populáció túlélési esélyét más fajokkal szemben: ez a toxikusság, amely mikrocisztin (MCY) termelő képességüknek tulajdonítható.

2.3.1. A mikrocisztinek kémiai szerkezete, bioszintézise, lebontása

A mikrocisztinek (MCY) a cianobaktériumok által termelt, a mérgezésekért felelőssé tehető cianotoxinok legrégebb óta kutatott csoportját alkotják. Mára már több mint 70 szerkezeti variánsa ismeretes (Ibelings és mtsai. 2007). Szerkezetüket tekintve ciklikus heptapeptidek (1. ábra). Az állatokon okozott mérgezési tünetek, anatómiai elváltozások alapján a hepatotoxinok családjába tartoznak (Pearson és mtsai. 1990, Carmichael 1992, Kaebernick és Neilan 2001). A MCY-LR az 1 és 2A típusú szerin-treonin protein-foszfatázok (PP1 és PP2A) specifikus gátlószereként az eukarióta sejtekben számos sejtélettani folyamatot befolyásolhat (MacKintosh és mtsai. 1990, MacKintosh és Diplexcito 2003).



1. ábra A mikrocisztin-LR szerkezete (Wiegand és Pflugmacher 2005, nyomán)

Termelésükre több faj is képes: *Microcystis sp. (M. aeruginosa, M. wessenbergii); Oscillatoria sp. (O. aghardii); Nostoc sp.; Anabaena sp. (A. flos-aquae); Anabenopsis sp.; Planktotrix sp.* (Pearson és mtsai. 1990, Carmichael 1992, Törökné és mtsai. 2000, Kaebernick és Neilan 2001). Bisoph és munkatársai (1959) izolálták és azonosították először a *Microcystis aeruginosa* (NRC-1) törzséből a peptid jellegű, „gyorsan ölő" hepatotoxint. Felismerték, hogy a heptapeptidek gyűrűt alkotó aminosavak között D és L izomerek is vannak. A négy D aminosav közül kettő különleges: az MDHA (N-metil-dehidroalanin) és az apoláros oldalláncú ADDA (3-amino-9-metoxi-2,6,8,-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav) (Rinehart és mtsai 1988, Namikoshi és mtsai. 1989, Botes és mtsai. 1985, Rao és mtsai. 2005). Ezen aminosavaknak a toxicitás szempontjából van jelentőségük. Az L-aminosavak cserélődhetnek, meghatározva fő csoportjaikat: MCY-LA (leucin, alanin); -LR (leucin, arginin); -YR (tirozin, arginin); -YM (tirozin, metionin; Botes és mtsai. 1985) és -RR (arginin, arginin; Krishnamurthy és mtsai 1986, 1989). Az 1991. évi velencei-tavi toxikus vízvirágzást okozó *Microcystis aeruginosa* törzs többféle mikrocisztint termel (MCY-RR, -YR, -LR), melyek közül legnagyobb mennyiségben a MCY-LR van jelen (Kós és mtsai. 1995, Vasas és mtsai. 2004).

A MCY bioszintézisének lépései, a folyamatot katalizáló enzimek ma már ismertek (Kaebernick és Neilan 2001). Szintézisük a nem-riboszómális peptid-szintetáz (NRPS) és a poliketid-szintáz (PKS) működése révén valósul meg (Dittmann és mtsai 1997, Börner és Dittmann 2005). Ezen enzimkomplexek a *mcy* gén klaszter által kódoltak (Nishizawa és mtsai. 1999, Tillett és mtsai. 2000, Via-Ordorika és mtsai. 2004). Tillett és munkatársai (2000) kutatásaiban a *mcy* klaszter szekvenciájának analízise feltárta a kettős operon struktúrát, amelyből a hosszabb operon kódolja a PKS-NRPS géneket (*mcyD-J*), amíg a rövidebb az NRPS géneket (*mcyA-C*). A cianobaktériumok növekedését, valamint toxintermelő képességét különböző környezeti tényezők (fény, hőmérséklet, tápanyagok, nyomelemek) befolyásolják. A növekedéshez optimális körülmények között a toxintartalom a növekedés késői exponenciális szakaszában a legmagasabb (Orr és Jones 1998, Borbély és mtsai. 1997). Termelődésük illetve felhalmozódásuk „célja", valamint sejten belül betöltött szerepük valójában még nem tisztázott, magyarázatukra mindezidáig több hipotézis született:

1. A cianotoxinok csupán ún. másodlagos anyagcseretermékek.

Mellette szól, hogy a nem-toxintermelő törzsek is életképesek, ellene az szól, hogy ugyanakkor ezek a szervezetek is termelnek nem toxikus analóg vegyületeket, amelyek szintézise bonyolult és energiaigényes folyamat (Paerl és Millie 1996, Orr és Jones 1998).

2. A cianotoxinok kationokkal komplexek képzésére képesek.

Sejten kívül elősegíthetik a vas megkötését, a sejten belüli vas-mikrocisztin komplexek pedig csökkenthetik a kationok mennyiségét és szabályozhatják a szabadgyökök sejten belüli koncentrációját (Utkilen és Gjolme 1995, Lukac és Aegerter 1993).

3. A cianotoxinoknak kapcsolata lehet a sejt fotoszintetikus apparátusával és szerepe lehet a fénygyűjtésben, valamint a kromatikus adaptációban. Ez magyarázhatná a mikrocisztinek koncentráció-növekedését magas fényintenzitás mellett (Orr és Jones 1998, Kaebernick és mtsai. 2000).

4. Kísérletek során megfigyelték, hogy egyes *M. aeruginosa* tenyészetek esetében kompetíciós előnyt jelentenek az általuk termelt metabolitok (Lam és Silvester 1979) más planktonikus szervezetekkel szemben.

5. Zilliges és munkatársai (2011) legújabb eredményei szerint a MCY fehérjeszerkezet módosító/védő funkcióval rendelkezik. Azt figyelték meg, hogy a MCY termelő sejtekben a MCY molekulák cisztein oldalláncaikkal kovalensen hozzákötődnek a fehérjékhez, és védik azokat a fény és oxidatív stressz okozta szerkezeti károsodásokkal szemben.

A MCY endotoxinok, tehát a víztérbe kerülésük a sejtek pusztulását követő folyamat. A vízvirágzások során a gázvakuólumokkal rendelkező sejtek nagy mennyiségben halmozódnak fel a víz felületén, különösen a parti régióban mérhetők extrém biomassza értékek (858-918 µg klorofill-a ml^{-1} vízminta). A felhalmozódó, elpusztult sejtekből a víztérbe kerülő mikrocisztin koncentrációja irodalmi adatok szerint elérheti a 7,3-7,8 mg MCY g^{-1} szárazanyag értékeket (Sivonen és Jones 1999, Törökné és mtsai. 2000). A vízben természetesen megindul mikrobiális lebontásuk (Manage és mtsai. 1999), de a molekulák igen stabilak, a hővel szemben is ellenállók (Kós és mtsai. 1995), ennek következtében még legalább két hétig, de gyakran egy hónap múlva is jelen vannak a vizekben (Carmichael 1994, Manage és mtsai. 1999), lehetővé téve a vízinövényekkel az interakciót.

2.3.2. A mikrocisztin-LR állati szervezetekre gyakorolt hatásai

A cianotoxinok okozta mérgezésekért leggyakrabban a hepatotoxinok felelősek. Mérgezésre akkor adódik lehetőség, ha a hullámzás a cianobaktériumokat a parti sekély részre nagy tömegben összehordja és az állatok onnan isznak. A béltraktusba került MCY-t az epesavat szállító peptidek azonnal kötik, majd a májba szállítják (Eriksson és mtsai. 1990, McDermott és mtsai. 1998, Fischer és mtsai. 2005), ahol a májsejteket károsítják (Erikson és mtsai. 1990, Runnegar és mtsai. 1981, 1991; Meriluoto és mtsai. 1990, Billam és mtsai 2008). A májban néhány órán belül vérzések

jönnek létre (Carmichael 1994, Billam és mtsai. 2008), emiatt a máj működésének súlyos zavara alakulhat ki, mely sok esetben halálhoz vezet. Irodalmi adatok igazolták, hogy a hepatociták MCY-LR-el történő kezelések hatására lényegesen érzékenyebbnek bizonyultak, mint más sejttípusok (McDermott és mtsai. 1998). Sajnálatos módon ismeretesek olyan esetek is, amikor a MCY emberi megbetegedéseket idézett elő azáltal, hogy bekerült az ivóvízhálózatba. Ez akkor következhet be, ha a vízkivétel olyan felszíni vizekből történik, melyekben toxintermelő cianobaktériumok szaporodnak el. Ezen kívül erős allergizáló hatásáról (bőrkiütés, viszketés szemirritáció) is olvashatunk a szakirodalomban (Pouria és mtsai. 1998, Törökné és mtsai. 2001). McDermott és munkatársai (1998) MCY kezelések során morfológiai és biokémiai változásokat észleltek; emlős máj szövetének sejtjeiben. A sejtek megduzzadtak, majd összezsugorodtak, DNS fragmentáció és „DNS létra" megjelenése volt detektálható. A MCY kezelések apoptózist indukáltak patkány és lazac hepatocitákban (Gehringer 2004). A MCY által az állati szervezetekben indukált biokémiai folyamatokat, sejtszintű változásokat Gehringer (2004) foglalta össze.

2.3.3. A mikrocisztinek növényekre gyakorolt hatásai

A mikrocisztinek növényekre gyakorolt lehetséges hatásait csak a 90-es évek második felétől kezdték vizsgálni. A mikrocisztinek gátolják az eukarióta sejtekben általános Ser/Thr protein foszfatázok PP1 és PP2A csoportjainak tagjait oly módon, hogy az enzim aktív centrumába kötődve meggátolják a szubsztrát kapcsolódását (Goldberg és mtsai. 1995). Egyre több növényi enzimről bizonyították, hogy működésének kontrollja reverzibilis foszforilációval-defoszforilációval valósul meg (Huber és mtsai. 1994, Smith és Walker 1996). A fentiek miatt kézenfekvővé vált a mikrocisztinek által indukált növényi válaszok vizsgálata.

Az előbbi biokémiai eredmények alapján, munkacsoportunk fehér mustárral (*Sinapis alba*) végezte el az első *in vivo* növénykisérleteket, amely egyértelműen bizonyította, hogy a nyers *M. aeruginosa* kivonat, valamint a tisztított MCY-LR gátolja a növények növekedését. A munka lehetővé tette a mustár növényteszt, a BGST (Blue-Green Sinapis Test) bevezetését, amely olcsó és efficiens módszer a mikrocisztinek kimutatására. A szerzők a cianotoxin és a növényi interakció ökológiai jelentőségét is felismerték (Kós és mtsai. 1995). Smith és Walker (1996) elsőként bizonyították, hogy a MCY-LR *in vitro* nM mennyiségben képes gátolni a növényi PP1 és PP2A enzimeket. Ezáltal valóban befolyásolhatják a növényekben a hormon-, a fény-, a szacharóz-, az etilén- és a patogének indukálta szignál transzdukciós folyamatokat, a K^+ és anion csatornák működését, a fény indukálta klorofill akkumulációt a kloroplasztiszokban és a sejtciklust (Smith és Walker 1996).

2.3.3.1. A mikrocisztinek hatása a szárazföldi növényekre

A szárazföldi növények cianobaktérium, illetve cianotoxin tartalmú öntözővizek által kerülhetnek kapcsolatba a cianotoxinokkal ("via spray irrigation" (Abe és mtsai. 1996, Codd és mtsai. 1999, Gehringer és mtsai. 2003). A növények gyökérzetükkel, illetve hajtásaikon keresztül is képesek a toxinok felvételére, mint ahogy ezt a mustár (Kurki-Helasmo és Meriluoto 1998), a saláta (Codd és mtsai. 1999 a, b), a bab (McElhiney és mtsai. 2001), az olajrepce és rizs (Chen és mtsai. 2004) esetében kísérletekkel bizonyították. Ez felveti annak lehetőségét is, hogy a MCY tartalmú vizekkel öntözött növények a fogyasztókra is veszélyt jelenthetnek. A *Phaseolus vulgaris*-ba bejutott MCY gátolta a fotoszintézist (Abe és mtsai. 1996), és a növekedésgátlás mellett oxidatív stresszenzimek aktivitás emelkedését indukálta a *Brassica napus* és *Oryza sativa* (Chen és mtsai. 2004) fajokban.

A *M. aeruginosa* nyers kivonata és a tisztított MCY-LR növekedésgátlást, antocián tartalom csökkenést, valamint az egyszálú DNS-t hasító enzimek aktivitásának növekedését idézte elő mustár csíranövényekben (Kós és mtsai. 1995, M-Hamvas és mtsai. 2003). Dohány BY-2 sejtek mikrocisztin-RR-el történő kezelése során az alacsonyabb toxinkoncentráció (60 μg ml^{-1}) tipikus apoptotikus változásokat (kromatin kondenzáció, citoplazma térfogatcsökkenés, csökkent sejttömeg stb.) indukált, amíg a magasabb (120 μg ml^{-1}) koncentráció a nekrózis tipikus morfológiai és ultrastruktúrális változásait okozta (Huang és mtsai. 2009). MCY-RR hatására dohány BY-2 sejtek és *Arabidopsis thaliana* sejtek tenyészeteiben is leírták az apoptózisra utaló elváltozásokat (Yin és mtsai 2005b, c; 2006).

2.3.3.2. A mikrocisztinek hatása a vízinövényekre

A mikrocisztinek vízinövényekre gyakorolt hatásaival kapcsolatban találunk adatokat a *Lemna minor* és *Lemna gibba* (Weiss és mtsai. 2000, Mitrovic és mtsai. 2005), *Spirodela oligorrhiza* (Romanowska-Duda és Tarczynska 2002), *Wolffia arrhiza* (Mitrovic és mtsai. 2005), *Ceratophyllum demersum* (Pflugmacher 2004), *Elodea canadensis, Vesicularia dubyana* és a *Phragmites australis* (Pflugmacher és mtsai. 1998, 1999, 2001; Wiegand és mtsai. 2002; Máthé és mtsai. 2007), *Vallisneria natans* (Yin és mtsai. 2005a) fajokról.

Casanova és munkatársai (1999) még azt valószínűsítették, hogy vízvirágzás során a cianobaktérium biomassza árnyékoló hatása sokkal inkább felelős a vízi makrofiták visszaszorulásáért, mint a csak átmenetileg jellemző magas cianotoxin koncentráció. Később több kutatócsoport is bizonyította, hogy a vízinövények a vízben lévő MCY-t felveszik és 12-24

óra alatt 0,6-1,75%-át akkumulálják (Pflugmacher és mtsai. 1998, Yin és mtsai. 2005). A vizsgálatok elsősorban a felvett mikrocisztinek által előidézett növekedés- és pigmenttartalom változásokra irányultak. A fiziológiai és enzimológiai változások közül többek között a MCY és a növények fotoszintetikus aktivitása, a peroxidáz, glutathion-S transzferáz, RN-áz enzimek aktivitása közötti összefüggéseket elemezték (Pflugmacher és mtsai. 1999, Weiss és mtsai. 2000, Romanowska-Duda és Tarczynska 2002, Mitrovic és mtsai. 2005). Romanowska-Duda és Tarczynska (2002) leírták, hogy a MCY-LR kezelések gátolták a *Spirodela oligorrhiza* növekedését és csökkentették a növényekben a klorofill koncentrációt. A *Lemna gibba*, *Lemna minor* és *Lemna japonica* esetében olvashatunk a cianotoxinok különböző biológiai folyamatokra (növekedés, fotoszintézis, toxin akkumuláció, oxidatív stressz stb.) kifejtett hatásairól (Weiss és Liebert 1998, Weiss és mtsai. 2000, Mitrovic és mtsai. 2005, LeBlanc és mtsai. 2005, Jang és mtsai. 2007, Saqrane és mtsai. 2007). A mikrocisztinek 10-20 $\mu g\ ml^{-1}$ koncentrációknál, 5 napos kezelést követően növekedés gátlást okoztak a *Lemna minor* és a *Wolffia arrhiza* növényekben (Mitrovic és mtsai 2005). Saqrane és munkatársai (2007) leírták, hogy a *Lemna gibba* növekedésében és klorofill koncentrációjában a MCY kezelések csökkenést okoztak. A *Ceratophyllum demersum* esetében irodalmi adatok bizonyítják, hogy a MCY bejut a növény szöveteibe, és biotranszformációja során reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkeznek, amelyek másodlagos toxikus hatásokért, például a pigmenttartalom csökkenéséért is felelőssé tehetők (Pflugmacher és mtsai. 2004). A ROS sejtkárosító hatásának kivédéséhez a *Ceratophyllum* sejtek hatékony védelmi rendszert fejlesztettek ki, jól működő antioxidatív enzimeik (pl. szuperoxid-dizmutáz, aszkorbinsav-peroxidáz, glutathion-peroxidáz,- reduktáz és -S-transzferáz) aktivitásemelkedését mérték MCY hatására (Pflugmacher és mtsai. 2004). Yamasaki (1993) leírta, hogy a *Microcystis* vízvirágzások a *Phragmites australis* növények hajtás hosszának, nedves tömegének csökkenését okozták. Ujabb kutatásokból kiderül, hogy a mikrocisztin-LR-el történő kezelés kalluszból regenerált nád növényeknél növekedésgátlást és szövettani elváltozásokat okoz (Máthé és mtsai. 2007).

2.4. Az *Aphanizomenon ovalisporum* és toxinja a cilindrospermopszin

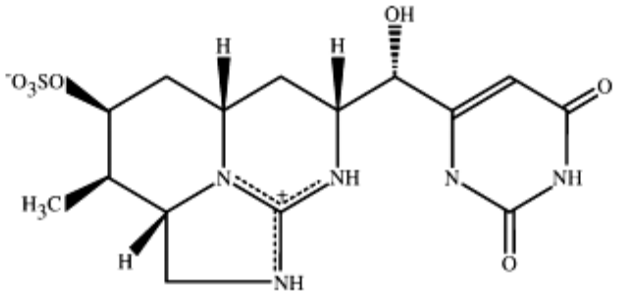
Az *Aphanizomenon ovalisporum* nitrogénfixáló, fonalas cianobaktérium. Rendszertani helyét tekintve a Cyanophyceae osztály, Nostocales rend, *Nostocaceae* család, *Aphanizomenon* genus (Komárek és Kováčik 1989) tagja. Az általunk használt *A. ovalisporum* tenyészet a Kinneret-tóból (Izrael)

származó, cilindrospermposzint termelő izolátum (Banker 1997, Vasas és mtsai. 2002a, Bácsi és mtsai. 2007).

Elsősorban trópusi területeken tömeges, de a mérsékelt övben, így hazánkban is előfordul (Padisák 1997, Vasas és mtsai. 2004). Mérete, amit a fonal hosszában határoznak meg, 50 és 500 µm között változik és a legtöbb esetben nitrát hiányában egy vagy több heterocisztát is lehet látni a trichóma közepén. A fonalat alkotó vegetatív sejtek hosszúkásak, a heterociszták gömbölyűek, vagy elliptikusak és mindig egyesével, a vegetatív sejtek között találhatók a fonalban. Ha a környezeti feltételek kedvezőtlenekké válnak a cianobaktérium számára -ovális vagy "hordó" alakú, speciális kitartó- és szaporító képleteket, az akinétákat lehet megfigyelni, amelyek szintén a vegetatív sejtek között helyezkednek el (Whitton 2002). Sejtjeik gázvakuólumokat is tartalmaznak (Banker és mtsai. 1997).

2.4.1. A cilindrospermopszin kémiai szerkezete

A cilindrospermopszin (CYN) kémiai szerkezetében és hatásmechanizmusában is eltér a cianobaktériumok által termelt hepatotoxinok, mint cianotoxin csoport többi tagjától (2. ábra). Egy vízben jól oldódó gyűrűs alkaloid származék viszonylag alacsony, 415 Da molekulatömeggel (Shaw és mtsai. 1999, Sivonen és Jones 1999).
Termelésére több cianobaktérium faj is képes, például a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins és mtsai. 1985), az *Umezakia natans* (Harada és mtsai. 1994), az *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker és mtsai. 1997, Shaw és mtsai. 1999), az *Anabaena bergii* (Schembri és mtsai. 2001, Fergusson és Saint 2003), *Aphanizomenon flos-aquae* (Preussel és mtsai. 2006) és a *Raphidiopsis curvata* (Li és mtsai. 2001, Carmichael és mtsai. 2001).



2. ábra A cilindrospermopszin szerkezete (Wiegand és Pflugmacher 2005 nyomán)

A CYN stabilitását különböző környezeti faktorok befolyásolják, így például a fényintenzitás és a vízhőmérséklet (Pietsch és mtsai. 2001, Preussel és mtsai. 2009). Chiswell és munkatársai (1999) a cilindrospermopszin stabilitását különböző környezeti körülmények között (látható és UV fény,

napfény, hőmérséklet és pH) vizsgálva egyértelműen megállapították a nagyfokú stabilitását, ugyanis 4-50°C hőmérséklet tartományban csak lassú bomlása figyelhető meg. A molekula igen stabilnak bizonyult széles pH tartományban is. Míg napfény hatására a CYN gyorsan lebomlik, árnyékos helyeken több hónapon keresztül is jelen lehet a víztömegben (Chiswell és mtsai. 1999, Wormer és mtsai. 2008).

2.4.2. A cilindrospermopszin állati szervezetekre gyakorolt hatásai

1982-ben Queensland-ben egy *Cylindrospermopsis* törzs okozta vízvirágzás következtében észlelt tömeges szarvasmarha elhullás és emberi mérgezés hívta fel a figyelmet a cilindrospermopszin súlyos egészségkárosító hatására (Wiegand és Pflugmacher 2005).

Állati sejtekben a CYN jelentős, irreverzibilis fehérjeszintézis gátló hatású, de a pontos mechanizmus nem ismert (Terao és mtsai. 1994, Froscio és mtsai. 2003). Egyéb anyagcserére kifejtett hatásai közül kiemeljük, hogy a pirimidin nukleotidok szintézisét gátolja (Reisner és mtsai. 2004). Emlősökben a CYN a máj, a vese, a timusz és a szív kóros elváltozásait okozza (Falconer és mtsai. 1999, Froscio és mtsai. 2003, Terao és mtsai. 1994). A CYN a humán hepatocitákban és enterocitákban DNS károsító hatásúnak bizonyult (Shen és mtsai. 2002, Bazin és mtsai. 2010). Magasabb koncentrációknál hatása már nem csak a DNS szálakon megjelenő törésekben, hanem a kromoszómaszám csökkenésében is megnyilvánul (Humpage és mtsai. 2000). Már több *in vitro* modellen bizonyították a cilindrospermopszin sejtkárosító hatását, protein-szintézis gátlást, valamint a citokróm p-450 metabolizmussal összefüggő citotoxicitást, valamint genotoxicitást mértek (Runnegar és mtsai. 1994, Humpage és mtsai. 2000, Froscio és mtsai. 2001, 2003). A citokróm p-450 bekapcsolódik a CYN metabolizmusába, és közvetett módon fokozhatja a mérgező hatást; vagy mérgező szekunder metabolitok generálásával, vagy a glutation-szintézis gátlásával (Runnegar és mtsai. 1994, Norris és mtsai. 2002. A glutation hiányában fenállhat annak a lehetősége, hogy megnő a reaktív oxigén gyökök (ROS) koncentrációja, ami hozzájárulhat a genotoxicitáshoz (Humpage és mtsai. 2005).

Bizonyított, hogy a CYN képes befolyásolni a vízi életközösségek egyes állatfajainak egyedfejlődését, életképességét (White és mtsai. 2007, Kinnear és mtsai. 2007b), és a vízzel érintkező, azt fogyasztó humán populációra is veszélyt jelent (Turner és mtsai. 1990). Humán megbetegedések úszás és vízi sportok végzésekor (Turner és mtsai. 1990), illetve permetezéses öntözéssel kezelt növények fogyasztása (Codd és mtsai. 1999) esetén fordulhatnak elő. A permetezéses öntözés során a toxin

érintkezik a növénnyel, felszívódik, ezáltal a környezetben egyébként kis mennyiségben jelen lévő cilindrospermopszin a növénybe jutva akkumulálodhat (Griffiths és mtsai. 2003, Codd és mtsai. 1997).

2.4.3. A cilindrospermopszin szárazföldi növényekre gyakorolt hatásai

Növényekre gyakorolt hatásairól még kevés adat ismert. A CYN növekedésgátló hatását *in vivo* növényi rendszerekben először Vasas és munkatársai (2002) *Sinapis alba* csíranövényeken bizonyították (IC_{50} érték 18,2 μg ml^{-1}). Dohánynövényeken a CYN gátolta a pollentömlő növekedését 5 és 1000 μg ml^{-1} között, valamint a pollentömlőben a fehérjeszintézis gátló hatását is kimutatták (Metcalf és mtsai. 2004). *In vitro* növényi rendszerben (búzacsíra extraktumban) is bizonyították fehérjeszintézis gátló hatását (Froscio és mtsai. 2008).

2.4.4. A cilindrospermopszin vízinövényekre gyakorolt hatásai

Kinnear és munkatársai (2008) azt tapasztalták, hogy 0,4 μg ml^{-1} CYN tartalmú *Cylindrospermopsis raciborskii* nyers kivonat enyhe növekedés-serkentést idézett elő, de csökkentette a *Hydrilla verticillata* klorofill tartalmát. Szövetkultúrából származó fiatal *Phragmites australis* növények érzékenyek voltak a CYN kezelésekre 0,5-40 μg ml^{-1} koncentráció tartományban (Beyer és mtsai. 2009). A CYN kezelések hatására a nád gyökerek a növények általános stresszválaszainak különféle jelenségeit mutatták. A CYN növelte a gyökérszámot, indukálta a „kallusz-szerű" szövetek megjelenését, a nekrózist, a mitotikus indexben és a mikrotubulusok denzitásában és orientációjában történő változásokat indukált. A szakirodalomban a CYN-nek, az általunk vizsgált vízi növényekre (*Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*, *Ceratophyllum demersum, Phragmites australis*) kifejtett hatásairól még kevés adatot találhatunk, így vizsgálataink a szakirodalomra nézve új eredményekkel szolgálhatnak.

2.5. A növényi hidrolázok rövid jellemzése

A hidrolázok kulcsszerepet játszanak számos növényi életfolyamatban, pl.: a növényi stresszválaszok kialakulásában, az indukált és természetes szeneszcencia jelenségében, a növényi apoptotikus folyamatokban (Wilson 1975, Blank és McKeon 1989, Láng 1998). A növények hidrolitikus

enzimeinek vizsgálata alapvetően segítette a növénypatogénekkel fertőzött növények, a patogének által indukált anyagcsere változásainak megértését (Goodman és mtsai. 1991). A hidrolázok fontos szerepet tölthetnek be a sejtciklus szabályozásában is (Hartl és Jones 2000).

2.5.1. A növényi proteázok

A növényi proteázok (E.C.3.4.11-19; 3.4.21-25; 3.4.99) biológiai szerepe a növényi szervezetekben igen sokrétű. A fehérjék lebontását, más szóval a proteolízis folyamatát katalizálják, ezért sok szempontból kulcsfontosságú szerepet töltenek be a növények életműködéseiben és fejlődésében (Láng 1998). Felelősek például a sejt belső egyensúlyi állapotának a fenntartásáért és a megfelelő stresszválaszok létrejöttéért az abnormális/hibás szerkezetű fehérjék lebontásával (Palma és mtsai. 2002). A proteázok, a szabályozó funkciójukon túl, fehérjék lebontásával aminosavakat szolgáltatnak az új fehérjék szintéziséhez. Katalizálják a zymogének és a peptid-típusú hormonok molekulájának megfelelő hasítását, ezek érési folyamatát. A kulcsenzimek és szabályozó fehérjék mennyiségének csökkentésével biztosítják az anyagcsere, a homeosztázis és a fejlődés kontrollját. A programozott sejthalál, a soksejtű szervezetek egyedfejlődésének természetes velejárója, szintén szigorúan szabályozott, komplex folyamat. A szén-, nitrogénvesztés csökkenése érdekében ilyenkor specifikus proteolitikus utak aktiválódnak és az aminosavak a növekvő vagy raktározó szervekhez transzportálódnak. Az előbb felsoroltakon kívül a növényi proteázok egyik alapvető jelentősége a fehérjeraktárak (magvak, raktározásra módosult szervek tápszövetei) mobilizásában rejlik (Vierstra 1996, Schlereth és mtsai. 2000, Palma és mtsai. 2002).

Egyre bizonyosabbá válik, hogy a növényekben a fehérjelebontás komplex folyamat, amely proteolitikus utak sokaságából áll, valószínűleg minden sejtorganellum rendelkezik eggyel vagy többel, amelyek között vannak a baktériumokkal és állati szervezetekkel homológok. Ezek közé tartozik a kloroplasztiszokban működő ClpAP proteáz, a vakuoláris katepszinek, a kiválasztó rendszerek KEX2 proteázai, a sejtmagban és a citoplazmában működő ubiquitin/26S proteoszóma rendszerhez kapcsolódó proteázok (Vierstra 1996).

Működésüket tekintve a proteázok általában két fő osztályba sorolhatók: a polipeptid lánc belsejében lévő peptidkötéseket specifikusan bontó endopeptidázokra (proteinázokra, EP) és a polipeptidlánc végeiről egy-egy aminosavat lehasító aspecifikus exopeptidázokra (peptidázok). Az endopeptidázok hasítása után megmaradó oligopeptideket tovább bontó exopeptidázok, lehetnek aminopeptidázok vagy karboxipeptidázok (aszerint, hogy N- vagy C-terminálison hasítanak). Ezek nem élesen elkülönülő

csoportok, ezért más enzimektől eltérően az enzim szubsztrátján, illetve termékén alapuló csoportosítás mellett, az enzimek aktív centrumának felépítésére, az enzim működéséhez nélkülözhetetlen komponensekre utaló csoportosítás is lehetséges. Ezek alapján a növényi proteázok körében beszélhetünk szerin-, cisztein-, aszpartát- és metalloproteázokról (Vierstra 1996, Palma és mtsai. 2002).

A proteáz enzimek kevésbé specifikus működése miatt az intracelluláris proteinek random módon történő lebontásának elkerülésére fontos a kompartmentálódásuk és a működésük regulációja. A szelektív fehérjedegradációt biztosítják a lebontandó fehérjék szelektív megjelölését szolgáló mechanizmusok, mint a fehérje-foszforiláció/defoszforiláció, vagy aminosavak kapcsolása a fehérjékhez (Vierstra 1996).

A sejtmagban és a citoszólban az ubiquitin/26S proteoszóma rendszer biztosítja a fehérjék szelektív lebontását. Az ubiquitin-függő útvonal lényege, hogy a lebontandó fehérjékhez ubiquitin molekulákból álló lánc kapcsolódjon, mert ezek a láncok szolgálnak felismerő helyekként (szignálokként) a szelektív lebontást végző 26S proteoszómák, az 1,5 MDa moltömegű sokalegységes proteáz komplexek számára. Ez a lebontási út különösen fontos a növények fejlődésének a szabályozásában azáltal, hogy szelektív módon eltávolítja a különböző sejtciklus effektorokat, transzkripciós faktorokat, sejtreceptorokat, például a fitokróm A-t. Valószínű, hogy mellette ubiquitin független proteolitikus utak is léteznek, erre utal, a Ca^{2+}-függő proteázok jelenléte is (Reddy és mtsai. 1994).

A fotoszintetizáló növényi szervekben a sejt fehérjetartalmának 50%-a a kloroplasztiszokban található, ezek turnoverét változatos kloroplasztisz-proteázok biztosítják, melyek között vannak ATP-függő és prokarióta proteázokkal homológok (pl.: ClpAP), valamint neutrális proteázok, prolyl endopeptidáz, a sztrómában lokalizált metalloproteáz (EP1), amely valószínűleg részt vesz a Rubisco lebontásában, de ATP-függő szerin-proteázt is leírtak kukorica kloroplasztiszában. Ezek jelentősége különösen megnő a levelek szeneszcenciájának idején (Vierstra 1996).

A növényi sejtextraktumokból mérhető proteáz aktivitást zömében a vakuólumokból kiszabadult hidrolitikus enzimek adják, amelyek között vannak exo-, endoproteázok, valamint szerin-, cisztein-, aszpartát- és metalloproteázok egyaránt. Egy részük a savas pH-jú, lebontó vakuólumokban, más részük a vakuoláris fehérjeraktárakban található. Ez utóbbiak csírázáskor *de novo* szintetizálódnak és szállítódnak a fehérjetestecskékbe, hogy mozgósítsák azok fehérjeraktárait (Schlereht és mtsai. 2000). Ezek az emlős lizoszómákban található cisztein-proteázok katepszin osztályának tagjaival rokon fehérjék, és jelenlétük a növényekben nem korlátozódik a magvakra, jelen vannak a levelekben, a csíranövények hipokotiljában is. A raktározott fehérjék lebontásán túl a vakuoláris proteázok

(más hidrolázokkal együtt) fontos szerepet játszanak a növények patogénekkel, parazitákkal, herbivorákkal szembeni védekezésében a megtámadott sejtek autolízisével, valamint a szeneszcencia végső fázisában a tonoplaszt felszakadása után a maradék citoszólikus és organelláris fehérjék lebontásában. Szerepük van a vakuoláris zymogének proteolitikus érésében, és végül aminosavak felszabadításával a vakuoláris proteázok segíthetnek a gyors növekedés szakaszában, éhezés, vagy egyéb stresszek kivédésében (Vierstra 1996, Láng 1998).

2.5.2. A növényi nukleázok

A dezoxiribonukleázok (DN-áz, E.C.3.1.11.; 3.1.13-16.; 3.1.21-22.; 3.1.25.-27.; 3.1.30.-31.) kifejezés a DNS hidrolízisét katalizáló enzimek közös neve (Láng 1998)

A nukleinsavak fiziológiás körülmények között nagyon stabil polinukleotid vegyületek, *in vivo* csak enzimatikus hidrolízissel degradálódnak. A növényi sejtmag, a mitokondriumok és a kloroplasztiszok nukleinsav állományának degradációja, a szabályozási és növénypatológiai folyamatok mellett sokszor kedvezőtlen fiziológiai körülmények között, stressz hatására bekövetkező folyamat. A folyamatot a nukleáz enzimek működésében bekövetkező nagymértékű változások, enzimaktivitás emelkedések kísérik (Wilson 1975).

Többféle felosztásuk létezik (Wilson 1975, Farkas 1982, Linn és Roberts 1982, Gersten és Gabriel 1992, Linn és mtsai. 1993, Green 1994). A legelfogadottabb a Wilson-féle (Wilson 1975) felosztás, amely az alábbi szempontokat veszi figyelembe:

1. A szubsztrátspecifitás (csak RNS-t, csak DNS-t, vagy mind kettőt bontani képes). A szubsztrátspecifitás szempontjából sok esetben nem annyira a pentóz, illetve bázis összetevőkben való különbség a meghatározó, hanem az egyfonalúság, illetve a kettős-hélix szerkezet.

2. A hasítás helye alapján lehetnek: endonukleázok, exonukleázok és endo-exonukleázok. Endonukleáz, ha képes a polinukleotid lánc belsejében hasítani, ezáltal oligonukleotidokat eredményez, vagy exonukleáz, ha a lánc egyik végéről, lépésről-lépésre hasítja le a nukleotidokat, ezáltal mononukleotidokat produkál. Néhány nukleáz mindkét módon képes hasítani.

3. A foszfodiészter kötés hasításának módja. A foszfodiészter kötés ugyanis mindkét oldalon hasítható; a hasítás eredményezhet 3'-foszfát és 5'-hidroxil véget, vagy a másik esetben 5'-foszfát és 3'-hidroxil véget.

Ezek figyelembevételével az igen változatos növényi nukleázokat RNáz I, RNáz II, nukleáz I, exonukleáz I csoportokba sorolja. DNS bontó

enzimaktivitással két csoportjuk, a nukleáz I és az exonukleáz II tagjai rendelkeznek (Wilson 1975).
Egyetlen növénynél is, -a növény különböző szerveiben, életciklusának különböző szakaszaiban, változó környezeti viszonyok között-, eltérő nukleáz enzim aktivitások mérhetők. Jól karakterizált nukleáz enzimek a mungó bab nukleázok, *Avena* levél nukleázok, dohány kultúra nukleázok (extracelluláris enzim) vagy az *Arabidopsis* szeneszcencia-indukált bifunkcionális nukleázai. Sok növény nukleáza I típusú (E.C.3.1.30.X), melyek extracelluláris vagy intracelluláris, hő-stabil glikoproteinek endonukleáris aktivitással (Wilson 1975, Farkas 1982, Pérez-Amador és mtsai. 2000).

A DN-ázok és RN-ázok aktivitásának együttes növekedése jellemző mechanikai sérülések és patogének okozta fertőzések hatására (Wilson 1975, Goodman és mtsai. 1991). Különböző ssDN-áz izoenzimek indukálódnak szárazság idején vagy oxidatív stressz során, amelynek fontos szerepe van a vírus rezisztenciában, baktérium vagy gomba patogénekkel szemben is, a programozott sejthalál (PCD) és szeneszcencia indukciójában (Wood és mtsai. 1998, Pérez-Amador és mtsai. 2000, Desai és Shankar 2003, Leśniewicz és mtsai. 2010). A növényekben megfigyelt, apoptózishoz hasonló jelenség a hiperszenzitív válasz (HR). Dohányban, dohánymozaik vírus (TMV) hatására jelentős mennyiségben indukálódnak nukleázok. A sejtmag DNS-e csak a folyamat késői szakaszában degradálódik, amikor már a plazmamembrán is sérül. Nukleázok már a fertőzés korai szakaszában jelentős mennyiségben kimutathatók (Láng 1998, Danon és Gallois 2000). Feltételezhető, hogy a nukleázok indukált szintézisének és szekréciójának eredeti funkciója az idegen DNS hasítása. A patogén támadást imitáló, de HR-t ki nem váltó stresszkezelések (ozmotikus sokk, mechanikai sérülések stb.) is eredményeznek nukleáz aktivitás növekedést, de a nukleáris DNS tényleges fragmentálódását csak a membránokat is károsító stresszhatás idéz elő (Láng 1998). Cianotoxinok okozta nukleáz enzimaktivitás változásról is olvashatunk a szakirodalomban (M-Hamvas és mtsai. 2003, 2008).

2.6. A vizsgált vízinövények jellemzése

A vízi vegetáció növényeinek közös jellemzői, hogy párologtató szerveik módosultak (vagy hiányoznak), légzésük a vízi életmódhoz alkalmazkodott. Többnyire a vízbe behatoló fénymennyiségtől függően vertikálisan is elkülönülnek egymástól. Életmódjukat a víz felhajtó ereje határozza meg. A vízi vegetáció faji összetételének változatosságát erősen befolyásolják a víz kémiai tulajdonságai, a benne oldott kémiai anyagok, a vízmélység-változások, stb (Jakucs 1981).

A hínár növényzetnek általában két fő csoportját különítik el: a lebegő hínárokat (*Lemnetea*-osztály) és a gyökerező hínárokat (*Potamogetonetea*-osztály). A lebegő hínárok között a két leggyakoribb hazai cönózis a felszínen úszó békalencse-hínár (Lemno-Utricularietum) és az alámerülő békatutaj-kolokán-hínár (Hydrochari-Stratiotetum) (Jakucs 1981). A békalencse-hínár mélyvizekben is kialakulhat, de a víz felszínén úszó növényeket a szél (vagy a víz áramlása) gyakran behajtja a part menti nádasokba, vagy a rögzített úszó hínárosok közé (Jakucs 1981). Leggyakoribb fajai -a vizsgálatainkban is felhasznált- *Lemna minor, Wolffia arrhiza*. Rendszertani besorolásuk: Monocotyledonopsida osztály, Aridae alosztály, Aranae főrend, Arales rend, *Araceae* (*Lemnaceae,* békalencsefélék) család (Landolt 1986, 1987, Podani 2003).

Az *Araceae* családba tartozó növények széles körben elterjedt és gyorsan növő szervezetek. A vízi ökoszisztémában kozmopolita *Lemna minor* és *Wolffia arrhiza* fajoknak, egyebek mellett fontos szerepe van a táplálékláncban, mint elsődleges termelők, és a víz oxigén szintjének szabályozásában. A környezetszennyezés érzékeny bioindikátorai (Horvat és mtsai. 2007) és ezeket a fajokat alkalmazzák hormonok (Piotrowska és mtsai. 2009) és specifikus bioszintézis inhibítorok (Bajguz és mtsai. 2005) teszteléséhez is. A békalencsék a nyugodt vízfelületeket beborító lebegő hínár tagjai, és igen erőteljesen szaporodnak vegetatív úton. Testük szabadon lebegő, lapos, levélszerű tagokból áll, amelyek sarjhajtásokkal szaporodnak. A nagyobb tag a levélnek, a kisebb pedig a redukált hajtástengelynek felel meg (Borhidi 1995). Kisebb állóvizek felületén úszó parányi, telepszerű virágos növények. Nagyon leegyszerűsödött szervezetek, gyökereik is hiányozhatnak; egyivarú, egylakiak. A békalencse fajok kis méretük, hosszú élettartamuk, gyors, elsősorban vegetatív úton történő szaporodásuk, axenikus körülmények közötti jó nevelhetőségüknek köszönhetően kiváló, és ennek megfelelően gyakran alkalmazott laboratóriumi tesztszervezetek (Cleland and Tanaka 1982, Nyberg 1986, Scholes 1987, Ramirez-Toro és mtsai. 1988, Wang 1990, Saqrane és mtsai. 2007). Fotoszintézisük, magas fehérjetartalmuk alkalmassá teszi őket ökofiziológiai, enzimológiai vizsgálatokra. Bizonyítottan érzékeny bioindikátorai a nehézfém szennyezéseknek (Davis 1981, Cowgill és mtsai. 1989, 1991; Hou és mtsai. 2007, Piotrowska és mtsai. 2009, Horvat 2007, Oláh és mtsai. 2008). Gyökérzetük ha van, akkor sem játszik jelentős szerepet az anyagfelvételben, az anyagok közvetlenül a hajtások felületén át kerülnek felvételre (Environment Canada 1999).

Az apró békalencse *(Lemna minor* L.*)* virágzatában két porzós és egy termős virág foglal helyet, amelyet közös buroklevél takar (Hortobágyi 1979). Mindkét oldalán lapos, 2-4 mm átmérőjű levélszerű szártagjából 1 tompán legömbölyített csúcsú gyökérsüveggel fedett gyökérszál lóg le vagy

öregen hiányzik. A szártagok magányosan vagy néhányadmagukkal (2-6) összenőve lebegnek. A legkülönfélébb minőségű vizekben fordulnak elő, a szerves terhelést is jól tűrik (Felföldy 1990).

Legkisebb virágos növény az 1-1,5 mm átmérőjű, kölesmaghoz hasonló, alul szivacsos szártagú és domború vízidara (*Wolffia arrhiza* L.). Gyökere, buroklevele sincsen. Virágzata egy porzós és egy termős virágból áll, de Magyarországon még nem észlelték virágos példányait. Magánosan vagy párosával („szülő és utód") úsznak a víz színén. Mezo- és eutrofikus, erősen felmelegedő, széltől védett vizekben található. Néha nagy tömegben elszaporodik, majd eltűnik. E növények a vízi állatok, madarak takarmányai (Felföldy 1990, Hortobágyi 1979).

A kísérlet-sorozatban alkalmazott érdes tócsagaz (*Ceratophyllum demersum* L.) rendszertani helye az előzőektől eltérő: Dicotyledonopsida osztály, Magnoliidae alosztály, a Nymphaeanae főrend, a Nymphaeales rend és *Ceratophyllaceae* (borzhínárfélék) család (Hortobágyi 1979). Teljesen víz alá merülten lebegve élő, gyökértelen hínárnövények. Örvökben álló leveleik 1-2-szer szeldeltek, összesen 2-4 sallangból állnak, amelyek sűrűn 2 sorban fogacskásak, kissé merevek. A levelek hónaljában, magányosan álló viráguk erősen leegyszerűsödött, egyivarú, egyszerű zöld virágtakaróval, spirálisan álló porzókkal és egyetlen termőlevélre redukálódott termővel (Felföldy 1990, Borhidi 1995). Termése a határozás szempontjából is fontos. Álló vagy lassan folyó különböző tápanyagellátottságú vizekben is gyakori. A szakirodalomban találunk adatokat a különböző toxikus anyagokkal végzett vizsgálatokról a *Ceratophyllum* fajokban. Vizsgálták a növények nehézfémion toleranciáját (Gupta 1996) és szenyvíztisztító hatását (Rai és mtsai. 1995).

A kutatásokba bevont nád (*Phragmites australis*, Cav. Trin. Ex Steud.) rendszertani helyét tekintve a *Poaceae* (pázsitfűfélék) családjához tartozik. A legnagyobb termetű hazai évelő fű. Kozmopolita, egészen a sarkvidékig él. Fő előfordulása az állóvizek és a lassan folyó vizek partja, de a száraz felületeken is találkozhatunk példányaival. Hajtáseredetű adventív gyökerei a rhizóma csomóin koszorúszerűen fejlődnek. Szárában, gyökerében sok a levegőjárat. A nád maximálisan 2 m-es vízborításban él, az értékes állomány 80-150 cm-es vízben fejlődik. A nádas jellegzetes növény- és állategyüttessel rendelkezik (Hortobágyi 1979). A *Phragmites australis* struktúrájáról, növekedésének dinamikájáról további adatokat olvashatunk Engloner 2009-ben megjelent összefoglalójában. A nád növények képesek akkumulálni bizonyos nehézfémeket, ezért használják remediációs céllal (Ye és mtsai. 1998). A biogén és abiogén eredetű környezeti faktorok által előidézett fiziológiai változások tanulmányozására is kiválóan alkalmasak (Armstrong és Armstrong 2001; Máthé és mtsai. 2007, Mészáros és mtsai. 2003).

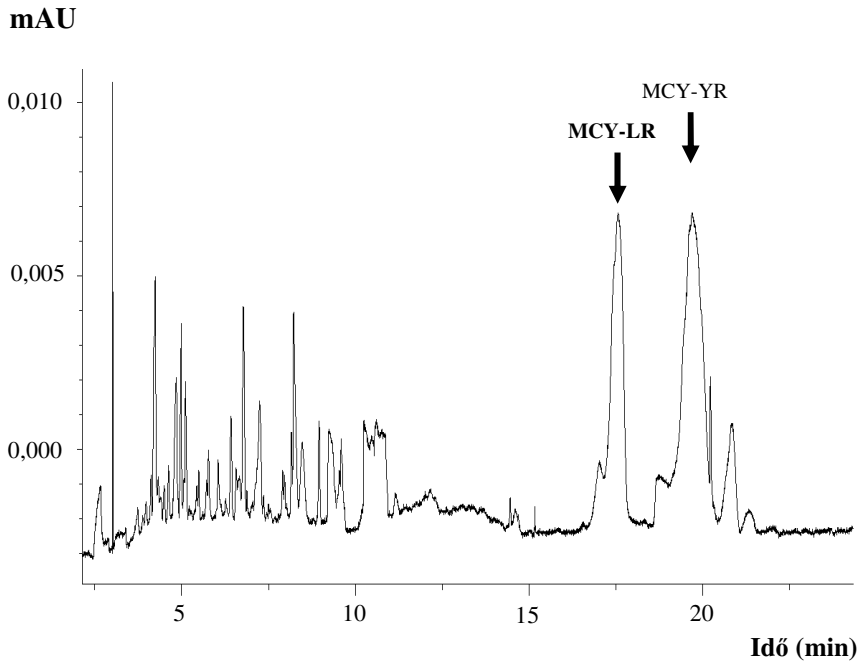
3. Anyag és módszer

3.1. *Microcystis aeruginosa* tenyésztése, a nyers toxinkivonat előállítása, a mikrocisztin-LR tisztítása

A vizsgálataink során használt *Microcystis aeruginosa* törzs az 1991. évi velencei-tavi toxikus vízvirágzásból származó izolátum (BGSD-243, Debreceni Egyetem TTK Növénytani Tanszék törzsgyűjteménye). 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 8 literes üvegedényekben sterilre szűrt, 4%-os CO_2 tartalmú, 28^{o}C-os levegővel átbuborékoltatott Allen tápoldatban történt (Allen 1968, Vasas és mtsai. 2004). A stacioner fázisban lévő tenyészeteket centrifugáltuk (Beckman Avanti J-25 centrifuga), majd az összegyűjtött sejtüledéket liofilizáltuk és felhasználásig -20^{o}C-on tároltuk. Az ismert tömegű liofilezett mintához Allen tápoldatot (Allen 1968) adtunk. A cianotoxin minél hatékonyabb feltárása érdekében többszöri ismétlésben lefagyasztottuk és 15-20 percig rázatva hagytuk felengedni, majd centrifugáltuk (13000x*g*, 10 perc). A „nyers" kivonatos kezeléseknél ezzel a MCY-LR tartalmú felülúszóval dolgoztunk (továbbiakban a megnevezése: „MCY tartalmú nyers kivonat"). Az extraktumok MCY-LR tartalmát kapilláris elektroforézis segítségével határoztuk meg (Vasas és mtsai. 2004, 3. ábra). 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 kétszer lefagyasztott sejtek extrakciója 80%-os metanollal történt. A tisztítás 16 órán keresztül, 0^{o}C-on történt. A felülúszót 10 N KOH oldattal pH 7,5-re állítottuk be. 0^{o}C-on történő, 2 óra inkubálás után a kivonatot centrifugáltuk (17400x*g*, 4^{o}C, 10 perc). Az összegyűjtött felülúszók MCY tartalmát C18-as oszlopon kötöttük meg, majd ezt követően 70%-os metanollal eluáltuk a töltetről. A Büchi vákumbepárló segítségével bepárolt eluátumot 5 mM-os, pH 7,0-es Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk fel, majd a toxin végső tisztításához DE-52 oszlopra vittük fel. Az eluált mintasorozat elemzése során a három, toxikusnak bizonyuló csúcs közül az első a MCY-LR volt. A cianotoxin tisztaságát (240 nm, ε=13.7 cm^2 mg^{-1}) HPLC és kapilláris elektroforézis módszerek segítségével ellenőriztük (Vasas és mtsai. 2002, 2004).

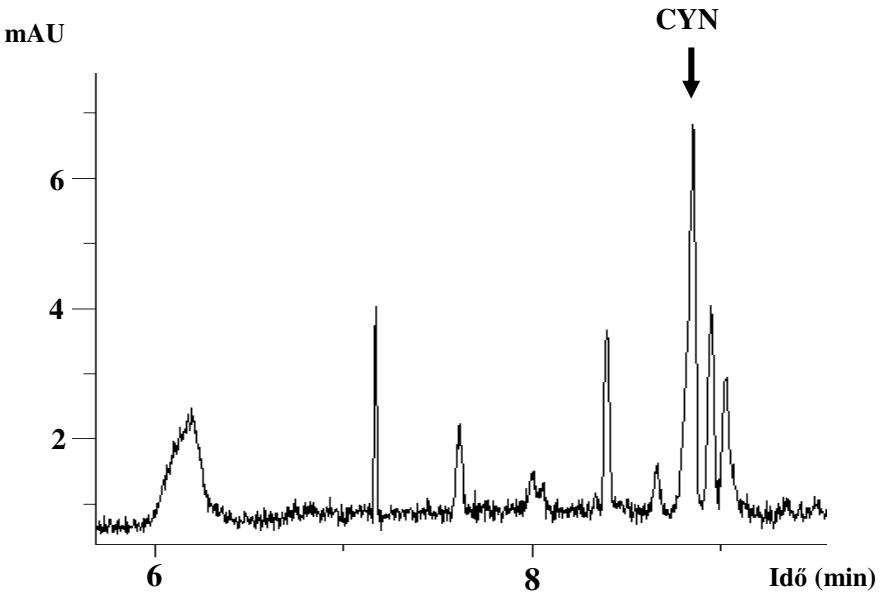


3. ábra A *Microcystis aeruginosa* sejtmentes nyers kivonatának elektroferogramja.

3.2. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyésztése, a nyers kivonat előállítása, a cilindrospermopszin tisztítása

A vizsgálataink során használt *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti, ILC-164, a DE TTK Növénytani Tanszék gyűjteményében BGSD-423) törzs az 1994. évi izraeli kinneret-tavi toxikus vízvirágzásból származó izolátum (Banker és mtsai. 1997). A vizsgálatainkhoz szükséges tenyészetek fenntartása, tenyésztése 4 literes lombikokban, állandó fényen, 28°C-on, 4%-os CO_2 tartalmú levegővel átbuborékoltatott, Allen tápoldatban történt (Allen 1968, Vasas és mtsai. 2004).

A nyers kivonatok előállítása: az exponenciális növekedési fázisban lévő 14 napos *A. ovalisporum* tenyészetet centrifugáltuk (6000x*g*, 10 percig, 4°C, Beckman Avanti J-25 centrifuga), az összegyűjtött sejtüledéket fagyasztás után liofilizáltuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A liofilizált cianobaktérium sejt tömeget Allen tápoldatban (Allen 1968) felszuszpendáltuk. A cianotoxin minél hatékonyabb feltárása érdekében többszöri ismétlésben lefagyasztottuk és 15-20 percig rázatva hagytuk felengedni, majd centrifugáltuk (13000x*g*, 10 perc) és az így kapott sejt- és törmelékmentes felülúszót használtuk a nyers kivonattal (továbbiakban a megnevezése: „CYN tartalmú nyers kivonat") történő kezelésekhez. A felülúszó CYN tartalmát kapilláris elektroforézis módszerével határoztuk meg (Vasas és mtsai. 2002, 2004; 4. ábra).



4. ábra Az *Aphanizomenon ovalisporum* sejtmentes nyers kivonatának elektroferogramja.

A tisztított CYN kinyerése: az *A. ovalisporum* tenyészetet centrifugáltuk (6000x*g*, 10 percig, 4°C, Beckman Avanti J-25 centrifuga), majd az összegyűjtött üledéket felhasználásig -20°C-on tároltuk. A felolvasztott sejtek toxintartalmának extrakciója 90%-os metanollal történt. Ebből a cianotoxin tisztítása Vasas és munkatársai által kidolgozott módszerrel történt (Vasas és mtsai. 2002, 2004).

3.3. Növénytesztek

A kísérletekhez *Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*, *Ceratophyllum demersum* és *Phragmites australis* vízinövények axenikus tenyészeteit használtuk. Növényanyagaink származási helyeit tekintve a *Lemna minor* tenyészetek. Debrecen környéki kis tavakból származnak. Növényanyagaink származási helyeit tekintve a *Wolffia arrhiza* törzstenyészetekhez a növényegyedeket a Kis-Balatonból, 2001-ben gyűjtöttük. A *Ceratophyllum demersum* növények a Debreceni Egyetem Botanikus kertjében található kis tóból származnak. A kezeléseknél használt kalluszból regenerált axenikus „mini nádnövényeket" Máthé és munkatársai (2000) által kidolgozott módszer alapján hoztuk létre. A kalluszok eredetileg Debrecen-Józsáról származó, a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékén fenntartott axenikus nádnövények nóduszaiból készültek.

A *L. minor, W. arrhiza, C. demersum* axenikus törzstenyészetek nevelése Allen tápoldatban (Allen 1968), fotoperióduson (14 óra megvilágítás és 10 óra sötét), 21°C-on, 100 µmol m^{-2} s^{-1} fényintenzitáson, 25 és 100 ml-es tenyészedényekben a DE TTK Növénytani Tanszék Növény- és Szövettenyésztő Laboratóriumában történt. A *L. minor* és *W. arrhiza* tenyészeteinek hetenkénti átoltása célszerű, illetve a tesztekhez felhasznált növények előnevelése 5-7 napig történt. A kezelésekhez alkalmazott *P. australis* növények embriogén kalluszokból regenerált „mini nádnövények" (Máthé és mtsai. 2007, 2009). A növények fenntartásához a kísérletek során használt Allen-tápoldat (Allen 1968) általánosan bevált. Az Allen tápoldatot vízinövény tenyészetek fenntartásához és vizsgálatához egyaránt alkalmazzák (Szigeti és mtsai. 2010). A nád esetében módosított MS táptalajt használtunk (Gamborg és mtsai. 1968, Murashige és Skoog 1962).

3.3.1. 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 növények kiindulási száma: 9 leveles (3x3) *L. minor*, 20 db *W. arrhiza* egyed, valamint 4 db 5 örvvel rendelkező *C. demersum* hajtások voltak. A kezelések során a növényeket 0,01-20 µg ml^{-1} tiszta cianotoxinnal ekvivalens MCY-LR, illetve CYN tartalmú sejtmentes extraktumot, vagy a tisztított MCY-LR és CYN oldatait tartalmazó Allen tápoldatba (Allen 1968) 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. A *Lemna minor* és *Wolffia arrhiz*a esetében az 5 napos kezelési idő optimálisnak bizonyult, mivel a kísérleteknél alkalmazott 3 ml-es tesztrendszerekben a növények az 5. napon „nőtték" be a tápoldat felszínét, így a növekedésük még nem lehetett gátolt. A szakirodalomban is olvashatunk 4-6 napos tesztrendszerekről (Mitrovic és mtsai. 2005, Saqrane és mtsai. 2007, Yi és mtsai. 2009). Eredményeink legalább három független kísérlet adataiból születtek. Mindegyik kísérletben koncentrációnként négyszeres ismétlésben végeztük el a kezeléseket.

A *C. demersum*-hoz hasonlóan a *P. australis* kezelése is tiszta MCY-LR-el történt. A toxinkezeléseket kémcsövekben végeztük. Egy kémcsőben egyszerre egy növényt kezeltünk. A tesztrendszer 2 ml-es volt. A kísérleteket a már Máthé és munkatársai (2007, 2009) által leírtak alapján hajtottuk végre. A MCY-LR kezeléseket 60±3,2 (SE) mm hosszú, jól fejlett hajtás- és gyökérrendszerrel rendelkező fiatal növényekkel végeztük („0 napos növények"). A cianotoxint a 2 ml folyékony módosított MS tápoldathoz adtuk (Gamborg és mtsai. 1968, Murashige és Skoog 1962), 0,5 µg ml^{-1}-től

40 µg ml^{-1}-ig terjedő toxinkoncentráció-tartományban. A cianotoxin kezelések időtartama 2-20 nap. Nukleáz enzimaktivitás vizsgálatokhoz a kezelések 5., 10. és 20. napján készítettünk kivonatokat a növényekből (az „Eredmények" fejezetben: „5 napos", „10 napos" és „20 napos nádnövények"-ként említjük a növénymintákat).

3.3.2. 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, ábrázoltuk.

3.4. Enzimaktivitás vizsgálatok

3.4.1. Növénykivonatok készítése

Az enzimaktivitások kimutatásához a kontroll és a cianotoxin (MCY-LR és CYN) kezelt növényekből 1:1 arányban (növény nedves tömege : puffer térfogata) kivonatokat készítettünk 100 mM Tris-HCl (pH 8,0; Sigma-Aldrich), 15 mM NaCl (Reanal, Budapest), 1µl ml^{-1} merkaptoethanol (ME; Sigma-Aldrich) tartalmú pufferrel (Schlereth és mtsai. 2000). A kivonatokat centrifugáltuk (2x5 perc, 13000x*g*, Biofuge), majd a felülúszókat felhasználásig kis térfogatokban, -20°C-on tároltuk. A kivonatok fehérjetartalmát Bradford (1976) módszerével az oldatok 595 nm-en mérhető fényelnyelése alapján SHIMADZU UV-1601 típusú spektrofotométeren határoztuk meg.

3.4.2. Enzimaktivitás vizsgálatok gélelektroforézissel

A proteáz és a DN-áz enzimek kimutatásának jól bevált, általános módszere a módosított Laemmli-féle poliakrilamid-gélrendszer (Laemmli 1970) alkalmazása, melynek lényege, hogy az SDS tartalmú poliakrilamid gélekbe megfelelő enzim szubsztrátot polimerizálunk, majd a géleket, a futtatás és a megfelelő mosási lépések után, az enzimek működéséhez optimalizált körülmények között (puffer, pH, hőmérséklet, időtartam) inkubáljuk. A poliakrilamid aktivitásgéleken a szubsztráthoz kötődő festékekkel, a negatív

festés elve alapján tehetjük láthatóvá a szubsztrátot hasító fehérjék sávjait (Laemmli 1970, Schlereth és mtsai. 2000, M-Hamvas és mtsai. 2003). Ez a módszer lehetővé teszi a különböző fajokra jellemző enzimmintázatok (zimogramok) összehasonlítását.

3.4.2.1. A proteáz enzimek aktivitásának vizsgálata egydimenziós poliakrilamid-gélelektroforézissel

A vízinövények proteáz enzimeinek kimutatásához szubsztrátként (0,04% tömeg/térfogat) zselatint tartalmazó 10%-os poliakrilamid aktivitás géleket (13x10x0,15 cm) alkalmaztunk (Schlereth és mtsai. 2000). A zselatin a legáltalánosabban alkalmazott szubsztrát, mert a szerin-, cisztein-, metallo-, aszpartát proteázok is képesek hasítani (Schlereth és mtsai. 2000, Szilágyi és mtsai. 2011). A felülrétegző gél mintahelyeire egyenlő fehérjetartalmú mintamennyiségeket vittünk fel, melyekhez 2% SDS-t tartalmazó mintapuffert (Laemmli 1970) adtunk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat nem forraltuk. A mintákkal párhuzamosan a molekulatömeg meghatározásokhoz markert is futtattunk (Sigma-Aldrich).

Proteáz gél esetében az elektroforézis 20 mA/gél erősségű egyenárammal, 4°C-on, sötétben történt. Az elektroforézist követően a géleket steril desztillált vízzel (5 perc), majd pufferekkel mostuk. A lúgos proteázok kimutatásához pH 8,0-as 100 mM Tris-HCl-oldatot (Sigma-Aldrich), savas proteázok kimutatásához pH 5,0-ös nátrium-foszfát puffer oldatot (Reanal, Budapest) használtunk. Az első lépésben 20 percig pufferrel, majd ezt követően az SDS eltávolításához 20%-os izopropanolt tartalmazó pufferrel mostuk a géleket (2x10 perc). Ezt 20 percig tartó, puffer oldattal történő ismételt mosás követte. Éjszakára a géleket 5 mM merkaptoetanolt (ME, Sigma-Aldrich) tartalmazó pufferben, hidegszobában (4°C-on) előinkubáltuk, (a ME védi az –SH csoportokat és elősegíti az enzimek működését). Az inkubálás 5 mM ME-t tartalmazó pufferben, 6 órán át, sötétben, 37 ^{o}C-on történt.

A géleken az enzimaktivitással rendelkező fehérjék sávjait ún. negatív festéssel tettük láthatóvá, a proteáz gélek esetében Coomassie Brilliant Blue R250 oldatot (Schlereth és mtsai. 2000) alkalmazva.

Elővizsgálataink alapján a *Lemna* és *Wolffia* esetében is azt tapasztaltuk, hogy érdemes mind a savas, mind a lúgos tartományban vizsgálni a proteáz mintázatokat. Schlereth és munkatársai (2000) tapasztalatait követtük az 5 mM 2-merkaptoetanol inkubáló pufferhez történő hozzáadásában is, ami valóban kedvező hatással volt a növényi proteázok működésére. Kísérletet tettünk a proteázok bizonyos mértékű karakterizálására, ehhez különböző proteáz inhibítorokat, illetve fémionokat adagoltunk az inkubáló pufferekbe

[20 mM EDTA, 4 mM PMSF, 1 mM Zn^{2+} ($ZnCl_2$ formájában) és 1 mM Ca^{2+} ($CaCl_2$ formájában)].

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

Az egyfonalú DNS-t hasító fehérjék kimutatása (végcc. 15-17 µg ml^{-1}) egyfonalú csirke vér DNS-t tartalmazó géleken (13x10x0,15 cm) történt (Laemmli 1970, M-Hamvas és mtsai. 2003). Az egyfonalú DNS előállítása csirke vér DNS denaturálásával történt (10 perc forralás után hirtelen, jégben történő lehűtés). Duplaszálú DNS-t hasító képességgel rendelkező fehérjék aktivitásának kimutatásához ezzel ellentétben a szeparáló gélbe forralás nélküli csirke vér DNS-t polimerizáltunk. A felülrétegző gél mintahelyeire egyenlő fehérjetartalmú mintamennyiségeket vittünk fel, melyekhez 2% SDS-t tartalmazó mintapuffert adtunk, ezt követően 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat nem forraltuk. A mintákkal párhuzamosan a relatív molekulatömeg meghatározásokhoz markert is futtattunk (Sigma-Aldrich).

A DN-áz gélek esetében az elektroforézis 20-25 mA/gél áramerősségű egyenárammal, 4°C-on történt. Az elektroforézist követően a géleket steril desztillált vízzel (5 perc), 10 mM pH 6,8-as Tris-HCl pufferrel (30 perc), 20%-os izopropanolt tartalmazó 10 mM pH 6,8-as Tris-HCl pufferrel (2x10 perc) és újra 10 mM pH 6,8-as Tris-HCl pufferrel történő mosásnak (20 perc) vetettük alá, amelyek az SDS eltávolításával az enzimek renaturálását szolgálta. A fehérjék renaturálódását segítette elő, ha a géleket egy éjszakán át 4°C-on tartottuk. A géleket ezt követően friss pufferbe, 39°C-on, 24-72 órán át inkubáltuk.

A DN-áz géleknél ethídium-bromidos (Sigma-Aldrich) festést (Gersten és Gabriel 1992) alkalmazva 254 nm hullámhosszú UV fénnyel tettük láthatóvá az egy- és kettős szálú DNS-t (narancsvörös fluoreszcencia), míg a DNS-t emésztő enzimek sávjai sötétek maradtak, nem fluoreszkáltak, amit fekete háttéren jól lehet detektálni.

3.4.2.3. A poliakrilamid gélek kiértékelése

Az SDS tartalmú poliakrilamid-gélelektroforézis tájékoztat a molekulák egymáshoz viszonyított relatív moltömegéről is. Ahhoz, hogy meghatározzuk az izoenzimek molekulatömegét, az enzim tartalmú mintákkal párhuzamosan molekulatömeg fehérje markereket is futtattunk (Sigma-Aldrich). A molekulatömeg markert tartalmazó gélcsíkokat közvetlenül a gélek elektroforézise után levágtuk, és azonnal festettük Coomassie Blue R250 oldattal, mert a mosási és inkubálási idő alatt a molekulatömeg marker

fehérjék nagy része degradálódott volna. A géleken a az enzimsávok („band”-ek) relatív molekulatömegüknek a meghatározása az UVI-TEC® program, míg az intenzitásuk a CpAtlas® program segítségével történt.

Legalább három, egymástól független kísérlet géljeit elemeztük. Az eredményeket a Sigma Plot 11.0 program statisztikai és grafikai alkalmazásával értékeltük és ábrázoltuk.

4. Az eredmények és megvitatásuk

A cianobakteriális toxinok és a növények interakciója a természetben megvalósuló jelenség. A különböző cianobaktérium izolátumokból tisztított cianotoxinok növényekre gyakorolt hatásainak elemzése a kultúrnövény fajok vizsgálatával kezdődött, elsősorban a toxinok hatásmechanizmusának feltárását célozva (Kós és mtsai 1995). Ez a tendencia érthető, hiszen ezekről a növényekről sok fiziológiai, biokémiai és molekuláris adat állt rendelkezésre.

A toxikus cianobakteriális vízvirágzások mind gyakoribb megjelenése hívta fel a figyelmet a természetben lejátszódó folyamat modellezésének fontosságára; a vízinövények bevonását a kísérletekbe, valamint a tisztított cianotoxinok mellett a nyers cianobakteriális extraktumok alkalmazását.

A különböző vízinövény fajokkal végzett kísérleteinkkel a cianotoxinok (MCY-LR és CYN) hatásmechanizmusának jobb megértése volt a célunk, bízva abban, hogy eredményeink hozzájárulnak az *in situ* cianotoxin – vízi makrofita kapcsolatok megértéséhez is.

4.1. A mikrocisztin-LR hatásai a vizsgált kísérleti növényekre

A MCY-LR okozta növekedésgátlás értékeléséhez több paramétert mértünk. Vizsgáltuk a kezelt növények nedvestömeg, hajtásszám, hajtáshossz, örvszám és pigmenttartalom változásait. A pigmenttartalom változásra vonatkozó adatok eredményei leginkább a *Wolffia arrhiza* esetében voltak informatívak.

Kísérleteink során vizsgáltuk a stresszválaszokban kulcsfontosságú enzimek (proteázok, DN-ázok) működésének optimális körülményeit (pH optimum, inkubálási idő, hőmérséklet stb.), valamint a MCY-LR-el történő kezeléseket követően aktivitásuk, izoenzim-mintázatuk változásait.

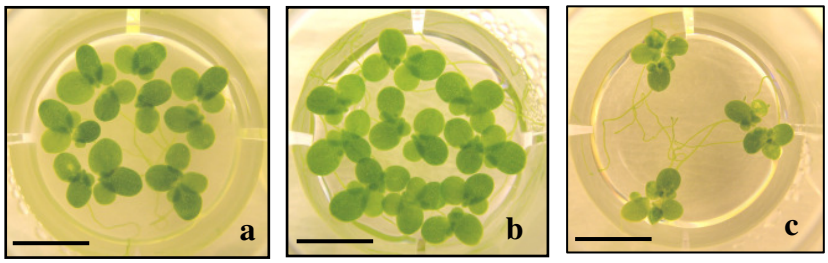
4.1.1. A mikrocisztin-LR hatása a *Lemnaceae* családba tartozó fajok tenyészeteire

A *Lemnaceae* család tagjai, mint a parti régióban jellegzetes lebegő hínárnövények gyakran használt tesztnövényei a MCY hatásvizsgálatoknak.

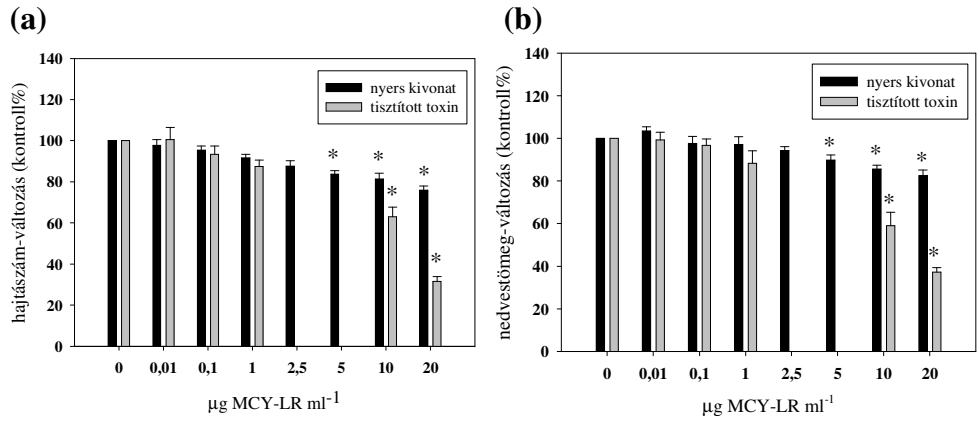
A *Lemna minor*, *Lemna gibba, Spirodela oligorrhiza*, *Wolffia arrhiza* növényekkel végzett korábbi, elsősorban rövid-távú kísérletek tapasztalatait mi is felhasználtuk kísérleteink összeállításánál, eredményeink értékelésénél.

4.1.1.1. A növekedésvizsgálatok eredményei

A MCY-LR hatását a *Lemna minor* és *Wolffia arrhiza* tenyészetekben 0,01-20 µg ml^{-1} koncentrációtartományban vizsgáltuk. A növekedési paramétereket a kezelés 5. napján értékeltük. A kísérletek eredményeit összesítve a MCY-LR növekedésgátló hatását tapasztaltuk (5.-8. ábrák).



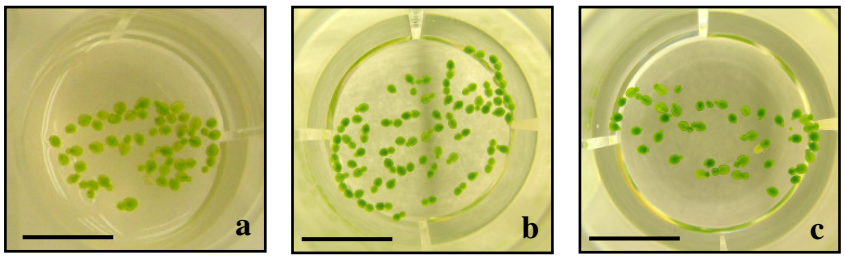
5. ábra Mikrocisztin-LR hatása a *Lemna minor* növekedésére a kezelés 5. napján.
(a) 20 µg ml^{-1} MCY-LR tartalmú nyers kivonattal kezelt növények, ***(b)*** kontroll növények, ***(c)*** tisztított MCY-LR-el (20 µg ml^{-1}) kezelt növények. Lépték: 1 cm



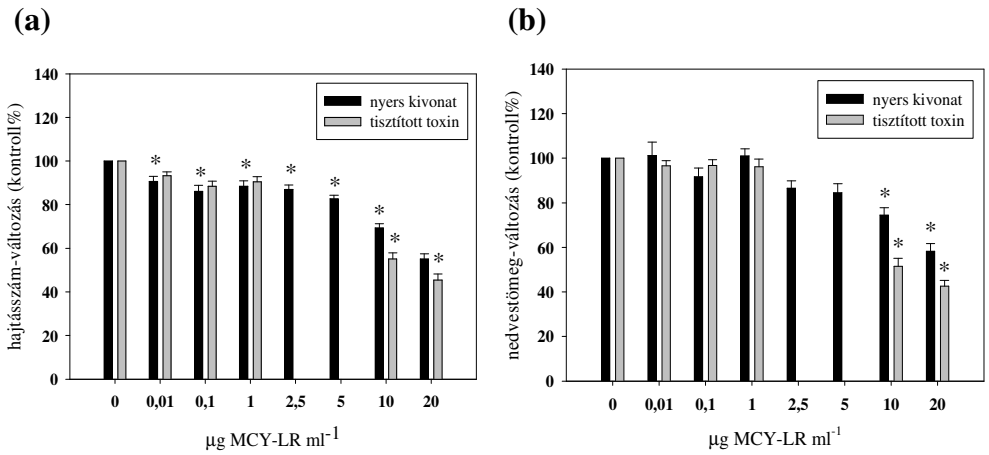
6. ábra MCY-LR kezelések hatásai a *Lemna minor* hajtásszám- *(a)* és nedvestömeg-változására *(b)* a kezelés 5. napján.
Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

A kontroll ***Lemna minor*** egyedeinek száma az átoltást követő 2. napon kezd növekedett, és a 4. napra kétszereződött meg. A *L. minor* tenyészetekben a kezelések során alkalmazott MCY tartalmú nyers kivonatok 5-20 µg ml^{-1} MCY-LR-el ekvivalens koncentráció-tartományban, a tisztított MCY-LR 10-20 µg ml^{-1} koncentráció-tartományban fejtett ki szignifikáns növekedésgátlást (5. és 6. ábrák). A szignifikáns gátlás mind a hajtásszám-, mind a nedvestömeg értékekkel jól jellemezhető (6. a, b ábrák), és a két paraméter változása azonos tendenciákat mutat.

A ***Wolffia arrhiza*** kontroll tenyészetek növekedése gyors, egyedszámuk már a 2. napon megkétszereződött. A *W. arrhiza* tenyészetek növekedésében is szignifikáns eltéréseket mértünk a 0,01-20 µg ml^{-1} koncentrációtartományban alkalmazott MCY-LR kezelések hatására (7. és 8. ábrák). A MCY tartalmú nyers kivonat a hajtásszámban (darabszám) már 0,01 µg ml^{-1} koncentrációnál szignifikáns csökkenést okozott (8. a ábra), míg a nedves tömeg kevésbé érzékeny paraméternek bizonyult (8. b ábra), csak 10 µg ml^{-1} koncentrációnál mértünk szignifikáns csökkenést.



7. ábra Mikrocisztin-LR hatása a *Wolffia arrhiza* növekedésére a kezelés 5. napján.
(a) 20 µg ml^{-1} MCY-LR tartalmú nyers kivonattal kezelt növények, ***(b)*** kontroll növények, ***(c)*** tisztított MCY-LR-el (20 µg ml^{-1}) kezelt növények. Lépték: 1 cm

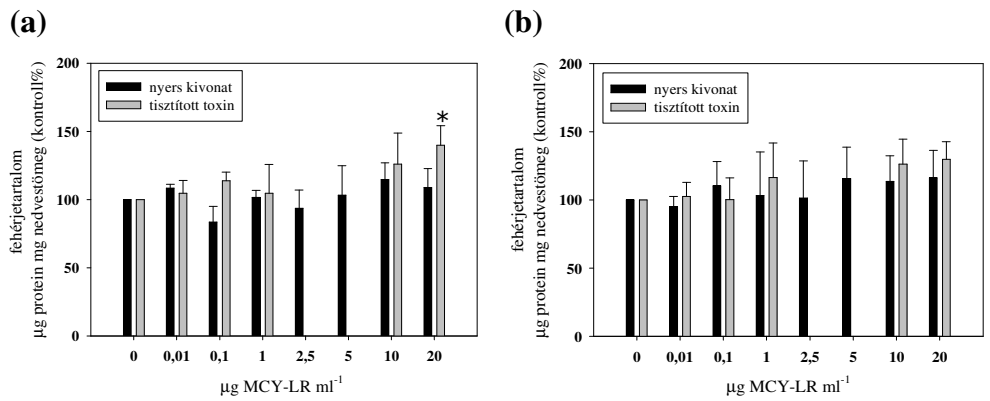


8. ábra MCY-LR kezelések hatásai a *Wolffia arrhiza* hajtásszám- *(a)* és nedvestömeg-változásaira *(b)* a kezelések 5. napján.
Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

Tisztított MCY-LR-el történő kezelésnél 0,01-1 µg ml^{-1} MCY-LR koncentráció tartományban sem a hajtásszámban, sem a nedvestömegben nem mértünk szignifikáns csökkenést, csak az ennél magasabb toxinkoncentráció okozott szignifikáns növekedés gátlást (8. a, b ábrák).

A növekedési paraméterek alapján a két lebegő hínárnövény faj közül tehát a *Wolffia arrhiza* mutatkozott érzékenyebbnek a MCY-LR-el szemben. A *M. aeruginosa* toxintartalmú kivonata nagyságrendekkel kisebb koncentrációban (0,01 µg ml^{-1} MCY-LR-el ekvivalens toxinkoncentráció) indukált szignifikáns hajtásszám csökkenést, mint a tisztított MCY-LR (10 µg ml^{-1}). Azonban mindkét faj esetében igaz, hogy 10-20 µg ml^{-1} koncentrációtartományban a tiszta toxin okozott nagyobb mértékű növekedésgátlást. Ez magyarázható azzal, hogy a nyers cianobaktérium kivonatok a MCY-LR mellett egyéb MCY izoformákat, toxikus és hatásában még tisztázatlan anyagcseretermékeket, sejtfalanyagokat is tartalmaznak, amelyek hozzájárulhatnak a MCY-LR hatásához (Welker és von Döhren 2006).

4.1.1.2. A mikrocisztin-LR kezelések hatása a vízinövények fehérjetartalmára



9. ábra MCY-LR kezelések hatásai a *Lemna minor (a)* és a *Wolffia arrhiza (b)* fehérjetartalom-változásaira a kezelés 5. napján.
Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

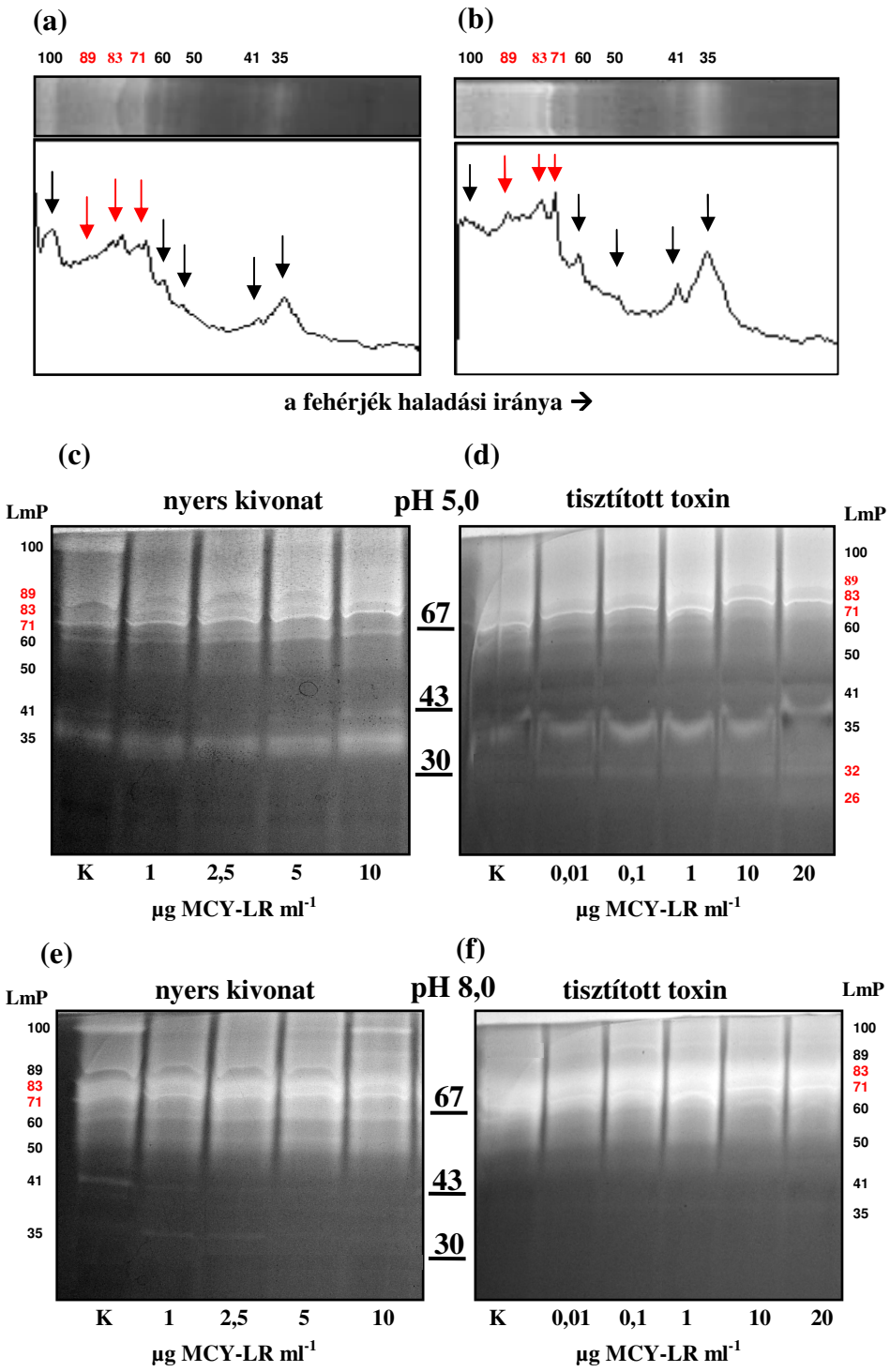
Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a toxinnal kezelt vízinövények egységnyi nedvestömegre vonatkoztatott fehérjetartalma a MCY-LR koncentrációk függvényében (0,01-20 µg ml^{-1}) enyhén növekvő tendenciát mutat (9. a, b ábrák). Szignifikáns változást a *L. minor* tisztított MCY-LR-el (20 µg ml^{-1}) történő kezelésekor detektáltunk (9. a ábra).

4.1.1.3. A mikrocisztin-LR hatása a proteáz enzimek aktivitására

A MCY-LR kezelések a növekedésbeni eltérések mellett sejtszintű biokémiai változásokat is indukálnak, amit a szubsztrátként zselatint tartalmazó poliakrilamid aktivitás géleken detektálható proteáz izoenzim mintázat változások is bizonyítanak (10. és 12. ábrák).
A tisztított MCY-LR, valamint a MCY-LR tartalmú nyers kivonatok *L. minor* és *W. arrhiza* proteáz izoenzimek aktivitására kifejtett hatása egymással jól összevethető eredményeket adott (10. és 12. ábrák). Kontroll és MCY-LR kezelt *Lemna minor* növények fehérjekivonataiban 10 zselatinbontó aktivitású proteáz detektálható, amelyek molekulatömege a 100-26 kDa tartományba esik (10. ábra, 2. táblázat: LmP100-LmP26 jelölésű fehérjék). A *Wolffia arrhiza* növénykivonatokban is összesen 10 zselatinbontó proteázt mutattunk ki (12. ábra, 3. táblázat: WaP100-WaP36 jelöléssel).

A ***Lemna minor*** esetében négy nagy molekulatömegű (≥74 kDa) proteáz mind a savas (pH 5,0), mind a bázikus (pH 8,0) pufferben inkubált géleken megjelent (10. a ábra: LmP100, LmP89, LmP83, LmP71).
Az LmP100 jelölésű savas proteáz aktivitása, 0,1 és 1 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR-el történő kezelések hatására kismértékű emelkedést mutatott, míg a nyers extraktummal történő kezelés nem befolyásolta az aktivitását. A MCY-LR-el történő kezelések hatására az LmP89, LmP83, LmP71 enzimek aktivitásában mind a savas, mind a bázikus pH-n inkubált géleknél növekedést detektáltunk (10. a, b, c, d, e, f ábrák; 2. táblázat). Aktivitásuk legnagyobb mértékű emelkedése a 0,1 és az 1 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR kezelt növények kivonataiban detektálható (10. b, d, f, ábrák; 2. táblázat).

A savas pH-n inkubált géleken az LmP60 enzim aktivitásában a tisztított toxinnal történő kezelés hatására enyhe csökkenést figyelhettünk meg, míg a nyers kivonat aktivitásemelkedést indukált. Bázikus pH-n az LmP60 enzim aktivitása a kontrollhoz viszonyítva nem változott. A savas körülmények között inkubált géleken az LmP50 enzim aktivitása nyers kivonattal történő kezelés során enyhe növekedést mutatott, míg tisztított toxinnal kezelt növényekben az aktivitása a kontrollhoz viszonyítva nem változott. Nem detektáltunk aktivitásváltozást a bázikus pH-n sem (10. c, d, e, f ábrák; 2. táblázat).



10. ábra MCY-LR kezelés hatása a *Lemna minor* proteáz enzimeinek mintázatára a kezelés 5. napján (pH 5,0 és pH 8,0).

(a) a kontroll minták; ***(b)*** a *M. aeruginosa* 10 µg ml^{-1} MCY-LR tartalmú extraktumával kezelt növények karakterisztikus sávjai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitás gélen (pH 5,0); ***(c, d, e, f)*** a kontroll és a MCY-LR kezelt növények zselatin zimogramjai (a római számok a detektált izoenzimeket, az arab számok a kísérletekben alkalmazott cianotoxin koncentrációkat jelölik, µg ml^{-1}). Egy kísérlet reprezentatív gélje.

2. Táblázat A *Microcystis aeruginosa* nyers (MCY-LR tartalmú) kivonatok és a tisztított MCY-LR hatása a *Lemna minor* proteáz enzim-mintázatára.

izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 5,0			pH 8,0		
		nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt	nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt
LmP100	**100±3**	NV	**++**	↑ [0,1-1]	NV	**+**	NV
LmP89	**87±2**	↑	**+**	↑ [0,1-1]	NV	**++**	↑
LmP83	**83±1**	↑	**++**	↑ [0,1-1]	↑	**++**	↑ [0,1-1]
LmP71	**71±2**	↑	**++**	↑ [0,1-1]	↑	**+**	↑ [0,1-1]
LmP60	**60±2**	↑	**+**	↓	NV	**++**	NV
LmP50	**50±3**	↑	**+**	NV	NV	**++**	NV
LmP41	**41±3**	↑	**++**	NV	↓	**+**	NV
LmP35	**35±2**	↑	**++**	NV	↓	**+**	NV
LmP32	**30±2**	**-**	**-**	↑	**-**	**-**	**-**
LmP26	**26±1**	**-**	**-**	↑	**-**	**-**	**-**

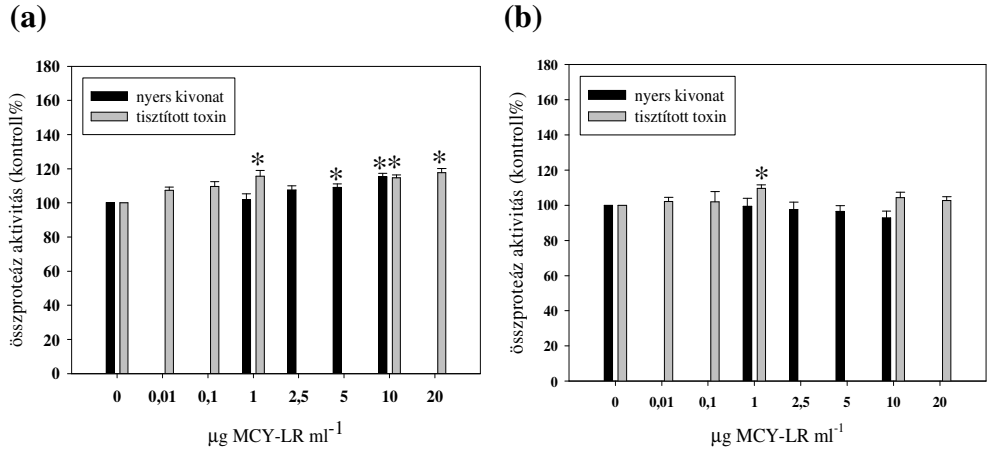
+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ MCY-LR okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-10 µg ml^{-1} és 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; ↓ MCY-LR okozta csökkenés az izoenzim aktivitásban 0,01-10 µg ml^{-1} és 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [0,1-1] a növekedés vagy csökkenés jellegzetes 0,1-1 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

Az 50 kDa alatti molekulatömegű enzimek közül az LmP41 és LmP35 enzimek mutattak magas aktivitást, savas pH optimummal. A tisztított MCY-LR nem befolyásolta aktivitásukat. A MCY tartalmú nyers cianobaktérium kivonat ezzel szemben a számukra optimális savas tartományban fokozta aktivitásukat, míg a lúgos tartományban tovább csökkentette azt.

A tisztított toxinnal történő kezelés 0,01-20 µg ml^{-1} koncentrációknál, két új savas proteáz (LmP32, LmP26) megjelenését indukálta, amelyek aktivitása a kezelés során alkalmazott MCY-LR koncentrációjával arányos emelkedést mutatott (10. d ábra, 2. táblázat).

Ezeknek az enzimeknek az aktivitását bázikus pH-n inkubált géleken nem detektáltuk (10. e, f ábrák; 2. táblázat).

A gélek kiértékelése során mért enzimaktivitás adatokból számolt ún. összproteáz aktivitások tulajdonképpen az egyes izoenzimek aktivitásának eredőjeként értékelhetők. Ezek a savas pH-n inkubált géleken voltak magasabb értékek, elsősorban az 50 kDa alatti molekulatömegű proteázoknak köszönhetően. A kontroll százalékában megadva az összproteáz aktivitások szignifikáns változásokat mutattak (11. ábra). Ez alátámasztja a gélképeken látottakat (10. c, d, e, f ábrák). A MCY-LR tartalmú nyers kivonat a *L. minor* savas proteázainak összaktivitásában, 5 és 10 μg ml^{-1} MCY-LR ekvivalens koncentrációknál indukált szignifikáns növekedést (11. a és 10. c ábrák). Ezzel szemben a bázikus proteázok összaktivitásában enyhe csökkenést tapasztaltunk (11. b és 10. e ábrák). A tisztított MCY-LR mind a savas, mind a bázikus proteázok összaktivitásában enyhe emelkedést indukált (11. a, b és 10. d, f ábrák). Szignifikáns változást ≥1 μg ml^{-1} (pH 5,0), valamint 1 μg ml^{-1} (pH 8,0) koncentrációknál detektáltunk (11. a és b ábrák).

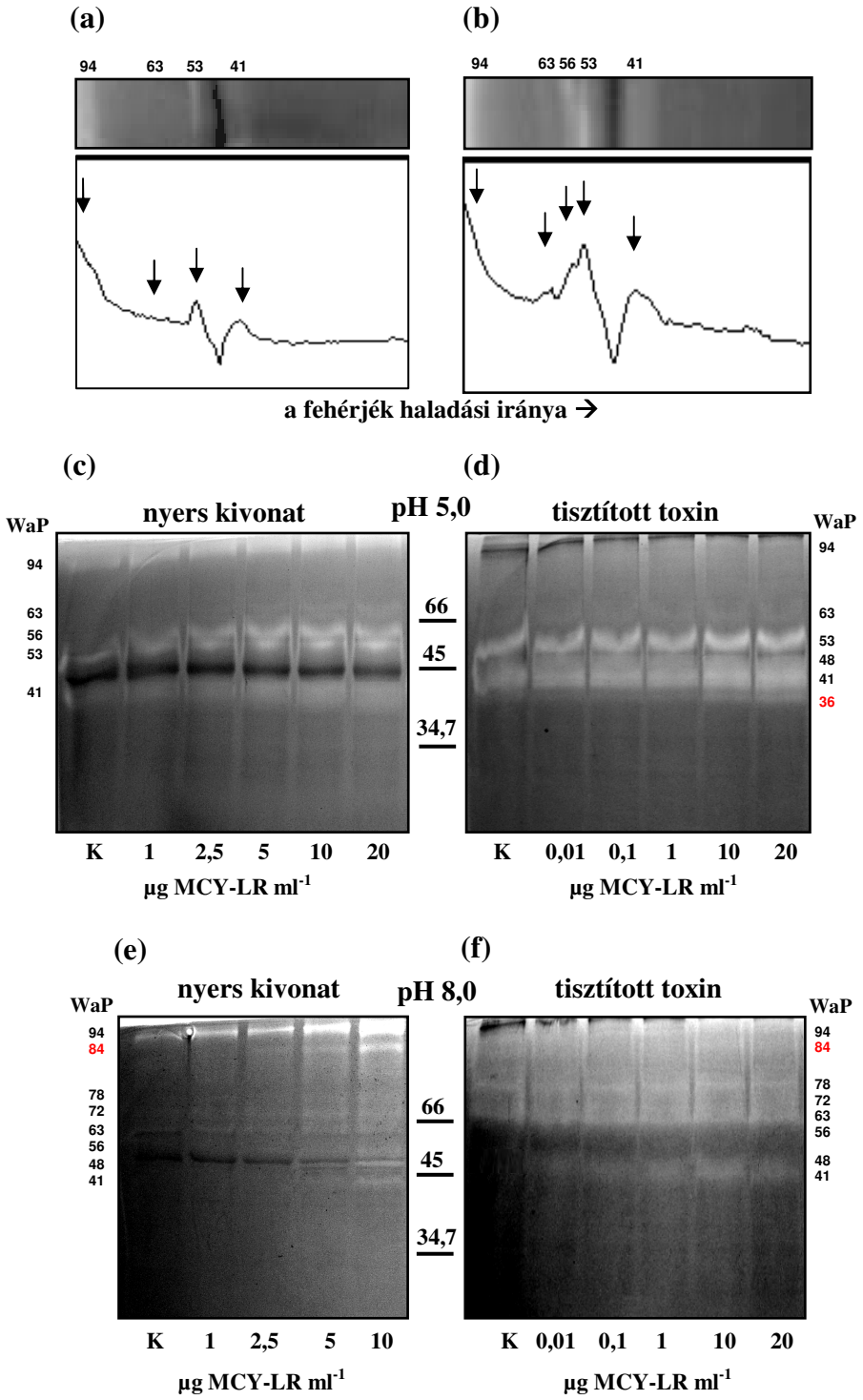


11. ábra MCY-LR kezelések hatása a *Lemna minor* összproteáz aktivitására.
(a) pH 5,0-ön, ***(b)*** pH 8,0-on mért összproteáz aktivitások. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

A ***Wolffia arrhiza*** esetében a mikrocisztin-LR kezelések által előidézett zselatinbontó enzimaktivitás változásokat a 12. a-f ábrák mutatják. A kiértékelt gélek eredményeit a 3. táblázat tartalmazza.
A kontroll növények mintáiban összesen négy savas proteáz (WaP94, WaP63, WaP53, WaP41), és hat bázikus proteáz (WaP94, WaP78, WaP72, WaP63, WaP56, WaP48) aktivitását detektáltuk. Ezek közül egyetlen enzim mutatható ki csak bázikus körülmények között (WaP72).

A savas pH-n inkubált gélek esetében egy (WaP94), bázikus pH-n két (WaP94 és WaP78) 75 kDa feletti molekulatömegű izoenzim jelent meg a kontroll növényekben (3. táblázat). A savas pufferben inkubált géleken, a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal kezelt növények kivonataiban a kontrollhoz viszonyítva a WaP94 izoenzim aktivitása a toxinkoncentráció emelkedésével arányosan nőtt (12. c ábra). A tisztított MCY-LR-el kezelt növényekben a WaP94 izoenzim aktivitása a kontrollhoz képest nem változott (12. d ábra). Bázikus pH-n inkubált géleken a kontrollban a WaP94 mellett egy WaP78 izoenzim is magas aktivitást mutatott. Ezek aktivitása a nyers extraktummal való kezelést követően nőtt (WaP94) illetve nem változott (WaP78), a tisztított MCY-LR kezelés aktivitásukat nem módosította. **A MCY kezelés egy új, emelkedő aktivitású bázikus izoenzim (WaP84) megjelenését is indukálta** (12. e, f ábra; 3. táblázat). Az, hogy a WaP84 izoenzim mind a tisztított, mind a nyers MCY-LR kezelt növények kivonataiból kimutatható, azt a következtetést vonja maga után, hogy az enzim megjelenését a MCY-LR indukálja (12. e, f ábra; 3. táblázat).

A 47-70 kDa molekulatömeg közé eső proteázok aktivitása pH és kezelés függő. A bázikus pH-n működő WaP72 jelzésű izoenzim aktivitása nyers kivonattal történő kezelést követően nő, míg tisztított toxinnál az enzim aktivitása a kontrollhoz képest nem változik (12. e, f ábrák; 3. táblázat). Savas inkubáló pufferben, a kontrollban is megjelenő WaP63 és WaP53 izoenzimek aktivitása mind a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal, mind a tisztított toxinnal történő kezelést követően emelkedett. Ezzel ellentétben bázikus körülmények között a WaP63 aktivitása a MCY-LR kezelések hatására a kontrollhoz viszonyítva nem változott, a WaP53 enzim pedig nem detektálható (12. c, d, e, f ábrák; 3. táblázat). A WaP56 és WaP48 enzimeket mindkét pH-n detektáltuk, azonban aktivitásuk eltéréseket mutatott. A WaP56 enzimet savas pH-n a kontrollban és a tisztított MCY-LR toxinnal kezelt növények esetében nem detektáltuk, csak a nyers extraktummal történő kezelésnél jelent meg az enzim a növényi kivonatokban, és aktivitása a kezelésekhez alkalmazott toxin koncentráció függvényében nőtt. Ugyanezt az enzimet bázikus körülmények között mind a kontroll, mind a kezelt növények esetében detektáltuk, változatlan aktivitással.



12. ábra MCY-LR kezelés által okozott proteáz mintázatok- és aktivitás változások a *Wolffia arrhiza* fehérje kivonataiban a kezelés 5. napján (pH 5,0 és pH 8,0).

(a) a kontroll minták; ***(b)*** a *M. aeruginosa* 20 µg ml^{-1} MCY-LR tartalmú extraktumával kezelt növények karakterisztikus sávjai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitás gélen (pH 5,0); ***(c, d, e, f)*** a kontroll és a MCY-LR kezelt növények zselatin zimogramjai (a római számok a detektált izoenzimeket, az arab számok a kísérletekben alkalmazott cianotoxin koncentrációkat jelölik, µg ml^{-1}). Egy reprezentatív kísérlet gélje.

3. Táblázat *Microcystis aeruginosa* nyers (MCY-LR tartalmú) kivonatok és a tisztított MCY-LR hatása a *Wolffia arrhiza* proteáz enzim-mintázatára.

izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 5,0			pH 8,0		
		nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt	nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt
WaP94	94±4	↑	+	NV	↑	++	NV
WaP84	84±3	-	-	-	↑	-	↑
WaP78	78±2	-	-	-	NV	++	NV
WaP72	72±3	-	-	-	↑	+	NV
WaP63	63±3	↑	++	↑	NV	+	NV
WaP56	56±4	↑	-	-	NV	++	NV
WaP53	53±2	↑	+	↑	-	-	-
WaP48	48±2	-	-	↑	↑	++	NV
WaP41	41±1	↑	+	↑	↑	-	↑
WaP36	36±1	-	-	↑	-	-	-

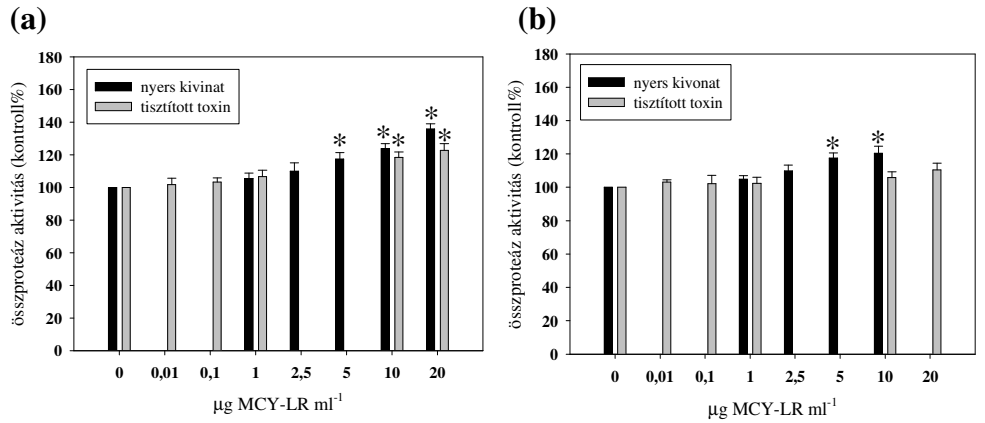
+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ MCY-LR okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-10 µg ml^{-1} és 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; ↓ MCY-LR okozta csökkenés az enzim aktivitásban 0,01-10 µg ml^{-1} és 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

A WaP48 enzim savas pH-n kontroll és nyers kivonattal kezelt növényeknél nem jelent meg, tisztított toxinos kezelés hatására 1 µg ml^{-1} koncentrációtól enyhe aktivitás-emelkedést mutatott. A WaP48 enzim aktivitása lúgos pH-n magas, nyers kivonattal kezelt növényekben pedig még magasabb érték (↑) (12. c, d, e, f ábrák; 3. táblázat).

A <44 kDa molekulatömegű enzimek aktivitását is befolyásolták a pH és a MCY-LR kezelések. A WaP41 proteáz savas pH-n a kontrollban megjelenik, a MCY-LR kezelések hatására aktivitása nő. A bázikus pufferben inkubált géleken az enzim aktivitása kezelés hatására emelkedő tendenciát mutatott, amíg a kontroll növényekben zselatinbontó enzim aktivitása nem detektálható.

A WaP36 izoenzim savas proteáz, melynek megjelenését a *W. arrhiza*-ban a tisztított toxinnal történő kezelések indukálták. A

toxinkoncentráció növelésével a géleken emelkedő aktivitással detektálható (12. c, d, e, f ábrák; 3. táblázat).



13. ábra MCY-LR kezelések hatása a *Wolffia arrhiza* összproteáz aktivitására.
(a) pH 5,0-ön, ***(b)*** pH 8,0-on mért összproteáz aktivitások. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

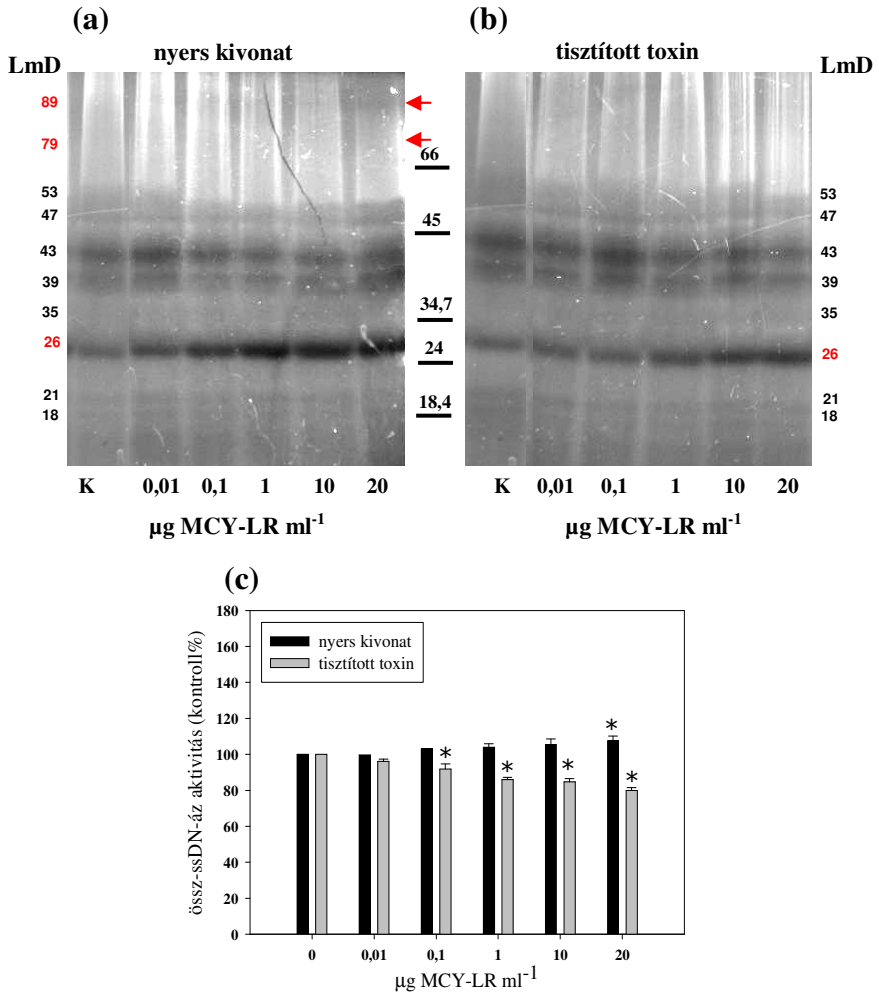
A *W. arrhiza* esetében a savas proteázok összaktivitása emelkedő tendenciát mutatott mind a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal, mind a tisztított MCY-LR-el történő kezelés hatására (13. a ábra). Nyers kivonattal kezelt növényekben 5-10 µg ml^{-1}, tisztított MCY-LR-el kezeltekben 10-20 µg ml^{-1} cianotoxin koncentrációknál mérhető szignifikáns változás (13. a ábra). A bázikus proteázok összaktivitása nyers extraktummal történő kezelés hatására emelkedő tendenciát mutatott, 5-10 µg ml^{-1} cianotoxin koncentrációknál szignifikáns eltéréssel (13. b ábra), míg a tisztított toxinnal végzett kezelés csak 10 és 20 µg ml^{-1} koncentrációknál okozott enyhe, de nem szignifikáns növekedést (13. b ábra).

A proteáz enzimek MCY okozta változásairól összességében elmondható, hogy a MCY kezelt *Lemnaceae* fajokban elsősorban a savas proteázok aktivitásának az emelkedése detektálható. A MCY-LR tartalmú nyers kivonat több enzim működésében indukált változást (elsősorban emelkedést), mint a tisztított toxinnal történő kezelés. A két faj közül a *W. arrhiza* kivonataiban detektáltunk nagyobb összenzimaktivitás emelkedést. A MCY-LR kezelés mindkét fajban indukálta új izoenzimek megjelenését (2. és 3. táblázatok: LmP32, LmP26 és WaP84 jelű proteázok).

4.1.1.4. A mikrocisztin-LR hatása az ssDN-áz enzimek aktivitására

A *Lemna minor* és *Wolffia arrhiza* kontroll növénykivonatokból kimutatható egyfonalú DNS-t hasító nukleázok száma *L. minor* esetében 8-10 (LmD89-LmD18), *W. arrhiza* esetében pedig egy (WaD38), amelyek molekulatömegeit a 4. táblázat tartalmazza.

A ***Lemna minor***-nál mind a MCY-LR tartalmú nyers kivonattal, mind a tisztított MCY-LR-el történt kezelések változásokat indukáltak az ssDN-ázok aktivitásában. Az enzimek specifikus aktivitásában a kezelések hatására növekvő és csökkenő tendenciák egyaránt jellemzőek voltak (14. a, b ábrák és 4. táblázat).



14. ábra MCY-LR kezelés hatása a *Lemna minor* ssDN-áz aktivitás mintázatára a kezelés 5. napján (pH 6,8).
(a) a *M. aeruginosa* MCY-LR tartalmú extraktumaival kezelt növények; ***(b)*** tisztított MCY-LR-el kezelt növények enzimmintázata; ***(c)*** a cianotoxin kezelések hatása a *Wolffia arrhiza*

ssDN-áz enzimeinek az összaktivitására (pH 6,8). Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. *$p<0,05$. Egy kísérlet reprezentatív gélje.

4. Táblázat *Microcystis aeruginosa* nyers (MCY-LR tartalmú) kivonatok és a tisztított MCY-LR hatásai a *Lemna minora* ssDN-áz enzim-mintázatára.

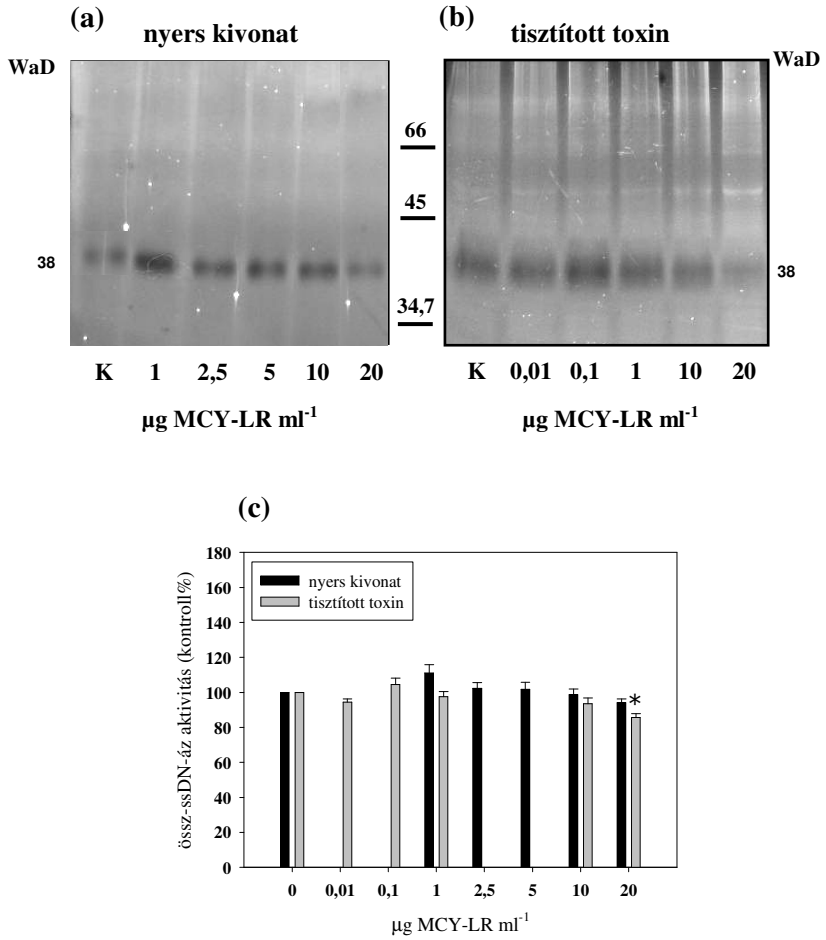
izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 6,8		
		nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt
LmD89	89±2	↑ [1-20]	-	-
LmD79	79±1	↑ [1-20]	-	-
LmD53	53±2	↑	+	NV
LmD47	47±2	↑	+	NV
LmD43	43±1	↑	++	↓
LmD39	39±2	↑	++	↓
LmD35	35±2	NV	+	NV
LmD26	26±2	↑	++	↑
LmD21	21±1	NV	+	NV
LmD18	18±1	NV	+	NV

+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ MCY-LR okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; ↓ MCY-LR okozta csökkenés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [1-20] a növekedés vagy csökkenés jellegzetes 1-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

A kontroll növények kivonataiból nyolc izoenzimet (LmD53-LmD18) detektáltunk. A mikrocisztin-LR tartalmú nyers extraktummal történő kezelések hatására jelentek meg 1-20 µg ml^{-1} koncentrációknál az LmD89 és LmD79 jelölésű enzimek. Ezen ssDN-ázok specifikus aktivitása a MCY-LR koncenrációjával arányos növekedést mutatott (14. ábra). Emelkedő tendenciát láthattunk nyers extraktummal történő kezeléseknél az LmD53, LmD47, LmD43 és LmD39 izoenzimeknél egyaránt. Ezzel ellentétben a tisztított MCY-LR hatására az LmD53, LmD47 enzimek aktivitása a kontrollhoz képest nem változott, míg az LmD43 és LmD39 jelű izoenzimek aktivitásában csökkenést tapasztaltunk (14. ábra). A 43 kDa molekulatömegű izoenzimnek, hosszú inkubálási időt követően dsDN-áz aktivitását is detektáltuk, amely aktivitás kezelés hatására csökkent. Az LmD26 izoenzim aktivitása mindkét kezelés (nyers extraktum és tisztított MCY-LR) hatására a toxinkoncentrációk növekedésével arányos emelkedő tendenciát mutatott,

míg az LmD35, LmD21 és LmD18 jelzésű ssDN-ázok aktivitásában a kontrollhoz viszonyítva nem tapasztaltunk változást (14. ábra; 4. táblázat). Az ssDN-áz izoenzimek összaktivitásában nyers extraktummal történő kezelés során emelkedő, míg a tisztított cianotoxinos kezelés hatására csökkenő tendenciát mértünk (14. a, b, c ábrák).

A ***Wolffia arrhiza*** MCY-LR-el történő kezelése során mind a nyers extraktum, mind pedig a tisztított toxin hatására egy, a kontroll növényeknél is megjelenő karakteres 38 kDa molekulatömegű ssDN-áz izoenzimet (WaD38 jelzésű) detektáltunk (15. a, b ábrák).



15 ábra Tisztított MCY-LR kezelés hatása a *Wolffia arrhiza* ssDN-áz aktivitására a kezelés 5. napján (pH 6,8).
(a) a *M. aeruginosa* MCY-LR tartalmú extraktumaival kezelt növények; ***(b)*** tisztított MCY-LR-el kezelt növények DN-áz zimogramjai; ***(c)*** a cianotoxin kezelések hatása a *Wolffia arrhiza* össz-ssDN-áz aktivitására (pH 6,8). Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. *$p<0,05$. Egy kísérlet reprezentatív gélje.

Az enzim aktivitása a nyers MCY-LR tartalmú extraktummal történő kezelést követően 1 μg ml^{-1}-nél, míg a tisztított toxinos kezelésnél 0,1 μg ml^{-1} toxinkoncentrációnál enyhe emelkedést mutatott, majd a cianotoxin koncentrációk növekedésével az enzim specifikus aktivitásában csökkenést tapasztaltunk (15. a, b ábrák). Szignifikáns változást az össz-ssDN-áz aktivitásban tisztított toxin hatására 20 μg ml^{-1} toxinkoncentrációnál mértünk (15. c ábra). A *W. arrhiza* tisztított toxinnal történő kezelése során, hosszú inkubálási időt követően a 38 kDa molekulatömegű enzim dsDN-áz aktivitása is kimutatható volt. A toxinkoncentrációk növekedésével az enzim aktivitásában csökkenő tendenciát mértünk (nem bemutatott adatok).

Eredményeink mutatták, hogy a *Lemnaceae* fajok ssDN-áz izoenzim-mintázatában jelentős különbségek vannak. A *Wolffia* kivonatokban, a kezelések 5. napján csak egy enzim hasítja az egyfonalú DNS-t (pH 6,8), melynek aktivitását a MCY-LR kezelés csak magas koncentrációban, 50%-os növekedésgátlás mellett is csak max. 15%-al csökkentette. Ezzel szemben *L. minor* kivonatokban 10 izoenzim detektálható. Közülük három izoenzim működését indukálta a MCY-LR (LmD89, LmD79 és LmD26). Négy enzim aktivitását emelték a nyers cianobaktérium kivonat vegyületei. Mivel ezek a tisztított MCY-LR kezelt növényekben nem mutattak aktivitás-emelkedést a hatás nem a kivonat MCY-LR tartalmának tulajdonítható (LmD53, LmD47, LmD43 és LmD39).

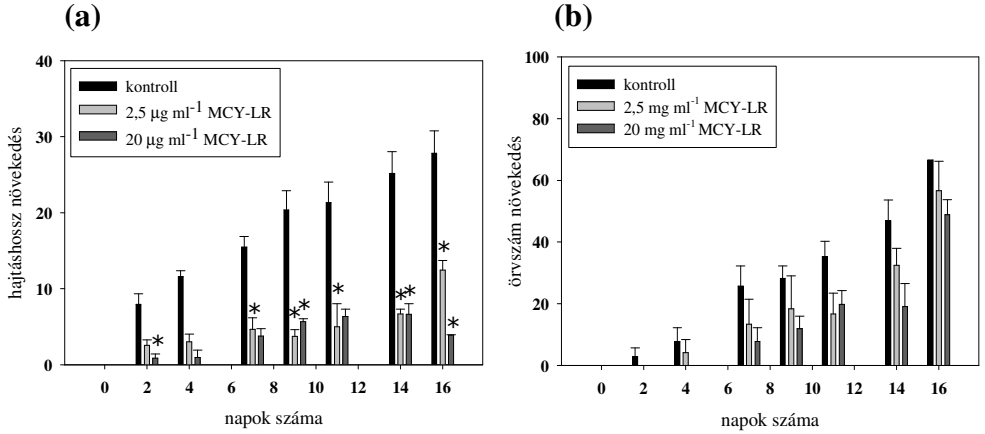
4.1.2. A mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* tenyészetekre

A *C. demersum* a vízi életközösségek fontos alámerülő hínárnövénye. Pflugmacher és munkatársai (1998) a *C. demersum* tenyészetek MCY-LR-el szembeni érzékenységét tesztelve ismerték fel, hogy a glutation anyagcsere szerepet játszhat, mint védekező mechanizmus a közegből a növényekbe könnyen bejutó MCY-LR káros hatásainak a kivédésében. Kutatócsoportunk a MCY-LR által kiváltott növekedésgátlások hátterében álló, a hajtáscsúcs merisztéma sejtjeiben bekövetkező sejtszintű változásokat vizsgálta (Szigeti és mtsai. 2010). Jelen munkában az enzimszintű változások közül a sejtek fehérje- és nukleinsav-anyagcseréjét szabályozó proteázok és ssDN-ázok aktivitásváltozásait elemeztem, és kerestem a kapcsolatot ezeknek az enzimeknek az aktivitásváltozása, valamint a tapasztalt anatómiai és növekedésbeli változások között.

4.1.2.1. A mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* növekedésére

A *Ceratophyllum demersum* növekedését a hajtások hosszával és a hajtáson lévő levélörvök számával jellemeztük.

A kezelések során a tisztított MCY-LR idő- és koncentráció-függő hatásait a *Ceratophyllum* különböző növekedési paraméterein (hajtáshossz, levélörvök száma) vizsgáltuk.

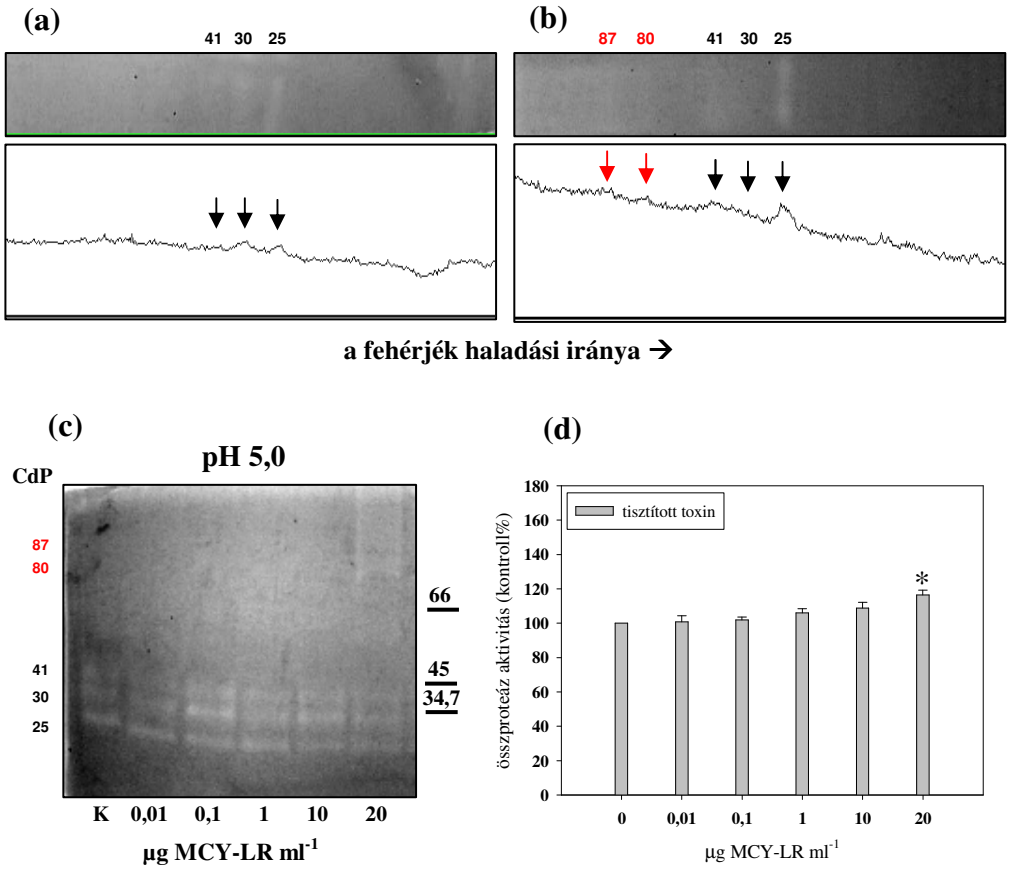


16. ábra Tisztított mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* növekedésére.
(a) a MCY-LR idő- és koncentráció-függő hatása a hajtáshosszra; ***(b)*** a MCY-LR hatása az örvszámra. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

A kezelések során a 2,5 µg ml^{-1} és 20 µg ml^{-1} cianotoxin koncentrációk egyaránt szignifikánsan gátolták a hajtáshossz növekedését. A 16. napon a 2,5 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR kezelés 56,4%-al, a 20 µg ml^{-1} toxin koncentráció 87,3 %-al gátolta a hajtáshossz növekedését (16. a ábra). Ezzel szemben a 2-11. napnál a levélörvök száma nem mutatott szignifikáns csökkenést a cianotoxin kezelés hatására (16. b ábra).

4.1.2.2. A mikrocisztin-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* proteáz enzimeinek aktivitására

A szubsztrátként zselatint hasító proteáz izoenzimeket savas közegben (pH 5,0) a *C. demersum* kivonatokból is sikerült kimutatni (17. a ábra). Lúgos pH-n enzimaktivitást nem detektáltunk.



17. ábra MCY-LR által okozott proteáz mintázat- és aktivitás változások a *Ceratophyllum demersum* fehérje kivonataiban a kezelés 5. napján (pH 5,0).
(a) a kontroll minták; ***(b)*** a 20 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR-el kezelt növények karakterisztikus sávjai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitás gélen (pH 5,0); ***(c)*** a kontroll és a MCY-LR kezelt növények zselatin zimogramjai (a római számok a detektált izoenzimeket, az arab számok a kísérletekben alkalmazott cianotoxin koncentrációkat jelölik, µg ml^{-1}); ***(d)*** pH 5,0-ön mérhető proteáz összaktivitás. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*. Egy kísérlet reprezentatív gélje.

A *C. demersum* fehérjekivonataiból zselatin géleken kevés számú savas proteázt detektáltunk (CdP87-CdP25). **A magas, 87 és 80 kDa (CdP87 és CdP80) molekulatömegű izoenzimeket a kontroll növények kivonataiban nem detektáltuk, csak a 20 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR toxinkezeltekben indukálódtak (17. a, b, c ábrák; 5. táblázat).** Az izoenzimek specifikus aktivitásában a tisztított MCY-LR hatására enyhe növekedést tapasztaltunk (17. c, d ábrák és 5. táblázat). A cianotoxin az összproteáz aktivitásban 20 µg ml^{-1} koncentrációnál szignifikáns változást okozott (17. d ábra), ami elsősorban a nagy molekulatömegű enzimek működésének köszönhető.

5. Táblázat MCY-LR hatása a *Ceratophyllum demersum* proteáz enzim-mintázatára.

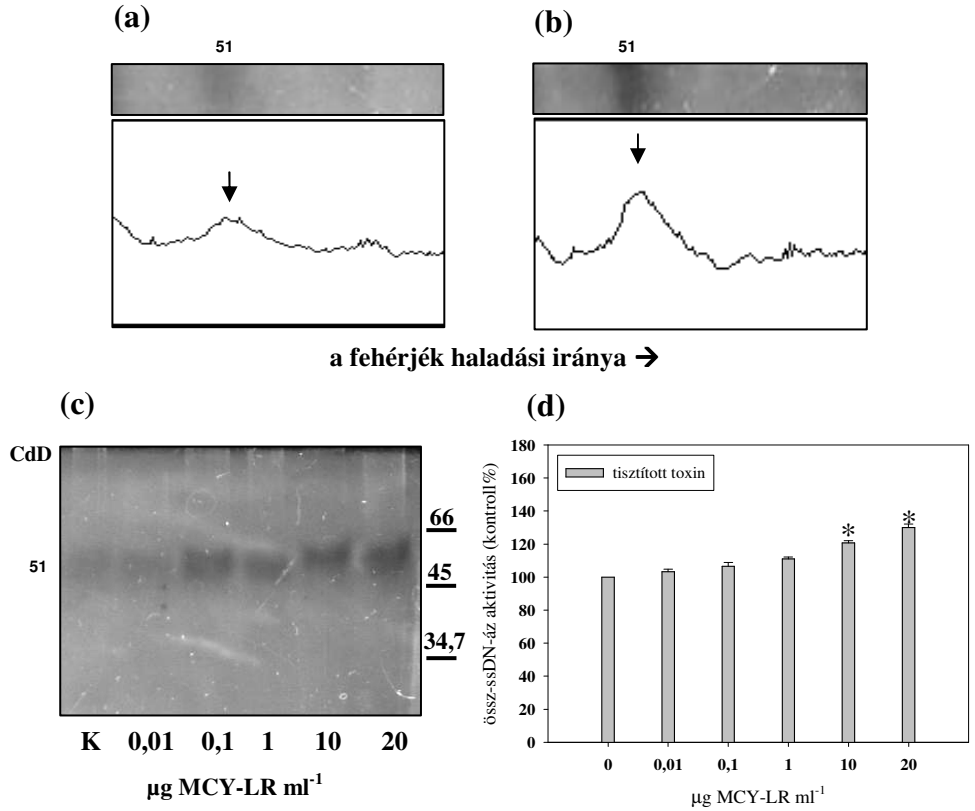
izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 5,0	
		kontroll	tisztított toxinnal kezelt
CdP87	87	-	↑
CdP80	80	-	↑
CdP41	41-42	+	NV
CdP30	30-31	+	↑ [0,1]
CdP25	25-26	++	↑

+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ MCY-LR okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [0,1] a növekedés jellegzetes a 0,1 µg ml^{-1} koncentrációnál; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

4.1.2.3. A mikrocisztin-LR hatása az ssDN-áz enzimek aktivitására

A *C. demersum* kivonataiból egy 51-52 kDa molekulatömegű ssDN-áz izoenzimet (CdD51) is detektáltunk (18. a, b, c ábrák). Az enzim specifikus aktivitásában a tisztított MCY-LR koncentrációk növekedésével arányos emelkedést tapasztaltunk (18. a, b, c ábrák). Ezt a sávintenzitási görbék értékelésével nyert adatok, (jelen esetben ezek megfelelnek az „össz-ssDN-áz aktivitás" értékeknek) szignifikáns változásai is bizonyítják (18. d ábra; 10-20 µg ml^{-1} MCY-LR koncentrációk).

Az alámerülő hínárnövények közül a *C. demersum*-mal végzett kísérleteink eredményei alapján elmondható, hogy rövidtávú (5 napos) kezelésekben csak magas MCY-LR koncentrációk befolyásolják szignifikánsan a *C. demersum* növekedését. Enzimszintű változások azonban már ≥0,01 µg ml^{-1} koncentrációknál mérhetők, emelkedő ssDN-áz és proteáz enzimaktivitások jellemzők. Szignifikáns enzimaktivitás emelkedések, újonnan detektálható enzimek (CdP87 és CdP80) azonban csak a növekedésükben már erősen gátolt, 10-20 µg ml^{-1} MCY-LR koncentrációkkal kezelt növényekben mérhetők.



18. ábra MCY-LR kezelés hatása a *Ceratophyllum demersum* ssDN-áz aktivitás mintázatára a kezelés 5. napján (pH 6,8).
(a) a kontroll minták; ***(b)*** a 20 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR-el kezelt növények karakterisztikus sávjai (pH 5,0); ***(c)*** a kontroll és a MCY-LR kezelt növények; ***(c)*** a kontroll és a MCY-LR kezelt növények zimogramjai (a római számok a detektált izoenzimeket, az arab számok a kísérletekben alkalmazott cianotoxin koncentrációkat jelölik, µg ml^{-1}); ***(d)*** pH 6,8-on indukálódott össz-ssDN-áz izoenzim aktivitás. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. *$p<0,05$. Egy kísérlet reprezentatív gélje.

A 4.1.1.-4.1.2. fejezet eredményei bizonyítják a különböző hínárnövény fajok eltérő érzékenységét a mikrocisztin-LR-el szemben. Mindhárom faj esetében azt tapasztaltuk, hogy összevetve a MCY-LR-t termelő *M. aeruginosa* nyers kivonatával történt kezelések eredményeit a tisztított MCY-LR-el történt kezelések eredményeivel a vizsgált növényi válaszok (növekedési paraméterek, proteáz- és ssDN-áz aktivitásváltozások) tendenciájukat tekintve általában hasonlók.

A kísérletekben alkalmazott vízinövény fajoknál az 5 napos mikrocisztin-LR kezeléseket követően a levelek barnulását, nekrózisát nem tapasztaltuk szemben más tesztnövényeken leírtakkal (M-Hamvas és mtsai.

2003, Máthé és mtsai. 2007), azonban szignifikáns növekedésgátlást-, és nedvestömeg csökkenést detektáltunk mind a MCY-LR tartalmú nyers kivonatokkal, mind a tisztított MCY-LR-el történő kezeléseket követően. A ***Lemna minor*** esetében a kísérletekben alkalmazott MCY-LR tartalmú nyers kivonatok 5-20 µg ml^{-1}, míg a tisztított MCY-LR 10-20 µg ml^{-1} koncentrációtartományban gátolta szignifikánsan a növekedést (5. és 6. ábrák). A ***Wolffia arrhiza*** nyers kivonattal történő kezelése során a hajtásszám érzékenyebb paraméternek bizonyult, mert már 0,01 µg ml^{-1} MCY-LR koncentrációnál szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, míg a nedvestömegben csak 10-20 µg ml^{-1} MCY-LR koncentrációknál mértünk szignifikáns gátlást. Tisztított cianotoxinnal kezelve a *W. arrhiza* tenyészeteket mind a hajtásszámban, mind pedig a nedves tömegben szignifikáns csökkenést 10-20 µg ml^{-1}-toxinkoncentrációknál detektáltunk (7. és 8. ábrák). A maximális növekedésgátlás (hajtásszám és nedves tömeg) a *L. minor* esetében nyers kivonatos kezelés során 22% és 18%, a *W. arrhiza*-nál 45% és 42%, amíg tisztított toxin hatására a *L. minor*-nál 65% és 60%, a *W. arrhiza* esetében 54% és 58% (6. és 8. ábrák).

Eredményeink hasonlóak a szakirodalomban olvasható adatokkal. Weiss és munkatársai (2000) a *L. minor* esetében, 6 napos tisztított MCY-RR-el történő kezelés során 3-5 µg ml^{-1} toxinkoncentrációnál, a 3. napon tapasztaltak a szignifikáns növekedésgátlást, ami a klorofill tartalom csökkenésével is párosult. Mitrovic és munkatársai (2005) leírták, hogy 10-20 µg ml^{-1} MCY-LR 5 nap után gátolta szignifikánsan a *Lemna minor* és a *Wolffia arrhiza* tenyészetek növekedését. A *L. minor* MCY-LR-el szembeni nagyobb érzékenységéről írtak, de szignifikáns különbséget a két faj között nem mértek.

A fehérjetartalom jó paraméter olyan kulcsfolyamatok jellemzésére, mint a szeneszcencia, emellett jól válaszol a környezeti stressz-faktorokra. Környezeti stressz hatására, a fehérjetartalom növekedése mellett a stressz enzimek (kataláz, SOD, POD) aktivitásának emelkedése mérhető (Piotrowska és mtsai. 2009). Kísérleteinkben a MCY-LR kezelt *Lemna* és *Wooffia* növények egységnyi nedvestömegre vonatkoztatott fehérjetartalma enyhén növekvő tendenciát mutatott. Szignifikáns fehérjetartalom növekedést a 20 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR-el kezelt *L. minor* növényekben mértünk.

A ***Ceratophyllum demersum*** tisztított MCY-LR kezelése során a hajtáshossz bizonyult az erősebben gátolt növekedési paraméternek az örvszámhoz viszonyítva. A MCY-LR (0,1-10 µg ml^{-1}) szignifikánsan gátolta a *C. demersum* hajtáscsúcs merisztéma sejtek megnyúlását. Ez azzal magyarázható, hogy a kortikális mikrotubuláris rendszer reorientálódása, a hajtáscsúcs sejtek radiális duzzadása, a sejtek mitotikus aktivitásának növekedése -a korai mitotikus fázisban rekedt sejtek számának magas arányával-, következett be a cianotoxin hatására (Szigeti és mtsai. 2010). A

2,5 µg ml^{-1} tisztított MCY-LR már 56,4%-al, a 20 µg ml^{-1} toxin koncentráció pedig 87,3 %-al gátolta a hajtáshossz növekedését a kezelés 16. napján (16. ábra). A *Ceratophyllum demersum* tenyészetek toleranciáját a mikrocisztinekkel szemben Pflugmacher (2002) is bizonyította, 1 illetve 5 µg l^{-1} MCY-LR-el kezelt tenyészetei csak 3 illetve 6 hét kezelés után mutattak szignifikáns növekedésgátlást. A tenyészetek fenntartása során szerzett tapasztalataink is bizonyították, hogy lassú növekedése miatt, ha csak a növekedési paraméterekre vagyunk kíváncsiak, rövidtávú tesztekben kevésbé alkalmazható tesztnövény. A cianotoxinok által indukált enzimszintű változások elemzéséhez azonban jól alkalmazható képviselője az alámerülő hínárnövény közösségeknek (Pflugmacher 2002, 2004).

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a MCY bejut a növény szöveteibe, és biotranszformációja során reaktív oxigén-gyökök (ROS) keletkeznek, amelyek másodlagos toxikus hatásokért is felelőssé tehetők (Pflugmacher 2004). A ROS sejtkárosító hatásának kivédéséhez a *Ceratophyllum* sejtek hatékony védelmi rendszert fejlesztettek ki, jól működő antioxidatív enzimeik (pl. szuperoxid-dizmutáz, aszkorbinsav-peroxidáz, glutathion-peroxidáz, -reduktáz, és -S-transzferáz) aktivitásemelkedését mérték MCY hatására (Pflugmacher 2004). MCY-LR kezelések hatására Mitrovic és munkatársai (2005) *Lemna minor* növényekben mértek peroxidáz (POD) enzim aktivitásemelkedést.

A mikrocisztinek növényi proteázokra gyakorolt hatásairól a nemzetközi szakirodalomban nem találtunk adatokat. A Növénytani Tanszéken korábban, mustár csíranövényekkel végzett kísérletek eredményei azt bizonyították, hogy a MCY-LR etiolált mustár csíranövényekben a savas proteázok aktivitásemelkedését, és új enzimek megjelenését indukálta (Helgert 2003, M-Hamvas és mtsai. 2004). A ***Lemnaceae* fajok** esetében a kontroll és a MCY-LR-el (nyers kivonat és tisztított toxin) kezelt növényekben azonos proteáz enzimek jelentek meg, azonban a kezelések hatására aktivitásaik eltérőnek bizonyultak, növekvő és csökkenő tendenciákat egyaránt mértünk, sőt új enzimek megjelenését is detektáltuk.

A ***Lemna minor*** savas pH-n inkubált zselatináz-géljein a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal, valamint a tisztított toxinnal történő kezelések az összproteáz aktivitás növekedését eredményezték. A tisztított MCY-LR hatására új izoenzim megjelenését is detektáltuk (LmP26), amely aktivitása a toxinkoncentráció függvényében nőtt. A tísztított toxin ugyan növelte a bázikus proteázok összaktivitását, azonban a nyers extraktum hatására enyhe csökkenésüket mértünk. Új enzimek megjelenését a nyers és tisztított toxinos kezelés lúgos pH-n nem indukálta (10., 11. ábrák; 2. táblázat). A ***Wolffia arrhiza*** esetében mind a MCY-LR tartalmú nyers extraktummal, mind pedig a tisztított toxinnal történő kezelések az összproteáz aktivitások növekedését eredményezték. A MCY-LR újabb, a kontrollban nem detektált izoenzimeket

is indukált (12., 13. ábrák; 3. táblázat: WaP84 és WaP36). A ***Ceratophyllum demersum*** esetében a citológiai vizsgálatokkal összhangban (Szigeti és mtsai. 2010) az enzimológiai vizsgálatokhoz is a kezelések 5. napján készítettünk a növényekből nyers fehérjekivonatokat. A tisztított MCY-LR-el történő kezelésekor csak savas proteáz izoenzimeket detektáltunk a zselatin tartalmú géleken. A proteázok összaktivitása a cianotoxin hatására növekedést mutatott a CdP87 és CdP80 indukciójának következtében (17. ábra, 5. táblázat). Eredményeink megerősítették korábbi tapasztalatainkat, hogy a MCY-LR elsősorban a lebontó folyamatokban kulcsfontosságú savas proteázok működését befolyásolja, emelve aktivitásukat (Vierstra 1996). A nyers kivonat különböző vegyületei nem csak közvetve, hanem közvetlen módon is befolyásolhatják a proteázok működését, ugyanis proteázgátló peptideket is azonosítottak a nyers cianobaktérium kivonatok vegyületei között, bár ezek *in vivo* hatása hajtásos növényekre még nem ismert (Ghosh és mtsai. 2008). Nyers kivonatok által kiváltott proteáz aktivitás csökkenéseket csak a *L. minor* kivonatokban detektáltunk (2. táblázat).

A MCY-LR növényi nukleázokra gyakorolt hatásairól kevés adat áll rendelkezésünkre (Romanowska-Duda és Tarczynska 2002, M-Hamvas és mtsai. 2003). A vízinövények közül a *Spirodela oligorrhiza* RN-áz aktivitását vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy 0,2 µg ml^{-1} MCY-LR hatására a kezelés 7. napján, az egységnyi nedves tömegre vonatkoztatott RN-áz aktivitás szignifikáns növekedést mutat (Romanowska-Duda és Tarczynska 2002). Mustár csíranövényeknél azt tapasztalták, hogy az 50%-os növekedésgátlást előidéző MCY-LR a mustár csíranövények egységnyi fehérjetartalomra megadott (specifikus) ssDN-áz aktivitását emelte, de az ennél nagyobb dózis már a sejtek pusztulása miatt (nekrózis jelensége) az enzimek aktivitásának a csökkenését okozta (M-Hamvas és mtsai. 2003). Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a növényi sejtekben mérhető nukleáz aktivitás a növények egyedfejlődése során is változik (M-Hamvas és mtsai. 2000), ami a vegetatívan szaporodó tenyészeteinkben is okozott enzimmintázat különbségeket. A ***L. minor*** esetében a nukleázok összaktivitásában a MCY-LR tartalmú nyers kivonattal történő kezelés emelkedést (a legszembetűnőbb az LmD26 aktivitásemelkedése) és két új enzim (LmD89, LmD79) megjelenését indukálta, míg a tisztított MCY-LR (LmD26 aktivitásemelkedése ellenére) az összaktivitásban csökkenést okozott (0,01-20 µg ml^{-1}; 14. ábra). A kezelésekre érzékenyebb ***W. arrhiza*** esetében a nyers extraktummal történő kezelések a nukleáz aktivitások 1 µg ml^{-1} koncentrációnál bekövetkező emelkedését, majd csökkenését (2,5-20 µg ml^{-1}) indukálták. A tisztított MCY-LR hatására már 1 µg ml^{-1} feletti cianotoxin hatására az össznukleáz aktivitás csökkenését detektáltuk, de a csökkenés mértéke max. 15%-os volt (15. ábra). A *Lemnaceae* fajokkal szemben a

tisztított MCY-LR a ***C. demersum*** ssDN-áz enzimeinek az aktivitását is növelte (18. ábra).

Mind a MCY-LR tartalmú nyers kivonattal, mind pedig a tisztított MCY-LR-el történő kezelések hatására az általunk vizsgált vízinövényfajok proteáz és nukleáz enzimeinek mintázat- és aktivitásbeli változásai, valamint a cianotoxin indukálta új enzimek megjelenése a szakirodalomra nézve új eredményekkel szolgál.

4.1.3. A nukleáz enzimek aktivitásának változása a mikrocisztin-LR kezelt *Phragmites australis* (nád) növényekben

A Máthé és munkatársai (2000) által kidolgozott *in vitro* nád kallusz tenyészetből regenerált „mini nádnövények" érzékenyen reagáltak a MCY-LR kezelésekre, a cianotoxin növekedésgátlást, szövettani és citológiai eltéréseket indukált (Máthé és mtsai. 2007, 2009). Kísérleteink során a strukturális eltérések hátterében álló biokémiai változásokat elemeztük a szimplaszálú-, és duplaszálú DNS-t hasító nukleázok vizsgálatával a növények hajtás-, és gyökérkivonataiban.

6. Táblázat A MCY-LR hatása *Phragmites australis* növényekből detektált DN-áz izoenzimek aktivitására.

izoenzim	molekulatömeg (kDa)	előfordulás a kontrollban és aktivitásuk	MCY-LR hatása a nukleáz aktivitásokra
PaD53	**53-56**	ssDN-áz aktivitás a 10 napos hajtások és gyökerek esetében; dsDN-áz aktivitása az 5 napos hajtások és gyökerek esetében	az ssDN-áz aktivitás változatlan marad a hajtásban, átmeneti csökkenés a gyökérben; a ds DN-áz aktivitás gyenge, de átmeneti növekedés tapasztalható a hajtások és gyökerek esetében
PaD44	**44**	csak ssDN-áz aktivitás a 10 napos hajtások és gyökerek esetében	az ssDN-áz aktivitás változatlan maradt a hajtásban és a gyökérben
PaD42	**42**	ssDN-áz aktivitás 20 napos, és kis dsDN-áz aktivitás 5 napos gyökereknél	az ssDN-áz aktivitás csökken, dsDN-áz aktivitás nem szignifikáns
PaD38	**38-41**	ssDN-áz aktivitás 5 napos hajtások és gyökerek esetében, 10-20 napos gyökereknél (gyenge aktivitás a hajtásokban), dsDNáz aktivitás nincs	5 napos kezelés: átmeneti növekedés a hajtásoknál és gyökereknél; 10 napos kezelés: átmeneti növekedés a gyökereknél; 20 napos kezelés: csökkenés a gyökereknél; 10-20 napos kezelés során a hajtásokban az aktivitás-változások nem szignifikánsak
PaD37	**37-39**	ssDN-áz aktivitás a hajtások és gyökerek esetében minden időpontban, dsDN-áz aktivitás a 10 napos hajtásoknál és gyökereknél	5 napos kezelésnél ssDN-áz aktivitás-növekedés a hajtásokban és gyökerekben; 10 napnál: átmeneti növekedés a gyökerekben, a hajtásoknál nem szignifikáns; 20 napos kezelés során átmeneti növekedés a hajtásoknál, növekedés a gyökereknél. dsDN-áz aktivitás csökkenés a hajtásokban, 10 napos kezelésnél növekedés a gyökereknél
PaD35	**35-38**	ssDN-áz aktivitás 5-10 napos hajtások és gyökerek és 20 napos gyökerek esetében, gyenge dsDN-áz aktivitás 5 napos hatásoknál és gyökereknél	gyenge ssDN-áz aktivitás-növekedés hajtásban és gyökérben 5 napos kezelés esetében; 10 napnál: aktivitás csökkenés a hajtásokban, az aktivitás változatlan maradt a gyökerekben; 20 napos kezelésnél: átmeneti növekedés a gyökerekben. dsDN-áz aktivitás: gyenge aktivitás, növekedés a hajtásokban, átmeneti növekedés a gyökerekben
PaD28	**28-32**	ssDN-áz aktivitás 5 napos gyökereknél, 10-20 napos hajtások és gyökerek esetében, dsDN-áz aktivitás nincs	ssDN-áz aktivitás-növekedés a gyökerekben 5 napos kezelést követően, átmeneti növekedés a hajtásokban és gyökerekben 10 napos kezelésnél; 20 naposnál: átmeneti növekedés a hajtásokban és csökkenés a gyökerekben

4.1.3.1. A kontroll *Phragmites australis* növények nukleáz enzimei

Az 5, 10 és 20 napos kontroll nád (*Phragmites australis*) növények hajtásaiból és gyökereikből karakterisztikus DN-áz izoenzimeket detektáltunk. Az enzimek molekulatömege 31-55 kDa molekulatömeg közzé esett, jelölésük PaD53-tól PaD28-ig (6. táblázat) történt. A többször ismételt kísérletek összes aktivitás géljeinek elemzése és kiértékelése alapján azt tapasztaltuk, hogy az PaD53 és PaD38-PaD28 izoenzimek (6. táblázat) a legkarakterisztikusabbak, jól reprodukálhatók, és a MCY-LR kezelések során változó aktivitással megjelenő enzimek.

Az ssDNS-t tartalmazó gélekben 5 napos kontroll hajtásoknál PaD38-PaD35, a kontroll gyökereknél PaD38-PaD28 jelzésű nukleáz izoenzimeket detektáltunk. A PaD35 jelzésű enzim mutatta a legnagyobb ssDNáz aktivitást mindkét szervben (19. a ábra). A PaD28 izoenzim csak a gyökérben volt detektálható (19. a, d ábrák). Általánosságban a dsDN-áz aktivitás alacsonynak bizonyult. A dsDNS tartalmú gélekben a PaD53 és PaD35 jelzésű izoenzimeket mindkét szervben, míg a PaD42 enzimet csak a gyökérben detektáltuk (22. a ábra).

A 10 napos hajtásokban és gyökerekben az ssDNS tartalmú géleken PaD53, PaD44, PaD38, PaD37, PaD35, PaD28 jelzésű ssDN-áz izoenzimek aktivitásait detektáltuk (20. a ábra). A legkarakterisztikusabb izoenzim a PaD35 maradt mindkét szervben (20. a ábra). A hajtásban a PaD53 és PaD37 enzimeknek jól kimutatható dsDN-áz aktivitásuk volt, míg a gyökérben csak a PaD37 enzim jelent meg (22. c ábra). A PaD35 jelű enzim csak 120 óra inkubálás után jelent meg a natív DNS-t tartalmazó aktivitás géleken (dsDN-áz aktivitás, 22. c' ábra).

20 nap után a hajtásokban csak a PaD38, PaD36 és PaD28 enzimek ssDN-áz aktivitása volt detektálható, míg a gyökerekben PaD42 és PaD35 sávjai is megjelentek (21. a, c, d ábrák). A hajtásokban a legkarakterisztikusabb izoenzimek a PaD37 és PaD28, a gyökerekben a PaD38 és PaD35 (21. a ábra). Ezek az izoenzimek az aktivitás gélek 24 órás inkubálása után nem mutattak dsDN-áz aktivitást (22. e ábra), csak nagyon hosszú inkubálási idő után (168h) váltak gyengén láthatóvá a PaD53 és PaD35 sávok (22. e' ábra). A PaD53 esetében a protein kis koncentrációban való jelenléte okozhatta az alacsony aktivitást, hiszen az ssDN-áz géleken sem detektálható a 24 órás inkubálást követően (21. a ábra). Ezzel szemben PaD35 jelenlétét a mintában az ssDN-áz géleken mutatott magas aktivitás bizonyítja (21. a ábra). Az alacsony dsDN-áz aktivitás hátterében az enzim szubsztrát preferenciája vagy egyéb, az enzimaktivitást befolyásoló tényezők (ionigény, hőmérséklet stb.) állhatnak.

A nád növényeknek tehát jól detektálható nukleáz mintázata van, amely kor- és szervfüggő. A szervek ssDN-áz aktivitásában a legnagyobb különbség a

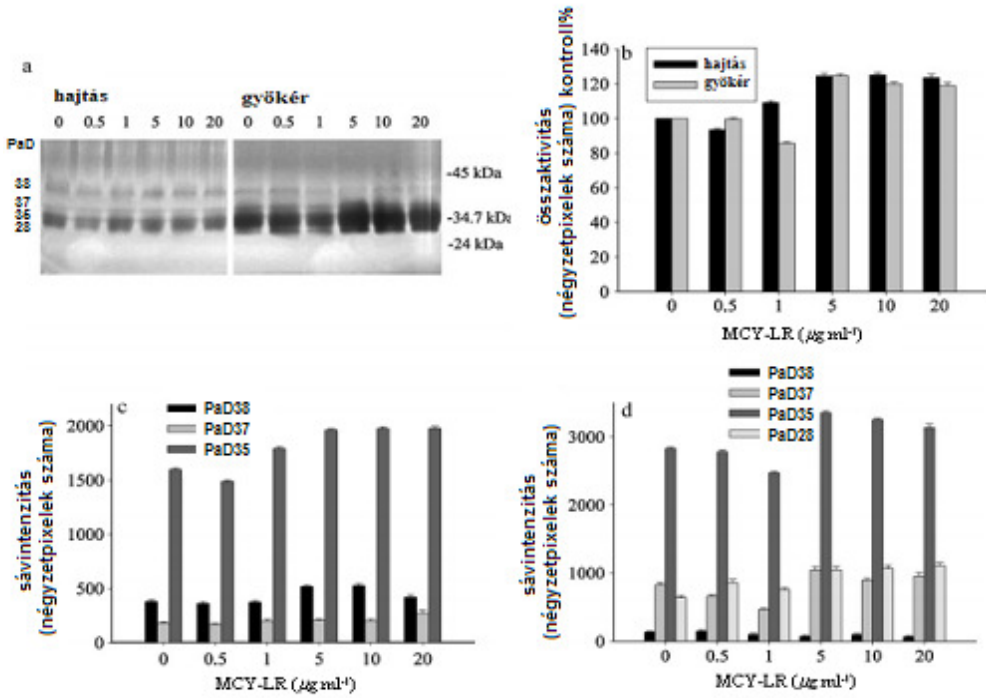
kezelések kezdetétől számított 20. napon detektálható: a hajtásokban csak a PaD37 és PaD28 izoenzimek mutattak magas aktivitást, míg a gyökerekben az ssDN-áz aktivitások általánosságban magasabbak voltak, mint a hajtásokban (21. ábra). Hasonlóképpen Leśniewicz és munkatársai (2010) is különböző nukleáz izoenzim mintázatokat találtak a karfiol csíranövények különböző szerveiben. „Kor-függő" változásokat láthattunk a nád gyökerekben, de ezt a hajtásoknál is megfigyelhetjük, ahol az aktivitás-géleken a legtöbb izoenzimet 10 napos növényeknél detektáltuk. A nukleázok mintázatában, a növénykultúrák életkorától függő változásokat búza leveleiben is leírtak (Blank és McKeon 1989).

4.1.3.2. A mikrocisztin-LR hatása a *Phragmites australis* nukleáz izoenzimeinek aktivitásaira

A MCY-LR kezelés hatásait a *P. australis* ssDN-áz és dsDN-áz enzimeinek aktivitásaira a 6. táblázat foglalja össze.

Az 5 napos MCY-LR kezelések az ssDN-áz izoenzimek aktivitásainak a növekedését indukálták a hajtásokban és a gyökerekben egyaránt. A legmagasabb aktivitásokat a nagyobb koncentrációknál detektáltuk (5-20 μg ml^{-1}, 19. b ábra).

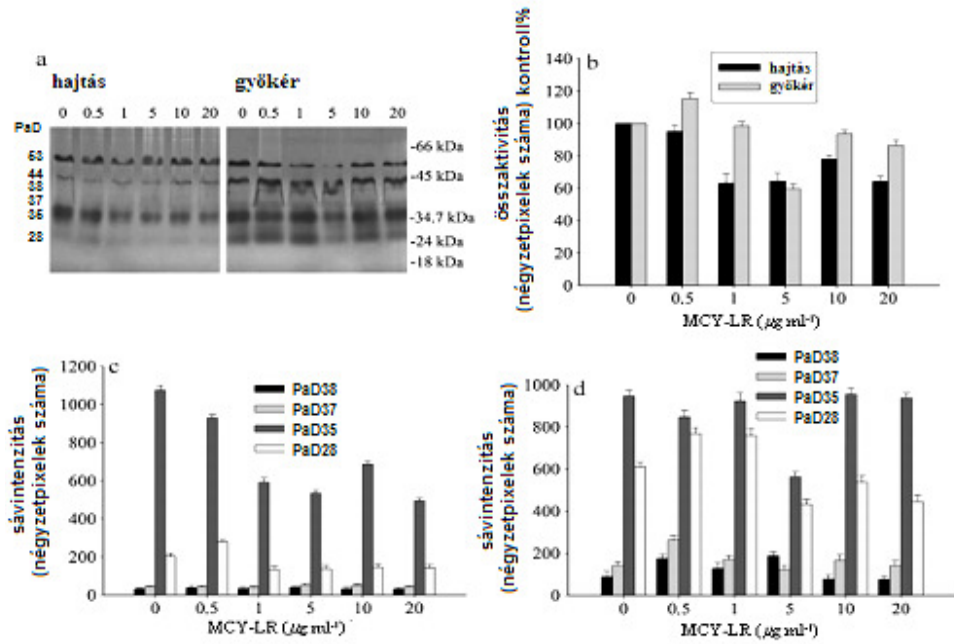
A hajtásokban, a MCY-LR kezelések hatására enyhe növekedést mértünk a kontrollokban is működő izoenzimek aktivitásában (19. c ábra). A gyökerek esetében, az PaD37-PaD28 jelű ssDN-áz izoenzimek mutattak aktivitás növekedést cianotoxin jelenlétében (19. d ábra). A legmagasabb aktivitás emelkedést a PaD28 izoenzim esetében, 20 μg ml^{-1} MCY-LR kezelésnél mérhettük. A MCY-LR a hajtásokban indukálta a dsDN-áz enzimek összaktivitásának emelkedését (22. b ábra). Ez az emelkedés a gyökerekben átmenetinek bizonyult. A legmagasabb aktivitást 1 μg ml^{-1} MCY-LR kezelésnél detektáltuk. Magasabb cianotoxin koncentrációknál a dsDN-áz aktivitás csökken, de még fölötte marad a kontroll értéknek (22. b ábra).



19. ábra Mikrocisztin-LR kezelés hatása a *P. australis* tengelyszerveinek ssDNáz enzim mintázatára a kezelés 5. napján.
(a) A hajtás és a gyökér kivonatok izoenzim-mintázatai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitású géleken. A nagybetűk jelzik a detektált izoenzimeket, a számok mutatják a kezelések során alkalmazott MCY-LR koncentrációkat. ***(b)*** MCY-LR hatása a gyökér és hajtás kivonatainak ssDN-áz enzimek összaktivtására. ***(c)*** MCY-LR hatása a hajtás PaD38-PaD35 izoenzimeinek aktivitására. ***(d)*** MCY-LR hatása a gyökér PaD38-PaD28 izoenzimeinek aktivitására.

10 napos cianotoxin kezelésnél a MCY-LR gátolta az ssDN-ázok aktivitását a hajtásokban. A gyökerekben az aktivitások változatlanok maradtak, és csak 0,5 μg ml^{-1} MCY-LR indukált kismértékű aktivitás-növekedést (20. b ábra).

A MCY-LR gátolta a dsDN-áz enzimek aktivitását a hajtásokban, és láthatóan növelte a gyökerekben (22 c, d ábrák). A dsDNS-t tartalmazó géleken detektált összaktivitás változásokat főként a PaD37 jelzésű izoenzim aktivitásváltozásai határozzák meg (22. c ábra). Hosszú inkubálást követően azt találtuk, hogy az 1-20 μg ml^{-1} MCY-LR-el történő kezelések hatására nőtt a PaD35 jelzésű izoenzim aktivitása (22. c' ábra).

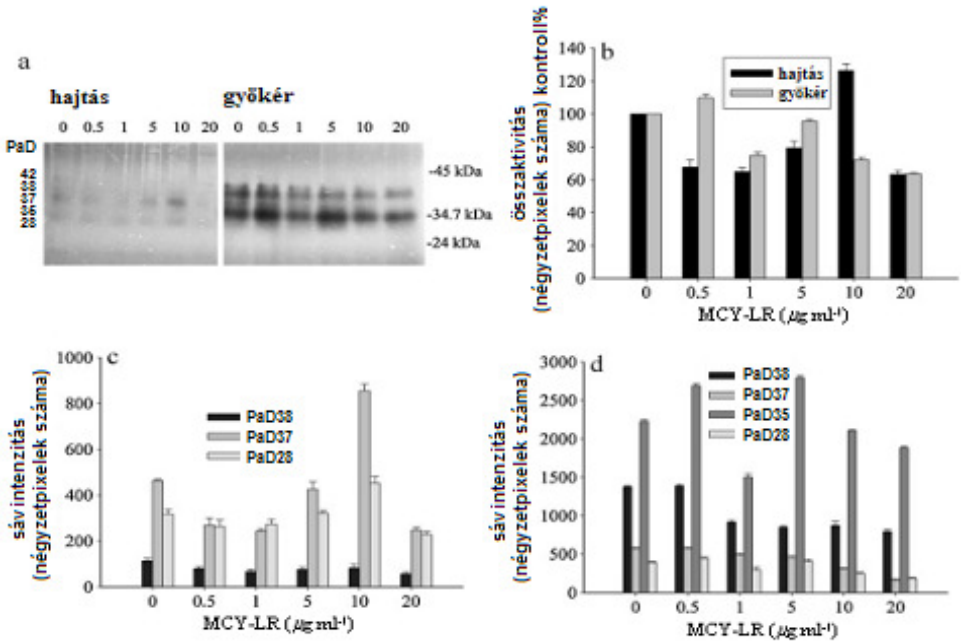


20. ábra Mikrocisztin-LR kezelés hatása a *P. australis* tengelyszerveinek ssDNáz enzim mintázatára a kezelés 10. napján.
(a) A hajtás és a gyökér kivonatok izoenzim-mintázata 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitású géleken. A nagybetűk jelzik a detektált izoenzimeket, a számok mutatják a kezelések során alkalmazott MCY-LR koncentrációkat. ***(b)*** MCY-LR hatása a gyökér és hajtás kivonatainak ssDN-áz enzimek összaktivtására. ***(c)*** MCY-LR hatása a hajtás PaD38-PaD28 izoenzimeinek aktivitására. ***(d)*** MCY-LR hatása a gyökér PaD38-PaD28 izoenzimeinek aktivitására.

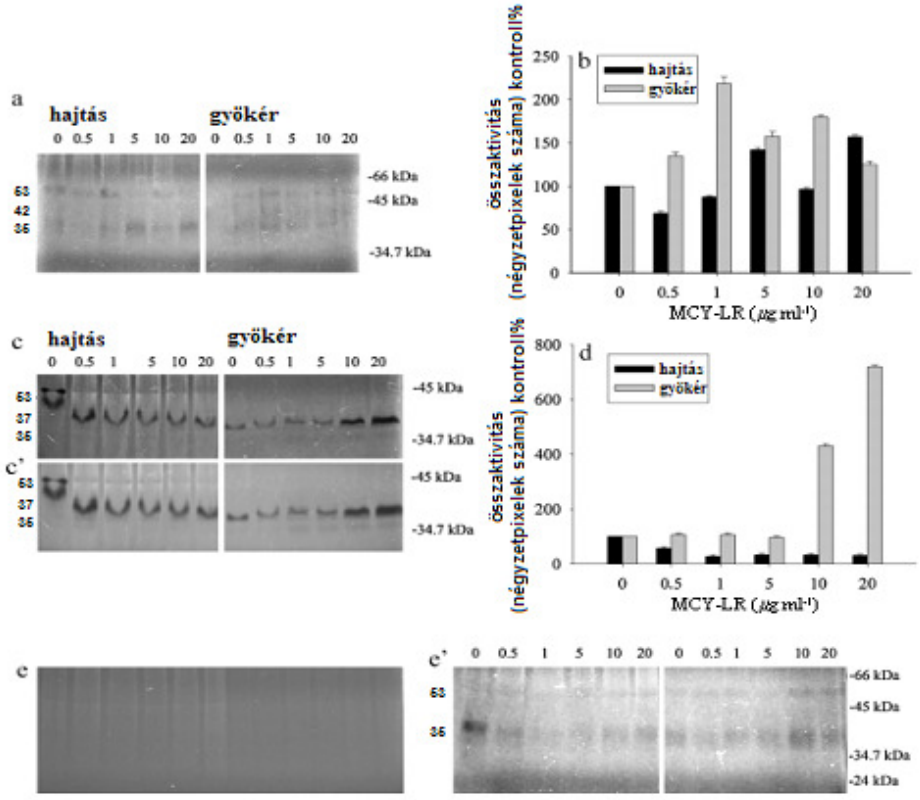
20 napos MCY-LR kezelést követően az össz-ssDN-áz aktivitás gátolva volt a hajtásokban, kivéve 10 μg ml^{-1} MCY-LR koncentrációnál, ami átmeneti növekedést indukált (21. a, b ábrák).

A gyökereknél 1-20 μg ml^{-1} MCY-LR-el történő kezelés gátolta az ssDN-áz izoenzimek aktivitását (21. a, b ábrák). Ezen aktivitás-változásokért a PaD38, PaD37, PaD35 és PaD28 izoenzimek voltak felelősek (21. d ábra).

Noha a 10 napos MCY-LR kezelések gátolták a dsDN-áz izoenzimek aktivitását a hajtásokban és emelte a gyökerekben, de ezek a változások csak hosszú inkubálási idő után voltak kimutathatóak (22. e' ábra). 24 órás inkubálást követően nem detektáltunk dsDN-áz aktivitást a 20 napos kontroll és cianotoxinnal kezelt növényeknél (22. e ábra).



21. ábra Mikrocisztin-LR kezelés hatása a *P. australis* tengelyszerveinek ssDNáz enzim mintázatára a kezelés 20. napján.
(a) A hajtás és a gyökér kivonatok izoenzim-mintázata 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitású géleken. A nagybetűk jelzik a detektált izoenzimeket, a számok mutatják a kezelések során alkalmazott MCY-LR koncentrációkat. ***(b)*** MCY-LR hatása a gyökér és hajtás kivonatainak ssDN-áz enzimek összaktivitására. ***(c)*** MCY-LR hatása a hajtás PaD38, PaD37 és PaD28 izoenzimeinek aktivitására. ***(d)*** MCY-LR hatása a gyökér PaD38-PaD28 izoenzimeinek aktivitására.



22. ábra A mikrocisztin-LR kezelés idő-, és koncentráció-függő hatása a *P. australis* tengelyszerveinek dsDN-áz izoenzim mintázatára.
(a) MCY-LR-el kezelt növények hajtás és a gyökér kivonatai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitású géleken, 5 napos kezelés után. A gélek inkubálása 24 órán át, Tris-HCl (pH 6,8) pufferben történt. A nagybetűk jelzik a detektált izoenzimeket, a számok mutatják a kezelések során alkalmazott MCY-LR koncentrációkat. ***(b)*** Az 5 napos MCY-LR kezelés hatása a hajtás és gyökér dsDN-áz enzimek összaktivitására 24 órás inkubálás után. ***(c* és *c')*** MCY-LR-el kezelt növények hajtás és a gyökér kivonatai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitású géleken, 10 napos kezelés után (**c**: 24h inkubálás; **c'**: 120h inkubálás). ***(d)*** A 10 napos MCY-LR kezelés hatása a hajtás és gyökér dsDN-áz enzimek összaktivitására 24 órás inkubálás után. ***(e* és *e')*** MCY-LR-el kezelt növények hajtás és a gyökér kivonatai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitású géleken, 20 napos kezelés után (**e**: 24h inkubálás; **e'**: 168h inkubálás).

Összegezve a nád nukleáz izoenzimekre vonatkozó eredményeinket elmondható, hogy a MCY-LR hatása a nukleáz izoenzimek aktivitására „kor-és szerv"-függő. Így például a 10 napos kezelésnél, az ssDN-áz izoenzimek aktivitása általánosságban gátolva volt a hajtásokban, azonban a gyökerekben változatlan maradt (20. ábra). „Szerv-függő" stressz válaszokról olvashatunk Sivók és munkatársai (1977) egy korábbi tanulmányában, ahol leírták, hogy az abszcizinsav búza levelekben növelte a

nukleázok aktivitását, de a gyökerekben nem történt változás. Újabb tanulmányokban ezt a változást mutatta a szárazságstressz, amely növelte a különböző nukleáz izoenzimek aktivitását karfiol csíranövények kotiledonjaiban és leveleiben (Leśniewicz és mtsai. 2010). Az eltérő MCY-LR koncentrációk magyarázhatják a nád különböző szerveinek (hajtás, gyökér) válaszait, amit Pflugmacher és munkatársai (2001) is bemutattak. MCY-LR jelenlétében a nád gyökér növekedése érzékenyebbnek bizonyult, mint a hajtás növekedése (Máthé és mtsai. 2007). A változások összefüggésben vannak a MCY-LR kezelések időtartalmával is. Rövid, 5 napos kezelési időben az ssDN-áz aktivitások emelkedtek. 10 napos kezelés során a hajtásban csökkentek, a gyökérben nem változtak az aktivitások. A 20. napon gátló hatást figyelhettünk meg mind a két szervben.

Valamennyi nukleáz izoenzim aktivitásának változása a MCY-LR hatására, a gélek 24 órás inkubálását követően következett be. A kontroll minták nukleáz izoenzim mitázatához viszonyítva néhány enzim csak a MCY-LR kezelések során volt detektálható. Azt találtuk, hogy a PaD38-PaD28 jelölésű izoenzimek a legérdekesebbek, amelyek aktivitás változásai összefüggésben vannak a MCY-LR jelenlétével. A legtöbb nukleáz enzim molekulatömege 31 és 54 kDa közé esik (Wilson 1975, Wood és mtsai. 1998). A 28-32 kDa izoenzim (PaD28 jelzésű), amely csak ssDN-áz izoenzim aktivitást mutatott, összehasonlítható az árpa 31 kDa molekulatömegű izoenzimével (Yen és Baenziger 1993). Az általunk detektált PaD35 izoenzim (35-38 kDa) pedig az árpa levél szeneszcenciája során indukálódott 36,5 kDa molekulatömegű nukleáz enzimmel vethető össze (Wood és mtsai. 1998). A PaD35 izoenzim aktivitás-emelkedést mutatott rövid időtartalmú MCY-LR kezelés hatására (19. ábra). Ezen adatok alapján az általunk detektált 35-38 kDa molekulatömegű nukleáz izoenzimek biotikus és abiotikus stresszek által indukálhatók. Azonban, a különböző fajok nukleáz izoenzimeinek egymással történő összehasonlítását körültekintően kell kezelni, mert a különböző módszerek alkalmazása félrevezető eredményekhez vezethetnek. Számos növényi nukleáz glikoprotein természetű, vannak, amelyek több polipeptid láncból is állnak, ezért a lehetséges enzimatikus aktivitással rendelkező proteolitikus hasítási termékeik további pontatlanságokat okozhatnak az aktivitási gélek mintázatainak az összehasonlításában. A 38-41 kDa molekulatömegű PaD38 jelzésű izoenzim (6. táblázat) összevethető a *Zinnia*-ban trachea differenciálódás során detektált ZEN1 nukleáz enzimmel, amely a 40-43 kDa molekulatömegű nukleáz enzim családhoz tartozik (Aoyagi és mtsai. 1998). Azonban, a *Zinnia* nukleáza eltérő tulajdonságú, mint a PaD38 jelű izoenzimek, mivel az egy Zn^{2+} függő S1-típusú nukleáz (Aoyagi és mtsai. 1998).

A vizsgált rendszerben figyelemreméltó a 37-39 kDa molekulatömegű (PaD37) izoenzim természete. 10 napos növénykultúrában detektálható a

PaD37 jelű enzim dsDN-áz aktivitása, míg az 5 és 20 napos növénykultúráknál az enzim aktivitása nem volt kimutatható. A hajtásokban a MCY-LR gátolta a PaD37 izoenzim dsDN-áz aktivitását, amíg a gyökerekben a magas cianotoxin koncentrációknál (10-20 μg ml^{-1}) nőtt az enzim (PaD37) aktivitása (22. c, d ábrák). Ezzel szemben a PaD37 izoenzim ssDN-áz aktivitása a hajtásban alacsonynak bizonyult, és átmeneti növekedést láthattunk a gyökérben 10 napos MCY-LR kezelés hatására (20. ábra). Az ss- és dsDN-áz aktivitásaiban detektálható különbségeket okozhatják a MCY-LR indukálta indirekt változások az enzim aktív centrumának komformációjában. Ez azonban nem magyarázza a MCY-LR ellentétes hatásait a gyökerekben és a hajtásokban. Habár a PaD37 (37-39 kDa) izoenzim molekulatömege hasonló a búza leveleinek nukleáz (Blank és McKeon 1989) és az *Arabidopsis*-ból izolált 38 kDa molekulatömegű glikoprotein természetű enzimeihez (Pérez-Amador és mtsai 2000), mégis különbözik ezektől az enzimektől, mert a búza és az *Arabidopsis* enzimek nem mutattak dsDN-áz aktivitást.

A cianotoxin kezelések eredményei alapján megállapítható, hogy a MCY-LR képes megvátoztatni a nád nukleáz izoenzimeinek aktivitását. Ennek magyarázatát a szóban forgó izoenzimeket kódoló gének azonosítása után, azok expresszió változása alapján lehet eldönteni.

Ismert, hogy a DNS javításában és a sejthalálban részt vevő nukleázok aktivitásának emelkedése kíséri az oxidatív stressz indukálta DNS sérüléseket (Lloyd és Linn 1993, Stein és Hansen 1999). Különböző növények nukleáz enzimeiről tudott, hogy részt vesznek a programozott sejthalál szabályozásában. Tipikus példák a *Zinnia*-ban a trachea elemek differenciálódása során létrejövő ZEN1, ZEN2 és ZEN3 gének géntermék (Pérez-Amador és mtsai. 2000). A mikrocisztinek hatására bekövetkező oxidatív stressz jól dokumentálható a vízi makrofitonokban és a modell növényi rendszerekben (Chen és mtsai. 2004, Yin és mtsai. 2005, Pflugmacher és mtsai. 2007). Korábbi eredményeink bizonyították, hogy az MCY-LR mustár növényekben az ssDN-ázok aktivitásának a növekedését idézi elő (M-Hamvas és mtsai. 2003). A *Phragmites australis* növényekben MCY-LR indukálta peroxidáz-aktivitás növekedés detektálható (Molnár és mtsai. 2000). Jelen eredményeink bizonyítják, hogy az ssDN-áz és dsDN-áz aktivitásokban is változások detektálhatók (Jámbrik és mtsai. 2011). Oxidatív stressz során az ssDN-áz aktivitások cianotoxin indukált változásai a sejthalál mechanizmusok és a DNS javítás folyamatának a kezdetére figyelmeztet. Különböző nukleázok aktivitása rövid cianotoxin kezelési idő alatt megemelkedik, ezzel párhuzamosan kromatinkondenzáció játszódik le (Máthé és mtsai. 2009). A hosszútávú (20 napos) kezelések hatását a nukleáz enzimek aktivitására (21. ábra, 6. táblázat) magyarázhatjuk a MCY-LR hatására indukált sejthalállal vagy nekrózissal, amit Máthé és mtsai. (2007) szövettani metszetekkel/adatokkal bizonyítottak. A MCY-LR-ről bizonyított,

hogy különböző állati sejtekben DNS létra kialakulását idézi elő (McDermott és mtsai. 1998, Mankiewicz és mtsai. 2001). A kezelések során a *P. australis* növényekben kromatin kondenzációt tapasztaltunk, de DNS létrát nem láttunk (nem közölt eredmények). Máthé és munkatársai (2009) leírták, hogy a MCY-LR kezelt *P. australis* gyökerekben gátolt az 1 és 2A típusú protein foszfatázok aktivitása, ami ahhoz vezethet, hogy megváltozik a sejtek struktúrája és funkciója. A MCY-LR a nádnövényekben általános stresszválaszokat indukál, úgymint; a sejtfalak lignifikációja, kromatin kondenzáció, enzimatikus aktivitás-változások, végül a mikrotubuláris rendszer depolimerizációja, sejthalál, nekrózis (Máthé és mtsai. 2007, 2009, nem közölt eredmények). Világosan láthattuk, hogy a nád gyökerekben a mikrotubuláris depolimerizáció közvetlenül összefügg a MCY-LR által gátolt protein defoszforilációval (Máthé és mtsai. 2009).

Eddig nem ismert olyan szakirodalmi adat, amely arra utalna, hogy a nukleázok és proteázok működésének szabályozásában a fehérje foszforiláció és defoszforiláció szerepet játszana. A *P. australis*-on végzett sokrétű megfigyelések eredményeinek alapján azt mondhatjuk, hogy a MCY-LR, mint protein-foszfatáz gátló nem közvetlenül befolyásolja a nukleázok aktivitását, de ugyanakkor a MCY-LR, mint protein-foszfatáz gátló befolyásolhat olyan szignál transzdukciós útvonalakat, amelyek többek között a hidrolázok működését is befolyásolják.

4.2. A cilindrospermopszin hatásainak vizsgálata a kísérleti növényekben

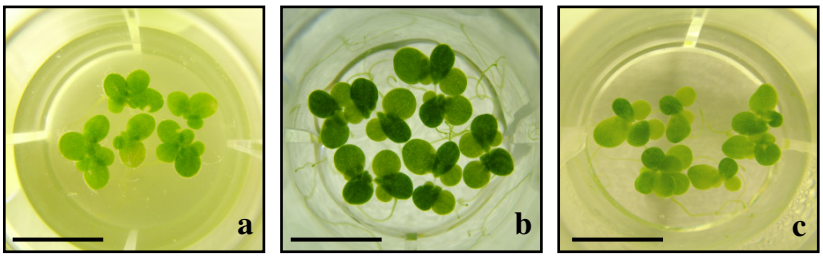
A mikrocisztinekkel szemben a cilindrospermopszinok növényekre gyakorolt hatásairól jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre. Elsőként kutatóink írták le, hogy a növények növekedését gátló hatással rendelkező toxinról van szó (Vasas és mtsai. 2002). A CYN-vízinövények lehetséges kapcsolataira vonatkozó kísérletek a *Hydrilla verticillata, Phragmites australis*, *Ceratophyllum demersum*, *Lemna minor*, *Wolffia arrhiza* fajok bevonásával csupán néhány éve kezdődtek. Ezért axenikus növényi tesztrendszereink és a MCY-LR vizsgálatok tapasztalaitainak felhasználásával célul tűztük ki, hogy a CYN által kiváltott növényi stresszválaszok elemzésével új adatokkal szolgáljunk a CYN hatásmechanizmusára vonatkozóan.

4.2.1. A cilindrospermopszin növekedésgátló hatása

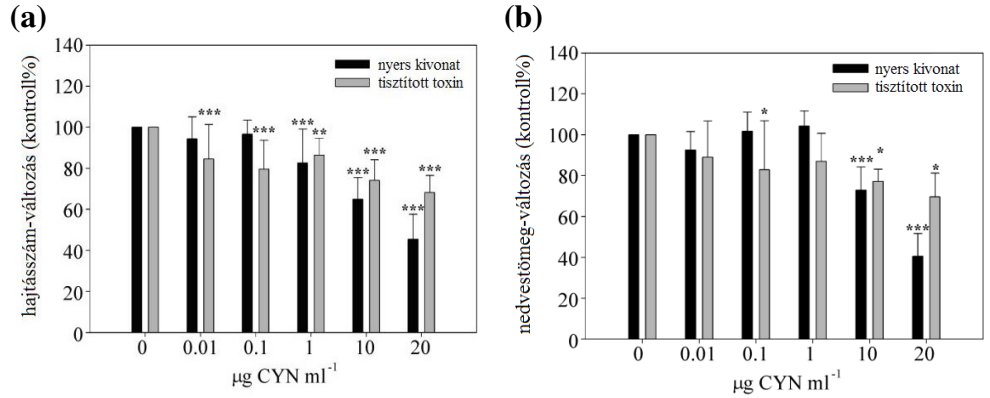
Kísérleteinkben a tápoldatokhoz adagolt *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészet liofilizátumából készült CYN tartalmú extraktum, valamint a tisztított CYN toxikus hatásait vizsgáltuk a *Lemna minor* és a *Wolffia arrhiza* vízinövényeknél. Megállapítottuk, hogy a kezelések során alkalmazott cianotoxin képes befolyásolni a vízinövények növekedését, szaporodását.

A tesztnövények érzékenysége a cilindrospermopszint termelő cianobaktérium nyers kivonatával szemben jól összevethető volt a tisztított CYN által kifejtett hatással. Mind a CYN tatalmú nyers kivonat, mind a tiszta CYN a *L. minor* és a *W. arrhiza* növekedésgátlását okozta. A kísérletek 5. napján a nedves tömegben és a hajtásszámban egyaránt szignifikáns csökkenést figyeltünk meg. Nem volt jelentős különbség a nyers kivonat és a tisztított cianotoxin növekedésgátló hatásai között (23. és 24. ábrák).

A ***Lemna minor*** esetében a nyers kivonat és a tisztított toxin 1-20 µg ml^{-1} koncentrációknál a növekedésben szignifikáns csökkenést okozott, amit a hajtásszám eredményei mutatnak (23. a-c ábrák).



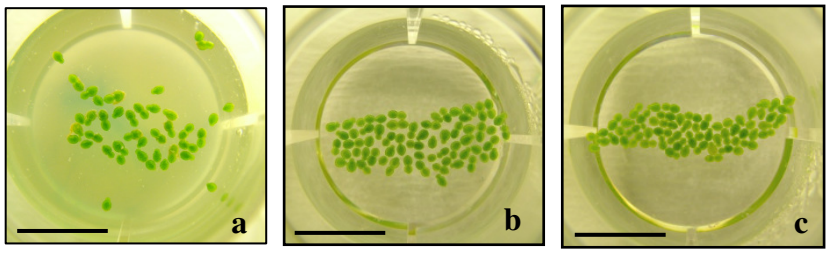
23. ábra Cilindrospermopszin hatása a *Lemna minor* növekedésére (a-c) a kezelés 5. napján.
(a) 20 µg ml^{-1} CYN tartalmú nyers kivonattal kezelt növények, **(*b*)** kontroll növények, ***(c)*** tisztított CYN-nel (20 µg ml^{-1}) kezelt növények. Lépték: 1 cm



24. ábra CYN kezelés hatása a *Lemna minor* hajtásszám- *(a)* és nedvestömeg-változására *(b)* a kezelés 5. napján.
Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*; ***p<0,01* és ****p<0,001*

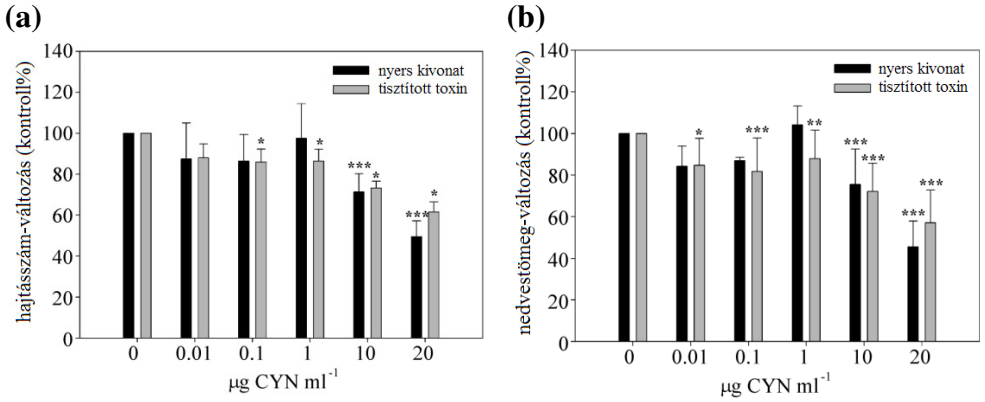
A tisztított cianotoxinnal történő kezelés során ezt a szignifikáns csökkenést már 0,01 µg ml^{-1} cianotoxin koncentrációtól tapasztalhattuk (24. a ábra). A *L. minor* nedves tömege kevésbé érzékeny paraméternek bizonyult a hajtásszámmal szemben (24. b ábra). A nyers kivonattal történő kezelés szignifikáns különbséget a kontroll és a CYN kezelt növények nedves tömege között 10 és 20 µg ml^{-1} CYN koncentrációknál (24. b ábra) okozott. A tisztított CYN a nedves tömegben szignifikáns változásokat indukált 0,1; 10; 20 µg ml^{-1} CYN koncentrációknál (24. b ábra).

A ***Wolffia arrhiza*** CYN hatására bekövetkező növekedésgátlását a 25. a-c és 26. ábrák mutatják be.



25. ábra Cilindrospermopszin hatása a *Wolffia arrhiza* növekedésére (a-c) a kezelés 5. napján.
(a) 20 µg ml^{-1} CYN tartalmú nyers kivonattal kezelt növények, ***(b)*** kontroll növények, ***(c)*** tisztított CYN-nel (20 µg ml^{-1}) kezelt növények. Lépték: 1 cm

Abban az esetben, amikor nyers kivonatot alkalmaztunk a *Wolffia* kezeléseknél, mind a hajtásszám, mind a nedves tömeg szignifikánsan csökkent 10 és 20 µg ml^{-1} koncentrációk hatására (26. a, b ábrák). Ezzel szemben a tisztított CYN a hajtásszámnál már 0,1-20 µg ml^{-1} (26. a ábra), nedves tömegnél 0,01-20 µg ml^{-1} (26. b ábra) koncentrációknál okozott szignifikáns csökkenést.



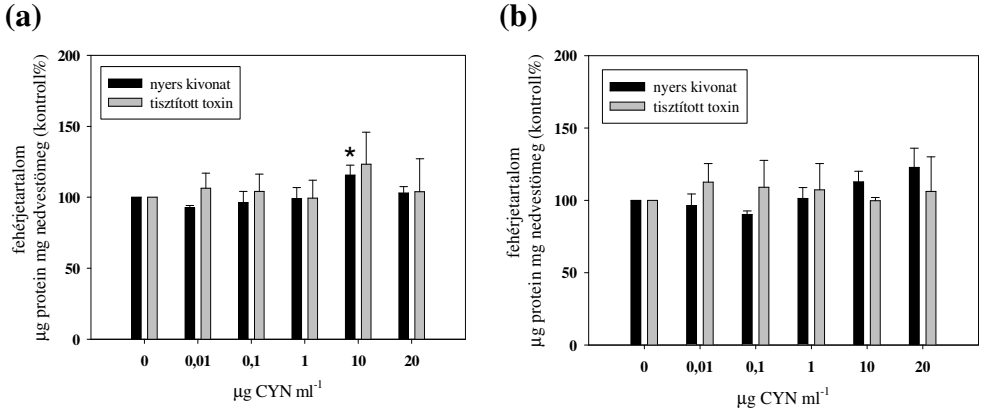
26. ábra CYN kezelés hatása a *Wolffia arrhiza* hajtásszám- *(a)* és nedvestömeg-változására *(b)* a kezelés 5. napján.
Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*; ***p<0,01* és ****p<0,001*

A két *Lemnaceae faj* növekedésében közel azonos érzékenységet mutatott a CYN kezelésekre. A nedves tömegek alapján például a 20 µg ml^{-1} CYN tartalmú nyers cianobaktérium kivonattal kezelt *L. minor* és a *W. arrhiza* növekedése 60% illetve 54%-al maradt el a kontroll értékeitől. Ezek az értékek a tisztított CYN kezeléseknél 30% és 43% (24. b és 26. b ábrák). Hasonló gátlásbeli arányok mérhetők a hajtásszámok alapján is (24. a és 26. a ábrák). A CYN tartalmú *A. ovalisporum* nyers kivonatok növekedésgátló hatása felülmúlta a tisztított CYN hatását. Analitikai méréseink alapján a nyers toxikus kivonataink nem tartalmaznak egyéb CYN izoformákat (Vasas és mtsai. 2002), de egyéb másodlagos anyagcseretermékek, Gram-negatív sejtfalanyagok ebben az esetben is erősíthetik a toxinok kedvezőtlen hatásait (4. ábra).

4.2.1.1. A cilindrospermopszin kezelések hatására bekövetkező változások a fehérjetartalomban

A CYN protein-szintézis gátló a növényi és az állati sejtekben (Froscio és mtsai. 2003, Metcalf és mtsai. 2004, Terao és mtsai. 1994). Kísérleteinkben a legnagyobb CYN koncentráció (20 µg ml^{-1}) sem okozott csökkenést az egységnyi nedves-tömegre vonatkoztatott fehérjetartalomban (27. ábra). Ez azonban nem zárja ki a *de novo* proteinszintézis gátlásának lehetőségét.

A két vízinövény nedves tömegre vonatkoztatott fehérjetartalmában szignifikáns különbséget a *L. minor* esetében, a nyers kivonattal történő kezelés során 10 µg ml^{-1} toxinkoncentrációnál tapasztaltunk (27. a ábra). A fehérjetartalom a CYN-nel kezelt növényekben nem mutatott csökkenést, inkább enyhe növekedést láthattunk mindkét vizsgált vízinövényben (27. a, b ábrák).



27. ábra CYN kezelés hatása a *Lemna minor (a)* és *Wolffia arrhiza (b)* fehérjetartalmára a kezelés 5. napján.
Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

4.2.1.2. A cilindrospermopszin hatása a proteáz izoenzimek aktivitására

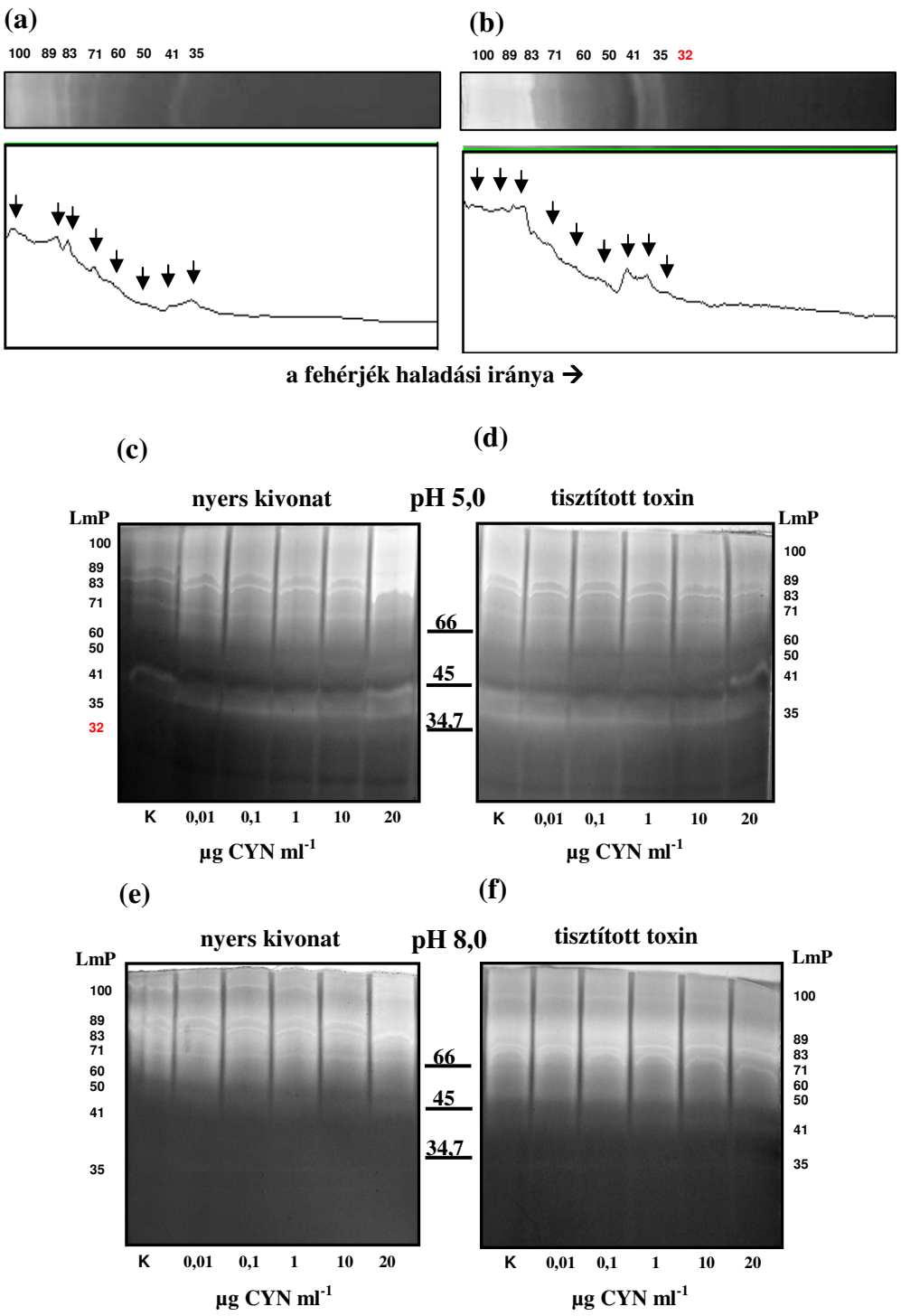
A CYN kezelések sejtszintű változásokat is indukálnak, amit a poliakrilamid-aktivitás géleken detektálható proteáz enzimmintázat változások bizonyítanak.

Zselatin tartalmú poliakrilamid géleken detektáltuk a tisztított CYN, valamint az *A. ovalisporum* CYN tartalmú nyers kivonatának a hatásait a *L. minor* és a *W. arrhiza* proteáz izoenzimeinek az aktivitására (28. és 30. ábrák). *L. minor* kivonatok esetében 9 (28. b ábra; 7. táblázat: LmP100-LmP32 jelölésű fehérjék), a *W. arrhiza* kivonatokban 8-10 zselatinbontó fehérjesávot mutattunk ki (WaP94-WaP41; 30. a, b, c, d, e, f ábrák; 8. táblázat).

A kontroll ***Lemna minor*** növények zimogramjain négy, mind a savas (pH 5,0), mind a bázikus (pH 8,0) tartományban magas aktivitást mutató proteáz sáv látható (28. a ábra: LmP100, LmP89, LmP83 és LmP71 jelűek). Ez összhangban van korábbi eredményeinkkel (10. ábra). A CYN-nel történő kezelések ezen enzimek aktivitásában növekedést indukáltak. A tisztított CYN indukáló hatása „átmeneti" volt, 0,01-1 µg ml^{-1} cianotoxin a kezelés 5. napján emelte az aktivitásukat, de az ennél magasabb toxinkoncentráció már nem idézett elő sziginifikáns emelkedést. Ez nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a magasabb cianotoxin koncentrációval kezelt növényekben már a 2. vagy 3. napon jelentkezne ezeknek az enzimeknek az aktivitásemelkedése, ami a 4. vagy 5. napra „lecseng". Ezért fontos hangsúlyoznunk, hogy eredményeink a kezelés 5. napjára jellemző állapotot tükrözik. Ezeknek az enzimeknek a legnagyobb aktivitását a CYN tartalmú, nyers kivonattal kezelt növényeknél 20 µg ml^{-1} koncentrációnál tapasztaltuk (28. c, d, e, f ábrák; 7. táblázat).

Az 50 és 70 kDa molekulatömeg mérettartományba tartozó proteáz enzimek (LmP60 és LmP50 jelölésűek) bázikus körülmények között nagy aktivítást mutattak. Savas körülmények között inkubált géleken azt tapasztaltuk, hogy ezeknek az izoenzimeknek az aktivitása a nyers kivonattal kezelt növényekben indukálódott.

A géleket savas pH-n inkubálva, az LmP41 és LmP35 enzimek nagy aktivitást mutattak a kontroll és a CYN kezelt növényekben. Ezen enzimek érzékenyek voltak a CYN-re, különösen az LmP35, amelynek aktivitása nőtt a nyers kivonatos kezelések során, de nem változott, vagy kissé csökkent a tisztított CYN hatására, aktivitását tehát nem a nyers kivonat CYN tartalma serkentette. Lúgos pH-n inkubált géleken az LmP41 és LmP35 enzimek aktivitása a kontrollhoz viszonyítva nem változott. **A CYN tartalmú nyers kivonattal történő kezelés egy új savas proteáz (LmP32) megjelenését is indukálta (28. a, b, c ábrák; 7. táblázat).**



28. ábra CYN kezelés hatása a *Lemna minor* proteáz izoenzim mintázatára a kezelés 5. napján (pH 5,0 és pH 8,0).

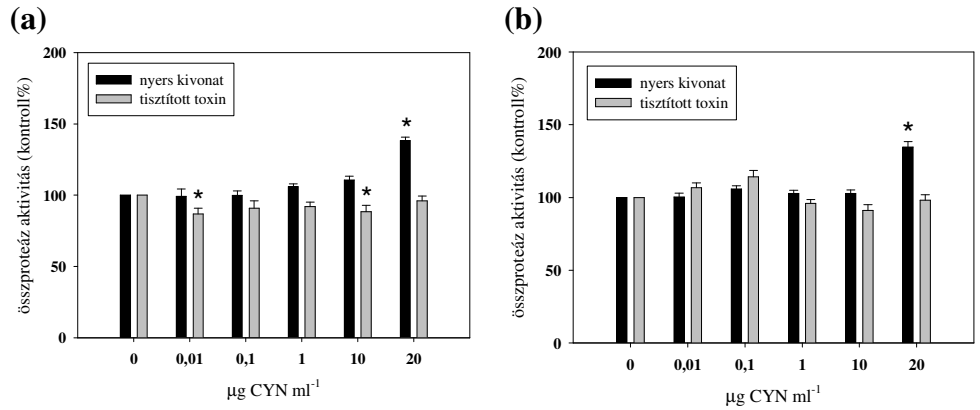
(a) a kontroll minták; ***(b)*** a 20 µg ml^{-1} CYN tartalmú extraktummal kezelt növények karakterisztikus sávjai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitás gélen (pH 5,0); ***(c, d, e, f)*** a kontroll és a CYN kezelt növények zselatin zimogramjai (a római számok a detektált izoenzimeket, az arab számok a kísérletekben alkalmazott cianotoxin koncentrációkat jelöli, µg ml^{-1}). Egy kísérlet reprezentatív gélje.

7. Táblázat Az *Aphanizomenon ovalisporum* nyers (CYN tartalmú) kivonatok és a tisztított CYN hatása a *Lemna minor* proteáz izoenzim-mintázatára.

izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 5,0			pH 8,0		
		nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt	nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt
LmP100	100±3	↑	++	NV	↑	+	NV
LmP89	89±3	↑	+	↑ [0,01-1]	↑	++	↑ [0,01-1]
LmP83	83±1	↑	++	↑ [0,01-1]	↑	++	↑ [0,01-1]
LmP71	71±2	↑	+	↑ [0,01-1]	↑	+	↑ [0,01-1]
LmP60	60±2	↑	+	↓	NV	++	NV
LmP50	50±3	↑	+	↓	NV	++	NV
LmP41	41±3	NV	++	NV	NV	+	NV
LmP35	35±2	↑	++	↓	NV	+	NV
LmP32	32±2	↑	-	-	-	-	-

+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ CYN okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; ↓ CYN okozta csökkenés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [0,01-1] a növekedés vagy csökkenés a 0,01-1 µg ml^{-1} koncentráció tartományban jellegzetes; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

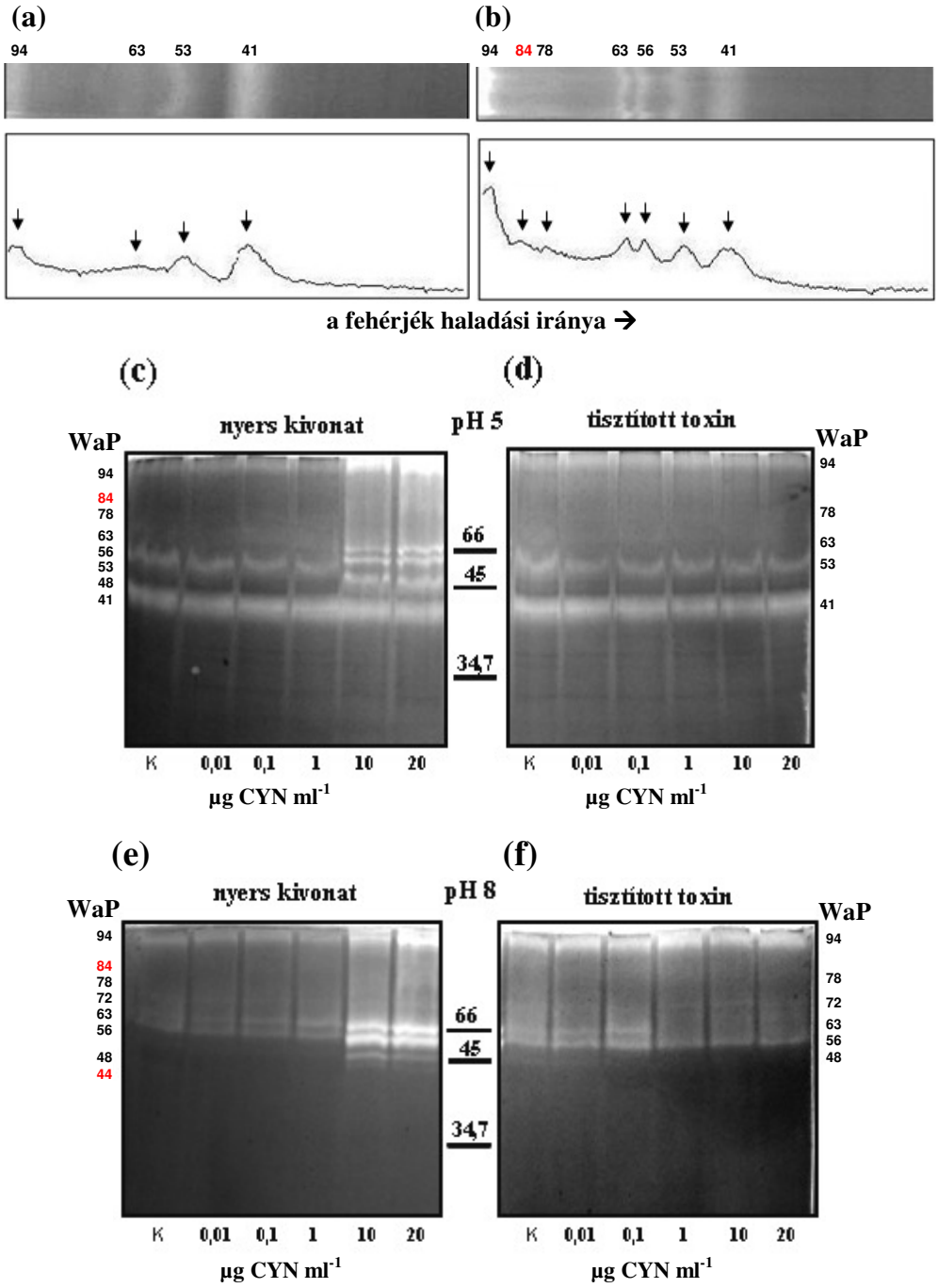
A *L. minor* esetében a CYN tartalmú nyers kivonat a savas és a bázikus proteázok összaktivitásának szignifikáns növekedését indukálta.
A tisztított CYN csak bázikus körülmények között, 0,01 és 0,1 µg ml^{-1} cianotoxin koncentrációknál indukált, enyhe, nem szignifikáns emelkedést, az LmP89, LmP83 és LmP71 aktivitásemelkedésének köszönhetően (29. a, b ábrák). Ezek az enzimek CYN hatására savas pH-n inkubált géleken is aktivitás-emelkedést mutattak, de az LmP60, LmP50 és LmP35 egyidejű aktivitáscsökkenése az összproteáz aktivitás szignifikáns csökkenését okozta (29. b ábra, 7. táblázat).



29. ábra CYN kezelések hatása a *Lemna minor* összproteáz aktivitásra a kezelés 5. napján.
(a) pH 5,0-ön indukálódott összproteáz aktivitás, ***(b)*** pH 8,0-on indukálódott összproteáz aktivitás. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

Kontroll ***Wolffia arrhiza*** kivonatokban a nagy molekulatömegű (>75 kDa) zselatinbontó proteázok közül pH-tól függően 1 vagy 2 enzimaktivitás detektálható (30. a ábra, 8. táblázat: WaP94 és WaP78). 10-20 µg ml^{-1} CYN koncentrációknál nyers kivonattal kezelt növényekben három (WaP94, WaP84, WaP78), a tisztított cianotoxinnal kezelteknél két izoenzimet (WaP94, WaP78) mutattunk ki ebben a molekulatömeg tartományban mindkét pH-n (30. ábra, 8. táblázat).

A 75 kDa alatti molekulatömegű proteázok aktivitása is változó a pH és kezelés függvényében. Ami a legszembetűnőbb a gélképek táblázatba foglalt adataiból (8. táblázat), hogy ezeknek az enzimeknek az aktivitásemelkedése a nyers kivonattal kezelt növényekben volt jellemző (30. ábra, 8. táblázat). Ezek a változások a savas pH-n inkubált géleken a legszembetűnőbbek (30. a, b ábrák), az egyik enzim (WaP53), a kontroll, a tisztított CYN-nel és a nyers kivonattal kezelt növényekben is jellemző, de ez utóbbi esetében csak 0,01-1 µg ml^{-1} CYN koncentráció közé eső tartományban figyelhető meg. A tisztított CYN kezeltekben aktivitása csökkent. Ez az enzim kizárólag savas pH-n, míg a WaP72 csak lúgos pH-n működött. Ez utóbbi aktivitását a CYN kezelés nem befolyásolta.



30. ábra CYN kezelés hatása a *Wolffia arrhiza* proteáz izoenzim mintázatára a kezelés 5. napján (pH 5,0 és pH 8,0).

(a) a kontroll és minták ***(b)*** az *A. ovalisporum* 20 µg ml^{-1} CYN tartalmú extraktumával kezelt növények karakterisztikus sávjai 10%-os SDS-poliakrilamid aktivitás gélen (pH 5,0-ön) ***(c, d, e, f)*** a kontroll és a CYN kezelt növények zselatin zimogramjai (a római számok a

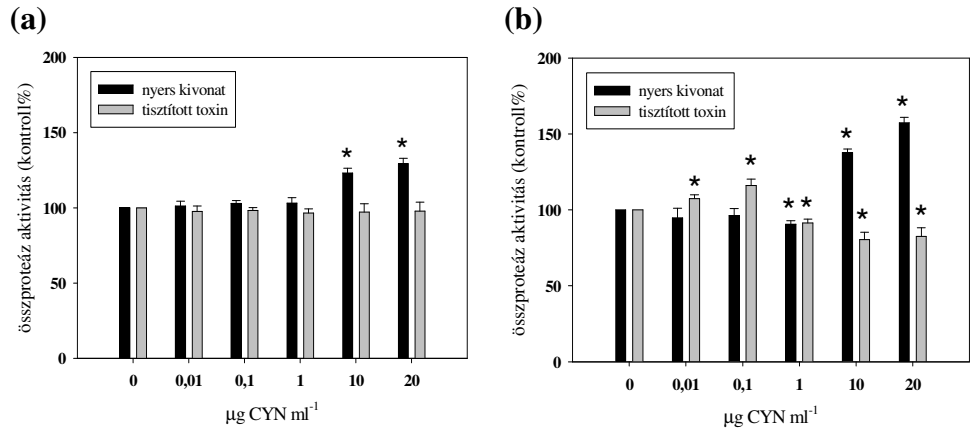
detektált izoenzimeket, az arab számok a kísérletekben alkalmazott cianotoxin koncentrációkat jelöli, µg ml^{-1}). Egy kísérlet reprezentatív gélje.

8. Táblázat Az *Aphanizomenon ovalisporum* nyers (CYN tartalmú) kivonatok és a tisztított CYN hatása a *Wolffia arrhiza* proteáz enzim-mintázatára.

izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 5,0			pH 8,0		
		nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt	nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt
WaP94	**94±4**	↑	**+**	NV	↑	**++**	NV
WaP84	**84±3**	↑	**-**	**-**	↑	**-**	**-**
WaP78	**78±2**	↑	**-**	↑	↑	**++**	NV
WaP72	**72±3**	**-**	**-**	**-**	NV	**+**	NV
WaP63	**63±3**	↑	**++**	NV	↑	**+**	↓ [10-20]
WaP56	**56±4**	↑	**-**	**-**	↑	**++**	↓ [10-20]
WaP53	**53±2**	↑ [0-1]	**+**	↓	**-**	**-**	**-**
WaP48	**48±1**	**+**	**-**	**-**	↑	**++**	↓
WaP44	**44±1**	**-**	**-**	**-**	↑	**-**	**-**
WaP41	**41±1**	NV	**+**	NV	**-**	**-**	**-**

+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ CYN okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; ↓ CYN okozta csökkenés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [0-1] a növekedés vagy csökkenés jellegzetes 0,1-1 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [10-20] a növekedés vagy csökkenés jellegzetes 10-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

Két enzimet savas pH-n csak a nyers kivonattal kezeltekben detektáltunk (WaP56, WaP48). Lúgos pH-n a kontroll mintákban is magas aktivitást mutattak, amit a nyers kivonat fokozott. A WaP63 enzim akivitása is csak nyers kivonattal történő kezelések hatására emelkedett (30. d ábra). **A WaP44 jelű enzim kizárólag lúgos pH-n, a CYN tartalmú nyers kivonattal (10 és 20 µg ml^{-1}) kezelt növényekből detektálható enzim (30. e ábra, 8. táblázat).** A tisztított CYN hatására csak átmeneti aktivitásemelkedést detektáltunk (WaP63 és WaP56 proteázok; 0,01 és 0,1 µg ml^{-1} CYN koncentrációtartományban; pH 8,0), egyébként a ≥72kDa proteázok aktivitását vagy nem befolyásolta, vagy csökkentette a CYN kezelés (30. f ábra, 8. táblázat).

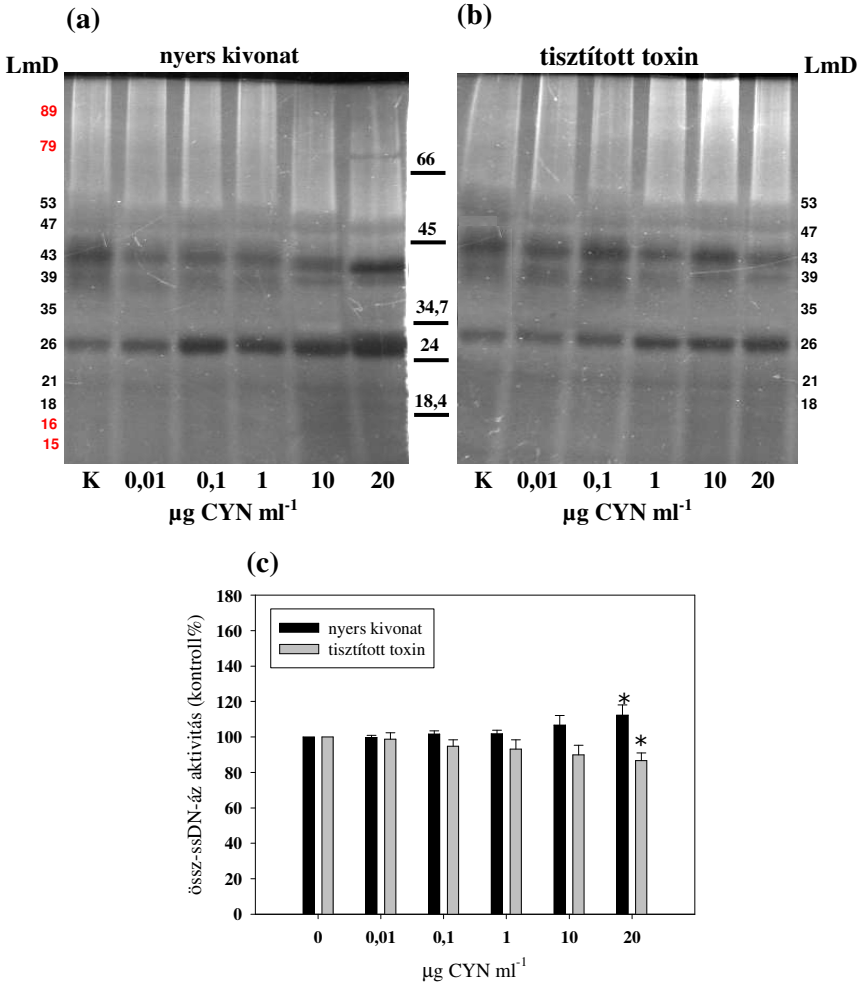


31. ábra CYN kezelések hatása a *Wolffia arrhiza* összproteáz aktivitásra a kezelés 5. napján.
(a) pH 5,0-ön indukálódott összproteáz aktivitás, ***(b)*** pH 8,0-on indukálódott összproteáz aktivitás. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. **p<0,05*

A nyers kivonattal kezelt *W. arrhiza* összproteáz aktivitása (pH 5,0 és pH 8,0) a legmagasabb koncentrációknál (10 és 20 µg ml^{-1} CYN) mutatott szignifikáns emelkedést.
A 0,01 és 0,1 µg ml^{-1} tisztított cianotoxinnal kezelt növényekben a bázikus proteázok összaktivitásának emelkedését mértük, míg az ennél nagyobb toxinkoncentrációk már szignifikáns csökkenést okoztak. Ez az átmeneti emelkedés a WaP63 és WaP56 enzimek aktivitás-emelkedésének tulajdonítható (30. f ábra, 31. b ábra; 8. táblázat). Savas körülmények között a kontroll és tisztított CYN kezelt növények kivonataiból detektált enzimek összaktivitásainak értékeiben nem mértünk szignifikáns különbséget (31. a ábra).

4.2.1.3. A cilindrospermopszin hatása az ssDN-áz enzimek aktivitására

A *L. minor* ssDN-ázainak aktivitásában változásokat detektáltunk mind a CYN tartalmú nyers extraktummal, mind pedig a tisztított CYN-nel történő kezelések során (32. ábra).



32. ábra CYN kezelés hatása a *Lemna minor* ssDN-áz aktivitás mintázatára a kezelés 5. napján (pH 6,8).
(a) az *A. ovalisporum* CYN tartalmú extraktumaival kezelt növények; ***(b)*** tisztított CYN-el kezelt növények. Egy reprezentatív kísérlet gélje; ***(c)*** a cianotoxin kezelések hatása a *Wolffia arrhiza* ssDN-áz aktivitásra (pH 6,8). Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között. *$p<0,05$. Egy kísérlet reprezentatív gélje.

A kontroll ***Lemna minor*** kivonatok esetében egyszálú DNS-t tartalmazó géleken nyolc izoenzimet (LmD53, LmD47, LmD43, LmD39, LmD35, LmD26, LmD21, LmD18) detektáltunk Ezek az izoenzimek a CYN

kezelések hatására is megjelentek, azonban aktivitásaik eltértek a kontroll növényeknél tapasztaltaktól (32. a ábra; 9. táblázat).

9. Táblázat Az *Aphanizomenon ovalisporum* nyers (CYN tartalmú) kivonatok és a tisztított CYN hatása a *Lemna minor* ssDN-áz enzim-mintázatára.

izoenzim	molekula tömeg (kDa)	pH 6,8		
		nyers kivonattal kezelt	kontroll	tisztított toxinnal kezelt
LmD89	89±2	↑ [10-20]	-	-
LmD79	79±1	↑ [10-20]	-	-
LmD53	53±2	NV	+	NV
LmD47	47±2	NV	+	NV
LmD43	43±1	↑ [20]	++	↓
LmD39	39±2	↓	++	↓
LmD35	35±2	NV	+	NV
LmD26	26±2	↑	++	↑
LmD21	21±1	↑	+	NV
LmD18	18±1	↑	+	NV
LmD16	16	↑ [10-20]	-	-
LmD15	15	↑ [10-20]	-	-

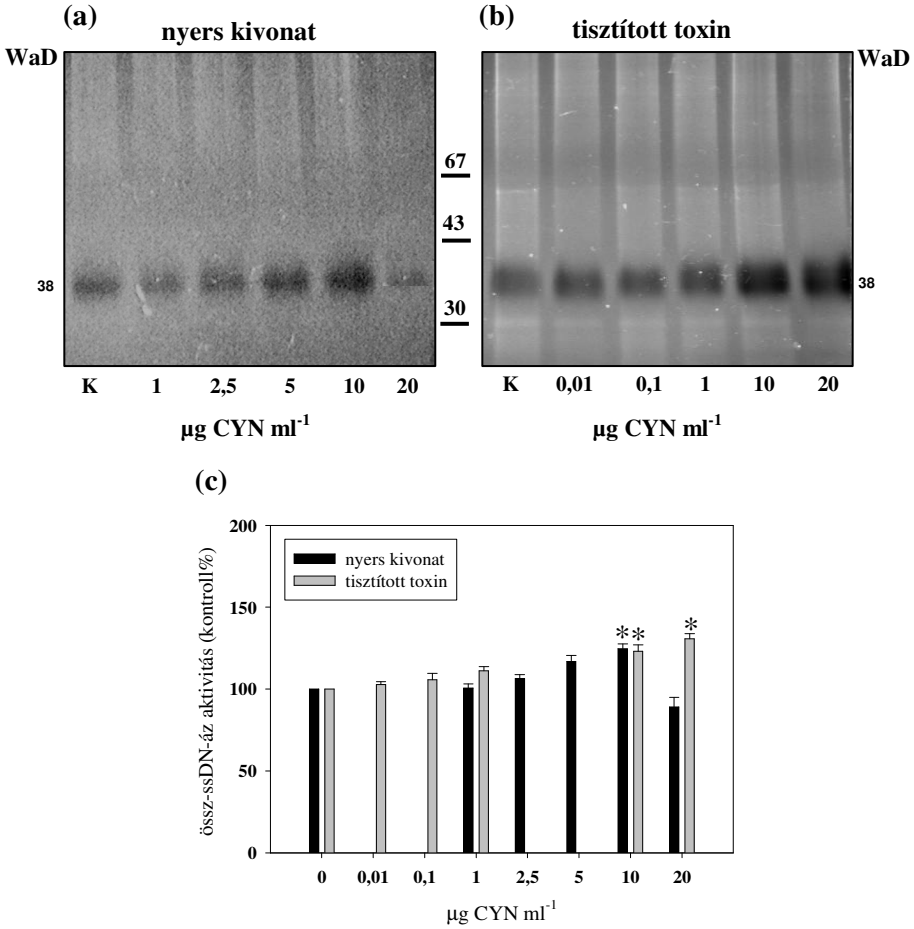
+ detektálható; **++** magas enzimaktivitás; **-** nem detektálható; ↑ CYN okozta növekedés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; ↓ CYN okozta csökkenés az enzim aktivitásban 0,01-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [10-20] a növekedés vagy csökkenés jellegzetes 10-20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; [20] a növekedés vagy csökkenés jellegzetes 20 µg ml^{-1} koncentráció tartományban; NV nem változik a kontrollhoz viszonyítva. A táblázat adatai 4 gél UVI-TEC® és CpAtlas® programmal történt értékelésének összesített eredményei.

A CYN tartalmú nyers kivonattal történő kezelések során, 10 és 20 µg ml^{-1} koncentrációknál jelentek meg az LmD89 és LmP79 jelzésű enzimek, emelkedő aktivitással (32. a ábra; 9. táblázat). Tisztított toxin hatására ezen enzimeket nem detektáltuk. Az LmD53 és LmD47 izoenzimek aktivitását a kezelések nem befolyásolták (32. a, b ábrák; 9. táblázat). A 43 kDa molekulatömegű izoenzim (LmD43) aktivitása nyers kivonatos kezelés hatására a toxinkoncentráció függvényében csökkenő tendenciát mutatott, azonban 20 µg ml^{-1} koncentrációnál aktivitása megnőtt (32. a ábra; 9.

táblázat). Tisztított CYN hatására az LmD43 specifikus aktivitásában csökkenő tendenciát mértünk (32. b ábra; 9. táblázat). A CYN tartalmú nyers extraktum és a tisztított CYN hatására az LmD39 jelölésű izoenzim aktivitásában csökkenést detektáltunk, az LmD35 jelű izoenzim aktivitása a kontrollhoz viszonyítva nem változott, az LmD26 izoenzim aktivitása pedig mindkét kezelés hatására egyaránt emelkedő tendenciát mutatott. Nyers kivonatos kezelés hatására az LmD21 és LmD18 izoenzimek aktivitása a toxinkoncentráció növekedésével arányosan emelkedő tendenciát mutatott, míg a tisztított cianotoxin hatására aktivitásuk a kontrollhoz viszonyítva nem változott. **Kizárólag CYN tartalmú nyers extraktummal történő kezelés hatására, 10 és 20 μg ml^{-1} koncentrációknál jelentek meg az LmD16 és LmD15 izoenzimek, amelyek aktivitásában emelkedő tendenciát detektáltunk (32. a, b ábrák; 9. táblázat).** Nyers extrakrummal történő kezelés hatására a 26 kDa molekulatömegű enzim hosszú inkubálási idő után dsDN-áz aktivitást is mutatott. Aktivitásában a toxinkoncentráció emelkedésével arányosan növekvő tendenciát mértünk. Tisztított CYN kezelt növényekben a 43 kDa moelekulatömegű enzim mutatott -hasonlóan hosszú inkubálást követően- dsDN-áz aktivitást. Az enzim dsDN-áz aktivitásában az ssDN-áz aktivitással megeggyező tendenciát detektáltunk.

Az ssDN-ázok össz-aktivitásában a CYN tartalmú nyers extraktum hatására emelkedő, míg a tisztított CYN kezelések során csökkenő tendenciát mutattak. Mindkét kezelés során szignifikáns változást 20 μg ml^{-1} koncentrációnál mértünk (32. c ábra).

A ***Wolffia arrhiza*** CYN-nel történő kezelése során a MCY-LR kezeléseknél leírt ssDN-áz enzimmintázatot detektáltuk (33. ábra). CYN tartalmú nyers extraktummal kezelve a *W. arrhiza* növényeket egy 38 kDa molekulatömegű enzimet detektálhattunk, amelynek aktivitásában enyhén emelkedő tendencia figyelhető meg, szignifikáns változást a 10 μg ml^{-1} koncentrációnál mértünk. 20 μg ml^{-1} toxinkoncentrációnál feltételezhetően a sejtek pusztulásával a nukleáz aktivitása már jelentősen lecsökkent (33. a, c ábrák, Jámbrik és mtsai. 2009). A tisztított CYN kezeléseknél is detektált 38 kDa molekulatömegű izoenzim aktivitása a toxinkoncentráció emelkedésével arányosan növekvő tendenciát mutatott, szignifikáns változást 10-20 μg ml^{-1} toxinkoncentrációknál detektáltunk (33. b, c ábrák). A *W. arrhiza* nyers extraktummal és tisztított toxinnal történő kezelése során, hosszú inkubálási időt követően a 38 kDa molekulatömegű enzim dsDN-áz aktivitását is detektáltuk, melynek aktivitás-változása a kezelések során az ssDN-áz aktivitásokkal megeggyező tendenciát mutatott.



33. ábra CYN kezelés hatása a *Wolffia arrhiza* ssDN-áz aktivitás mintázatára a kezelés 5. napján (pH 6,8).
(a) a *A. ovalisporum* CYN tartalmú extraktumaival kezelt növények; ***(b)*** tisztított CYN-el kezelt növények; ***(c)*** pH 6,8-on indukálódott izoenzim aktivitás. Szignifikáns változások a kontrollok és a kezeltek között $*p<0,05$. Egy kísérlet reprezentatív gélje.

A cilindrospermopszin növényekre gyakorolt hatásainak vizsgálatára irányuló 5 napos kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a kezelések során alkalmazott *A. ovalisporum* tenyészet liofilizátumából készült CYN tartalmú extraktum valamint a tisztított CYN képes befolyásolni a vízinövények (*Lemna minor* és a *Wolffia arrhiza*) növekedését, vegetatív szaporodását. Mindkét kezelés során szignifikánsan csökkent a növények nedves tömege és hajtásszáma. Nyers extraktummal történő kezelésekben 20 µg ml^{-1} CYN 60-55%-kal csökkentette a növények nedves tömegét. A tisztított CYN gátló hatása kissé gyengébb,

30-40%-os volt. Vasas és munkatársai (2000) leírták, hogy a CYN gátolta a sötétben nevelt *Sinapis alba* csíranövények növekedését. A *Sinapis alba* IC_{50} értéke (18,2 µg ml^{-1}) jól összevethető volt a mi eredményeinkkel. Kinnear és mtsai. (2008) egy legyökerező, víz alatt növő vízinövényt, a *Hydrilla verticillata-t*, *Cylindrospermopsis raciborskii* teljes sejtextraktumával kezelték (25-400 µg l^{-1} CYN), 14 napon keresztül. A növények felvették a CYN-t és akkumulálták 176 ng g^{-1} liofilizált koncentráció maximumnál (Kinnear és mtsai. 2008), ami alatta maradt a tápoldat CYN koncentrációjának. A bioakkumuláció hiányának ellenére a *Hydrilla* elváltozásokat mutatott a növekedésben, a gyökérképződésben klorózis és nekrózis nélkül (Kinnear és mtsai. 2008, White és mtsai. 2005). A *Spirodela oligorrhiza Cylindrospermopsis raciborskii* teljes sejtextraktumával történő kezelése során növekedésgátlást mértek a 7 µg l^{-1} és 113 µg l^{-1} toxinkoncentráció tartományokban, a 7 napos kezelés végén (Kinnear és mtsai. 2007). A kallusz tenyészetből regenerált „mini nádnövények" (Máthé és mtsai. 2007) érzékenyek voltak a CYN kezelésekre 0,5-40 µg ml^{-1} koncentráció tartományban (Beyer és mtsai. 2009). Általános stresszválaszként írták le, hogy a CYN növelte a gyökérszámot, indukálta a „kallusz-szerű" szövetek megjelenését, a nekrózist, valamint a gyökércsúcs sejtjeinél a mitótikus indexben, és a mikrotubulusok denzitásában és orientációjában változásokat idézett elő.

Kísérleteink során a vegetatív szaporodás gátlása mellett csak kismértékű, egyik fajnál sem szignifikáns összklorofill tartalom csökkenést tapasztaltunk (az adatokat itt nem mutatjuk be), nekrózist sem detektáltunk az alkalmazott CYN koncentráció tartományban (23., 25. ábrák).

A ***Lemna minor*** CYN tartalmú nyers kivonattal történő kezelése során az összproteáz aktivitás emelkedését mértük a savas és bázikus pufferben inkubált géleken egyaránt. A tisztított CYN kezelt növényekben a teljes enzimaktivitás növekedést bázikus pH-n, csak alacsonyabb (0,01-0,1 µg ml^{-1}) koncentrációk esetében láthattunk. Az összproteáz aktivitás változások hátterében a kontroll növényekre jellemző izoenzimek aktivitásának változásai állnak. Egy LmP32 enzim új a kontoll zimogramokhoz képest, melynek megjelenését a nyers *A. ovalisporum* extraktummal történő kezelés indukálta. Úgy tűnt, hogy a LmP32 izoenzim az LmP41 és a LmP35 enzimekkel együtt β–merkaptoetanolt (5 mM) igényeltek az inkubálópufferbe, ellenben a PMSF (10 mM az inkubáló pufferben) gátolta működésüket, és a legnagyobb aktivitásukat savas pH-nál detektáltuk. Ezek alapján ezek cisztein-proteázok lehetnek (az adatokat nem mutatjuk be). A CYN kezelés változásokat okozott az ssDN-ázok aktivitásában is. Elsősorban a nyers kivonattal kezelt *Lemna* növények kivonataiban detektáltunk aktivitásemelkedéseket, újonnan megjelenő enzimeket. A géleken LmD26 az egyetlen enzim a kilenc közül, aminek zselatinbontó

aktivitását mind a CYN, mind a CYN tartalmú nyers kivonattal történő kezelés emelte (32. ábra, 9. táblázat).

A nyers kivonattal kezelt ***Wolffia arrhiza*** esetében az összproteáz aktivitás savas és bázikus pH-n magas (10-20 μg ml^{-1}) toxinkoncentráció tartományban, emelkedő tendenciát mutatott. A növényi kivonatokban szignifikánsan emelkedett az ssDN-áz enzimek aktivitása is (1-10 μg ml^{-1} CYN), de 20 μg ml^{-1}-nél már a kontrollnál alacsonyabb aktivitást mértünk. A tisztított CYN kezelések hatására az összproteáz aktivitás savas pH-n enyhe csökkenését, bázikus körülmények között alacsony toxinkoncentrációknál (0,01-0,1 μg ml^{-1}) egy átmeneti növekedést mutatott. CYN tartalmú nyers extrakummal történő kezelés hatására bázikus pufferben inkubált géleken új proteáz enzimet (WaP44) detektáltunk. A nyers extraktummal kezelt növényekre a WaP84, WaP78, WaP48 proteázok magas aktivitása jellemző. Ezek működését a PMSF gátolta. A WaP48 enzim β-merkaptoetanolt igényelt, szemben a WaP84 és WaP78 izoenzimekkel, amelyek ennek hiányában is aktívak voltak. A PMSF gátló hatású a szerin proteázokra és különböző cisztein proteázokra, így részben megakadályozza a sejthalált, például patogén fertőzött dohány-levelekben (Woltering és mtsai. 2002). A cisztein és szerin proteázok nagyon fontos enzimek különböző folyamatokban, úgymint hiperszenzitív válasz, szignál transzdukció, programozott sejthalál (Vierstra 1996, Woltering és mtsai. 2002). A stresszfolyamatokra jellemző ssDN-ázok szignifikáns aktivitásemelkedése is jellemző volt (33. ábra). A CYN kezelt növényekben az enzimek aktivitás-növekedésének mértéke és mintázataik változása bizonyította, hogy a CYN képes befolyásolni olyan stresszenzimek kifejeződését és működését, mint a proteázok és nukleázok. Ezen stresszenzimek mintázatának elemzése, specifikus aktivitásuk mérése, valamint az új izoenzimek detektálása a CYN kezelt vízinövényekben a szakirodalomra nézve új adatokkal szolgált (Jámbrik és mtsai. 2010).

4.3. A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin kezelések hatásainak összevetése

Az alábbi táblázatban a MCY-LR és a CYN kezelések során vizsgált növekedési paramétereket (hajtásszám, nedvestömeg, örvszám, fehérjetartalom), valamint a stresszválaszokban kulcsfontosságú hidrolázok, a proteázok és nukleázok enzimmintázatában bekövetkező változásokat foglaltuk és hasonlítottuk össze.

10. Táblázat A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin kezelések hatásai a vizsgált vízinövény fajokban

DETEKTÁLT JELENSÉGEK	MCY-LR hatásai	CYN hatásai
növekedési paraméterek gátlása	***Lemna minor:*** szignifikáns hajtásszám és nedves tömeg csökkenést okozott: nyers extraktum: 5-20 μg ml^{-1} MCY-LR tisztított toxin: 10-20 μg ml^{-1} MCY-LR (a tisztított toxin gátló hatása > a nyers extraktumé) ***Wolffia arrhiza:*** szignifikáns hajtásszám és *nedves tömeg csökkenést okozott: nyers extraktum: 0,01-20 μg ml^{-1} /*10-20 μg ml^{-1} tisztított toxin: 10-20 μg ml^{-1} /*u.ez ***Ceratophyllum demersum:*** szignifikáns hajtásszám, örvszám és nedves tömeg csökkenést okozott: tisztított toxin: 2,5-20 μg ml^{-1} MCY-LR (Szigeti és mtsai. 2010) ***Phragmites australis*:** szignifikáns hajtásszám és *nedves tömeg csökkenést okozott; IC_{50}: 12 μg ml^{-1} /*10 μg ml^{-1}tisztított MCY-LR 5 napos kezelést követően (Máthé és mtsai. 2007/* Máthé és mtsai. 2009)	***Lemna minor:*** szignifikáns hajtásszám/*nedves tömeg csökkenést okozott: nyers extraktum: 1-20 μg ml^{-1} /*10-20 μg ml^{-1} CYN tisztított toxin 0,01-20 μg ml^{-1} /*0,1 és 10-20 μg ml^{-1} CYN ***Wolffia arrhiza:*** szignifikáns hajtásszám/*nedves tömeg csökkenést okozott: nyers extraktum: 10-20 μg ml^{-1}/*u.ez CYN tisztított toxin: 0,1-20 μg ml^{-1} /*0,01-20 μg ml^{-1} CYN ***Ceratophyllum demersum:*** nem vizsgáltuk ***Phragmites australis***: a CYN gátolta a gyökerek növekedését; IC_{50} 0,5 μg ml^{-1}, amíg a hajtások növekedését kevéssé befolyásolta (20μg ml^{-1}-nél). Újonnan képződő gyökerek száma növekedett (Beyer és mtsai. 2009).
fehérjetartalom változások	- a **fehérjetartalom** kismértékű emelkedése ***Lemna minor*** és ***Wolffia arrhiza*** fajokban, szignifikáns emelkedés ***L. minor*-**ban 20 μg ml^{-1} tisztított toxin hatására	- a **fehérjetartalom** kismértékű emelkedése ***Lemna minor*** és ***Wolffia arrhiza*** fajokban, szignifikáns emelkedés ***L. minor*** esetében a nyers extraktum (10 μg ml^{-1}) hatására
proteáz enzimmintázat változások	***Lemna minor:*** LmP100 aktivitása a kontrollhoz viszonyítva nem változik, vagy átmeneti emelkedés tapasztalható **LmP89, LmP83, LmP71** emelkedő tendenciát mutat LmP60*, LmP50, LmP41, LmP35 nyers extraktumos kezelés emeli, tisztított toxin *csökkenti, vagy nem változik	***Lemna minor:*** LmP100 aktivitás nyers kivonat hatására emelkedik. **LmP89, LmP83, LmP71** emelkedő tendenciát mutat LmP60, LmP50, LmP35 aktivitások nyers kivonat emeli, tisztított CYN csökkenti aktivitásukat LmP41 a kontrollhoz viszonyítva nem változik

	LmP32 és LmP26 tisztított toxin hatására megjelenő enzimek, amelyek aktivitása kezelés hatására nő ***Wolffia arrhiza:*** **WaP94** emelkedő tendencia az enzim aktivitásában **WaP84** megjelenését lúgos pH-n a MCY-LR indukálta WaP78 aktivitása a kontrollhoz viszonyítva nem változik WaP72 nyers kivonat hatására emelkedő **WaP63, WaP56, WaP53, WaP48, WaP41** az enzimek aktivitásában emelkedő tendenciát detektálható. **WaP36** megjelenését a tisztított MCY-LR indukálta ***Ceratophyllum demersum*:** **CdP87 és CdP80** megjelenését a tisztított MCY-LR indukálta	**LmP32** nyers extraktum hatására megjelenő enzim, amely aktivitása kezelés hatására nő ***Wolffia arrhiza***: **WaP94, WaP78** emelkedő tendencia az enzimek aktivitásában **WaP84** megjelenését lúgos és savas pH-n a CYN nyers kivonat indukálta WaP72 tendencia nélküli **WaP63, WaP56** aktivitások emelkednek (10-20 μg ml^{-1} CYN gátoltakban csökkennek) WaP53, WaP48, WaP41 ellentétes tendenciát mutatnak nyers kivonat és tiszta toxin hatására / nem változik. **WaP44** a nyers CYN tartalmú kivonat új enzim megjelenését indukálta pH 8,0-on ***Ceratophyllum demersum*:** nem vizsgáltuk
összproteáz enzimaktivitás változások	- az **összproteáz** aktivitások szignifikáns változása ***Lemna minor:*** nyers extraktum: 5-20 μg ml^{-1}- savas pH-n szignifikáns növekedést, bázikus pH-n enyhe csökkenést okoz tisztított toxin: 1 és 10-20 μg ml^{-1}- savas pH-n szignifikáns növekedést, bázikus pH-n csak 1 μg ml^{-1} értéknél szignifikáns emelkedés nyers extraktum hatása ≈ tisztított toxin ***Wolffia arrhiza:*** savas pH-n nyers extraktum (5-20 μg ml^{-1}) és tisztított toxin (10-20 μg ml^{-1}) hatására szignifikánsan nő bázikus pH-n nyers kivonatos (5-10 μg ml^{-1}) kezelések során szignifikánsan nő nyers extraktum hatása ≈ tisztított toxin	- az **összproteáz** aktivitások szignifikáns változása ***Lemna minor***: nyers extraktum: savas és bázikus pH-n 20 μg ml^{-1} CYN aktivitásemelkedést okoz tisztított toxin: savas pH-n 0,01 és 10 μg ml^{-1} hatására enyhe, de szignifikáns aktivitáscsökkenést, míg bázikus pH-n átmeneti emelkedés (0,01-0,1 μg ml^{-1} CYN) után kismértékű csökkenést okoz ***Wolffia arrhiza*:** nyers extraktum: savas pH-n (10-20 μg ml^{-1}), bázikus pH-n (1-20 μg ml^{-1} CYN) aktivitás emelkedést okoz, tisztított toxin: savas pH-n nincs változás, míg bázikus pH-n átmeneti emelkedés (0,01-0,1 μg ml^{-1} CYN) után kismértékű csökkenést okoz (1-20 μg ml^{-1})

	***Ceratophyllum demersum*:** savas pH-n a tisztított toxin (20 μg ml^{-1}) hatására nő ***Phragmites australis*:** nem vizsgáltuk	***Ceratophyllum demersum:*** nem vizsgáltuk ***Phragmites australis*:** nem vizsgáltuk
nukleáz enzimmintázat változások	***Lemna minor:*** **LmD89, LmD79:** csak nyers kivonat hatására megjelenő, emelkedő tendanciával **LmD53, LmD47, LmD43, LmD39** emelkedő tendenciát mutat nyers kivonat hatására, tisztított MCY-LR nem befolyásolja, vagy csökkenti aktivitását **LmD26** a tisztított toxin és nyers kivonat hatására aktivitása nő **LmD21, LmD18**: aktivitása nem változott ***Wolffia arrhiza:*** **WaD38** átmeneti emelkedés után enyhén csökkenő aktivitással van jelen mindkét kezelésnél	***Lemna minor:*** **LmD89, LmD79:** csak nyers kivonat hatására megjelenő, emelkedő tendenciával **LmD53, LmD47, LmD35,**: nem változott **LmD43**, nyers kivonat növeli, tisztított CYN csökkenti aktivitását, **LmD39** mindkét esetben csökken **LmD26** a tisztított toxin és nyers kivonat hatására aktivitása nő **LmD21, LmD18** aktivitását a nyers kivonat növeli **LmD16, LmD15:** csak nyers kivonat hatására megjelenő, emelkedő tendenciával ***Wolffia arrhiza:*** **WaD38** átmeneti emelkedés után enyhén csökkenő aktivitással van jelen mindkét kezelésnél
össznukleáz aktivitás változás	- az **össznukleáz** aktivitások szignifikáns változása ***Lemna minor:*** nyers extraktum (20 μg ml^{-1}) hatására nő, tisztított cianotoxin kezelések (0,1-20 μg ml^{-1}) hatására hasonlóképpen nő ***Wolffia arrhiza:*** csak 20 μg ml^{-1} tisztított toxinnál mérhető szignifikáns csökkenés ***Ceratophyllum demersum:*** tisztított toxin (10-20 μg ml^{-1}) hatására nő ***Phragmites australis***: (6. táblázat) **PaD53, PaD44, PaD42, PaD38, PaD37, PaD35, PaD28** enzimaktivitás változások a legjellegzetesebbek MCY-LR kezelés hatására	- az **össznukleáz** aktivitások szignifikáns változása ***Lemna minor:*** nyers extraktum (20 μg ml^{-1}) hatására nő, tisztított cianotoxin kezelések (0,1-20 μg ml^{-1}) hatására csökken ***Wolffia arrhiza:*** nyers extraktum (10 μg ml^{-1}) hatására nő, majd lecsökken, tisztított toxin (10-20 μg ml^{-1}) hatására nő ***Ceratophyllum demersum*:** nem vizsgáltuk ***Phragmites australis*:** nem vizsgáltuk

Az LmP89, LmP83, LmP71 savas proteázok mindkét toxin esetében, mind nyers, mind tiszta cianotoxin hatására aktivitásemelkedést mutattak. Az, hogy a növekedésében gátolt *Lemna* növények kivonataiban ezeknek az aktivitása megemelkedik, általános stresszválaszként értékelhető. Ezek az enzimek működésükhöz β–merkaptoetanolt nem igényelnek, az EDTA gátolta működésüket, és a Zn^{2+} jelenléte kedvező, míg a Ca^{2+} szignifikáns aktivitásváltozást nem okozott. Az LmP32 izoenzim a kontroll növényekben nem volt detektálható, a MCY-LR indukálta megjelenését és emelkedő aktivitását. A CYN tartalmú nyers extraktummal kezelt növények kivonataiban is kimutatható volt. Ennek magyarázata még nem tisztázott. Az LmP26 izoenzim csak a MCY-LR kezeltekben jelent meg. Az LmP32 és LmP26 izoenzim β–merkaptoetanolt (5 mM) igényeltek az inkubálás alatt, az EDTA nem, de a PMSF (10 mM az inkubáló pufferben) gátolta működésüket, és a legnagyobb aktivitásukat savas pH-nál detektáltuk. Ezek alapján ezek cisztein-proteázok lehetnek (az adatokat nem mutattuk be).
A kontroll *Wolffia* kivonatokban a WaP84 nem detektálható, de mindkét toxin esetében detektálható emelkedő tendenciával, lúgos pH-n nagyobb aktívitással. WaP44 a CYN tartalmú nyers kivonat hatására bázikus pH-n indukálódott, míg a WaP36 megjelenése a MCY-LR kezelés hatására savas pH-n jellemző. WaP36 működéséhez a β–merkaptoetanol jelenléte kedvező, de a PMSF és az EDTA gátolta működését.
Az enzimek további karakterizálása további vizsgálatokat igényel.

5. Összefoglalás

Munkánk során az eukarióta szervezetek protein-foszfatázait (PP1 és PP2A típusúakat) gátló *Microcystis aeruginosa* által termelt mikrocisztin-LR (MCY-LR) és az *Aphanizomenon ovalisporum* fehérjeszintézist gátló cianotoxinjának a cilindrospermopszinnak (CYN) a vízinövényekre gyakorolt hatásait vizsgáltam.

A vízinövények és a cianobaktériumok együttes előfordulása a vízterekben általános jelenség. Az általunk választott vízinövény fajok (*Lemna minor, Wolffia arrhiza*, *Ceratophyllum demersum*, *Phragmites australis*) eltérő rendszertani csoportba tartoznak, de mindegyik a parti régió jellemző, tömegesen előforduló kozmopolita faja.

Kísérleteinket a cianotoxinok (MCY-LR és CYN) tisztított és nyers extraktumaival végeztük. Olyan cianotoxin koncentrációkat alkalmaztunk, amelyek vízvirágzások idején a parti sávban felhalmozódó, majd elpusztuló sejttömegből kiszabadulhatnak, ezzel lehetővé téve a természetben lejátszódó folyamatok modellezését (Sivonen és Jones 1999).
A doktori disszertáció eredményeinek összefoglalása a célkitűzésekkel összhangban kerül bemutatásra.

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

Az általunk vizsgált vízinövényfajok 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 vízinövény faj közül a *Wolffia arrhiza* bizonyult érzékenyebbnek az 5 napig tartó MCY-LR kezelésekkel szemben. A ***W. arrhiza*** tenyészetek növekedését már 0,01 μg ml^{-1} MCY-LR tartalmú nyers extraktum szignifikánsan gátolta, míg a ***L. minor*** esetében ez a cianotoxin koncentráció ≥5 μg 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 μg 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 μg 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).

b_1.) A mikrocisztin-LR hatása a vízinövények 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 izoenzimek 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 $\mu g\ ml^{-1}$ tisztított MCY-LR-el kezelt *C. demersum* növényekben két magas molekulatömegű (CdP87 és CdP80) savas proteáz megjelenését detektáltuk.

b_2.) A mikrocisztin-LR hatása a vízinövények nukleáz enzimeinek aktivitására és izoenzim-mintázatára

A vizsgálataink eredményei mutatták, hogy a növényi stressz-enzimekhez tartozó ssDN-áz izoenzimmintázatok 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 μg ml^{-1}) cianotoxin koncentrációknál enyhe emelkedést, magasabb (5-20 μg 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 ***P. australis*** növényekben a tisztított MCY kezelések hatására bekövetkező strukturális eltérések (Máthé és mtsai. 2007, 2009) hátterében 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 μg ml^{-1}) a dsDN-áz aktivitás a kisebb toxinkoncentrációknál (0,5-5 μg ml^{-1}) mérhető emelkedő aktivitás után csökkent, de még fölötte maradt a kontroll értéknek. Ezek az aktivitásemelkedések a nád szövetekben a MCY-LR hatására bekövetkező programozott sejthalállal hozhatók összefüggésbe. A hajtásokban, 10 napos kezelések során a MCY-LR gátolta az ssDN-ázok aktivitását. A gyökerekben az aktivitások változatlanok maradtak. Noha a 10 napos MCY-LR kezelések 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 figyelhettünk 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 cilindrospermopszin 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 (1-20 μg ml^{-1} cianotoxin koncentrációknál) a hajtásszám szignifikáns csökkenését okozta. A tisztított CYN-el kezelt békalencsék hajtásszámában ez a szignifikáns csökkenés már 0,01 μg 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 μg ml^{-1} cianotoxin koncentrációk hatására tapasztaltuk.

10 és 20 μg ml^{-1} CYN tartalmú nyers kivonatottal 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 μg ml^{-1} CYN) szignifikánsan csökkentek a növekedési paraméterek.

d_1.) A cilindrospermopszin 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.

d_2.) A cilindrospermopszin 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 μg 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 μg ml^{-1} cianotoxin koncentrációnál már szignifikáns növekedést mutatott. 20 μg 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 μg ml^{-1} cianotoxin koncentrációknál detektáltunk.

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

Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy toxikus vízvirágzás során, a vízterekbe 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 μg ml^{-1} cianotoxin koncentrációknál szignifikáns csökkenést mértünk, míg a MCY-LR ≥ 10 μg 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 μg 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 megállapitottuk, hogy mindkét cianotoxin változást eredményez a növényi stresszválaszokban kulcsfontosságú proteázok és nukleázok enzimmintázatában és azok specifikus aktivitásában. Mind a MCY-LR, mind a CYN kezelt növények kivonataiban enzimaktivitás emelkedéseket detektáltunk (LmP100, 89, 83, 71, 60 valamint a WaP94, 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 mellet 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. enziminhibítor peptidek) is szintetizálódnak a cianobaktériumok sejtjeiben (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.

6. Summary

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 μg ml^{-1} of MCY-LR containing crude extracts while in the case of *Lemna minor* this cyanotoxin concentration was ≥5 μg 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 μg 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 μg 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).

b_1.) The effects of microcystin-LR on the activity of protease enzymes and isoenzyme-patterns of aquatic plants

By gelatin, as substrate contaaining 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).

b_2.) 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 és 1 μg ml^{-1}) cyanotoxin concentration both at treatment with crude toxin extracts and purified toxins and shows decreasing tendency at high (5-20 μg 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 ***P. 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 duoble standed 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 form 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 μg ml^{-1}) dsDNase activity increased and at higher concentrations (20 μg 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 containig 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 μg ml^{-1}. For the frond number of duckweeds treated with purified CYN this significant decrease was measurable even at 0.01 μg 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 μg 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 μg ml^{-1} CYN) cyanotoxin concentrations.

d_1.) 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 form the *W. arrhiza* treated with crude cyanotoxin extracts.

d_2.) 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 μg 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 mildl increase exposed in crude extract treated plants, but at 10 μg ml^{-1} cyanotoxin concentration significant increase was observed. At 20 μg 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 μg 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 μg ml^{-1} cyanotoxin concentrations while MCY-LR caused significant inhibition at ≥ 10 μg 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 μg 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 cianotoxin 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 investigsted 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.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszenetet mondani témavezetőimnek, Dr. Mikóné dr. Hamvas Mártának és Dr. Borbély Györgynek, akik hasznos szakmai és gyakorlati tanácsaikkal, támogatásaikkal hozzájárultak a témában való ismereteim megszerzéséhez és doktori értekezésem elkészítéséhez.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Máthé Csabának, nélkülözhetetlen szakmai segítségéért.

Továbbá köszönettel tartozom a Növénytani Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozójának, Dr. Mészáros Ilonának, Dr. Vasas Gábornak, Dr. Surányi Gyulának, Dr. Bácsi Istvánnak, Dr. Oláh Viktornak, Beyer Dánielnek, Barabás Évának, Bácsiné Béres Viktóriának, Tóth Szilviának, Görög Edinának, Havelant Katalinnak, Kökényesi Zsuzsának és természetesen PhD hallgatóinak, szakdolgozóinak, Ildikének, Charlienak, Grétinek, Zitának a sok segítségükért és hasznos tanácsaikért, és azért, hogy munkámat kellemes légkörben, barátok között végezhettem.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsának, az általa létrehozott *Ceratophyllum demersum* tenyészetekkel végzett kísérletekért.

Köszönöm a Kereskedelmi Bank Rt. által létesített, és a DE TEK által gondozott Universitas Alapítvány támogatását, amely lehetővé tette a kísérletek elvégzéséhez szükséges vegyszerek és eszközök beszerzését.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom a szüleimnek, a barátomnak segítségükért, bíztatásukért, türelmükért, megértésükért, azért, hogy mindig, minden helyzetben mellettem álltak.

8. Irodalomjegyzék

Abe T., Lawson T., Weyers J.D.B., Codd G.A. (1996) Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: Implications for current spray irrigation practice. New Phytology 133: 651-658.

Allen M.M. (1968) Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. J. Phycol. 4: 1-4.

Armstrong J., Armstrong W. (2001) An overview of the effects of phytotoxins on *Phragmites australis* in relation to die-back. Aquatic Botany 69: 251-268.

Arnon D.I. (1949) Copper enzymes in chloroplasts: polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Aoyagi S., Sugiyama M., Fukuda H. (1998) BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. FEBS Lett. 429: 134–8.

Bajguz A., Asami T. (2005) Suppression of *Wolffia arrhiza* growth by brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis and its restoration by endogenous 24-epibrassinolide. Phytochemistry (Amsterdam) 66: 1787-1796.

Banker R., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R., Sukenik A. (l997) Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. J. Phycol. 33: 613-616.

Bazin E., Mourot A., Humpage A.R., Fessard V. (2010) Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. Environmental and Molecular Mutagenesis, 51: 251-259.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé C. Tóth E., Grigorszky I., Gáspár A., Tóth S., Borbély G. (2007) Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum. FEMS Microbiology Letters. Vol. 259, Issue 2: 303–310.

Beyer D., Surányi G., Vasas G., Roszik J., Erdıdi 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.

Billam M., Mukhi S., Tang L., Gao W., Wang J.S. (2008) Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single dose treatment. Toxicon 51: 1068-1080.

Bishop C.T., Anet E.F.L.J., Gorham P.R. (1959) Isolation and identification of the fast death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 453-471.

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.

Börner T., Dittmann E. (2005) Molecular biology of cyanobacterial toxins. Genetic basis of microcystin production. In: Huisman, J., H.C.P. Matthijs, P. Visser (eds). Harmful Cyanobacteria. Auquatic Ecology Series. Vol. 3. Springer, Dortrecht, pp. 25-40.

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.

Branco W.C., Sienna A.C. (1994) Algological Studies 75: 84-96.

Bryant D.A. (1994) The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 879.

Botes D.P., Wessels P.L., Kruger H., Runnegar M.T.C., Stanikarn S, Smith R.J., Barna J.C.J., Williams D.H. (1985) Structual studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA and - YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2745-2748.

Borbély Gy., Máthé Cs., M.-Hamvas M., Kós P. (1997) A növények és a cianotoxinok interakciója. Hidrológiai Közlöny 77. 1-2: 24-28.

Borhidi A. (1995) A zárvatermők fejlődéstörténeti rendszertana, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.

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. (1993) 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 cyanobacteia: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environ Health Perspec 109: 663-668.

Casanova T.M., Burch D.M., Brock A.M., Bond M.P. (1999) Does Toxic *Microcystis aeruginosa* Affect Aquatic Plant Establishment, Environment Toxicology 14: 97-109.

Chen J., Song L., Dai J., Gan N., Liu Z. (2004) Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). Toxicon 43: 393-400.

Chiswell R.K, Shaw G.R., Eaglesham G.K., Smith M.J., Norris R.L, Seawright A.A., Moore M.R. (1999) Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. Environ Toxicol 14(1): 155-161.

Chorus I., Bartram J. (1999) Toxin cyanobacteria in water–A guide to their public health consequences monitoring and management. E & FM Spon London.

Cleland C.F., Tanaka O. (1982) Influence of plant growth substance and salicylic acid on flowering and growth in the Lemnaceae (duckweeds). Aquatic Botany 13: 3-20.

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., Ward C.J., Bell S.G. (1997) Cyanobacterial toxins: occurence, modes of actior; health effectsand exposure routes. In: Archives of toxicolory, supplement 19 (Seiler, J. P. and Vilanova E., Eds.), pp.339-410. Springer, Berlin.

Codd G.A., Metcalf J.S., Beattie K.A. (1999a) Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. Toxicon 37: 1181-1185.

Codd G.A., Bell G.S., Kaya K., Ward C.J., Beattie K.A., Metcalf J.S. (1999b) Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. Eur. J. Phycol. 34: 405–415.

Codd G.A., Morrison L.F., Metcalf J.S. (2005) Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. Toxicology and Applied Pharmacology 203: 264-272.

Cowgill U.M, Milazzo D.P. (1989) The culturing and testing of two species of duckweed. In: Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Vol. 12, ASTM STP 1027, (Eds. Cowgill U.M. & Williams L.R.) pp.: 379-391 Philadelphia.

Cowgill U.M., Milazzo D.P., Landenberger B.D. (1991) The sensitivity of *Lemna gibba* G-3 and four clones of *Lemna minor* to eight common chemicals using a 7 days test. Research Journal of Water Pollution Control Federation. Vol. 63: pp. 991-998.

Davis J.A. (1981) Comparison of static-replacement and flow-through bioassays using duckweed, *Lemna gibba* G-3. US EPA 560/6-81-003, Washington, DC.

Desai N.A, Shankar V. (2003) Single strand-specific nucleases. FEMS Microbiol. Rev. 26: 457-491.

Dittmann E., Neilan B., Erhard M., von Döhren H., Börner T. (1997) Insertional mutagenesisi of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Mol. Microbiol. 26: 779-787.

Engloner A. (2009) Stucture, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*) – A review. Flora 204: 331-346.

Environment Canada (1999) Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte *Lemna minor*. Report EPS 1/RM/37.

Eriksson J.E., Toivola, D., Meriluoto J.A.O., Karaki H., Han Y., Hartshorne D. (1990) Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 173: 1347-1353.

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.

Falconer I.R., Hardy S.J., Humpage A.R., Froscio S.M., Tozer G.J. (1999) Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. Environmental Toxicology; 14: 143-150.

Farkas G. (1982) Ribonucleases and ribonucleic acid brekdown. Encyclopedia of Plant Pysiology. 14: 224-262.

Farkas G. (1984) szerk. Növényi Biokémia. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 12-17: 184-185, 349-350.

Fay P., Baalen J. (1986) The blue-greens (Cyanobacteria). Camelot Press, Southampton.

Felföldy L. (1990) Vízügyi Hidrobiológia. AQUA Kiadó és Nyomda, Budapest.

Fergusson K.M., Saint C.P. (2003) Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. Environmental Toxicology 18(2): 120-125.

Fischer W.J., Altheimer V., Cattori V., Meier P.J., Dietrich D.R., Hagenbuch B. (2005) Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicology and Applied Pharmachology 203, 3, pp. 257-263.

Froscio 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.

Froscio 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.
Froscio 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.
Gehringer M.M., Kewada V., Coates N., Downing T.G. (2003) The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. Toxicon 41: 871-876.
Gehringer M.M. (2004) Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Letter 557: 1-8.
Gersten D.M., Gabriel O. (1992) Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. II. Enzymes modifying nucleic acids. Analytical Biochemistry 203: 181-186.
Ghosh S.K., Bagchi D., Baghci S.N. (2008) Proteolytic activity in Microcystis aeruginosa PCC7806 is inhibited by a trypsin-inhibitory cyanobacterial peptide whit a partial sructure of microviridin. Journal of Applied Phycology; 20: 1045-1052.
Goldberg J., Huang H., Kwon Y., Greengard P., Nairn A.C., Kuriyan J. (1995) Three dimensional structzre of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-l. Nature 376: 745-753.
Goodmann R.N., Király Z., Wood K.R. (1991) A beteg növény biokémiája és élettana. Akadémiai Kiadó, Budapest.
Gorzó Gy. (1985) Hidrobiológiai Közlöny 65: 357-359.
Green P.J. (1994) The ribonucleases of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 421-445.
Griffiths D.J., Saker M.L. (2003) The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. Environmental Toxicology: 18, 78-93.
Gupta P. Chandra P. (1996) Response of Cadmium to *Ceratophyllum demersum* L., a rootless submerged plant- Waste Management, Vol. 16, No. pp.: 335-337.
Haider S., Naithani P.N., Poonam K. (2003) Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. Chemosphere 52: 1-21.
Harada K., Ohtani I., Iwamoto K., Suzuki M., Watanabe M.F., Terao K., (1994) Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32: 73-84.
Hartl D.L., Jones E.W. (2000) Genetics. Analysis of Genes and Genomes. (5th ed.), Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Harper D. (1992) The ecological relationships of aquatic plants at Lake Naivasha, Kenya. Hydrobiologia 232: 65-71.

Hawkins P.R., Runnegar M.T.C., Jackson A.R.B., Falkoner I.R. (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raja isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Enivron. Microbiol. 50: 1292-1295.

Helgert T. (2003) A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. Diplomamunka. Debrecen, DE-TTK Növénytani Tanszék.

Hortobágyi T. (1979) Növényrendszertan, Tankönyvkiadó, Budapest.

Horvath T., Vidaković-Cifrek Z, Orescanin V, Tkalec M, Pevalek-Kozlina B. (2007) Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. Science of the Total Environment 384: 229-238.

Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C. (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiology and Biochemistry 45: 62-69.

Huang W., Xin W., Li D., Liu Y. (2009) Microcystin-RR induced apoptosis in tobacco BY-2 suspension cells is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. Toxicol in Vitro 22: 328-337.

Huber S.C., Huber L.J., McMichael R.W. Jr. (1994) Control of plant enzyme activity by reversible protein phosphorylation. Int. Rev. Cytol. 149: 47-96.

Humpage A.R., Fenech M., Thomas P., Falconer I.R. (2000) Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 472: 155-161.

Humpage A.R., Fontaine F., Froscio S., Burcham P., Falconer I.R. (2005) Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues. 68: 739-753.

Ibelings W.B., Chorus I. (2007) Accumulation of cyanobacterial toxin sin freshwater „seafood" and its consequences for public health: A review. Environmental aaapollution 150: 177-192.

Jakucs P., Précsényi I. (1981) Növénytársulástan. Hortobágyi T. és Simon T. (szerk.) Növényföldrajz, Társulástan és Ökológia. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest.

Jang H.M, Ha K., Takamura N. (2007) Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). Toxicon 49: 727-733.

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

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. Hoerkel). Acta Biologica Hungarica 61 (Suppl.), pp. 77-94.

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.

Jones G.J., Orr P.T. (1994) Release and degredation 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.

Kaebernick M., Neilan B.A., Borner T., Dittmann E. (2000) Light and the transcriptionalresponse of the microcystin biosynthesis gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3387-3392.

Kaebernick M., Neilan B.A. (2001) Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. FEMS Microbiol. Ecol. 35: 1-9.

Kinnear S.H.W., Duivenvoorden L.J., Fabbro L.D. (2007a) Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. Harmful Algae 6: 642-650.

Kinnear S.H.W., Duivenvoorden L.J., Fabbro L.D. (2007b) Growth and bioconcentration in *Spirodella oligorrhiza* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* whole cell extracts. Australisian Journal of Ecotoxicology Vol. 13.pp. 19-31.

Kinnear S.H.W., FabbroL.D., 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.

Kiss K.T. (1998) Bevezetés az algológiába. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest.

Komárek J. és Kováčik L. (1989) Trichome structure of four*Aphanizomenon* taxa (Cyanophyceae) from Czechoslovakia, with notes on the taxonomy and delimitation of the genus. Plant Systematics and Evolution 164: 1-4, 47-64.

Komárek J., Anagnostidis K. (1999) Cyanokaryota 1. Teil: Chroococcales. Gustav Fischer Verlag, Jena. pp. 1-237.

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.

Krishnamurthy T., Carmichael W.W., Sarver E.W. (1986) Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from Microcystis aeruginosa and *Anabaena flos-aquae*. Toxicon 24: 865-873.

Krishnamurthy T., Szafraniec L., Hunt D.F., Shabanowitz J., Yates J.R., Hauer C.R., Carmichael W.W., Skulberg O.M., Codd G.A., Missler S. (1989) Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sciences USA. 86: 770-774.

Kurki-Helasmo K., Meriluoto J. (1998) Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. Toxicon 36: 1921-1926.

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.

Lam C.W.Y., Silvester W.B. (1979) Growth interaction among blue-green (*Anabaena Oscillarioides*, *Microcystis aeruginosa*) and green (*Chlorella sp.*) algae. Hydrobiol. 63: 135-143.

Landolt E. (1986) The family of Lemnaceae – a monographic study. Vol. 1.; Veröffentlichungen des Geobotanishen Institutes ETH, Stiftung Rübel, Zürich.

Landolt E. (1987) The family of Lemnaceae – a monographic study. Vol. 2.; Veröffentlichungen des Geobotanishen Institutes ETH, Stiftung Rübel, Zürich.

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.

Láng F. (Ed.) (1998) Növényélettan (A növényi anyagcsere). Egyetemi tankönyv. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. pp. 862-873, 915-984.

LeBlanc S., Pick F.R., Aranda-Rodriguez R. (2005) Allelopathic effects of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on duckweed, *Lemna gibba* L., Environtal Toxicology 20: 67–73.

Leśniewicz K., Pieńkowska J., Poręba E. (2010) Characterization of nucleases involved in seedling development of cauliflower. J Plant Physiology 167: 1093-1100.

Li R., Carmichael W.W., Brittain S., Eaglesham G.K., Shaw G.R., Mahakhant A., Noparatnaraporn N., Yongmanitchai W., Kaya K., Watanabe M.M. (2001) Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Toxicon 39 (7): 973-980.

Linn S.M., Roberts R.J. (1982) Nucleases. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1-378.

Lloyd R.S., Linn S.M. (1993) Nucleases involved in DNA repair. In: Linn SM, Lloyd RS, Roberts RJ, editors. Nucleases. second edition Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 263–316.

Lukac M., Aegerter R. (1993) Influence of trace metals on growht and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon 31: 293-305.

MacKintosh C., Diplexcito J. (2003) Naturally occurring inhibitors of ser-ine/threonine phosphatases. In: Wells, J., Hunter, T., Karin, M., Farquhar, M.,Thompson, B. (Eds.), Handbook of Cell Signalling, vol. 1. Elsevier Science Publication, USA, pp. 607–611.

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 J.B., Davey M.R., 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., Jámbrik 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 mycrocystin-LR is a potent and secific inhibitor of

protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Letters 264: 187-192.

McElhiney J., Lawton L.A., Leifert C. (2001) Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. Toxicon 39: 1411–1420.

Meriluoto J.A.O., Nygard S.E., Dahlem A.M., Eriksson J.E. (1990) Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. Toxicon 28: 1439-1446.

Metcalf J.S., Barakate A., Codd G.A. (2004) Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterialhepatotoxin, cylindrospermopsin. FEMS Microbiology Letters 235: 125-129.

Mészáros I., Veres S., Dinka M., Lakatos G. (2003) Variations in leaf pigment content and photosynthetic activity of Phragmites australis in healthy and die-back stands of Lake Ferto/Neusiedlersee. Hydrobiologia 506: 681–6.

M-Hamvas M., Molnár E., Máthé Cs., Grigorszky I., Vasas G., Borbély Gy. (2000) Az egyszálú DNS-t bontó nukleázok aktivitásának változása a csírázás folyamán mikrocisztinnel kezelt mustár (*Sinapis alba* L.) csíranövényekben. Hidrológiai Közlöny 80/5-6: 326-328.

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.

M-Hamvas M., Helgert T., Papp M., Surányi Gy., Tóth E., Vigvári T., Bácsi I., Borbély Gy. (2004) A mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. Hidrológiai Közlöny 84/ 5-6: 74-76.

M-Hamvas M., Jámbrik K., Beyer D., Máthé Cs., Vasas G., Bácsi I., Borbély Gy. (2008) A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatásai különböző vízinövényfajokra. 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.

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.

Molnár E., M-Hamvas M., Máthé Cs., Vasas G., Grigorszky I., Borbély Gy. (2000) Cianotoxinok hatása növényi peroxidázok aktivitására. Hidrológiai Közlöny 80/5-6: 371-372.

Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum 15: 473-497.

Namikoshi M., Rinehart K.L., Dahlem A.m., Beasley V.R., Carmichael W.W. (1989) Total synthesis of Adda, The unique C_{20} amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. Tetrahed. Lett. 30: 4349-4352.

Nishizawa T, Asayama M, Fujii K., Harada K., Shirai M. (1999) Genetic Analysis of the Peptide Synthetase Genes for a Cyclic Heptapeptide Microcystin in *Microcystis* spp. J. Biochem. 126: 520-529.

Norris R.L.G., Seawright A.A., Shaw G.R., Senogles P., Eaglesham G.K., Smith M.J., Chiswell R.K., Moore M.R. (2002) Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. Toxicon; 40: 471-476.

Nyberg P.F. (1986) Effects of allelopathic chemicals on photosynthetic rate of *Lemna minor*. MA Thesis, University of S. Dakota, Vermillion, SD, USA.

Oláh V., Szőllősi E., Varga É., Kiss T. (2008) Chromium (VI) induced inhibition of photosynthesis and growth in duckweed. Cereal Researh Communications. 36: 319-322.

Orr P.T., Jones G.J. (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen limited *Microcystis aeruginosa* cultures. Limnology Oceanography; 43: 1604-1614.

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 raciborkii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Arch. Hidrobiol. / Suppl. 4:563-593.

Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., del Río L.A. (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant Physiology and Biochemistry 40: 521–530.

Pearson M.J., Ferguson A.J.D., Codd G.A., Reynolds C.S., Fawell J., Hamilton R.M., Howard S.R., Attwood M.R. (1990) Toxic Blue-Green Algae. National River Authority, London. Water Quality Series No. 2. pp. 1-125.

Pearl H.W., Millie D.F. (1996) Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. Phycologia 35: 160-167.

Pérez-Amador M.A., Abler M.L., De Rocher J., Thompson D.M., van Holol A., LeBrasseur N.D., Lers A., Green P.J. (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. Plant Physiology 122: 169-179.

Pflugmacher S., Wiegand C., Oberemm A., Beattie K.A., Krause E., Codd G.A., Steinberg C.E.W. (1998) Identification of enzymatically formed

glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. Biochim. Biophys. Acta 1425: 527-533.

Pflugmacher S., Codd G.A., Steinberg C.E.W. (1999) Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication emzymes in aquatic plants. Environ. Toxicol. 14: 111-115.

Pflumacher 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.

Pflugmacher S., Aulhorn M., Grimm B. (2007) Influence of a cyanobacterial crude extract containingmicrocystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. New Phytol. 175: 482–9.

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.

Piotrowskaa A., Bajguza A, Godlewska-Zyłkiewiczb B., Czerpaka R., Kami´nska M. (2009) Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). Environmental and Experimental Botany 66: 507–513.

Podani J. (2003) A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana. ISBN 963 463 632 2.

Pouria S., Andrade de A., Barbosa J., Cavalcanti R.L., Barreto V.T.S., Ward C.J., Preiser W., Poon G.K., Neild G.H., Codd G.A. (1998) Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. Lancet 352: 21–26.

Preussel K., Stuken A., Wiedner C., Chorus I., Fastner J. (2006) First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon 47 (2): 156-162.

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 indrustrial significance secondary metabolites. Biotechnology Advances 27: 521-539.

Ramirez-Toro G.I., Leather G.R., Einhelling F.A. (1988) Effects of three phenolic compounds on *Lemna gibba* G3. J. Chem. Ecol. 14: 845-853.

Rai U.N., Sinha S., Tripathi R.D., Chandra P. (1995) Waste water treatability potential of some aquatic macrophytes-removal of heavy metals. Ecologocal Engineering Vol. 5, No. pp. 1:5-12.

Rao L.P.V., Gupta N., Jayaraj R., Bhaskar A.S.B., Jatav P.C. (2005) Age-dependent effects on biochemical variables and toxicity induced by cyclic peptide toxin microcystin-LR in mice. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 140: 11–19.

Reddy A.S.M., Safadi F., Beyette J.R., Mykles D.L. (1994) Calcium-dependent proteinase activity in root cultures of *Arabidopsis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 1089-1095.

Reisner M., Carmeli S., Werman M., Sukenik A. (2004) The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide syinthesis and alters cholesterol distribution in mice. Toxicological Sciences 82: 620-627.

Reskóné N.M. (1998) *Microcystis aeruginosa* cianobaktérium a Velencei-tóban. Kutatási jelentés.

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.

Reynolds C.S., Walsby A.E. (1975) Water-blooms Biol. Rev. 50. 437-481.

Rinehart K.L., Harada K., Namikoshi M., Chen C., Harris C.E.J., Munroe M.H.G., Blunt J.W., Mulligan P.E., Beasley V.R., Dahlem A.M., Carmichael W.W. (1988) Nodularin, microcystin and the configuration of ADDA. J. Am. Chem. Soc. 110: 8557-8558.

Romanowska-Duda Z., Tarczynska M. (2002) The influance of microcystin-LR and hepatotoxic extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. Environment Toxicology 17: 434-440.

Runnegar M.T.C., Falconer I.R., Silver J. (1981) Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacology 317: 268-272.

Runnegar M.T.C., Gerdes R.G., Falconer I.R. (1991) The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. Toxicon 29: 43-51.

Runnegar M.T., Kong S.M., Zhong Y.Z., Lu S.C. (1994) Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 49: 219-225.

Saqrane S., El ghazali I., Ouahid Y., El Hassni M., El Hadrami I., 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.

Schembri M.A., Neilan B.A., Saint C.P.(2001) Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii.* Environ Toxicol 16 (5): 413-421.

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.

Scholes K. (1987) Effects of six classes of allelochemicals on growth, photosynthesis, and chlorophyl content in *Lemna minor*. MA Thesis, University of S. Dakota, Vermillion, SD, USA.

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.

Shen X., Lam P.K.S., Shaw G.R., Wickramasinghe W. (2002) Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Toxicon 40: 1499–1501.

Sivók B., Udvardy J., Balogh Á., Farkas G.L. (1977) Nuclease I in wheat root. Z Pflanzenphysiol 83: 327–33.

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.

Skulberg O.M., Carmichael W.W., Codd G.A., Skulberg R. (1993) In: Ed. Falconer I.R. Algal Toxin in Seafood and Drinking Water. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. Chapter 9. pp. 145-164.

Smayda T.J., 2008. Complexity in the eutrophication–harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. Harmful Algae: 8, 140-151

Smith R.D., Walker J.C. (1996) Plant protein phosphatases. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 101-125.

Stein J.C., Hansen G. (1999) Mannose induces an endonuclease responsible or DNA laddering in plant cells. Plant Physiol. 121: 71–9

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.

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).

Terao K., Ohmori S., Igarashi K., Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, Ito E, Watanabe M. (1994) Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. Toxicon 32: 833-843.

Tillett D., Dittmann E., Erhard M., von Döhren H., Börner T., Neilan B. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: An integrated peptide-polyketide synthetase system. Chem. Biol. 7: 753-764.

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.

Turner P.C., Gammie A.J., Hollinrake K., Codd G.A. (1990) Pneumonia associated with contract with cyanobacteria. brit. Med. J. 300, 1165-1175.

Utkilen H., Gjolme N. (1995) Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 797-800.

Vasas G., Padisák J., M-Hamvas M., Máthé C., Molnár E., Surányi Gy., Grigorszky I., Borbély Gy. (2002a) A cilindrospermopszin termelés analitikai vizsgálata *Cylindrospemopsis raciborskii* izolátumokban. Hidrológiai Közlöny 82: 143-144.

Vasas G., Gásprár A., Surányi G., Batta G., Gyémánt Gy., M.Hamvas M., Máthé C., Grigorszky I., Molnár E., Borbely G. (2002b) Capillary Electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, 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., Borbely G. (2004) Analysis of cyanobacterials toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. Electrophoresis 25: 108-115.

Vasas G., Borbely G., Nánási P., Nánási P.P. (2010) Alkaloids from Cyanobacteria with Diverse Powerful Bioactivities. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 10: 946-955.

Via-Ordorika L., Fastner J., Kurmayer R., Hisbergues M. Dittmann E., Komarek J., Erhard M., Chorus I. (2004) Distribution of Microcystin-Producing and Non-Microcystin-Producing Microcystis sp. in European Freshwater Bodies: Detection of Microcystins and Microcystin Genes in Individual Colonies. System. Appl. Microbiol. 27: 592–602.

Vierstra R.D. (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. Plant Molecular Biology 275-302.

Vörös L., Vízkelet É., Tóth F., Németh J. (1983) Trofitás vizsgálatok a Balaton Keszthelyi-medencéjében. Hidrológiai Közlöny 63:(9) pp. 390-398.

Wang W. (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research 52: 7-22

Weiss J., Liebert H.P. (1998) Ökophysiologische Untersuchungen zur Interaktion von *Microcystis* and *Lemna* in co-kulturen. Poster-abstract, Botanikertagung Bremen, 30.80.06.09.

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'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 followingexposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures. Environmental Pollution 177: 158-167.

Whitton B.A. (2002) Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria). In: The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds), pp. 25-122. Cambridge: Cambridge University Press.

Wiegand C., Peuthert A., Pflugmacher S., Carmeli S. (2002) Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. Environ. Toxicol. 17: 400-406.

Wiegand C., Pflugmacher S. (2005) Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. Toxicology and Applied Pharmacology. 203: 201-218.

Wilson C.M. (1975) Plant nucleases. Annu Rev. Plant Physiology. 26: 187-208.

Woltering E. J., van der Bent A., Hoeberichts F. A. (2002) Do plant caspases exist? Plant. Physiol. 130: 1764–1769.

Wood M., Power J.B., Davey M.R., Lowe K.C., Mulligan B.J.(1998) Factors affecting single strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Sci 131: 149-159.

Yamasaki S. (1993) Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. J Plant Res; 106: 113-120.

Ye Z.H., Wong M.H., Baker A.J.M., Willis A.J. (1998) Comparison of biomassa and metal uptake between two populations ps *Phragmites*

australis grown in flooded and dry conditions. Ann. Bot.-London 82: 83-87.

Yen Y., Baenziger P.S. (1993) Identification, characterization and comparison of RNA-degrading enzymes of wheat and barley. Biochem Genet 31: 133–45.

Yi D., Yijun Z., Xue B., Zhihui F., Kai C. (2009) Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on *Lemna minor* and *Myriophyllum spicatum* phyto-tolerance and superoxide dismutase activity. 24: 304-308.

Yin L., Huang J., Li D., Liu Y. (2005a) Microcystin-RR uptake and its effects on the growht of submerged macrophyte *Vallisneria natans* (lour.) hara. Environmental Toxicology 20 (3): 308-313.

Yin L.Y., Huang J.Q., Huang W.M., Li D.H., Wang G.H., Liu Y.D. (2005b) Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. Toxicon; 46: 507-512.

Yin L., Huang J., Huang W., Li D., Liu Y., (2005c) Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. Toxicon; 46: 859-864.

Yin L.Y., Huang J.Q., Li W., Liu Y.D. (2006) Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. Toxicon; 48: 204-210.

Zilliges Y., Kehr J.-C., Meissner S., Ishida K., Mikkat S., Hagemann M., Kaplan A., Börner T., Dittmann E. (2011) The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of *Microcystis* under Oxidative Stress Conditions. PLoS ONE 6(3): e17615. DOI:10.1371/journal.pone.0017615.

9. 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. Hoerkel). Acta Biologica Hungarica 61 (Suppl.), 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) Vízinövények cilindrospermopszinnal szembeni érzékenységének 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 vízinövényfajokra. 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) Vízinövények cilindrospermopszinnal szembeni érzékenységének 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., Borbely 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) Vízinövények mikrocisztin-LR-el szembeni érzékenységének összehasonlító vizsgálata. Intézményi Tudományos Diákköri Konferencia. Debrecen.

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

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

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