

**INDICATORI BIOCHIMICI DE EVALUARE A
REZISTENȚEI SPECIILOR FORESTIERE LA POLUAREA
INDUSTRIALĂ CU COMPUȘI AI SULFULUI
ÎN ACȚIUNE SINERGICĂ CU METALELE GRELE,
ÎN ZONA COPȘA MICĂ**

MARIAN IANCULESCU¹, EVELINA CLAUDIA BUDU²

¹Institutul de Cercetări și Amenajări Silvice, București, România

²TelBari Inc, PO Box 210007, Nashville, TN 37221, USA

Abstract

**BIOCHEMICAL INDICATORS FOR THE EVALUATION OF FOREST
TREE SPECIES RESISTANCE TO SO₂ POLLUTION IN SYNERGISM
WITH HEAVY METALS IN COPȘA MICĂ INDUSTRIAL AREA**

The aim of this paper is the evaluation of different biochemical indicators to foliage material and stems' phloem in synergism with heavy metals (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn), in high and low polluted areas respectively.

Thus, the assimilation pigments, total proteins and peroxidase activity analyses were performed in foliage material whereas peroxidase chemibioluminiscence, UV absorption spectra and electrophoretic mobility of proteins were evaluated in stems' phloem.

A completely new experiment regarding the possible induction of resistance in sessile oak seedlings has been carried out in SO₂ controlled fumigation chambers. Therefore, the seedlings were infused with 2 glycoproteins, around their stems, using chromatographic paper. These 2 glycoproteins were extracted from the stem of 40 years old, healthy sessile oak, using affinity chromatography. The seedlings were divided into two lots; controlled with and without infused glycoproteins and affected lot, with infused glycoproteins following controlled SO₂ fumigation.

The following conclusions have been drawn: 1) A significant reduction of the assimilation pigments were observed in high polluted areas to different forest species; 2) Total protein concentration showed extreme values, low or high in connection with different metabolic reactions involved; 3) Phloems' protein fractions, evaluated for the first time here, might be sensitive indicators of the degree of pollution, in the industrial areas; 4) Phloems' peroxidase chemibioluminiscence had low response in high polluted areas, in comparison with low affected areas. It can be assumed that a metabolic selection pressure was taking place; 5) The foliage peroxidase activity in sessile oak seedlings might be regulated "in vivo" at least on glycoprotein, G₂, under SO₂ fumigation stress; 6) These results may open an entirely new scientific way in forest research in connection with SO₂ induced stress with possible implication to global warming as well.

Keywords: forest trees, air pollution, biochemical indicators, environmental stress, plant immunology, climate change

Rezumat

În lucrare se prezintă rezultatele investigațiilor biochimice efectuate la două organe principale ale arborilor, material foliar și trunchi, prelevate atât din diferite specii de arbori aflate sub influența poluării pe bază de compuși ai sulfului în acțiune sinergică cu metalele grele (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn), cât și din arbori aflați în zonă martor, neafecțați, pentru compararea rezultatelor. La nivelul acelor și frunzelor s-au făcut determinări privind concentrațiile în pigmenți asimilatori, concentrații în total proteine și activitate peroxidazică. O mare parte a investigațiilor au fost întreprinse asupra floemului din trunchi, ca țesut important în transportul asimilatelor. La acest țesut s-au făcut determinări privind activitatea peroxidazică, intensitatea emisiei luminescente a peroxidazei, spectre de absorbție în UV și distribuția electroforetică a proteinelor. Totodată, în lucrare, se prezintă un experiment, în premieră, pentru a stabili posibilitatea inducerii unei rezistențe sporite la influența SO₂, a unor plante de gorun, aflate în camere test cu atmosferă controlată. Astfel, puietii de gorun din cadrul experimentului au fost supuși inițial unui proces de „interacție” prin badijonare la nivelul tulpinițelor, cu hârtie cromatografică, îmbibată cu două fracțiuni glicoproteice (efectori glicoproteici extrași dintr-un exemplar de gorun sănătos, în vârstă de 40 de ani, folosind cromatografia de afinitate), după care puietii au fost împărțiți în două loturi: unul martor și altul supus fumigării cu diferite concentrații de SO₂.

Prezentăm în continuare principalele concluzii ale lucrării. 1) În zonele afectate de poluare s-a constatat o scădere evidentă a pigmentilor asimilatori, atât la nivelul diferitelor arborete, cât și la nivelul arborilor individuali; 2) Indicatorul biochimic, total proteine, nu variază linear cu gradul de poluare, el crescând sau scăzând în funcție de gradul poluării, care determină activarea sau inhibiția proteică, controlată de gene sau reacții metabolice, care intră în acțiune la acest nivel; 3) Fracțiunile proteice de la nivelul floemului, determinate pentru prima dată, pot fi sesizabile ale gradului de vătămare, modulând în anumite condiții adaptarea arborilor la stresul poluant, prin creșterea sintezei acestor fracțiuni; 4) Variația activității peroxidazice de la nivelul floemului în funcție de intensitatea luminoasă a peroxidazei, răspunde în mod uniform, în condiții de poluare ridicată, ca răspuns de adaptare a speciilor forestiere (în special pin negru și gorun) la presiunea de selecție metabolică exercitată în principal de poluarea pe bază de compuși ai sulfului; 5) În urma efectuării unor experimente, în premieră, privind stimularea unor puietii de gorun cu extracte glicoproteice, care induc modificări la nivelul peroxidazei din plantele respective, s-au constatat următoarele: acești compuși au ajuns în circuitul metabolic al plantelor și au indus efecte de activare, respectiv de inhibiție asupra activității peroxidazei de la nivelul materialului foliar, existând astfel premise ca efectorul glicoproteic G1 să fie implicat în procesul de apărare al plantei la stresul cu SO₂; 6) Tehnica inducerii de rezistență la diverși factori de stress (poluare, secetă etc.) devenită posibilă în urma experimentului realizat, reprezintă o nouă provocare pentru cercetarea științifică din silvicultură, în contextul modificărilor globale de mediu.

Cuvinte cheie: poluare, indicatori biochimici, stress, imunologie vegetală (inducere de rezistență la stress), modificări globale de mediu

1. INTRODUCERE

Pentru diagnosticarea vătămarilor produse arborilor și arboretelor de poluarea chimică nu mai sunt suficiente metodele de analiză folosite, până odinioară, la descoperirea, atât a cauzalității vătămarilor, cât și stării fiziologice a ecosistemelor forestiere. De aceea a apărut necesitatea îmbunătățirii metodologiilor de lucru, așa cum a preconizat, de pildă, Hüttermann (1983), prin programul de diagnosticare fiziologico – biochimică pentru depistarea așa ziselor vătămări „ascunse” produse de poluarea arborilor și arboretelor. Acest program cuprinde o serie de analize la nivelul organelor de vegetație (ace și frunze), la nivelul rădăcinilor și în sol. În această lucrare am extins în plus aria investigațiilor la nivelul floemului din trunchiul arborilor, care constituie principalul mijloc de transport al asimilatelor din arbori.

Modificările asupra proceselor ecofiziologice principale (fotosinteza, respirație, transpirație, umiditatea acelor și frunzelor) la arborii forestieri datorită poluării aerului și solului cu compuși ai sulfului în acțiune sinergică cu metale grele (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn) și negru de fum, din zona industrială Copșa Mică, au fost prezentate de M. Ianculescu et al., (1987, 1989) și M. Ianculescu (2005a).

Poluanții, în special compușii sulfului, sunt factori ce produc efecte fitotoxice în toate organele plantelor. Literatura de specialitate abundă în lucrări privind evaluarea daunelor produse de SO₂, prin prisma transformărilor biochimice și fiziologice ce apar la arborii stresați. Astfel, s-a constatat că compușii sulfului afectează, așa cum s-a mai prezentat (Ianculescu et al., 1987, 1989, Ianculescu, 2005 a), un număr de funcții metabolice cum ar fi transpiratia, respiratia, fotosinteza (Malhotre, 1976; Ziegler, 1975), fără însă a se putea trage concluzii cu privire la succesiunea exactă a acestora. Apertura stomatelor este transformată odată cu expunerea plantelor la poluanți (Rosen, 1978).

Odată cu reducerea fotosintezei sub influența poluării se reduce și producerea fotosintetizatelor din plante, conducând la schimbări importante în ceea ce privește distribuția lor între organele plantelor (Minochin, 1986). Se sugerează chiar că în condițiile expunerii la compuși ai sulfului, moleculele transportatoare implicate în încărcarea floemului sunt distruse, iar mecanismul de încărcare, devine un important punct limită, în controlul translocației (Teh, 1982). S-a remarcat de asemenea că celulele ciuruite (liberiene) ale floemului fac colaps de timpuriu și nu mai își pot îndeplini funcția conducătoare, care poate fi corelată cu acumulările patologice de amidon, din acele bolnave (Fink. S., 1983).

Compușii sulfului, interferează cu structura și permeabilitatea membranelor celulare, sugerând faptul că ei afectează componentele lipidice membranale (Khan, 1975; Malhotra, 1978). Totuși, studii, care să demonstreze efectul compușilor sulfului asupra metabolismului lipidic sunt puține, (Grunwald, 1981). La concentrații mari de SO₂, s-a constatat emisia de hidrogen sulfurat la frunze (De Cormis, 1969; Hallgren, 1982).

În ceea ce privește relația dintre acțiunea compușilor sulfului și altor poluanți și activitățile enzimatică celulare, rezultatele obținute sunt însă contradictorii. Astfel, sunt enzime care prezintă o activitate ridicată la acele sănătoase, care se reduce sau dispare la acele vătămate, cum ar fi cazul succinat dehidrogenazei. Alte enzime ca fosfataza acidă, peroxidaza, citocrom oxidaza, sunt mai active la acele vătămate (Fink, 1983).

Conform altor cercetări, compușii sulfului ar avea o acțiune inhibitoare asupra fosfatazei acide și de stimulare a succinat dehidrogenazei (Fink, 1983). Multe dintre efectele biochimice însă care apar sunt răspunsuri nespecifice la SO₂ și pot fi detectate numai la concentrații mari de SO₂, acumulate în plante. Până în prezent nu s-a putut găsi nici un parametru de metabolism care să reacționeze rapid și clar, la concentrații scăzute de gaze nocive, să prezinte specificitate la componentele individuale ale emanațiilor gazoase (în speță SO₂), să fie ușor de măsurat și reproductibil, așa cum

caracterizează Arndt (cit. de Landolt, 1983) indicatorul sau indicatorii sensibili la stres. Pornind totuși de la ideea vehiculată de Landolt (1983) că în celule trebuie să existe procese primare, biochimice și fiziologice, care sunt afectate de noxe, și care în cele din urmă conduc la conturarea unor vătămări vizibile, în lucrarea de față s-au încercat mai multe tipuri de analize biochimice, la două organe principale ale arborilor, material foliar și trunchi, prelevate atât din zona industrială Copșa Mică, cât și din sera unde s-au făcut experimente, în premieră, cu gazări controlate cu SO₂. Astfel, la nivelul acelor sau frunzelor s-au făcut determinări privind concentrațiile în pigmenți asimilatori, concentrații în total proteine și activitate peroxidazică.

O mare parte însă a investigațiilor biochimice s-au oprit asupra floemului din trunchi, ca țesut important în transportul asimilatelor, și ca regiune relativ ușoară, de prelevare a probelor din arbori. La acest țesut s-au făcut determinări privind activitatea peroxidazică, intensitatea emisiei luminescente a peroxidazei, spectre de absorbție în UV și distribuția electroforetică a proteinelor. Într-o lucrare anterioară (Ianculescu, 2005 a) anticipam faptul că rezultatele acestor investigații, din lipsă de spațiu, vor face obiectul unei lucrări aparte. Așadar, lucrarea de față, reprezintă o continuare a prezentării rezultatelor investigațiilor biochimice la speciile forestiere aflate sub influența poluării cu compuși ai sulfului, în acțiune sinergică cu metale grele (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn) și negru de fum din zona industrială Copșa Mică.

2. MATERIAL ȘI METODE DE LUCRU

2.1. Metode specifice de analiză

În ceea ce privește aspectul referitor la indicatorii biochimici de evaluare a rezistenței speciilor forestiere la poluarea industrială, în special pe bază de compuși ai sulfului, s-au folosit metode specifice fiecărei analize în parte, după cum urmează.

Pigmenții asimilatori au fost extrași din materialul foliar cu acetonă 80%, prin mojarare în prezență de nisip de cuarț și carbonat de magneziu. Extractul s-a colorimetrat, la trei lungimi diferite de undă, 663 nm, 645 nm și 472 nm, după indicațiile date de M. Stirban și Gh. Frecus (1968).

Determinarea concentrației în pigmenți asimilatori s-a făcut folosind următoarele formule:

$$\text{Clorofila a (mg/g substanță proaspătă)} = \frac{12.5 \times E_{663_{nm}} \times 0.86 \times E_{645} \times V \times D}{dx \times 20 \times W}$$

$$\text{Clorofila b (mg/g substanță proaspătă)} = \frac{19.3 \times E_{645_{nm}} - 3.6 \times E_{663_{nm}} \times V \times D}{dx \times 1000 \times W}$$

$$\text{Total caroteni (mg/g substanță proaspătă)} = \frac{E_{472} \times V \times D \times 10}{dx \times W \times 2485}$$

unde: E = extincția la lungimile de unde respective

V = volumul extractului în acetonă

d = diluția folosită

D = grosimea cuvei

W = greutatea materialului de analiză

Valorile obținute s-au raportat la 1l extract.

Determinarea concentrației în proteine totale la nivelul materialului foliar. Extracția proteinelor din frunze sau ace s-a făcut urmărind indicațiile date de H.A. Constantinidou și T.T. Kozłowski (1979).

Izolarea proteinelor vegetale din materialul foliar a necesitat îndepărtarea prealabilă a pigmentilor clorofilieni și a fenolilor, cu ajutorul polivinilpirolidonei insolubile. Determinarea cantitativă a proteinelor totale s-a făcut prin spectrocolorimetrie la 660 nm, folosind ca reactiv de colorare specifică reactivul Folin – Ciocalteu (metoda Lowry, 1961). Valorile extincțiilor obținute s-au exprimat în mg/ml cu ajutorul unei curbe de etalonare, cu albumină serică bovică, ca standard.

Izolarea materialului proteic de la nivelul floemului din trunchi. Extracția proteică la nivelul floemului din trunchi s-a realizat prin 2 metode. Prima metoda a constat în mojararea peretelui intern al scoarței în prezență de nisip de cuarț, cu o soluție tampon TRIS H_3BO_3 – EDTA, pH = 7,4. A doua metodă s-a bazat pe extragerea prin difuziune celulară a componentelor proteici activi, cu catenă mică într-o soluție de EDTA (Urquhart, 1981). Astfel s-au imersat suprafețe constante de scoarță (2,5 x 25 mm), pentru mai multe zile în soluția mai sus menționată. Compușii proteici obținuți pe această cale sunt în concentrații mai mici decât în procedeul prin mojarare, dar prezintă avantajul evaluării eventualelor blocaje celulare.

Concentrația proteinelor floemice prin precipitări fracționate, cu sulfat de amoniu. Considerându-se că fiecare proteină în funcție de structura ei precipită la o anumită concentrație cu sulfatul de amoniu, s-a încercat precipitarea fracționată, treptată a proteinelor dintr-un amestec. Astfel s-au făcut precipitări fracționate la 30%, 60% și respectiv 90%, saturație, în sulfat de amoniu. Precipitațiile obținute au fost reluate într-un volum minim de tampon TRIS-HCl, pH = 7,4 în prezență de dodecil sulfat de sodiu (SDS).

Electroforeza în dodecil sulfat de sodiu. SDS electroforeza în gel de poliacrilamidă este o metodă folosită pentru separarea subunităților proteice cu determinarea greutăților lor moleculare. Se cunoaște că proteinele disociază în constituenții lor (grupări polipeptidice), cu ajutorul detergenților.

SDS, ca agent de denaturare și solubilizare, induce schimbări conformaționale la nivelul proteinelor. SDS electroforeza, a apărut prima dată în cercetările efectuate de A.L. Shapiro (1967) și K. Weber și M. Osborn (1969).

Greutățile moleculare ale proteinelor pot fi determinate prin compararea mobilității proteinelor cu proteine standard.

Electroforeza proteinelor obținute prin precipitare fracționată, cu sulfatul de amoniu, din floem, s-a efectuat urmărind indicațiile lui U.K. Laemmli (1970). După

electroforeză gelurile au fost colorate cu Blue, Brilliant, Coomassie (Görg, 1985). După colorare gelurile au fost densitometrate, folosind un densitometru Quiq Scan și un filtru de o lungime de undă de 610 nm.

Determinarea activității peroxidazei. Dozarea activității s-a făcut folosind 2 metode. Prima metodă, cronometrică, a constat din evaluarea vitezei de reacție a peroxidazei (în calitate de catalizator) al reacției de oxidare a benzidinei, cu apă oxigenată în prezența acidului ascorbic. Viteza de reacție a peroxidazei s-a exprimat în acid ascorbic oxidat/ml/prep.enz./min. A doua metodă (spectrofotometrică) s-a bazat pe măsurarea ratei de oxidare enzimatică a hidrochinonei la para benzochinonă în prezență de H₂O₂ (Mateescu, Schell și Budu, 1979). Activitatea enzimatică s-a exprimat în μmoli paraBQ₂/min/ml după formula:

$$\text{activitatea enzimatică} = \frac{\Delta A / \text{min} \times 2.1}{18.18 \times 0.1}$$

în care 2,1 reprezintă volumul exprimat în ml; 18,18 reprezintă coeficientul molar de extincție a soluției de p. benzochinona; 0,1 – volumul probei folosite în lucru (ml).

În figura 1 se prezintă schema de prelucrare biochimică a materialului de analiză. Determinarea intensității luminoase a peroxidazei floemice. Extractul proteic din floem a fost supus electroforezei în gel de poli-acrilamidă și colorat specific pentru peroxidază, în prezență de benzidină și apă oxigenată. În primele 5 minute de la incubarea gelurilor cu soluția de benzidină și apă

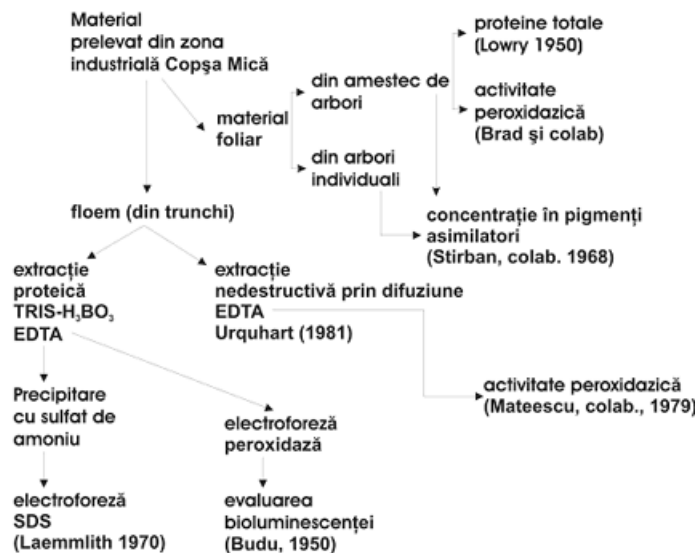


Fig. 1. Schemă privind prelucrarea biochimică a materialului de analiză
Scheme regarding biochemical conversion of analysis material

oxigenată a apărut un efect luminescent, care s-a putut evalua cantitativ prin inhibarea enzimei cu o soluție de acid acetic 10%, și citirea absorbției respective la 432 nm, cu ajutorul unui spectrocolorimetru (Budu, 1985).

Evidențierea spectrelor de absorbantă ale extractelor floemice în UV. Spectrele de absorbantă ale extractelor floemice au constat în evaluarea cantitativă a compușilor ce absorb în regiunea ultravioletă. Probele au fost diluate corespunzător, iar înregistrarea spectrelor s-a realizat cu ajutorul unui spectrofotometru tip Karl Zeiss Jena (200-350nm).

2.2. Scurtă prezentare a metaboliților luați în studiu

Pigmenții asimilatorii sunt principalii componenți, care, având sediul în cloroplaste, transformă energia solară în energie chimică de reacție, în procesul fotosintezei. Sub influența SO₂, se constată o distrugere a cloroplastelor, o scădere a concentrației în clorofilă, prin transformarea lor în feofitină, cu pierderea ionului de Mg din molecula clorofilei (Neamțu, 1983)

Proteinele sunt compuși macromoleculari, cu structură complexă, ce prezintă în organisme un puternic dinamism, de specie, individ, țesuturi. În ceea ce privește creșterea sau descreșterea conținutului în proteine, în contact cu factorii poluanți, există până în prezent 2 teorii : una apreciază că descreșterea conținutului în proteine datorită acțiunii SO₂, ar fi atribuită unei inhibiții la nivelul sintezei proteice sau a unor degradări a proteinelor (Ting, 1971; Tomlinson et. al., 1967), iar alta explică creșterea conținutului în proteine, sub influența SO₂, ca o intensitate a sintezei proteice, în răspunsul de apărare a plantelor (Craker și Starbuck, 1972).

Peroxidaza este o enzimă oxido-reductazică, care descompune apa oxigenată din celule H₂O₂ în prezența unui donor de hidrogen, eliberând energia necesară altor procese metabolice. Deși, ca sistem enzimatic, peroxidaza este poate cea mai cercetată, rolul ei în plante este încă neelucidat complet.

Așa cum afirmă B.L. Saunders et al. (1964), peroxidaza este distribuită peste tot în plante, ea este implicată în creștere și dezvoltare (Trinih, 1961; Van Huyte, 1982), în balanța hormonală (Schneider, 1970) în diferite condiții de stress induse de temperatură (Hofferck, 1981), în stress mecanic (Birecks, 1974) în condiții de poluare a aerului, în special SO₂ (Castillo, 1980), în iradiere cu raze X (Thomas, 1979; Castillo, 1984), raze UV (Yannarelli, 2005) în infecții datorită agenților patogeni (Kaul et al., 1980).

S-au făcut de asemenea aprecieri cu privire la inhibiția creșterilor și procesului de lignificare, ca răspuns la agenții poluanți (Heath, 1984), în strictă dependență cu creșterea izoperoxidazelor bazice, urmată de creșterea izoperoxidazelor acide (Gaspar, 1985). În ceea ce privește emisia luminoasă a reacțiilor peroxidazei din plante, literatura de specialitate prezintă informații legate de emisia de lumină în plante care

poate să apară de obicei în timpul unui stress mecanic (Salin, 1981,1985) fiind similară cu sistemul leucocitic (de apărare), a mieloperoxidazei, de la animale (descries de Klebanoff, 1967, citat de Salin, 1981).

Studiindu-se posibilele mecanisme de reacție care furnizează emisia de lumină a peroxidazei din plante, s-a constatat că un rol important îl are apariția oxigenului singlet O_2 în mediul de reacție, care prin relaxarea sa la forma normală O_2 , determină o emisie de lumină (Slawinska, 1978). Oxigenul singlet este un produs potențial al reacțiilor fotochimice, fiind un agent dăunător în toate organismele vii (Knox, Dodge, 1985). Metaboliții secundari, cu diverse origini biogenetice cum ar fi chinone, furancumarine, poliacetilene, tiofeni, sunt capabili să fotogenereze oxigen singlet sugerând folosirea intensă a acestui potențial, ca agent de protecție și apărare (Knox, Dodge, 1985).

2.3. Prelevarea materialului de analiză

Prelevarea acelor și frunzelor. Aceste probe, reprezentate de amestecuri de frunze și ace, au fost recoltate din treimea inferioară a coroanei de la câte 10 arbori, cu diverse grade de vătămare, din 14 unități amenajistice, din zona industrială Copșa Mică. Prelevarea probelor de scoarță. Probele de scoarță, au fost recoltate de la aproximativ 10 arbori individuali, dintr-o specie reprezentativă pentru o unitate amenajistică, realizându-se recoltări din 10 asemenea unități amenajistice, din zona industrială Copșa Mică.

2.4. Fumigarea artificială cu SO_2 a puietilor de gorun în vârstă de 2 ani

Așa cum se apreciază în literatura de specialitate există 2 posibilități de fumigare: prima când se folosește poluant în concentrații aproape de valoarea reală pe perioade de zile și săptămâni, a doua când se fumighează cu concentrații foarte mari de poluant, pentru o perioadă scurtă de timp (minute sau ore), fiind supusă poluantului fie toată planta, fie părți din plantă. Când se investighează mecanismul fiziologic al răspunsului plantei, al doilea procedeu este eficient, deoarece efectele primare se pot evidenția cu ușurință, iar răspunsurile secundare și adaptive vor fi eliminate (Minchin, 1986).

Experimentul nostru a pornit cu 12 exemplare de gorun, cu aspect fenologic asemănător, care au fost împărțite în două loturi A și B. Ele au fost supuse inițial unui proces de "interacție" prin badijonare la nivelul tulpinii lor, cu hârtie cromatografică, îmbibată cu 2 fracțiuni glicoproteice, (efectori glicoproteici), în cantități variabile (tabelul 1). Cei 2 efectori au fost extrași din floemul unui gorun sănătos, în vârstă de 40 ani, folosind cromatografia de afinitate.

În figura 2 se prezintă experimentul din seră cu puietii de gorun în vârstă de 2 ani și etapele de lucru la analiza materialului prelevat din organele vegetative și din tulpinițe, înainte și imediat după gazarea cu SO_2 .

Tabelul 1. Schema privind modul de badijonare a puietilor de gorun cu 2 efectori glicoproteici
Scheme regarding the infussed procedure of sessile oak seedlings by using two - glycoprotein effectors

Numărul exemplarului analizat	Cantitățile de efectori glicoproteici G_1^x și G_2^{xx}	
	Lotul A (martor)	Lotul B (pentru gazare)
1	MARTOR	MARTOR
2	0,15 mg/ml G_1^x	0,15 mg/ml G_1
3	0,4 mg/ml G_1	0,4 mg/ml G_1
4	0,1 mg/ml G_2^{xx}	0,1 mg/ml G_2
5	0,2 mg/ml G_2	0,2 mg/ml G_2
6	0,1 mg/ml G_1 + 0,02 mg/ml G_2	0,1 mg/ml G_1 + 0,02 mg/ml G_2

G_1^x = efector glicoproteic 1

G_2^{xx} = efector glicoproteic 2

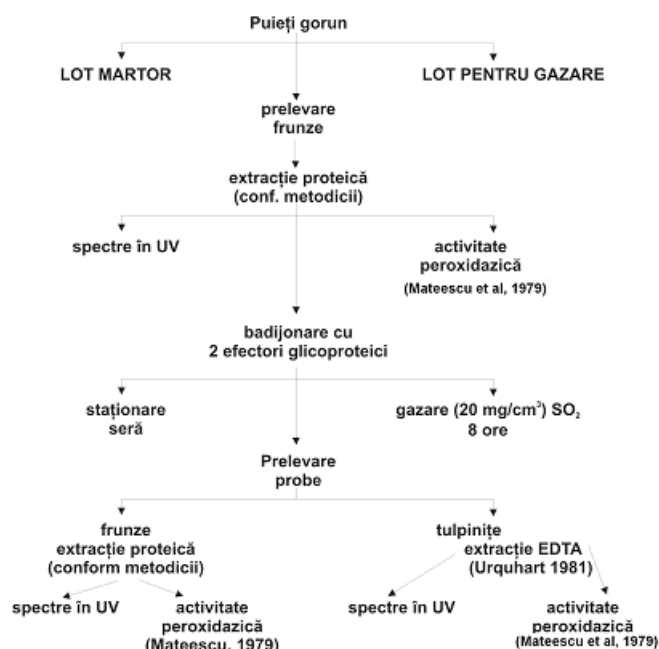


Fig. 2. Schemă cu experiment și analiză a materialului prelevat de la puietii de gorun din seră
Scheme with experiment and analysis of sampling material from sessile oak seedling in greenhouse

Izolarea efectorilor glicoproteici ce reglează activitatea enzimatică a peroxidazei din același țesut *in vitro* s-a realizat folosind cromatografia de afinitate. Această tehnică se bazează pe interacțiile specifice biologice existente între compușii unui amestec. În cazul nostru, pe o matrice insolubilă reprezentată de Sepharosa 4 B, activată cu BrCN, s-a imobilizat peroxidaza purificată din hrean. Tehnica cromatografiei de afinitate permite ca toți compușii care nu interacționează cu peroxidaza imobilizată să se elimine, rămânând doar compușii care au prezentat afinitate pentru această peroxidază. La floemul de gorun s-au evidențiat astfel 4

compuși de origine glicoproteică, care au interacționat cu enzima (Budu, nepublicat). Efectul de interacție al peroxidazei din gorun cu cei 4 efectori este încă necunoscut. Noi am încercat să evidențiem eventualele efecte asupra activității peroxidazice, la plantulele de gorun, prin badijonarea tulpinilor numai cu 2 dintre efectori. Cei 2 efectori, însemnați cu G_1 și G_2 , reprezintă primele 2 fracțiuni glicoproteice care au fost eliminate de pe coloana de peroxidază imobilizată pe Sepharoza 4B, activată cu BrCN, prin folosirea unui tampon de pH acid, care să elibereze efectorii legați de enzimă.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În literatura de specialitate se apreciază că metodele biochimice efectuate în câmp liber nu oferă avantaje semnificative pentru o diagnosticare timpurie a gradului de vătămare, nici pentru o analiză cauzală făcându-se abstracție de cheltuiala ridicată de muncă (Landolt, 1983). Față de această apreciere considerăm însă, ca și H. Hütterman (1983), că astfel de analize sunt strict necesare, deoarece numai în arealul lor normal de creștere, arborii își pot exercita reacția lor specifică, la mediu, sub efectul tuturor influențelor externe, aici fiind mediul, de unde, apoi, se vor selecta acei arbori care vor prezenta fenomenul de rezistență, spre analize în cabine test.

3.1. Rezultate privind concentrația în pigmenți asimilatori

Analizele privind concentrația în pigmenți asimilatori au făcut obiectul primelor investigații biochimice din teren. Determinarea concentrațiilor în pigmenți asimilatori pe amestec de material foliar, prelevat de pe arbori, din zona Copșa Mică, a permis ca suprafețele analizate să fie eșalonate în funcție de acești parametrii (tabelul 2).

Astfel, la gorun s-a constatat o concentrație maximă în pigmenți asimilatori, în UP I, u.a. 17A, mai ferită de influența poluării, iar concentrația minimă în UP I, u.a. 1A, puternic afectată de poluare.

La pin negru, concentrația maximă în pigmenți s-a evaluat în zona UP IV, u.a. 18A și UP VII, u.a. 17B, slab afectată de poluare, iar concentrația minimă în UP I, u.a. 1A și 3A, puternic afectate de poluare. La molid concentrația maximă s-a evidențiat în UP VII, u.a. 3A, situate la 17 km de sursa de poluare, iar concentrația mai scăzută în UP IV, u.a. 18B și UP VII, u.a. 75D. Pinul silvestru a prezentat concentrația maximă în UP VII, u.a. 7A, iar minima s-a evaluat în UP IV, u.a. 18B, sensibil apropiate ca valoare din cauză că aparțin aceleiași zone de vătămare.

Variația concentrației în pigmenți asimilatori la arbori individuali este prezentată în tabelul 3. Astfel, la pin negru s-a constatat că, în UP I u.a. 1A, arborele cu numărul 47, afectat fenologic puternic, a prezentat o concentrație scăzută în pigmenți

asimilatori față de alte exemplare din aceeași zonă, dar cu grade de vătămare diferite.

Tabelul 2. Variația concentrației în pigmenți asimilatori, la unele arborete din suprafețele de probă permanente, amplasate în zona Copșa Mică, Ocolul silvic Mediaș
Variation of chlorophylls and carotenes of foliage materials collected from different stands in Copșa Mică industrial areas

Nr. crt.	Specie	Zona de vatamare*	UP	u.a.	Concentratie clorofila A (mg/l)	Concentratie clorofila B (mg/l)	Total caroteni (mg/l)
1.	Gorun	III	I	17A	29,74	13,77	12,07
2.	Gorun	II	III	16D	22,37	10,22	6,60
3.	Gorun	I	I	2G	18,97	9,67	6,51
4.	Gorun	II	II	104F	13,42	6,80	5,55
5.	Gorun	I	I	1A	12,11	6,17	5,55
6.	Pin negru	III	IV	18A	19,46	10,12	9,66
7.	Pin negru	III	VII	3A	18,37	7,99	6,20
8.	Pin negru	II	VII	17B	9,37	4,88	4,67
9.	Pin negru	I	I	1A	8,78	4,29	3,34
10.	Pin negru	I	I	3A	8,16	4,75	3,26
11.	Molid	III	VII	3A	14,43	7,20	5,79
12.	Molid	II	VII	75D	13,28	6,90	4,60
13.	Molid	III	IV	18B	12,70	6,45	4,59
14.	Pin silvestru	III	VII	7A	15,89	8,10	5,79
15.	Pin silvestru	III	IV	18B	14,50	6,88	5,55

Notă: * - zona cu influență puternică și foarte puternică; II - zonă cu influență medie; III - zonă cu influență slabă

Tabelul 3. Variația concentrației în pigmenți asimilatori la arbori individuali din unele arborete din suprafețele de probă permanente amplasate în zona Copșa Mică
Variation of chlorophylls and carotenes of foliage materials collected from individual trees in some stands in Copșa Mică

Nr. Crt.	Specie	UP	UA	Nr. arb.	Grad de vatamare	Concentratie clorofila A (mg/l)	Concentratie clorofila B (mg/l)	Total caroteni (mg/l)
1.	Pin negru	I	1A	76	Mediu afectat	15,81	7,56	5,63
2.	Pin negru	I	1A	65	Puternic afectat	8,8	4,09	3,38
3.	Pin negru	I	1A	47	Puternic afectat	7,5	3,33	2,13
4.	Pin negru	VII	71D	X ₁	Slab afectat	19,48	9,54	7,16
5.	Pin negru	VII	71D	X ₂	Mediu afectat	17,36	8,25	5,96
6.	Gorun	I	1A	80	Slab afectat	21,89	9,97	6,28
7.	Gorun	IV	18B	X ₁	Puternic afectat	16,86	8,40	5,63
8.	Gorun	VII	6A	111	Mediu afectat	19,94	10,16	6,20
9.	Gorun	VII	6A	25	Mediu afectat	18,77	9,17	6,04
10.	Fag	VII	71D	X ₁	Slab afectat	20,00	9,01	7,16
11.	Fag	IV	18B	X ₁	Puternic afectat	11,88	8,03	6,52
12.	Fag	IV	18B	X ₂	Puternic afectat	10,20	5,40	3,54

În UP VII, u.a. 71D, deși este o zonă relativ ferită de poluare, exemplarul ales, mediu afectat, a prezentat o concentrație mai scăzută în pigmenți clorofilieni decât arborele fenologic neafectat.

La gorun, exemplarul ales (80), slab afectat, deși aflat în zona cu poluare intensă (UP I, u.a. 1A), a prezentat o concentrație de pigmenți asimilatori relativ ridicată. La fel se poate aprecia și exemplarul puternic afectat, care deși aflat în zona de poluare relativ scăzută (UP IV, u.a. 18), a prezentat o concentrație scăzută de pigmenți asimilatori.

Exemplele alese în UP VII, u.a. 6A, slab afectată de poluare, au prezentat valori apropiate ale concentrațiilor în pigmenți asimilatori. La fag s-a constatat că în UP VII, u.a. 71D, exemplarul ales fenologic sănătos a prezentat valori în pigmenți asimilatori ridicate, spre deosebire de exemplele alese, tot dintr-o zonă slab afectată de poluare (UP IV, u.a. 18B), dar puternic afectată fenologic, când concentrațiile în pigmenți au fost scăzute.

S-a putut constata astfel că indiferent de gradul de poluare a zonei cercetate, arborii individuali au grade de vătămare diferite, răspund în mod unitar, în sensul scăderii concentrațiilor în pigmenți asimilatori pe măsură ce gradul de vătămare crește fenologic în coronament. Valorile mai scăzute de pigmenți clorofilieni indică o depreciere fiziologică a arborilor din zonele respective, ca urmare a poluării aerului (Ianculescu, 1977). Variația concentrației în total proteine și activitate peroxidazică, în material foliar, a fost evaluată în 9 arborete (tabel 4). S-a putut aprecia că atunci când concentrația în total proteine este ridicată și activitatea peroxidazică este ridicată. Concentrații ridicate în total proteine și activitate peroxidazică s-au evidențiat la gorun în UP II, u.a. 13 și UP I, u.a. 1A, ambele situate în zone de poluare maximă. La arboretele din UP II, u.a. 122, u.a. 104F și u.a. 108, situate în zone de poluare puternică, respectiv medie, atât concentrația în proteine totale, cât și activitatea peroxidazică, sunt relativ scăzute. La pin negru s-a constatat o creștere în total proteine și activitate peroxidazică în UP I, u.a. 1A, zonă mult mai afectată de poluare decât UP VII, u.a. 17A.

Tabelul 4. Variația concentrației în total proteine și activitate peroxidazică în material foliar, din unele arborete în zona industrială Copșa Mică, Ocolul silvic Mediaș
Variation of total proteins and peroxidase activity obtained from foliage materials in different stands in Copșa Mică industrial areas

Nr. crt.	Specie	UP	u.a.	Grad vătămare pe arboret*	Concentrație Total Proteina mg proteina/ml	Activitate peroxidazică moli ascorbat/min ml oxidat
1.	Gorun	II	13	m-s	0,980	64,00
2.	Gorun	I	1A	fp	0,825	73,36
3.	Gorun	II	18B	fp	0,630	16,39
4.	Gorun	IX	4E	m	0,599	14,33
5.	Gorun	II	104F	m	0,580	10,03
6.	Gorun	II	122	p	0,527	13,61
7.	Gorun	II	108	m	0,425	6,60
8.	Pin negru	I	1A	fp	1,211	58,43
9.	Pin negru	VII	17A	m	0,827	13,81

Cunoscând din literatură cele două teorii, cu privire la creșterea, respectiv descreșterea sintezei proteice, sub influența stresului extern, se poate face aprecierea că, acești 2 parametri analizați, la nivelul arboretelor nu variază liniar, cu gradul de poluare, ci cresc sau scad, în funcție de activarea sau inhibiția proteică, controlată de gene și reacțiile metabolice, care intră în acțiune la acest nivel.

3.2. Rezultate referitoare la determinarea fracțiunilor proteice din floemul de gorun

Folosind tehnica SDS electroforezei s-au evidențiat 40 benzi proteice cu greutatea moleculară care au variat de la 70.000 Daltoni, la capătul catodic al gelului (-), până la 15.000 Daltoni, la capătul anodic al gelului (+) (fig. 3).

Frecvențele de apariție ale fracțiunilor proteice evaluate la 4 arborete din suprafețele de probă permanente sunt prezentate în tabelul 5.

Făcând o comparație între cele patru zone de gorun analizate, în funcție de frecvența de apariție a fracțiunilor proteice s-a constatat că acestea se pot subîmpărți în trei categorii: prima categorie o reprezintă fracțiunile proteice care au frecvență de apariție ridicată și relativ constantă, indiferent de zona cercetată cum se prezintă benzile 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 16, 20, 26, 29, 32, 34, 36, 38, 40. Acestea ne sugerează că apar cu frecvență mare indiferent de gradul de poluare, reprezentând fracțiuni de bază ale floemului, ce nu suferă modificări în relația cu mediul. A doua categorie o reprezintă fracțiunile proteice care apar cu frecvență redusă, în toate suprafețele analizate, cum ar fi benzile: 6, 13, 15, 17, 28, 30.

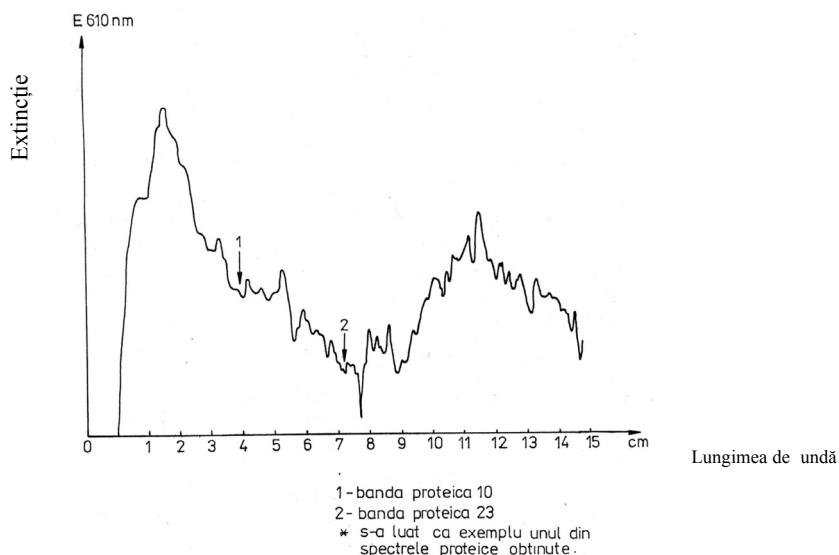


Fig. 3. Reprezentarea variației benzilor proteice de la nivelul floemului de gorun obținut prin densitometrie

Evaluation of proteins bands of sessile oak's phloem analysed by densitometry

Tabetul 5. Frecvența de apariție a proteinelor din floemurile evidențiate pe SDS electroforeză și densiometrare la 610 nm
The frequency of phloem's proteins analysed and evaluated by means of SDS electrophoresis and densiometry at 610 nm

Nr. Crt	Suprafața de probă permanentă din ...	Nr. de arb. analizați	Frecvența de apariție (b) a benzilor la arborii analizați																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1.	OS Dumbraveni, UP I, u.a. 5D	10	37	50	62.5	12.5	62.5	12.5	37	25	50	50	25	50	25	25	12.5	75	0
2.	OS Medias, UP III, u.a. 16D	10	40	40	40	20	60	0	20	20	60	20	0	40	0	20	0	60	0
3.	OS Medias, UP IV, u.a. 25C	5	20	20	60	20	60	20	20	20	40	0	0	40	0	0	0	60	0
4.	OS Medias, UP I, u.a. 1A	10	66	66	50	16.7	66	0	16.7	16.7	66	50	66	56	0	16.7	16.7	50	16.7

Frecvența de apariție (b) a benzilor la arborii analizați																						
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
12.5	25	62.5	37	0	62.5	12.5	12.5	75	12.5	25	100	25	25	100	12.5	75	25	88	12.5	50	12.5	50
20	20	40	60	40	20	20	40	20	0	60	0	0	0	60	40	60	40	40	40	60	40	100
0	0	40	0	60	0	0	0	40	0	20	60	0	0	60	0	60	0	60	0	50	0	60
0	33	66	33	33	100	33	66	66	33	0	83	16.6	16.6	83	33	83	16.6	83	16.6	83	16.6	66

Acestea sunt fracțiuni minore la nivelul floemului, ce apar la un număr relativ scăzut de exemplare, independent însă de gradul de poluare al mediului. A treia categorie de fracțiuni proteice o reprezintă benzile a căror frecvență de apariție este variabilă de la o suprafață la alta. Din această categorie fac parte benzile 10 și 23 a căror distanță de la start este de 4,4, respectiv 8 cm (fracțiunile sunt individualizate prin săgeți, în fig. 3). S-a constatat astfel că la nivelul benzii 10, -arboretul din UP I u.a. 1A, din OS Mediaș, foarte afectat de poluare, a prezentat aceeași frecvență de apariție cu arboretul din UP V, u.a. 5D, OS Dumbrăveni, slab afectat de poluare, sau chiar considerat a fi martor, neafectat.

La nivelul fracțiunii proteice 23, în UP I, u.a. 1A, din OS Mediaș, puternic poluat, există o frecvență de apariție de 100%, față de 62%, cât s-a înregistrat în UP V, u.a. 5D, din OS Dumbrăveni slab poluat.

La UP III, u.a. 16D, din OS Mediaș, puternic poluat, frecvența celor 2 fracțiuni proteice a rămas constantă, înregistrând, valori mici de 20%. Arboretul din UP IV, u.a. 25C, mediu afectat de poluare, nu a prezentat aceste benzi în nici unul din exemplare analizate.

Scăderea bruscă a frecvențelor acestor 2 fracțiuni proteice în zone cu poluare mai ridicată, ca UP III, u.a. 16D și UP IV, u.a. 25C, față de zona UP V, u.a. 5D, din Ocolul silvic Dumbrăveni, puțin afectată de poluare, o apreciem ca sensibilitate de răspuns a acestor fracțiuni proteice la factorii poluanți, care le inhibă sinteza proteică. Apariția unei frecvențe constante în UP I, u.a. 1A, puternic afectată de poluare, a fracțiunii proteice 10, sau creșterea frecvenței de apariție a fracțiunii proteice 23, de 100%, ne indică faptul că la un anumit grad de poluare, aceste fracțiuni proteice apar în procesul de adaptare a speciei la poluarea mediului.

Variația activității peroxidazice și a efectului luminiscent al peroxidazei, la nivelul floemului este prezentată în tabelul 6. Astfel s-a constatat că la pin negru, în UP VII, u.a. 17B, activitatea peroxidazică, la 7 arbori din 10 aleși este practic nulă sau foarte scăzută, astfel că nu poate fi sesizată de spectrofotometru. Cunoșcând că analiza spectrofotometrică de evaluare a activității peroxidazice, s-a realizat pe un extract obținut prin simpla difuziune celulară (în prezență de EDTA), se poate aprecia că transferul din celulă spre soluție a fost blocat. Deci, sub influența poluării pereții celulari, de la nivelul floemului, își blochează porii și nu permit trecerea enzimei în soluție.

În paralel, întâlnim valori ridicate ale activității peroxidazice, între 1-2 $\mu\text{moli/pBQ}/\text{min}/\text{ml}$, în special la fag și cu totul izolat la gorun și molid. Aceasta înseamnă că la unii arbori întâlnim o creștere a activității peroxidazice, ca răspuns la condițiile de stress poluant. Tot ca răspuns apare și inhibiția activității peroxidazice. Așa cum s-a apreciat anterior, activitatea peroxidazică nu apare ca un indicator liniar, în condiții de stress poluant. Ea prezintă valori extreme, minime sau maxime, la arborii stresați fiziologic.

În ceea ce privește distribuția activității peroxidazice, în funcție de efectul luminiscent al peroxidazei, la nivelul floemului se constată că aceasta este dependentă de specia luată în studiu (specie specific) și de gradul de vătămare al arboretelor din suprafețele analizate.

Tabelul 6. Variația activității peroxidazice și a emisiei luminoase a peroxidazei, la nivelul floemului, prelevat de la arbori individuali, din arboretele din unele suprafețe de probă amplasate în zona industrială Copșa Mică
Variation of peroxidase activity and phloem chemibioluminiscence, obtained from individual trees, stands of permanent sample plots in Copșa Mică industrial areas

Nr. Crt.	Specia	Suprafata de proba permanenta din ocolul silvic; UP; ua	Nr. arbore	Activitate peroxidazică $\mu\text{moli pBO}/\text{min}/\text{ml}$	Emisie luminoasă E432 mm		
0	1	2	3	4	5		
1	Gorun	Ocolul silvic Dumbrăveni - UP V, u.a. 5D,	22	0,7971	0,040		
2			113	0,7851	0,065		
3			120	0,4471	0,070		
4			Martor-slab poluat	40	0,3925	0,155	
5				67	0,3360	0,045	
6				107	0,2797	0,065	
7				50	0,2235	0,080	
8				98	0,1116	0,001	
9				119	0,0000	0,150	
10			Ocolu silvic Medias - UP III, u.a. 16D	Puternic poluat	44	2,4592	0,165
11					66	0,7675	0,280
12					79	0,5637	0,080
13					89	0,3925	0,100
14					55	0,3925	0,065
15					8	0,2797	0,310
16					49	0,2236	0,200
17					15	0,1675	0,240
18					90	0,0000	0,130
19					X	2,7141	0,070
20	Ocolul silvic Medias - UP I, u.a. 1A	Foarte puternic poluat	80	2,5698	0,170		
21			79	0,8566	0,005		
22			48	0,5063	0,235		
23			77	0,4471	0,075		
24			19	0,3925	0,100		
25			44	0,3911	0,015		
26			55	0,3360	0,090		
27			53	0,2235	0,084		
28			51	0,0000	0,105		
29			Ocolul silvic Medias - UP IV, u.a. 25D	Mediu la slab poluat	17	2,3552	0,128
30	34	0,8941			0,100		
31	62	0,8391			0,075		
32	13	0,5594			0,088		
33	100	0,5026			0,085		
34	18	0,4471			0,060		
35	30	0,3349			0,090		
36	60	0,2233			0,050		
37	73	0,0558			0,005		
38	X ₁	1,8582			0,305		
39	Fag	Ooclul silvic Medias - UP IV, u.a. 18E	X ₂₀	1,8458	0,330		
40			X ₉	1,4908	0,155		
41			Slab poluat	X ₅	1,1636	0,245	
42				X ₆	0,9774	0,355	
43				X ₃	0,9741	0,135	
44			X ₈	0,8366	0,215		
45			X ₄	0,6214	0,295		
46			X ₂	0,5637	0,198		
47			X ₇	0,5063	0,305		
48			Ocolu Silvic Medias - UP IV Boian, u.a. 21C	Slab poluat	11	2,2385	0,120
49	3	1,9482			0,145		
50	23	1,9209			0,160		
51	19	1,5593			0,040		
52	22	1,4208			0,235		
53	27	1,4908			0,060		
54	5	1,1636			0,040		
55	13	0,3925	0,270				

Tabelul 6 (continuare)

0	1	2	3	4	5
56	Fag	Ocolul silvic Medias - UP IV,	37	1,6999	0,310
57		u.a. 44A	95	1,4908	0,080
58		Slab - mediu poluat	87	1,0387	0,100
59			48	0,6214	0,280
60			59	0,6214	0,225
61			90	0,5063	0,050
62			88	0	0,130
63	Pin negru	Ocolul Silvic Medias - UP VII,	100	0,2235	0,089
64		u.a. 17B	55	0,1676	0,170
65		Slab poluat	14	0,1116	0,105
66			93	0,0000	0,150
67			49	0,0000	0,075
68			14	0,0000	0,035
69			94	0,0000	0,045
70			103	0,0000	0,100
71			12	0,0000	0,170
72			58	0,0000	0,089
73			42	0,0000	0,025
74		Ocolul silvic Medias - UP IV,	X ₅	0,3360	0,025
75		u.a. 18B	X ₄	0,2236	0,075
76		Slab poluat	X ₉	0,2236	0,035
77			X ₆	0,0236	0,125
78			X ₃	0,1676	0,055
79			X ₇	0,0000	0,160
80			X ₁	0,0000	0,095
81			X ₂	0,0000	0,120
82		Ocolul silvic Medias - UP I,	12	0,5637	0,145
83		u.a. 1A	61	0,3925	0,060
84		F puternic poluat	28	0,2235	0,045
85			76	0,1676	0,050
86			21	0,1676	0,085
87			62	0,1670	0,130
88			16	0,1676	0,160
89			47	0,1116	0,100
90			25	0,0558	0,165
91	Molid	Ocolul silvic Medias - UP IV,	X ₄	1,5702	0,085
92		u.a. 18B	X ₇	1,1188	0,160
93		Slab poluat	X ₁₀	0,8391	0,135
94			X ₉	0,5593	0,090
95			X ₈	0,5026	0,088
96			X ₅	0,2232	0,085
97			X ₁	0,1116	0,160
98			X ₃	0,1116	0,340
99			X ₆	0,0558	0,265
100		Ocolul silvic Medias - UP VII,	51	0,6706	0,195
101		u.a. 75D	8	0,5027	0,290
102			37	0,4493	0,175
103		Slab la mediu poluat	26	0,4471	0,190
104			46	0,2797	0,165
105			28	0,2235	0,200
106			29	0,2235	0,160
107			20	0,1675	0,220
108			31	0,1116	0,145

Indicele de corelație al activității peroxidazice, în funcție de emisia luminoasă a peroxidazei, este $r_{xy} = 0,524$, la molid, pentru $\alpha = 5\%$.

La celelalte specii luate în studiu, cei doi parametri nu au avut coeficientul de corelație semnificativ. S-a putut constata, totuși, că la pin, apare o uniformitate de răspunsuri, în ceea ce privește activitatea peroxidazică în funcție de emisie luminiscentă, acestea plasându-se la nivelul ordonatei între valorile de extincție de 0,1 - 0,4 la majoritatea exemplarelor studiate.

La gorun, întâlnim aceeași uniformitate de răspunsuri, a căror valori se încadrează între 0,0-0,2, valori de extincție. Se poate aprecia că pe măsură ce gradul de poluare este mai mare, specia mai afectată răspunde aproape uniform, fie cu activitate peroxidazică scăzută și constantă și emisie luminoasă variabilă, ca în cazul pinului, fie cu emisie luminoasă aproximativ constantă și activitatea peroxidazică variabilă, ca în cazul gorunului, în funcție de factorii complexului metabolic ce intră în funcțiune, și care probabil este specie specific.

Deci arborii, indiferent de starea lor fenologică, în condiții de poluare ridicată, răspund similar, datorită presiunii de selecție, dată de poluarea cu compuși ai sulfului în acțiune sinergică cu metalele grele care determină ca anumite cicluri metabolice să fie transformate într-o anumită direcție.

La fag, dispersia valorilor este astfel încât nu se pot face aprecieri cu privire la distribuția valorilor de activitate peroxidazică în funcție de emisia luminiscentă a peroxidazei. Ținând cont de faptul că suprafețele de fag alese în prezentul studiu nu sunt afectate de poluare (excepție face totuși arboretul din UP IV, u.a. 18), se poate aprecia că arborii nu răspund unitar la acești parametri, fiecare răspuns fiind în funcție de starea de sănătate și metabolică a arborilor respectivi. Rezultatele referitoare la experimentul efectuat, în premieră, la puietii de gorun stimulați și gazați artificial cu SO_2 , din lipsă de spațiu, vor face obiectul unei alte lucrări.

4. CONCLUZII

În zonele afectate de poluare s-a constatat o scădere evidentă a pigmentilor asimilatori, atât la nivelul diferitelor arborete, cât și la nivelul arborilor individuali. La acest nivel s-a constatat o scădere direct proporțională cu gradul de vătămare fenologică, indiferent de gradul de poluare a suprafeței analizate.

Indicatorul biochimic, total proteine, nu variază linear cu gradul de poluare, el crescând sau scăzând în funcție de gradul poluării, care determină activitatea sau inhibiția proteică, controlată de gene sau reacții metabolice care intră în acțiune la acest nivel. S-a stabilit că fracțiunile proteice de la nivelul floemului, determinate pentru prima dată, (benzile 10 și 23), pot fi sesizoare sensibile ale gradului de vătămare, modulând în anumite condiții adaptarea arborilor la stresul poluant, prin creșterea sintezei acestor fracțiuni.

Variația activității peroxidazice de la nivelul floemului în funcție de intensitatea

luminoasă a peroxidazei răspunde în mod uniform, în condiții de poluare ridicată (vezi pin negru și gorun), ca răspuns de adaptare a speciilor forestiere la presiunea de selecție metabolică exercitată de poluarea cu SO₂. În urma efectuării unor experimente, în premieră, privind stimularea unor puiți de gorun, cu extracte glicoproteice, ce induc modificări la nivelul peroxidazei din plantele respective, s-au putut constata următoarele: acești compuși ajung în circuitul metabolic, de la nivelul plantelor respective, inducând efecte de activare, respectiv de inhibiție, asupra activității peroxidazei de la nivelul materialului foliar. Există astfel premise ca efectul glicoproteic G₁ să fie implicat în procesul de apărare al plantei la stresul cu SO₂.

Analizând indicatorii biochimici luați în studiu se poate aprecia că în condițiile depistării exemplarelor rezistente este nevoie să se aprofundeze sistemele de analiză de la nivelul fracțiunilor proteice, floemice în paralel cu emisia luminiscentă și activitatea peroxidazică de la acest nivel.

În condiții controlate este strict necesar să se mărească seria experimentărilor privind gazările controlate precum și interacțiile cu efectori glicoproteici, care sunt specii specifici.

Este necesar de asemenea de a se mări aria investigațiilor fundamentale referitoare la modul de acțiune a acestor efectori față de peroxidaza extrasă din același țesut, *in vitro*, pentru a putea prevedea răspunsul plantelor în cazul în care se intervine cu acești compuși. Acest lucru este foarte important în evaluarea practică a strategiei de protecție a arborilor și arboretelor, ce suferă din cauza diversilor factori de stress, biotici și abiotici.

În contextul modificărilor de mediu, tot mai evidente în ultimul timp, apar noi întrebări vis-a vis de relația pădure și modificările climatice: cât de afectate sunt pădurile și pot pădurile răspunde la aceste modificări? (Ianculescu, 2005 b). Va trebui într-un viitor nu prea îndepărtat să abordăm pe lângă problematica silviculturii arboretelor și pe cea a arborilor individuali. Diagnosticarea timpurie a vătămărilor arborilor și arboretelor din cauza diversilor factori de stress reprezintă unul din cele mai importante mijloace de prevenire și combatere a vătămărilor produse. Se știe că dacă se depistează în faze incipiente diversele vătămări, devin mult mai eficiente și mult mai ieftine, măsurile de prevenire și combatere.

Pe de altă parte, inducerea de rezistență la arbori față de influența compușilor sulfului, după cum a fost demonstrat în cadrul experimentului, prezentat în premieră, în această lucrare, experiment de realizat și în cadrul altor factori de stress, cum ar fi de pildă seceta, cel mai frecvent în ultimul timp, reprezintă o nouă provocare pentru cercetarea științifică din silvicultură.

BIBLIOGRAFIE

- BIRECK, H., MILLER, A., 1974. *Plant Physiol* 53, p. 569
- BUDU, E., 1985. Bioluminiscenta naturală a unor forme multiple ale peroxidazei, în anumite condiții, la *Abies alba* Mill., Conferința națională de fiziologie a plantelor, București
- CASTILLO, F., J., GREPPIN, H.C.R., 1980. *Seanc. Soc. Phys Hist. Nat. Geneva*, 15, 57
- CONSTANTINIDON, H.,A., KOZLOWSKI, T.,T., 1979. *Can. J. Bot.*, 57, p. 176 – 184
- CRAKER, L., E., STARBUCK, J., S., 1972. *Can. J., Plant Sci.*, 52, p. 589 – 597
- DE CORMIS, 1969. *Air Pollution. Proc. of the 1-th Europ. Cong. on the influence of Air Pollution on Plant and Animals*, Wageningen, 75.
- DUMITRIU, I., F., IORDACHESCU, D., 1974. *Enzime*, Ed. Medicala, Bucuresti
- FINK, S., 1983. *AFZ* 25/27: 660-663
- GORG, A., POSTEL, W., WESSER, Y., SCHIVARA, H.W., BRESKEN, W., N., 1985. *Sci Tolls*: 32,5.
- HALLGREN, I., E., FREDRIKSSON, S., A., 1983. *Plant. Physiol.* 70: 456-459.
- HOFFERCK, H., 1981. *Biochim. Physiol. Pflanz* 176, 170
- HUTTERMAN, H., 1983. *AFZ* 26/27: 663-664.
- IANCULESCU, M. et al, 1977. Influenta poluarii aerului asupra cresterii padurilor, ICAS, Seria II, Bucuresti
- IANCULESCU, M. et al, 1987. Cercetări privind dinamica fenomenelor de poluare industrială a pădurilor din zona Copșa Mică. Manuscris, Referat științific final, ICAS, 182 p.
- IANCULESCU, M., BÂNDIU, C., BUDU, C., E., 1989. Modificări ale principalelor procese - ecofiziologice la arborii forestieri ca urmare a influenței poluării în zona Copșa Mică, *Revista pădurilor*, nr. 2 (Anul 104), pp 64 – 68
- IANCULESCU, M., TISESSCU, AI., 1989. Efectele poluării industriale pe bază de compuși ai sulfului în acțiune sinergică cu metalele grele asupra creșterii arboretelor din zona Copșa Mică și evaluarea pagubelor produse, *Revista pădurilor*, Anul 104, nr. 4, pp. 170 – 175
- IANCULESCU, M., 2005a . Aspecte ale relațiilor dintre pădure și poluare. In *Silvologie; Pădurile și modificările de mediu*” vol. IVA, (sub redacția Victor Giurgiu), Editura Academiei Române, pp. 92 – 126
- IANCULESCU, M., 2005b. Perdelele forestiere de protecție în contextul majorării suprafeței pădurilor și al atenuării modificărilor climatice. In *Silvologie „Pădurile și modificările de mediu”*, vol. IVA (sub redacția Victor Giurgiu), Editura Academiei Române, pp. 201 – 223
- IORDACHESCU, D., DUMITRU, I., F., 1980. *Biochimie practica*, Universitatea Bucuresti
- KAUL, J., L., MUNJAN, R., L., 1980. *Indian J. Phytopathol*, 33, 530
- KHAN, A., A., MALHOTRA, S., S., 1977. *Phytochem*, 16, 539
- KHOX, P., J., DODGE, A., D., 1985. *Phytochem*, 24, 88
- KIM, Y., H, LIM, S., HUN, S., H, LEE, J., C., SONG, W., K., BANG, J., W., KWON, S., Y., LEE, H., S., KWAK, S.,S., 2007. *Plant Physiol. and Biochem*, 45, 908-914.
- LAEMMLI, U., K., 1970. *Nature*, 227, 680
- LANDOLT, W., 1983 - *AFZ*, 26 / 27, p. 666 – 668
- LOWRY, O., M., ROSENBROUGH, W., J., FARS, L., A., 1951. *J. Biol. Chem*, 193, 165
- MALHOTRA, S., S., HOCKING, D., 1976. *New Physiol.*, 79, 227
- MALHOTRA, S., S., KHAN, A., A., 1978. *Phytochem.*, 17, 241
- MATEESCU, M., A., SCHELL, H., D., BUDU, C., E., 1979. *Rev. Roum. Biochim.* 16, 2, 115
- MINCHIN, R., E., H., GOULD, R., 1986. *Plant Science*, 43, 179
- NEAMTU, C., 1983. *Biochimie ecologica*, Ed. Dacia, Cluj Napoca, p. 236
- NEAMTU, G., 1981. *Biochimie vegetala*, Ed. Ceres, Bucuresti
- OLSZYK, D., M., TIBBITTS, T., W., 1981. *Plant Physiol*, 67, p. 539 – 544
- ROSEN, P., M., MUSSELMAN, R., C., KENDER, W., J., 1978. *Sci. Hart.*, 8, 137
- SALIN, M.,L., BRIDGES, S.,M., 1981. *Plant. Physiol.* 67, p. 43
- SALIN, M., L., QUINCE, K., L., HUNTER, D., J., 1985. *Photobiochem. Photobiophys.* 9, p. 271

- SAUNDERS, B., C., HOLMES-STEDLE, A., G., STARK, B., P., 1964. Peroxidase: The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Ed. Butterworth, London
- SCHNEIDER, G., 1970. Ann. Rev. Plant Physiol 21, 499
- SHAPIRO, A., L., VINUELA, E., MAIZEL, J., V., 1967. Biochem. Biophys. Rev. Commun, 28, 8, 5
- SLAWINSKI, D., 1978. Photochem. Photobiol. 30, p. 71
- SLAWINSKI, D., J., SLAWINSKI, K., POLEWSKI, K., PUKACKI, W., 1979. Photochem. Photobiol. 30, p. 71 – 80
- STIRBAN, M., FRECUS, GH., 1968. Studii si cercetari biologice, Seria Bot., 20, p. 69 – 79
- TEN, K., H., SWANSON, C., A., 1982. Plant. Physiol, 69, p. 88
- THOMAS, P., HENRY, D., 1979. Physicochemistry, 18, 977
- TING, I., P., MUKERJI, S., K., 1971. Am. J. Bot, 58, p. 497 – 504
- TRINH, T., H., GASPAR, T., H., VAN, T., T., REARCOTTE, J., L., 1981. Physiol Plant 53, 153
- URQUHART, A., A., JOI, K., W., 1981. Plant. Physiol. 68, p. 750
- VAN HUYTTE, R., B., CAIRNS, W., L., 1982. Phytochemistry 21, 1843
- WEBER, K., OSBOURN, M., 1969. J. Biol. Chem, 244, p. 4406 – 4412
- ZIEGLER, I., 1975. Residue Rev., 56, 79
- YANARELLI, G., G., GALLEGGO, S., M., TOMARO, L., M., 2005. Env.Experim. Bot. 56, 174-181