Pokazatelji starenja u listovima duhana (Nicotiana tabacum L.)

Matan, Melita

Master's thesis / Diplomski rad

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:711746

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Melita Matan

POKAZATELJI STARENJA U LISTOVIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2008

Ovaj rad je izrađen u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Pevalek-Kozlina kojoj iskreno zahvaljujem na stručnim savjetima, ponajviše strpljenju i iskazanom povjerenju tijekom izrade ovog rada.

Najljepše zahvaljujem asistentici dr. sc. Sandri Radić koja je imala dovoljno strpljenja i vremena da mi pomogne u svakom trenutku. Najviše joj zahvaljujem na iznimno stručnim i kvalitetnim savjetima koji su mi pomogli dovesti ovaj naš rad do savršenstva. Doista bez nje ovaj rad ne bi bio jedna zaista zaokružena cjelina.

Također zahvaljujem svim ostalim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

Dio ovog rada napravljen je u Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirjane Pavlice, a uz veliku pomoć asistentica dipl. ing. Petre Peharec i dipl. ing. Petre Cvjetko, kojima zahvaljujem na savjetima, velikoj pomoći i strpljenju tijekom izrade rada.

Dio rada napravljen je i u Zavodu za staničnu biologiju i ekofiziologiju biljaka, Odjela za biologiju Sveučilišta u Osijeku uz veliku pomoć doc. dr. sc. Hrvoja Lepeduša i dipl. ing. Ivne Štolfe, kojima također zahvaljujem na pomoći, savjetima i gostoprimstvu prilikom našeg boravka u Osijeku.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima na strpljenju i podršci tijekom svih godina mojeg studiranja, ali isto tako i svojoj «boljoj polovici» koji je morao izdržati sav taj teret zajedno sa mnom.

Na kraju izuzetno sam zahvalna svim svojim kolegama i kolegicama s kojima sam dijelila i lijepe i ružne trenutke, osobito Valeriji Vujčič i Tini Penić.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1 STARENJE LISTOVA 2

1.2 ENERGETSKA PROIZVODNJA 2

1.3 OŠTEĆENJA MEMBRANE 3

1.4 RAZGRADNJA PROTEINA 3

1.5 MODIFIKACIJE NUKLEINSKIH KISELINA 4

1.6 OTROVNI KISIKOVI SPOJEVI I RADIKALI 4

1.6.1 Lipidna peroksidacija 5

1.6.2 Vodikov peroksid 6

1.7 ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV 7

1.7.1 Enzimski mehanizmi 7

1.7.1.1 Superoksid dismutaza 7

1.7.1.2 Peroksidaze 8

1.7.1.3 Katalaza 9

1.7.2 Neenzimski mehanizmi 9

1.7.2.1 Karotenoidi 9

1.7.2.2 Tokoferol 10

1.8 REGULACIJE TIJEKOM STARENJA 10

1.8.1 Okolišni čimbenici 11

1.8.2 Unutarnji čimbenici 11

1.8.3 Signalizacija tijekom starenja 11

2. CILJ ISTRAŽIVANJA **14**

3. MATERIJALI I METODE **15**

3.1 BILJNI MATERIJAL 16

3.2 METODE 16

3.2.1 Kultura duhana (*Nicotiana tabacum* var. xanthi) u uvjetima *in vitro* 16

3.2.2 Mjerenje stvaranja kisika kisikovom elektrodom 18

3.2.3 Određivanje sadržaja pigmenata 18

3.2.4 Utvrđivanje strukturnih promjena svjetlosnom i elektronskom mikroskopijom 19

3.2.4.1 Svjetlosna mikroskopija 19
3.2.4.2 Elektronska mikroskopija 20
3.2.5 Određivanje sadržaja vodikovog peroksida 21
3.2.6 Određivanje sadržaja malondialdehida 22
3.2.7 Određivanje sadržaja karbonila 22
3.2.8 Utvrđivanje oštećenja molekule DNA Komet-testom 23
3.2.9 Utvrđivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima 24
3.2.9.1 Određivanje sadržaja proteina 25
3.2.9.2 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze 25
3.2.9.3 Određivanje aktivnosti katalaze 26
3.2.9.4 Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze 27
3.2.9.5 Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze 27

4. REZULTATI 28
4.1 FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA U LISTOVIMA VRSTE *Nicotiana tabacum* RAZLIČITE STAROSTI 29
4.1.1 Stvaranje i utrošak kisika u listovima duhana različite starosti 29
4.1.2 Sadržaj pigmenata 30
4.1.2.1 Sadržaj klorofila *a* i klorofila *b* 30
4.1.2.2 Sadržaj karotenoida 31
4.2 UTVRĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA SVJETLOSNOM I ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM 32
4.2.1 Svjetlosna mikroskopija 32
4.2.2 Elektronska mikroskopija 33
4.3 POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA 34
4.3.1 Sadržaj vodikovog peroksida 34
4.3.2 Sadržaj karbonila 35
4.3.3 Sadržaj malondialdehida 36
4.4 OŠTEĆENJE MOLEKULE DNA 37
4.5 AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE 38
4.6 AKTIVNOST KATALAZE 39
4.7 AKTIVNOST PEROKSIDAZA 40
4.7.1 Aktivnost askorbat peroksidaze 40

4.7.2 Aktivnost pirogalolol peroksidaze 41

5. RASPRAVA 43

6. ZAKLJUČAK 49

7. LITERATURA 51

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

POKAZATELJI STARENJA U LISTOVIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Melita Matan

Botanički zavod Biološkog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilište u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Duhan se često koristi kao modelna biljka budući je razmjerno tolerantan i široko rasprostranjen. Proces starenja obično izaziva smanjenje fotosinteze te oksidacijski stres. Istraživala sam proces prirodnog starenja u listovima starosti 14, 30, 120 i 270 dana te proces prijevremenog starenja potaknut vodikovim peroksidom (10 mM) u listovima starim 14 dana. U ovom radu praćeni su djelotvornost fotosintetskog aparata (stvaranje i utrošak kisika, sadržaji klorofila i karotenoida), strukturne promjene u stanicama lista, pokazatelji oksidacijskog stresa (sadržaji vodikovog peroksida, malondialdehida i karbonilnih grupa te oštećenje DNA) i aktivnost antioksidacijskih enzima. U svim listovima duhana došlo je do povećanog utroška kisika i smanjenja sadržaja klorofila i karotenoida sa starošću listova kao i u listovima tretiranim vodikovim peroksidom. Poludebeli prerezi listova pokazali su smanjenje kloroplasta sa starošću listova te povećanje broja plastoglobula. Pregledom ultratankih prereza listova uočen je dobro razvijen tilakoidni sustav u svim listovima osim u onima od 14 dana te povećanje plastoglobula sa starošću listova i prisutnost škrobnih zrnaca. Starenjem listova uočeni su porast vodikova peroksida, sadržaja malondialdehida i karbonila dok je u listovima tretiranim vodikovim peroksidom došlo do smanjenja sadržaja vodikovog peroksida te povećanja sadržaja malondialdehida i karbonila. Analiza jezgara stanica komet testom nije pokazala znatno oštećenje molekule DNA. Aktivnost superoksid dismutaze se povećala, a aktivnosti katalaze i peroksidaza smanjila sa starošću listova. U tretiranim listovima aktivnosti antioksidacijskih enzima su se povećale. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na sposobnost učinkovite obrane ove biljne vrste od oštećenja uzrokovanog oksidacijskim stresom te na ulogu vodikovog peroksida kao signalne molekule.

(57 stranica, 14 slika, 1 tablica, 84 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: starenje / *Nicotiana tabacum* L. / oksidacijski stres / antioksidacijski enzimi / oštećenje DNA / strukturne promjene /

Voditelj: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

INDICATORS OF SENESCENCE IN TOBACCO LEAVES *(Nicotiana tabacum* L.)

Melita Matan

Department of Biology
Faculty Of Science
University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Tobacco is often used as model plant because it is widely distributed and considered to be moderately tolerant plant species. The process of senescence is characterized by decline in photosynthesis and induction of oxidative stress. We have investigated the process of natural senescence in leaves old 14, 30, 120 and 270 days and process of artificial senescence induced by 10 mM hydrogen peroxide in leaves old 14 days. The efficiency of photosynthetic system (oxygen evolution and consumption, chlorophyll and carotenoid contents) structural changes in leaf cells, indicators of oxidative stress (contents of hydrogen peroxide, malondialdehyde and carbonyl groups as well as DNA damage) and activities of antioxidative enzymes were monitored. Chlorophylls and carotenoid contents declined while oxygen consumption increased as a result of both natural and artificially induced senescence. Number of chloroplasts decreased while that of plastoglobuls increased with senescence as evident by light microscopy. Ultrathin slices showed well developed thylakoids in all samples and increase of size and number of starch grains as well as plastoglobuls with senescence. Carbonyl and MDA contents increased with natural and artificial senescence while hydrogen peroxide showed increase and decrease with natural and artificial senescence, respectively. DNA damage evaluated by Comet test was not observed in senescent tobacco leaves. Superoxide dismutase activity increased while catalase and peroxidase activities decreased in senescent tobacco leaves. Senescence induced by hydrogen peroxide activities of all antioxidative enzymes increased. Presented results show the efficiency of antioxidative enzymes to fight oxidative stress and show the importance of hydrogen peroxide as a signal molecule.

(57 pages, 14 figures, 1 table, 84 references, original in Croatian)

Key words: senescence / *Nicotiana tabacum* L. / oxidative stress / antioxidative enzymes / degradation of DNA / struktural changes

Supervisor: Prof. Branka Pevalek-Kozlina, Ph. D.

1.1. STARENJE LISTOVA

Starenje listova (senescencija) je završni stadij u životu nekih biljaka. U tom stadiju odvijaju se oksidacijski procesi koji uključuju propadanje staničnih struktura i enzima. Proces starenja reguliraju SAG-geni („senescence-associated genes") koji zajedno s drugim genima uzrokuju razgradnju enzima što naposljetku dovodi do programirane smrti stanice. Prvi vidljivi znak starenja listova je žućenje koje je posljedica razgradnje klorofila u kloroplastima. Kloroplasti sadrže 70-80% ukupnih proteina u listovima, a koji u njima predstavljaju glavni izvor dušika. Većina tih proteina vezana je uz fotosintezu. Prilikom procesa starenja obujam kloroplasta se smanjuje, oblik se mijenja iz ovalnog u okrugli, a tilakoidi se raspadaju. Te promjene prati i razgradnja DNA. Razgradnja klorofila i enzima ribuloza-1,5-bisfosfat-karboksilaze-oksigenaze (RUBISCO) zbiva se u kloroplastima, no daljnji se stupnjevi razgradnje mogu zbivati i izvan kloroplasta kada plastoglobuli koji sadrže klorofil, karotenoide i proteine vezane za fotosintezu izađu iz kloroplasta (Sillanpää 2003).

1.2. ENERGETSKA PROIZVODNJA

Proces fotosinteze koji se odvija u kloroplastima biljnih stanica omogućava opskrbu biljke ugljikohidratima potrebnim za njezin rast i razvoj te je važan izvor energije. U svjetlosnim reakcijama fotosinteze Sunčeva energija se pretvara u kemijsku. Svjetlost koju apsorbira klorofil pokreće prijenos elektrona od vode prema akceptoru elektrona, oksidiranom obliku nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata ($NADP^+$), putem niza redoks-sustava. Kompleksi za sakupljanje svjetlosti (engl. "**l**ight **h**arvesting **c**omplex" – LHCII) fotosistema II (PSII) apsorbiraju svjetlosnu energiju i prenose je do reakcijskog središta P_{680}. Svjetlost inducira oksidaciju vode i prijenos elektrona na feofitin koji je primarni akceptor elektrona, i na dva plastokinona koji se reduciraju u plastokinol. Elektroni se dalje prenose preko kompleksa citokrom b_6f, plastocijanina i fotosistema I (PSI) na $NADP^+$ koji je konačni akceptor elektrona. Svjetlosnim reakcijama nastaje reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata (NADPH) koji je izvor visokoenergiziranih elektrona, a nastali protonski gradijent koristi ATP-sintaza za proizvodnju adenozin-trifosfata (ATP). NADPH i ATP koriste se

u reakcijama Calvinova ciklusa za fiksaciju CO_2 pomoću enzima RUBISCO i njegovu redukciju do ugljikohidrata. Reakcije Calvinova ciklusa nisu ovisne o svjetlosti (Uno i sur. 2001, Pevalek-Kozlina 2003). Tijekom starenja se smanjuje fotosintetska aktivnost kao posljedica smanjenja kapaciteta za sakupljanje svjetlosti (light-harvesting capacity) fotosistema II, količine i aktivnosti enzima RUBISCO, izmjene stope fiksiranja CO_2 i razine ekspresije mRNA fotosintetski vezanih gena te zbog toga kloroplasti proizvode manje NADPH i ATP. Smatra se da se povećanom stopom disanja koja je zamijećena tijekom starenja stvara dovoljno energije u obliku ATP-a potrebne za odvijanje kataboličkih procesa. Nađeno je da se tijekom induciranog starenja povećava broj mitohondrija i peroksisoma u listovima graška (*Pisum sativum* L.). U nekim je istraživanjima zamijećena pretvorba peroksisoma u glioksisome kao i povećana aktivnost enzima glioksilatnog ciklusa koji bi također mogao biti izvorom energije putem derivata masnih kiselina (Pastori i del Río 1997).

1.3. OŠTEĆENJA MEMBRANE

Propadanje membrane tijekom starenja uglavnom je određeno metabolizmom fosfolipida (Thompson i sur. 1998). U senescentnim mikrosomalnim membranama pronađeni su lipolitički enzimi fosfolipaze D, fosfatidne kiseline, fosfataze, lipolitičke acil hidrolaze i lipoksigenaze. Smatra se da je početni stupanj u razgradnji fosfolipida kataliziran fosfolipazom D, ali važnu ulogu imaju i lipoksigenaze jer mogu pokrenuti lipidnu peroksidaciju i stvoriti superoksidne radikale (Thompson i sur. 1998).

1.4. RAZGRADNJA PROTEINA

Osim na recikliranje dušika, razgradnja proteina utječe i na razine receptora te signalne putove uključene u starenje (Callis 1995). Razgradnja proteina pomoću ubikvitina odvija se uglavnom u citosolu i jezgri (Vierstra 1996). Do sada je otkriveno samo nekoliko gena uključenih u put razgradnje proteina pomoću ubikvitina (Buchanan-Wollaston 1997, Park i sur. 1998). U senescentnom su tkivu u velikoj količini prisutne i neke druge proteaze, kao što su endoproteaze, amino- i karboksipeptidaze (Huffaker 1990). Aktivnost proteaza većinom je ograničena na

vakuole (Huffaker 1990), iako su dokazane i u kloroplastima i peroksisomima (Adam i Clarke 2002, Distefano i sur. 1999).

1.5. MODIFIKACIJE NUKLEINSKIH KISELINA

U pravilu jezgrina DNA ostaje nepromijenjena i funkcionalna sve do završnog stadija starenja. Zabilježene su i neke promjene u molekuli DNA npr. povećan broj točkastih modifikacija u senescentnom plutu u usporedbi s mladim tkivom hrasta plutnjaka (*Quercus suber*; Pla i sur. 2000). U biljkama se tijekom starenja također povećava kondenzacija kromatina, a pronađeni su i fragmenti DNA (O'Brien i sur.1998, Yen i Yang 1998). Starenje uzrokovano nedostatkom dušika u listu špinata (*Spinacia oleracea*) dovodi do smanjenja količine DNA kloroplasta. Tijekom starenja smanjuje se razina kloroplastne kao i ukupne RNA (Masclaux i sur. 2000, Bate i sur. 1991). To je povezano s povećanom aktivnosti RNaze tijekom uznapredovale senescencije (Blank i McKeon 1991). Osim toga, identificirana je bifunkcionalna nukleaza koja je sposobna razgraditi obje RNA te jednolanlančanu DNA. Zamijećeno je da u početku procesa starenja dolazi do povećanja aktivnosti te nukleaze kao i količine njene mRNA (Pérez-Amador i sur. 2000).

1.6. OTROVNI KISIKOVI SPOJEVI I RADIKALI

Otrovni kisikovi spojevi i radikali (engl. "reactive oxygen species" – ROS) nastaju u raznim dijelovima stanice i u malim količinama su stalni produkti normalnog staničnog metabolizma. Tijekom normalnog metabolizma mogu nastati i u većim količinama jer su uključeni u sva područja aerobnih procesa poput disanja, fotosintetskog transporta elektrona na komponentama PSI i PSII, oksigenaznom aktivnošću enzima RUBISCO (Foyer i sur. 1994), oksidacijom različitih supstrata i dr. Zbog velike koncentracije kisika kloroplasti se smatraju glavnim izvorom ROS-a u biljnim stanicama (Pevalek-Kozlina 2003, Foyer i Noctor 2000). Toksičnost otrovnih kisikovih spojeva i radikala proizlazi iz njihove sposobnosti da potaknu kaskadne reakcije radikala koje vode oštećivanju proteina, DNA, membranskih lipida i konačno smrti stanice.

Tijekom starenja povećava se stvaranje kisikovih radikala i molekula koje su oštećene radikalima, a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što podiže razinu antioksidansa koji uklanjaju radikale. Njihovo se stvaranje tijekom starenja povećava jer se narušava ravnoteža između njihove proizvodnje i eliminacije (Thompson i sur. 1987). Otrovni kisikovi spojevi i radikali uključuju superoksidni anion O_2-·, perihidroksidni radikal HO_2·, vodikov peroksid H_2O_2, hidroksidni radikal OH·, alkoksi radikal RO·, peroksi radikal ROO·, organski hidroperoksid ROOH, singletni kisik $^1O_2$ i ekscitirani karbonil RO*. ROS mogu oštetiti proteine, lipide, polisaharide i nukleinske kiseline uzrokujući propadanje membrana, inaktivaciju enzima i oštećenja DNA (Thompson i sur. 1987).

Proizvodnja kisikovih radikala, i to alkoksi radikala RO·, peroksi radikala ROO· i singletnog kisika raste zbog lipidne peroksidacije koja je povećana u uznapredovaloj senescenciji (Thompson i sur. 1987). Veće količine singletnog kisika uzrokuju pojavu drugih oblika kisikovih radikala. Izolirani peroksisomi iz listova prirodno senescentnog graška pokazuju povišenu razinu lipidne peroksidacije, no također i povećanu razinu superoksida i vodikovog peroksida (Pastori i del Río 1997).

1.6.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Glavne sastavnice membranskih lipida su polinezasićene masne kiseline koje su posebno osjetljive na lipidnu peroksidaciju. Aktivacijom kisika u stresnim uvjetima stvara se njegov hidroksilni radikal i singletni kisik koji potom reagiraju s metilenskim skupinama polinezasićenih masnih kiselina formirajući štetne konjugirane diene, lipidne peroksi radikale i lipidne hidoksiperokside (Smirnoff 1995). Nastali peroksi radikal lipida vrlo je reaktivan te započinje lanac reakcija. Prvo reagira s novom polinezasićenom masnom kiselinom stvarajući lipidni hidroperoksid. On se pak cijepa reduciranim metalima kao npr. Fe^{2+} (Blokhina i sur. 2003). Zatim nastaje radikal lipidni alkoksil koji potiče još jedan niz lančanih reakcija (Buettner 1993). Slobodni radikali kisika mogu formirati i konjugirane diene masnih kiselina kidajući dvostruke veze u njima. Reakcije enzima lipoksigenaze također su izvor radikala lipida. Ovaj enzim katalizira hidroperoksidaciju polinezasićenih masnih kiselina (Sofo i sur. 2004). Derivati te reakcije se mogu razgraditi do radikala lipida te tako započeti lanac lipidne peroksidacije. Smatra se da je lipidna peroksidacija jedan od uzroka starenja listova.

Istraživanja su pokazala da je lipidna peroksidacija vezana i uz količinu H_2O_2 u stanici, jer H_2O_2 potiče stvaranje hidroksilnih radikala koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju (Lin i Kao 1998). Lanac reakcija radikala lipidne peroksidacije prekida se neenzimskim i enzimskim načinom. Vrlo važan antioksidans je tokoferol (vitamin E).

1.6.2. VODIKOV PEROKSID

Vodikov peroksid (H_2O_2) kao jedan od otrovnih spojeva kisika prirodni je produkt metabolizma biljaka (Halliwell 1997). Nastaje u peroksisomima i kloroplastima u reakcijama oksidacije te u mitohondrijima u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji (Braidot i sur. 1999). U tim staničnim odjeljcima H_2O_2 se akumulira u enzimskim reakcijama kao štetni produkt. Ksantin oksidaza stvara superoksidni radikal koji se potom prevodi u H_2O_2, a oksalat oksidaza u prisutnosti kisika također može pridonijeti nastanku H_2O_2 iz oksalata. Još jedna oksidaza, amino oksidaza, u svojoj reakciji uz NH_3 daje H_2O_2 (Regianni i Bertani 1989). Glikolat oksidaza prenosi elektrone od glikolata na kisik i stvara H_2O_2. Acil-CoA oksidaza u peroksisomima katalizira oksidaciju acil-CoA u β-oksidaciji lipida i stvara H_2O_2 (Inźe i Van Montagu 2002).

Glavni štetni učinak H_2O_2 očituje se u poticanju lipidne peroksidacije te na taj način H_2O_2 ubrzava proces starenja u tkivu pod stresom (Mukherjee i Choudhouri 1981). H_2O_2 u prisutnosti prijelaznih metala kao npr. Fe^{2+} uzrokuje stvaranje hidroksilnih radikala koji potom uništavaju membranske lipide tj. uzrokuju lipidnu peroksidaciju. Velika štetnost H_2O_2 očituje se i u inaktivaciji mnogih enzima, npr. metaloenzima. H_2O_2 inaktivira Cu/Zn superoksid dismutazu (SOD) putem redukcije Cu^{2+} iona u Cu^{+} ione u reakcijskom središtu enzima, uz dodatnu proizvodnju $HO^{\bullet}$. H_2O_2 također sprječava djelovanje Fe-SOD. Na H_2O_2 su osjetljivi i izoenzimi kloroplastne askorbat peroksidaze u prisutnosti donora elektrona.

H_2O_2 u mikromolarnim koncentracijama u tami smanjuje fiksaciju CO_2 u kloroplastima za 50% u 10 minuta. Inhibicija se događa zbog toga što H_2O_2 u aktivnim mjestima enzima Kalvinovog ciklusa (fruktoza-1,6-bifosfataza, NADP-gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza i ribuloza-5-fosfat kinaza) oksidira tiole do disulfida (Inźe i Van Montagu 2002).

Razina H_2O_2 unutar stanice regulirana je enzimski katalazama i peroksidazama. Obje skupine enzima imaju ulogu u otklanjanju H_2O_2. H_2O_2 je neutralna molekula pri pH vrijednosti ispod 10 te zbog toga može difundirati kroz biomembrane što mu omogućuje ulogu signalne molekule stresa (Inźe i Van Montagu 2002) koja djeluje na aktivaciju gena čiji produkti će uspostaviti novi stabilni metabolizam u biljnom organizmu.

1.7. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV

Stanični antioksidacijski sustav obuhvaća različite neenzimske i enzimske komponente. Enzimi askorbat-glutationskog ciklusa su glutation reduktaza (GR), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) i askorbat peroksdaza (APX). Radikalnoj deionizaciji također pridonose enzimi superoksid dismutaza (SOD), glutation S-transferaza (GST), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPX) i guaiakol-tip peroksidaze. Najvažnije neenzimske komponente u biljaka su molekule male molekulske mase kao što su askorbinska kiselina, vitamin E, glutation, karotenoidi, ksantofili i flavonoidi. Različiti stanični odjeljci imaju svoje specifične antioksidacijske mehanizme koji se sastoje od izoformnih antioksidacijskih enzima i antioksidanasa. Aktivnost antioksidacijskih enzima praćena je u kotiledonima krastavca (Kanawaza i sur. 2000) tijekom prirodnog starenja i starenja induciranog tamom. Tijekom prirodnog starenja ukupna aktivnost SOD, CAT, MDAR, DHAR i GR se smanjila, dok se aktivnost APX-a i guaiakol peroksidaze povećala (Kanawaza i sur. 2000). Suprotno tome, aktivnost SOD, CAT, APX, GPX i GR se pri starenju uzrokovanom tamom znatno povećala.

1.7.1. ENZIMSKI MEHANIZMI

1.7.1.1. SUPEROKSID DISMUTAZA

Superoksid dismutaza je enzim koji katalizira dismutaciju dva superoksidna radikala ($O_2^{\cdot-}$) u H_2O_2 i molekularni kisik:

$$2\ O_2^{\delta-} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Kako je SOD prisutan u svim aerobnim organizamima i u gotovo svim odjeljcima stanice gdje se stvara kisik pretpostavlja se da ima središnju ulogu u obrani protiv oksidacijskog stresa (Beyer i sur. 1991; Scandalias 1993). Postoje četiri različita oblika superoksid dismutaze koji su klasificirane na temelju metalnog kofaktora: bakar/ cink (Cu/Zn - SOD), mangan (Mn-SOD), nikal (Ni^{3+}-SOD) i željezo (Fe-SOD) forma. Ove izoforme se mogu odvojiti elektroforezom u nativnom poliakrilamidnom gelu ili na temelju osjetljivosti prema KCN i H_2O_2. Mn-SOD je otporna na oba inhibitora dok je Cu/Zn-SOD osjetljiva na oba; Fe-SOD je otporna na KCN i osjetljiva na H_2O_2. SOD ima pozitivan elektrostatski potencijal blizu aktivne strane koja na sebe privlači negativne superoksidne radikalne supstrate. Pozitivno nabijena aktivna strana ne doprinosi samo vezanju supstrata već i vezanju serije malih aniona.

1.7.1.2. PEROKSIDAZE

Vodikov peroksid, produkt SOD-a, zahtijeva daljnju detoksifikaciju koja se postiže drugim enzimskim antioksidansima koji se razlikuju u pojedinim staničnim odjeljcima. Jedan od tih enzimskih kompleksa su peroksidaze (vodik peroksid oksidoreduktaze), široko rasprostranjeni enzimi nađeni u biljnom i životinjskom carstvu. Biljne peroksidaze su monomerni glikoproteini molekularnih masa od 35 do 45 kDa koji kao prostetičku skupinu imaju protohematin IX koji je pomoću dviju molekula histidina povezan s glikoproteinskim dijelom enzima. Ti enzimi kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koristeći vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao supstrat.

S obzirom na fiziološku ulogu i supstratnu specifičnost peroksidaze su podijeljene u dvije skupine (Asada 1992):

1. Prva skupina su nespecifične peroksidaze (POX) koje koriste H_2O_2 za različite oksidacijske reakcije i imaju slabu supstratnu specifičnost. Zbog slabe supstratne specifičnosti kao donori elektrona mogu poslužiti gvajakol, pirogalol i druge molekule. Uključene su u procese diferencijacije stanica, biosinteze lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zaraštavanje rana te zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava u obranu od patogena (Gaspar i sur. 1991).

2. Drugoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza (APOX) i glutation peroksidaza. Glavna funkcija im je uklanjanje viška H_2O_2, organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju sve stanične komponente i uzrokuju stanična oštećenja. Za redukciju vodikovog

peroksida potreban je reducirajući supstrat, a to je u biljaka uglavnom askorbat. Askorbat peroksidaza najvažnija je za detoksifikaciju H_2O_2 u citosolu te u stromi i tilakoidima kloroplasta. Da bi se reducirala jedna molekula H_2O_2 potrebne su dvije molekule askorbata, a produkt reakcije su dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata (MDA).

$$2 \text{ askorbat} + H_2O_2 \rightarrow 2 \text{ MDA} + 2 H_2O$$

1.7.1.3. KATALAZA

Katalaza je hem-sadržavajući enzim koji katalizira dismutaciju vodikovog peroksida u vodu i kisik.

$$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$$

Katalaza se nalazi u stanicama svih eukariota i važna je za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u peroksisomima koji nastaje djelovanjem raznih oksidaza poput acil-CoA oksidaza koja sudjeluje u β-oksidaciji masnih kiselina u peroksisomima vegetativnih organa te u glioksisomima tijekom klijanja sjemenki i glikolat oksidaza koja prevodi glikolat nastao u kloroplastima tijekom fotorespiracije u glioksilat. Svi oblici katalaze su tetrameri prosječne molekulske težine od 220,000. U kukuruzu su nađene tri izoforme katalaze koje su kodirane odvojenim genima na kromosomima te imaju različitu ekspresiju i nezavisnu regulaciju (Scandalias 1990).

1.7.2. NEENZIMSKI MEHANIZMI

1.7.2.1. KAROTENOIDI

Karotenoidi su molekule topive u mastima, a jedna od njihovih uloga je zaštita od oštećenja koja može prouzročiti oksidacijski stres. Velike količine energije koju apsorbiraju pigmenti mogu oštetiti fotosintetske membrane ako se ta energija ne pohrani fotokemijski. Ako pobuđeno stanje klorofila potraje dulje nego je to normalno, doći će do reakcije s molekulskim kisikom. Tom reakcijom nastaje sigletni kisik ($^1O_2$) koji je vrlo reaktivan i može oštetiti stanicu. Karotenoidi imaju ulogu 'gašenja' pobuđenog stanja klorofila tj. u fotosintetskom aparatu zatomljuju pobuđeno tripletno stanje klorofila i nastajanje singletnog kisika, pa na taj način sprečavaju početak lipidne peroksidacije (Parker i Joyce 1967).

1.7.2.1. TOKOFEROL

Tokoferol (vitamin E) je sastojak membrana koji je topiv u lipidima. Prisutan je u biljnim i životinjskim organizmima. Tokoferol prekida lanac lipidne peroksidacije i popravlja radikale masnih kiselina tako da donira vodikov kation radikalu vodika, no kako pri tome i sam postaje radikal za oporavak mu je potrebna askorbinska kiselina (vitamin C) ili glutation (Fryer 1992). Enzimi koji zatim zajednički djeluju u popravku lanaca masnih kiselina su fosfolipaza A2; fosfolipid hidroksiperoksid glutation peroksidaza; glutation peroksidaza i masna kiselina koenzim A (FA-CoA). Tokoferol funkcionira u lipidnoj fazi membrane, a askorbat u hidrofilnoj fazi i njihovo je djelovanje sinergetsko.

1.8. REGULACIJE TIJEKOM STARENJA LISTA

1.8.1. OKOLIŠNI ČIMBENICI

Budući da su biljke ovisne o uvjetima okoliša u kojem rastu, promjene u okolišu značajno utječu na rast biljaka kao i na sam početak procesa starenja. Promjene u uvjetima rasta mogu pokazivati neke pravilnosti koje su rezultat izmjene dana i noći te godišnjih doba, ali mogu nastupiti i vrlo brzo. Biljke su kao odgovor na te promjene morale razviti brze metaboličke prilagodbe (aklimatizacija). Jedan od okolišnih čimbenika koji utječu na starenje je svjetlost. Poznato je da osim duljine fotoperioda, kvaliteta i intenzitet svjetlosti također utječu na rast biljaka. Povećanje intenziteta svjetlosti kao i udjela crvene svjetlosti pozitivno utječe na rast. Suprotno tome, utvrđeno je da tama uzrokuje starenje otkinutih listova (Pastori i del Rio 1997). U regulaciji prestanka rasta klijanaca breze zamijećeno je međudjelovanje fotoperioda i temperature; dnevni pad temperature od 5 do 10 ºC uzrokovao je raniji prestanak rasta ali samo ako su klijanci rasli u uvjetima duljine dana kraćima od kritične (Sillanpää 2003). Starenje listova može potaknuti i ograničena dostupnost hranjivih tvari npr. dušika, kalija, fosfora, magnezija, natrija i klora. Nedostatak hranjivih elemenata ubrzava starenje u starijim listovima te se na taj način omogućava kretanje tih elemenata tj. njihovo recikliranje u tkiva u razvoju (Marschner 1986). Vodni stres, povećana slanost i klimatske promjene kao što su povećana razina ozona i ugljikovog dioksida također mogu potaknuti prijevremeno starenje.

1.8.2. UNUTARNJI ČIMBENICI

Stvaranje etilena se povećava u listovima tijekom brzog gubitka klorofila. Egzogeno dodani etilen potiče starenje listova, no taj je učinak bio ovisan o starosti samog lista tj. stariji listovi su reagirali puno brže na etilen nego tek razvijeni listovi. Čini se da etilen regulira starenje na određenom razvojnom stupnju lista no da nije potreban za sam proces starenja (John i sur. 1995). Također je dokazano da egzogeno dodavanje citokinina kinetina, zeatina i benzilaminopurina odgađa starenje u listovima duhana (Singh i sur 1992). Smatra se da bi lokalno stvaranje citokinina u listovima moglo biti uključeno u regulaciju starenja listova. Pronađeno je da se količina apscizinske kiseline povećava neposredno prije ili tijekom starenja, a smanjuje u njenom kasnijem stadiju. Apscizinska kiselina je uključena u razgradnju klorofila kao i inhibiciju njihove biosinteze pa se smatra da na taj način potiče starenje. Slično djelovanje pokazuju i jasmonati. Giberelini pak djeluju slično citokininima, tj. odgađaju starenje.

Metabolički signali kao što su razina ugljikohidrata i dušika te njihov omjer također utječu na starenje lista (Paul i Driscoll 1997, Wingler i sur. 1998). Metaboliti ugljika i dušika su proučavani tijekom razvoja listova duhana praćenjem promjena od najmlađih do najstarijih listova (Masclaux i sur. 2000). Razine šećera i dušika bile su niske u mladim listovima, a povećavale su se u starijim u kojima je započelo starenje. Obrnuto, razina amonijaka bila je visoka u mladim, a smanjivala se u starijim listovima. Na taj je način omogućena remobilizacija dušika: stari listovi predstavljaju izvor dušičnih minerala, aminokiselina i ugljikohidrata dok mladi listovi dobivaju aminokiseline i ugljikohidrate koji su im potrebni u stvaranju energije i rastu.

1.8.3. SIGNALIZACIJA TIJEKOM STARENJA

Mehanizmi kojima biljke osjećaju fine promjene u svjetlosti, temperaturi, opskrbljenosti vodom i hranjivim elementima danas su predmet mnogih istraživanja. Otkriveni su tek neki receptori i signalne tvari, ali se još ne zna njihova točna funkcija tijekom života biljke. Fitokromi su fotoreceptori koji apsorbiraju crvenu i tamnocrvenu svjetlost te na taj način zamjećuju promjene u dostupnosti dnevne svjetlosti kao što su duljina fotoperioda i zasjenjivanje susjednim biljkama. Fitokrome kodira mala

porodica gena od kojih svaki ima svoju specifičnu ulogu u regulaciji razvoja biljke (Smith 2000). Fitokromi mogu regulirati ekspresiju gena i modificirati ravnotežu iona u stanici.

Istraživanja Sakakibara i sur. (2000) pokazala su da na raspoloživost dušika utječu citokinini kao signalne molekule. Dušik povećava razinu endogenih citokinina, a nedostatak dušika uzrokuje pad razine citokinina. Citokinini reguliraju ekspresiju nekoliko gena na transkripcijskoj i posttranskripcijskoj razini te zajedno s dušikom reguliraju ekspresiju nekoliko fotosintetskih i obrambenih gena.

Biljke mogu osjetiti razinu saharoze i heksoza koje također mogu djelovati kao signalne molekule (Smeekens 2000, Coruzzi i Zhou 2001). Razinu glukoze mogu prepoznati preko heksokinaze koja posjeduje glukozni signal za modificiranu gensku ekspresiju fotosintetskih gena *RbcS* i *Cab*, te fosfolipazu D tijekom starenja (Xiao i sur. 2000).

Unutarstanična koncentracija kalcija je često povećana kao odgovor na više vrsta abiotičkog stresa (Bowler i Fluhr 2000) i tijekom senescence (Huang i sur. 1997). Kalcij se veže za kalmodulin koji posjeduje signal na kalmodulin-vežućim proteinima u stanici. Nađeno je da klonirani gen koji kodira kalmodulin-vezni protein iz duhana pokazuje jaku ekspresiju u senescentnim listovima (Yang i Poovaiah 2000). No, kalcij i ostale signalne molekule kao i njihova međusobna interakcija tijekom starenja još uvijek nisu u potpunosti istraženi.

U ovom radu istraživani su pokazatelji starenja u listovima biljke duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Duhan se često koristi kao modelna biljka budući je razmjerno tolerantan i široko rasprostranjen.

Istraživala sam proces prirodnog starenja u listovima starosti 14, 30, 120 i 270 dana te proces prijevremenog starenja potaknut vodikovim peroksidom (10 mM) u listovima starim 14 dana.

Cilj mojeg istraživanja bio je utvrditi i usporediti promjene do kojih dolazi tijekom prirodnog i induciranog starenja u fotosintetskom aparatu uključujući stvaranje i utrošak kisika, sadržaj klorofila i karotenoida. Nastojala sam utvrditi potiču li procesi starenja oksidacijski stres i posljedično tome oksidacijska oštećenja molekula DNA, proteina i lipida. Također sam istraživala učinkovitost antioksidacijskih enzima u obrani biljke od stresnih uvjeta.

3.1. BILJNI MATERIJAL

Duhan (*Nicotiana* sp.) je biljka iz porodice pomoćnica (Solanaceae) podrijetlom iz južne Amerike. Danas je poznato 65 vrsta duhana. Zajedničko im je da sadrže alkaloid nikotin koji biljka proizvodi u korijenu i odlaže ga u listovima.



Slika 1. *Nicotiana tabacum*. Lijevo: tamnozeleni varijetet, divlji tip; desno: svijetlozeleni varijetet, heterozigot koji se koristi u proučavanju mutacija i oštećenja DNA.

U svojem istraživanju koristila sam vrstu *Nicotiana tabacum* var. xanthi. Ovaj varijetet je heterozigot i ima svijetlozelene listove, za razliku od dominantnog, divljeg tipa koji ima tamnozelene listove (Slika 1).

3. 2. METODE

3.2.1. KULTURA DUHANA (*Nicotina tabacum* var. xanthi) U UVJETIMA *IN VITRO*

Klijance duhana koje sam koristila u pokusima uzgojila sam u uvjetima *in vitro* iz prethodno steriliziranih sjemenki koje sam nasadila na hranjive podloge MS (Murashige i Skoog 1962) uz dodatak 500 mg/l MES soli (2-N-morfolino-etansulfonska kiselina), 1,5% saharoze i 0,22% fitagela (Gichner i sur. 2000). Sastav korištene hranjive podloge prikazan je u Tablici 1. Budući da je osim sastava podloge za razvoj biljaka važna i pH

vrijednost medija podesila sam ju na 5,6 što odgovara pH vrijednosti tla na prirodnom staništu. Nakon toga podloge sam ulila u tikvice, začepila vatom i aluminijskom folijom te zajedno s metalnim i ostalim priborom sterilizirala u autoklavu na temperaturi od 121 °C i tlaku 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta. Nakon presađivanja kulture su inkubirane u klima komori na temperaturi od 24 ± 2 ^{o}C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki (90 μEs^{-1} m^{-2}). Budući da sam istraživala proces starenja, koristila sam uzorke duhana stare 270, 120, 30 i 14 dana. Također sam na umjetan način pokušala izazvati starenje tkiva dodajući u podloge ohlađene na 40°C prethodno steriliziran (Nalgene filter, 0,2 µm) vodikov peroksid u koncentraciji od 10 mM.

Tablica 1. Sastav hranidbenih podloga MS

MS		
MAKROELEMENTI	mgl $^{-1}$	mM
KNO_3	1900	18,80
NH_4NO_3	1650	20,60
$CaCl_2$ x 2 H_2O	440	2,99
KH_2PO_4	170	1,25
$MgSO_4$ x 7 H_2O	370	1,50
MIKROELEMENTI	mgl $^{-1}$	mM
H_3BO_3	6,2	100,0
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,25	1,0
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,025	0,1
$MnSO_4$ x 4 H_2O	22,3	100,0
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	8,6	29,9
ŽELJEZO	mgl $^{-1}$	mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	27,8	100,0
Na_2EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI	mgl $^{-1}$	mM
m-inozitol	50,0	277,5
tiamin·HCl	0,05	0,15

3.2.2. MJERENJE STVARANJA KISIKA KISIKOVOM ELEKTRODOM

Za mjerenje stvaranja kisika koristila sam kisikovu elektrodu („Clark-type, gas-phase“, Hansatech). U utor elektrode stavila sam elektrolit kojeg je činila zasićena otopina KCl-a, a jednu kapljicu nanijela sam i na vrh elektrode. Na kapljicu elektrolita koju sam nanijela na vrh stavila sam razmaknicu (papir za cigarete veličine 1,5 x 1,5 cm) na koju sam stavila teflonsku membranu (veličine 2,5 x 2,5 cm). Preko teflonske membrane stavila sam O-prsten kojeg sam pritisnula na elektrodu pomoću aplikatora. Tako pripremljenu elektrodu sam priključila na strujni napajač i smjestila u komoru za mjerenje. Kalibraciju kisikove elektrode napravila sam injektiranjem 1 ml zraka temperature 20 ºC. Volumni udio kisika u 1 ml zraka je 21% , što znači da 1 ml zraka sadrži 210 µl kisika, odnosno 8,73 µmol.

U komoru za mjerenje stavila sam dio lista duhana kojeg sam izrezala pomoću bušača za čepove. Komoru sam zatim hermetički zatvorila i stavila na cirkulirajuću vodenu kupelj da bi održala konstantnu temperaturu od 20 ºC. Mjerenje sam vršila izlaganjem listova određenoj količini svjetlosti (100 µmol fotona m^{-2} s^{-1}) tijekom 15 minuta, a mjerila sam i stopu disanja tkiva duhana u tami. Stvaranje kisika kao i njegovu potrošnju disanjem izrazila sam u µmol O_2 min^{-1} cm^{-2}. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri replike ± standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PIGMENATA

Sadržaj pigmenata odredila sam spektrofotometrijski koristeći UV/VIS spektrofotmetar Specord (Analytik Jena). Uzorke svježih listova mase 60 mg ekstrahirala sam u 1,5 ml 80%-tnog hladnog acetona na ledu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 5 000 g, svakom sam uzorku izmjerila volumen dobivenog supernatanta i zatim ga kvantitativno prenijela u kivetu. Mjeren je cijeli spektar apsorbancije za svaki uzorak te su zatim očitavani podaci na tri valne duljine: 663, 646 i 470 nm (Arnon 1949). Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je prema sljedećim izrazima (Lichtenthaler 1987):

a) za klorofil *a*:

c_a = sadržaj klorofila *a* (mg / g svježe tvari)

$$c_a = \frac{12{,}21 \times A_{663} - 2{,}81 \times A_{646}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

b) za klorofil *b*:

c_b = sadržaj klorofila *b* (mg / g svježe tvari)

$$c_b = \frac{20{,}13 \times A_{646} - 5{,}03 \times A_{663}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

c) za ukupne karotenoide:

c_k = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g svježe tvari)

$$c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3{,}27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{l \times 1000 \times m} \times V$$

A_X = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V = volumen uzorka (ml)

l = duljina optičkog puta = 1 cm

m = masa uzorka = 30 mg

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna devijacija.

3.2.4. UTVRĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA SVJETLOSNOM I ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM

3.2.4.1. SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA

Svjetlosno-mikroskopska istraživanja su načinjena na prerezima tkiva lista uklopljenog u epoksidnu smolu (Spurrovo sredstvo). Komadići svježeg lista fiksirani su u 1%-tnom glutaraldehidu, postfiksirani u 1%-tnom osmijevom tetroksidu te uklopljeni u

Spurrovo sredstvo prema protokolu opisanom kod pripreme materijala za elektronsku mikroskopiju. Prerezi debljine 1 μm načinjeni su pomoću ultramikrotoma RMC MT 6.000-XL te obojani mješavinom 2%-tnog toluidinskog modrila i 2%-tnog boraksa (u omjeru 1:1) pri povišenoj temperaturi (provlačenjem kroz plamen plamenika). Uzorci su pregledani mikroskopom Zeiss, Axiovert 35 i Zeiss, Axiolab te snimljeni digitalnom kamerom Pixera Pro 150 ES ili fotografskim aparatom Contax 167 MT.

3.2.4.2. ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Za elektronsko-mikroskopska istraživanja korišteni su komadići listova uzimani nakon 10. dana pokusa.

Materijal je priređen prema sljedećem protokolu:

1. Fiksacija i postfiksacija
   - fiksacija 1%-tnim glutaraldehidom u 0,05 M kakodilatnom puferu (pH 7,2), 20 min na temperaturi +2 ºC
   - ispiranje u kakodilatnom puferu, 2 x 10 min na temperaturi +1 ºC
   - postfikscija 1%-tnim osmijevim tetroksidom u 0,05 M kakodilatnom puferu, 60 min na temperaturi +2 ºC
   - ispiranje destiliranom vodom, 10 min
2. Dehidracija – provođenjem materijala kroz sljedeće otopine:
   - serija etanola rastuće koncentracije (50, 60, 70, 80 i 96%), po 10 min
   - apsolutni etanol (preko noći)
   - mješavina 100%-tnog etanola i 100%-tnog propilen-oksida, 30 min
   - 100%-tni propilen-oksid, 30 min
3. Uklapanje u Spurrovo sredstvo (epoksidna smola)
   - mješavina propilen-oksida – Spurrovo sredstvo (1:1), 1 h na 35 ºC
   - Spurrovo sredstvo 4-5h na 40 ºC
   - plošno uklapanje materijala u kalupe
   - polimerizacija na 65 ºC, 48 h

Ultratanki presjeci (50-90 nm) napravljeni su ultramikrotomom Leica Ultracut R. Prerezi su kontrastirani 4%-tnom vodenom otopinom uranil-acetata, 10 min, te olovnim

citratom pH 12, 10 min (Reynolds 1963). Tkivni prerezi su pregledani FEI Morgagni 268D elektronskim mikroskopom.

3.2.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VODIKOVOG PEROKSIDA

Uzorke svježih listova mase 200 mg ekstrahirala sam u 1 ml hladnog acetona na ledu. Smjesu sam centrifugirala 3 minute na 1 000 g da bi odstranila kruti stanični materijal. Potom sam u smjesu dodala 400 µl titanil-sulfata i 500 µl koncentrirane otopine amonij-hidroksida. Smjesu sam zatim centrifugirala 10 minuta na 10 000 g, odlila supernatant te tako dobivene precipitate otopila u 1 ml 2M H_2SO_4. Apsorbancija uzoraka mjerena je na 415 nm. Koncentraciju H_2O_2 odredila sam iz baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijoma H_2O_2 (0,23-1,27 x 10^{-3} mol/l). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu. Pri dodatku titanil-sulfata i amonijevog hidroksida precipitirao je peroksid-titanil kompleks, prema kojemu je izvršena procjena sadržaja H_2O_2 (Mukherjee i Choudhouri 1981).

$$[H_2O_2] = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \qquad [\mu M/ml]$$

$$H_2O_2/g = \frac{[H_2O_2] \times 1000}{m\,(g) / 1 ml} \qquad [nM/g_{st.}]$$

$V_{r.s}$= volumen reakcijske smjese = 1 ml
F.R. = faktor razrjeđenja = 1
$V_{uzor.}$ = volumen uzorka = 1 ml
ε = ekstincijski koeficijent = 1,878 $mM^{-1}cm^{-1}$
l = duljina optičkog puta = 1 cm

3.2.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA

Kako bih odredila sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješala sam 200 µl uzorka s 1300 µl reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina otopljena u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini). Kao slijepu probu koristila sam 1,5 ml reakcijske smjese. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene semimikroepruvete, te ih zagrijavala u sušioniku 30 min na 95 ^{o}C. Nakon toga sam ih naglo ohladila na ledu te centrifugirala 10 min na 10 000g. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama nmol/g $_{sv.\ t}$ uz ekstinkcijski koeficijent ε_{532} = 155 $mM^{-1}cm^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna devijacija.

3.2.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KARBONILA

Uzorke mase 200 mg homogenizirala sam u 1,0 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA i 5 Mm natrijev askorbat. Homogenat sam centrifugirala 10 minuta na 20 000 g. Po 200 µl uzorka (supernatanta) pomiješala sam s 300 µl dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepu probu koristila sam alikvot istog uzorka (200 µl) pomiješan samo s 2 M HCl-om (300 µl). Pripremljene uzorke inkubirala sam 1 sat na sobnoj temperaturi (promiješala sam ih svakih 15 minuta). Nakon inkubacije je slijedila precipitacija proteina s 500 µl 10% trikloroctene kiseline (TCA), zatim se par minuta uzorci ohlade na –20 ^{o}C te centrifugiraju 10 minuta na 12 000 g. Dobiveni talog sam ispirala smjesom etanola i etilacetata u omjeru 1:1 (2 x 500 µl) da bi se uklonio nevezani reagens. Zatim sam talog otapala u 1 ml 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji

oko 10 min. Sadržaj karbonila tamelji se na reakciji karbonilnih skupina s DNPH. Njegov sadržaj sam određivala spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur. 1990).

$$[\text{KARBONILI}] = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \qquad [\mu M/ml]$$

$$\text{KARBONILI/g} = \frac{[\text{KARB}] \times 1000}{m\,(g) / 1ml}$$

$V_{r.s}$= volumen reakcijske smjese = 1 ml
F.R. = faktor razrjeđenja = 1
$V_{uzor.}$ = volumen uzorka = 1 ml
ε = ekstincijski koeficijent = 22 $mM^{-1}cm^{-1}$
l = duljina optičkog puta = 1 cm

3.2.8. UTVRĐIVANJE OŠTEĆENJA MOLEKULE DNA KOMET-TESTOM

Komet-test primijenjen je na jezgrama stanica lista duhana. Za izolaciju jezgara koristila sam 400 mM Tris/HCl pufer pH vrijednosti 7,5. U plastičnu Petrijevu zdjelicu koja se nalazila na ledu dodala sam 200 µl pufera za izolaciju u kojem smo mehanički usitnile komadić lista te sam ju nagnula kako bi se jezgre nakupljale u puferu. Na djelomično brušena predmetna stalakca (ESCO, Erie Scientific) se nanosi ukupno tri sloja agaroze različitih tališta, s tim da se prvi sloj obično pripremi unaprijed dok se treći sloj (0,5%-tna agaroza niskog tališta) može izostaviti. Prvi sloj agaroze se nanosi uranjanjem stakalca u vodenu otopinu 1%-tne agaroze normalnog tališta. Nakon 15 min polimerizacije na sobnoj temperaturi nanosi se drugi sloj koji se sastoji od 100 µl 1%-tne agaroze niskog tališta u fosfatnom puferu (PBS) pH vrijednosti 7,0 (8,5 g/l NaCl; 0,85 g Na_2HPO_4; 0,54 g/l KH_2PO_4) pomiješane s uzorkom (60 µl ekstrakta lista i 60 µl 1%-tne

agaroze niskog tališta se pomiješa i od toga 100 µl nanese na prvi sloj agaroze). Taj je sloj pokriven pokrovnicom te su stakalca stavljena na +4 ºC kroz 15 min. Nakon uklanjanja pokrovnice, stakalca su uronjena u pufer za lizu pH vrijednosti 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, 1%-tni Triton X-100, 10%-tni DMSO) u kojem obično stoje 2 sata. Međutim, vrijeme lize od 2 ili 24 sata nije ništa mijenjalo na "kvaliteti" jezgara tako da je taj korak izostavljen.

Preparati su poslagani u kadicu za horizontalnu elektroforezu i preliveni hladnim, svježe pripremljenim puferom za elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13). U puferu za elektroforezu provedena je alkalna denaturacija DNA kroz 15 min na +4 ºC. Elektroforeza je provedena u istom puferu i u istim uvjetima pri jakosti struje od 300 mA te 0,72 V/cm. Po završetku elektroforeze preparati su neutralizirani 3 x 5 min u Tris/HCl puferu pH vrijednosti 7,5, isprani destiliranom vodom te osušeni na sobnoj temperaturi. Tako fiksirani preparati mogu biti pohranjeni i par mjeseci u tami na sobnoj temperaturi. Neposredno prije analize preparati su rehidrirani destiliranom vodom (5 min), te bojani nakapavanjem (oko 70 µl po preparatu) otopine fluorescencijske boje etidij bromida u koncentraciji 10 µg/ml. Suvišak boje ispran je kratkotrajnim uranjanjem u destiliranu vodu i preparati su prekriveni pokrovnicom te pregledavani pomoću fluorescencijskog mikroskopa Zeiss Axioplan (filter 09: ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija kod valne duljine 610 nm). Jezgre su snimane digitalnom kamerom kod povećanja objektiva 40x. Mjerenja dužine repa, postotka DNA u repu i repnog momenta provedena su pomoću računalnog programa Komet 5 Kinetic Imaging Ltd. Analizirano je 100 jezgara po preparatu (200 po koncentraciji). Parametar repni moment produkt je dužine repa i postotka DNA u repu.

3.2.9. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA

Po 400 mg uzorka svježih listova homogenizirala sam u 2,0 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,8) koji sadrži 0,1 mM EDTA i 5 mM natrij askorbata (Shalata i sur. 2001). Homogenat sam centrifugirala u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 ^{o}C 20 minuta na 22 000 g. Dobiveni ekstrakt koristila sam za određivanje aktivnosti enzima i koncentracije proteina.

3.2.9.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA

Supernatant sam koristila kao sirovi ekstrakt u kojem sam određivala koncentraciju proteina metodom Bradforda (1976). Ova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljni 595 nm. U 1 ml radne otopine Bradford – 15 ml etanola, 30 ml 88%-tne H_3PO_4, 30 ml Bradford stock otopine (100 ml 96%-tnog etanola, 200 ml 88%-tne H_3PO_4 i 350 mg Coomassie brillant blue G 250) i 450 ml H_2O – dodala sam 50 µl uzorka sirovog ekstrakta. Koncentraciju proteina u svakom uzorku odredila sam očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog goveđeg albumina poznatih koncentracija (od 0,096 mg/ml do 0,8 mg/ml).

3.2.9.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određivala sam spektrofotometrijski prema metodi Giannopolitisa i Riesa (1977). Reakcijska smjesa je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,8), 13 mM metionina, 75 mM nitrotetrazolijum plavila (NBT), 0,1 mM EDTA, 2 µM riboflavina te ekstrakcijski pufer ili enzimsku otopinu. Na 890 µl reakcijske otopine dodala sam 100 µl ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok je proba sadržavala isti volumen enzimske otopine koja je dobivena miješanjem pufera i određenih volumena originalnih enzimskih ekstrakata (50, 75 i 100 µl). 10 µl riboflavina sam dodala u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Uzorke sam promiješala i stavila ispod izvora svjetlosti (15 W) u zamračenom prostoru.

Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti, te se nakon 10 min mjerenja svjetlost ugasi. NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 560 nm.

Postotak inhibicije se mjeri prema sljedećoj jednadžbi:

% inhibicije = (uzorak A_{560} – kontrola A_{560}) / kontrola A_{560}

Jedna jedinica aktivnosti SOD-a izražava se kao ona količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti.

Specifična aktivnost SOD dobivena je dijeljenjem aktivnosti SOD po gramu svježe tvari s koncentracijom proteina izraženom u miligramima proteina po gramu svježe tvari (U / mg proteina).

3.2.9.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KATALAZE

Za mjerenje aktivnosti katalaze (KAT) koristila sam reakcijsku otopinu koja sadrži 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7) i 10 mM H_2O_2 (Aebi 1984). Na 970 µl otopine dodala sam 30 µl sirovog ekstrakta i mjerile pad apsorbancije svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost katalaze je izažena kao jedinica aktivnosti po gramu svježe tvari te po miligramu proteina (U = promjena apsorbancije u minuti):

1) $KAT = \frac{\Delta Asv \times 6xV_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \qquad [\mu mol/min\ ml]$

$$KAT = \frac{\Delta A \mu mol\ min\ ml}{m\ (g)} \qquad [\mu mol/min\ g_{sv\ t}]$$

λ = 240 nm

ΔA sv = srednja vrijednost promjene aporbancije u 10 s

6= faktor s kojim se množi ΔA sv da bi se rezultat izrazio u minuti

Σ_{240} = 40 $mM^{-1}cm^{-1}$

2) specifična aktivnost katalaze

$$\frac{\text{aktivnost katalaze}\left[\frac{\Delta A\ \mu mol}{min\ g_{sv.t.}}\right]}{\text{sadržaj proteina}\left[\frac{mg}{g_{sv.t.}}\right]}$$

3.2.9.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ASKORBAT PEROKSIDAZE

Za određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) koristila sam ekstrakt u kojem sam određivala i aktivnost katalaze. Kao reakcijsku otopinu za askorbat peroksidazu koristila sam otopinu po Nakanu i Asadi (1981) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7), 0,2 mM askorbinske kiseline, 0,2 mol/l EDTA i 12 mM H_2O_2. Vodikov peroksid (20 µl) dodala sam u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 790 µl ove otopine dodala sam 180 µl sirovog ekstrakta i mjerila pad apsorbancije zbog oksidacije askorbinske kiseline svaku sekundu tijekom 15 sekundi pri valnoj duljini od 290 nm. Aktivnost APX je izračunata na isti način kao i aktivnost KAT, no uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent (ε_{290} = 2,8 $mM^{-1}cm^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.9.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PIROGALOL PEROKSIDAZE

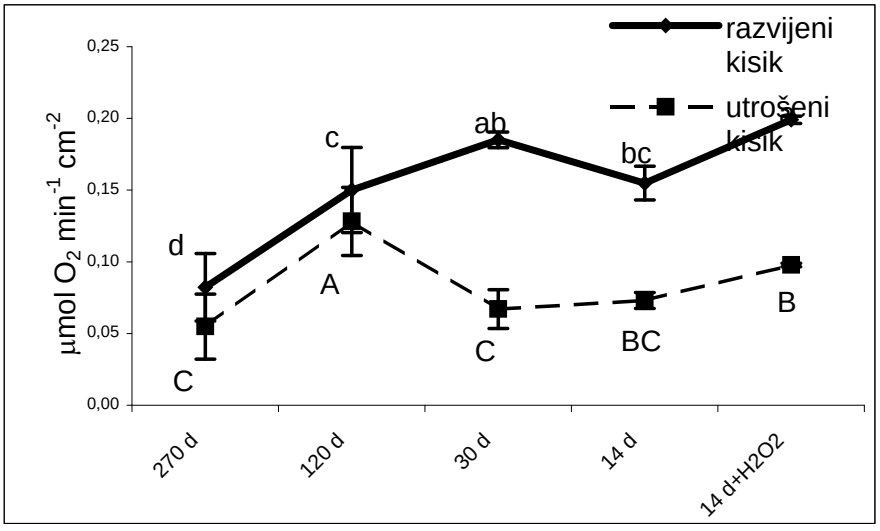
Za mjerenje aktivnosti pirogalol peroksidaze (POX) koristila sam reakcijsku otopinu po Chanceu i Maehlyu (1955) koja sadrži 50 Mm kalij fosfatnog pufera (pH 7), 20 mM pirogalola i 1 mM H_2O_2 kojeg sam dodala neposredno prije korištenja. Na 990 µl otopine dodala sam 10 µl uzorka i mjerila pad apsorbancije svakih 15 s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 430 nm. Aktivnost POX je izražena kao količina nastalih produkata u µmolima po minuti po gramu svježe tvari i po miligramu proteina koristeći ε_{430} = 2,47 $mM^{-1}cm^{-1}$.

4.1. FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA U LISTOVIMA VRSTE *NICOTIANA TABACUM* RAZLIČITE STAROSTI

4.1.1. STVARANJE I UTROŠAK KISIKA U LISTOVIMA DUHANA RAZLIČITE STAROSTI

Vrijednosti stvaranja kisika izražene u μmol O_2 min^{-1} cm^{-2} bile su u listovima duhana starim 270 dana najmanje u odnosu na sve ostale uzorke (Slika 2). Stvaranje kisika bilo je najveća u uzorcima listova tretiranim s 10 mM H_2O_2, a sličnih no nešto nižih vrijednosti i u listovima starim 30 dana. Manje stvaranje kisika u odnosu na listove tretirane vodikovim peroksidom zamijećeno je u listovima starosti 14 i 120 dana.

Utrošeni kisik (μmol O_2 min^{-1} cm^{-2}) tj. stopa disanja bila je najveća u listovima starim 120 dana, a najmanja u listovima starosti 270 i 30 dana. Nešto više vrijednosti u odnosu na najstarije listove zamijećene su u netretiranim i tretiranim listovima starim 14 dana.

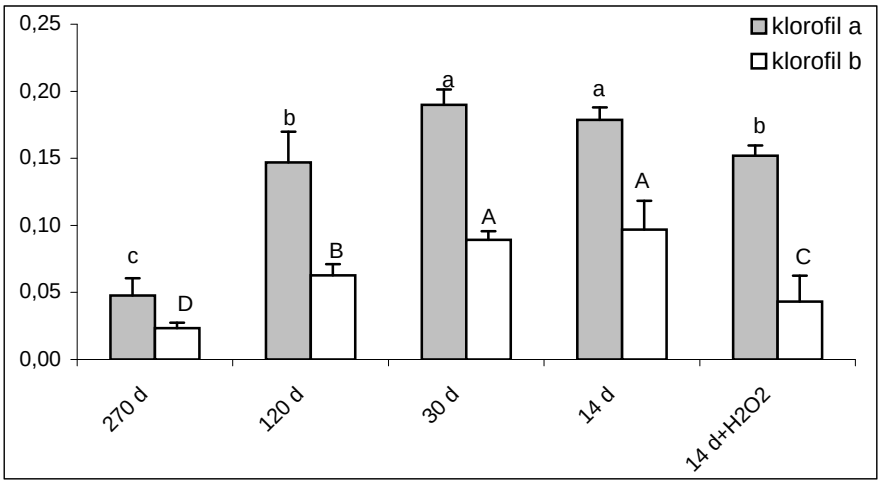


SLIKA 2. Vrijednosti stvaranja i utroška kisika (μmol O_2 min^{-1} cm^{-2}) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* starosti 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima starosti 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (P≤0,05). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.1.2. SADRŽAJ PIGMENATA

4.1.2.1. SADRŽAJ KLOROFILA *a* I KLOROFILA *b*

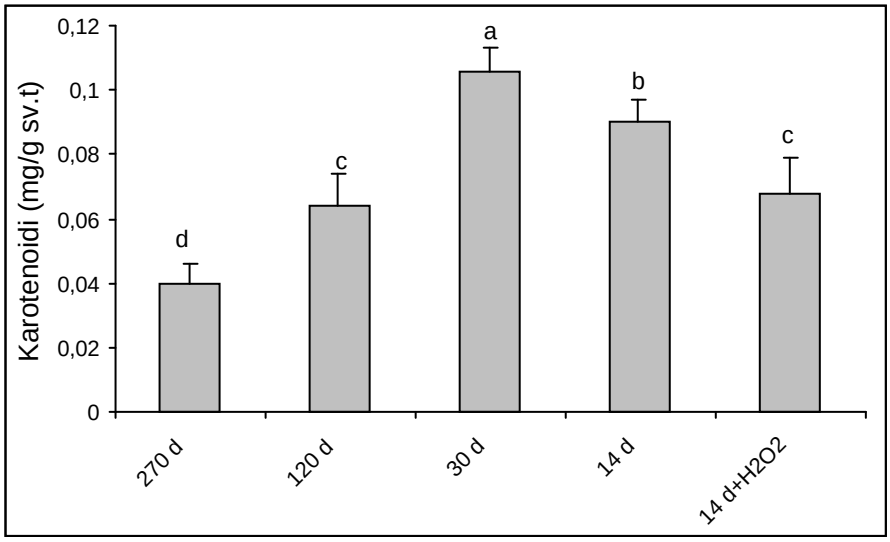
S postupnim starenjem listova duhana sadržaj klorofila *a* i *b* se smanjivao (slika 3). Sadržaj klorofila *a* i *b* bio je najveći je u listovima starim 14 i 30 dana, znatno manji u listovima starim 120 dana, a najmanji je bio u najstarijim listovima. U listovima tretiranima s H_2O_2 sadržaj klorofila *a* podjednak je onom u uzorcima listova starih 120 dana, a sadržaj klorofila *b* sličan je onom u uzorcima listova starih 270 dana.



SLIKA 3. Sadržaj klorofila *a* i klorofila *b* (mg/g svježe tvari) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* tijekom postupnog starenja biljke od 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima starosti 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.1.2.2 SADRŽAJ KAROTENOIDA

Sadržaj karotenoida u u listovima duhana postupno se smanjivao sa starošću biljke (slika 4) pri čemu je najveći sadržaj zabilježen u listovima starim 30 dana. Sadržaj karotenoida u listovima starim 14 dana tretiranim vodikovim peroksidom je sličan onom u listova starih 120 dana te je značajno niži od sadržaja karotenoida u uzorcima starim 14 dana.

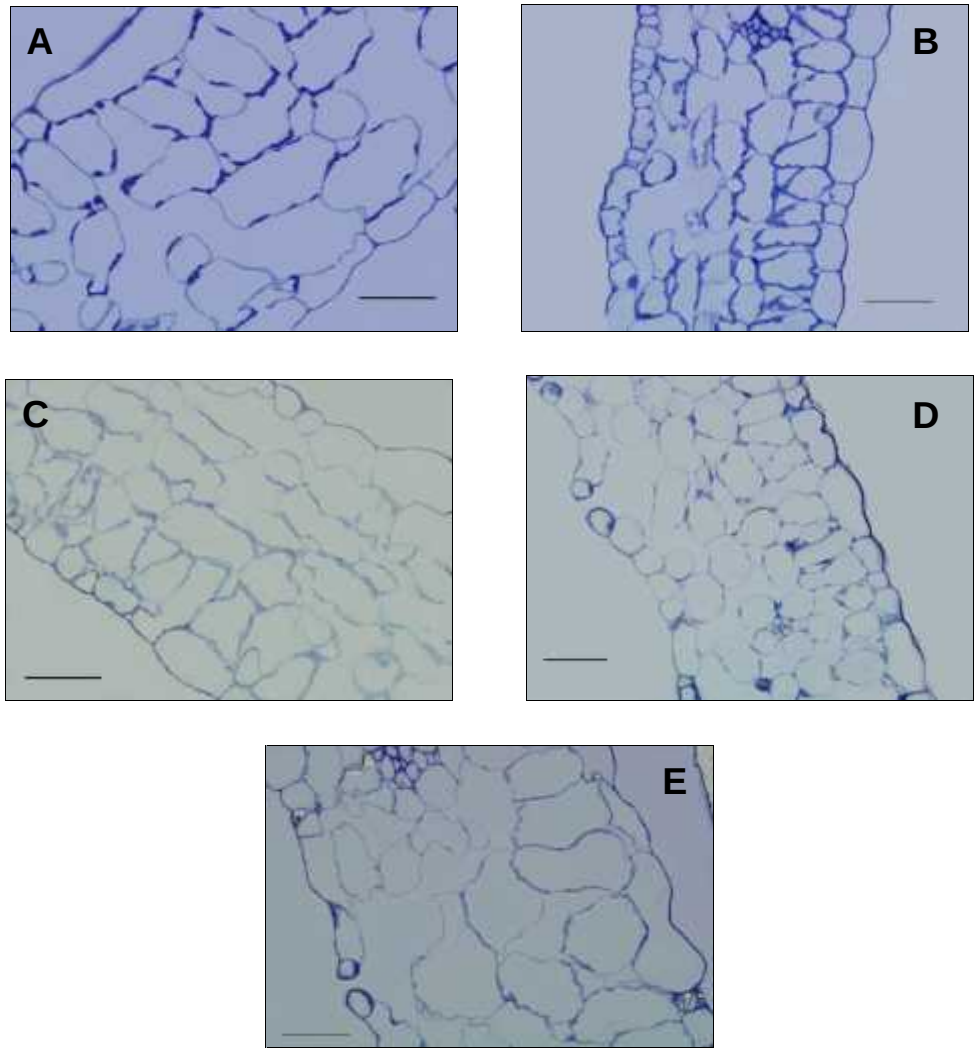


SLIKA 4. Sadržaj karotenoida (mg/g svježe tvari) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* tijekom postupnog starenja biljke od 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima starosti 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.2. UTVRĐIVANJE STRUKTURNIH PROMJENA SVJETLOSNOM I ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM

4.2.1. SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA

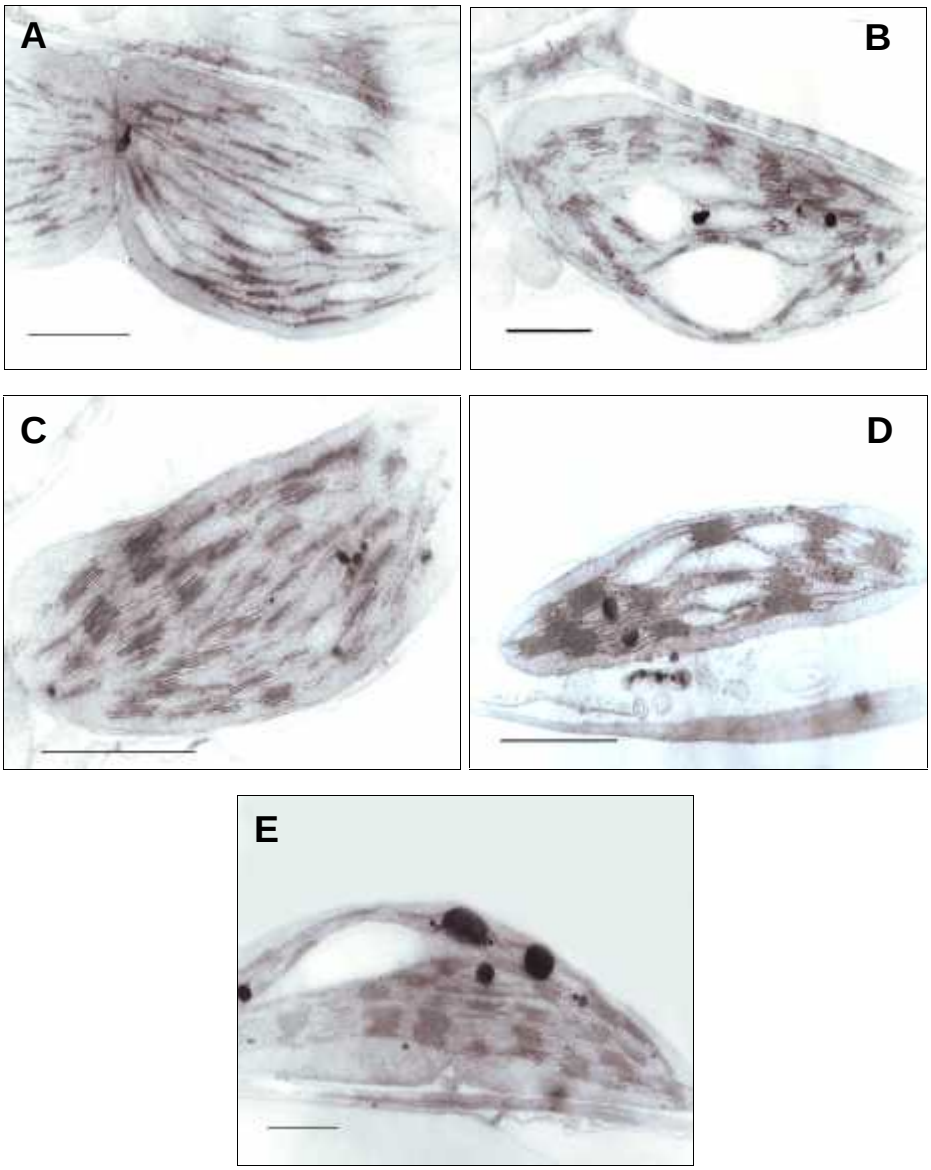
Prerez kroz list vrste *Nicotiana tabacm* prikazan je na slici 5 (A-E). U listovima se mogu zamijetiti normalno razvijene stanice s kloroplastima. Brojnost kloroplasta u stanicama se smanjuje sa starošću listova, a istovremeno se povećava broj plastoglobula koji su u najstarijim listovima izrazito vidljivi. Velik broj kloroplasta zamjetljiv je i u listovima tretiranim s 10 mM vodikovim peroksidom.



SLIKA 5. Poludebeli prerezi listova biljne vrste *Nicotiana tabacum*: stanice biljke stare 14 dana (A), stanice biljke stare 14 dana i tretirane s H_2O_2 (B), stanice biljke stare 30 dana (C), stanice biljke stare 120 dana (D), stanice biljke stare 270 dana (E). Bar = 50 µm.

4.2.2. ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Na slici 6A prikazan je kloroplast u stanicama lista duhana stare 14 dana gdje je vidljivo da je tilakoidni sustav razvijen, ali ne u tolikoj mjeri kao u starijim listovima. U listovima starim 14 dana i tretiranim s H_2O_2 (Slika 6B) tilakoidni sustav je dobro razvijen uz prisutnost zrnaca škroba i malog broja plastoglobula kao i u listovima starim 30 dana (Slika 6C). Starenjem listova uočljiv je porast broja plastoglobula kao i njihove veličine te prisutnost škrobnih zrnaca (Slika 6D i 6E).

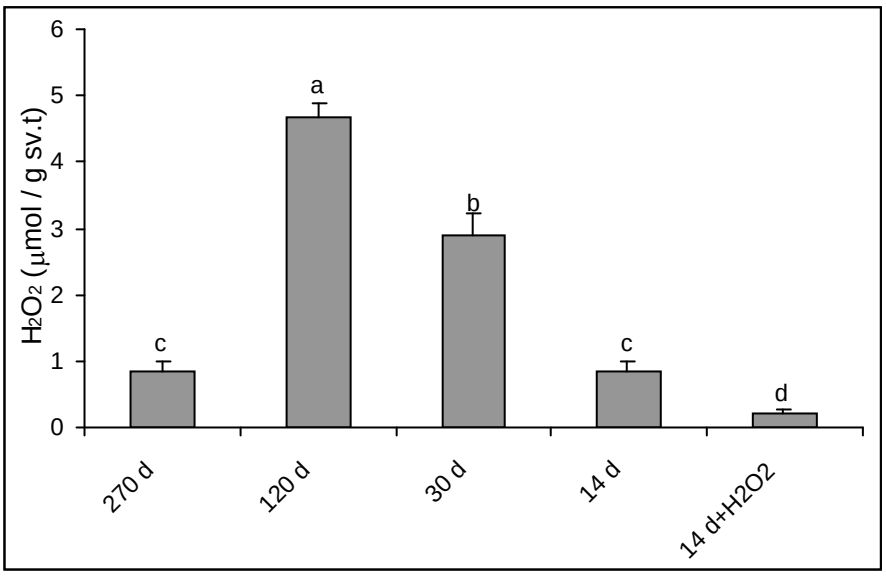


SLIKA 6. Elektronsko-mikroskopske slike ultrastruktura u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum*: plastid biljke stare 14 dana (A), plastid biljke stare 14 dana i tretirane s H_2O_2 (B), plastid biljke stare 30 dana (C), plastid biljke stare 120 dana (D), plastid biljke stare 270 dana (E). Bar = 1 µm.

4.3. POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA

4.3.1. SADRŽAJ VODIKOVOG PEROKSIDA

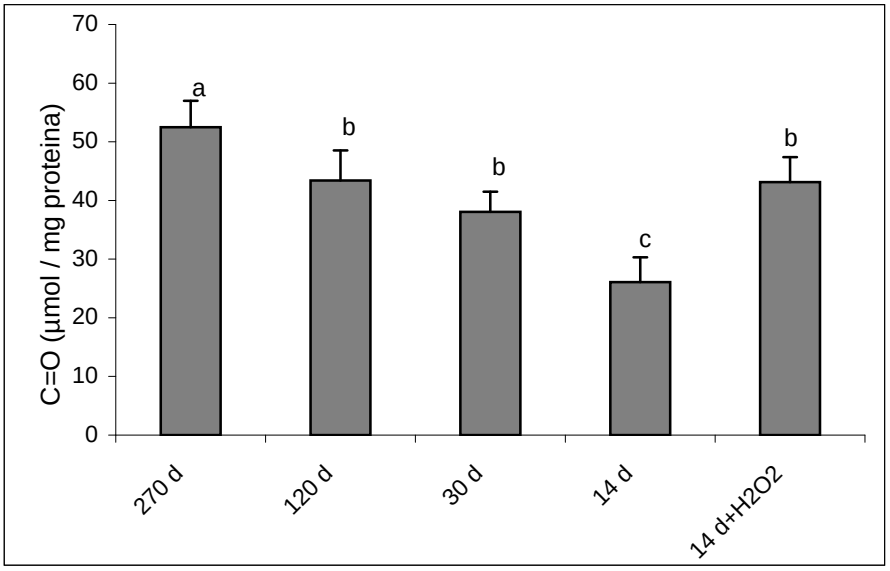
U listovima duhana sadržaj H_2O_2 se sa starošću tkiva značajno povećava te postiže maksimalnu vrijednost u uzorcima listova starim 120 dana (Slika 7). Sadržaj H_2O_2 u listovima starim 270 dana podjednak je onom u listovima starim 14 dana, dok je najmanji sadržaj vodikovog peroksida zabilježen u listovima tretiranim vodikovim peroksidom u koncentraciji od 10 mM.



SLIKA 7. Sadržaj vodikovog peroksida (µmol/g svježe tvari) u listovima vrste *Nicotiana tabacum* starim 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima od 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.3.2. SADRŽAJ KARBONILA

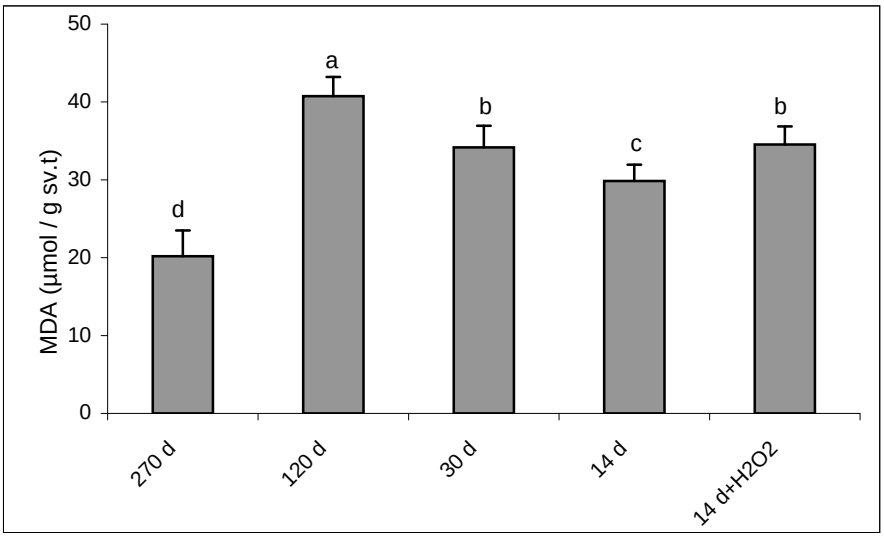
S postupnim starenjem duhana uočen je porast sadržaja karbonila koji je bio najveći u najstarijim listovima (Slika 8). Sadržaj reaktivnih karbonila u listovima tretiranim s 10 mM vodikovim peroksidom bio je podjednak onom u listovima starim mjesec dana.



SLIKA 8. Sadržaj karbonila (µmol/mg proteina) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* tijekom postupnog starenja biljke od 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima od 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.3.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA

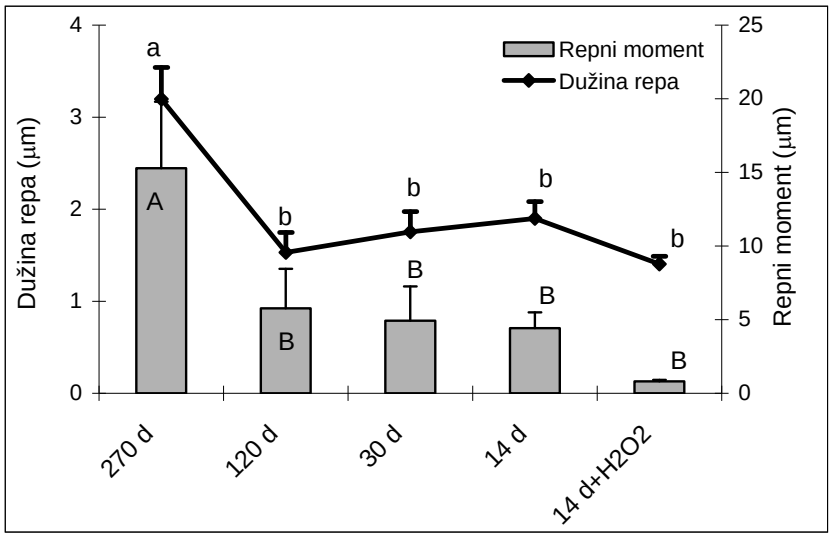
Opseg oštećenja lipida izražen je kao sadržaj malondialdehida – krajnjeg produkta lipidne peroksidacije koji u reakciji s tiobarbiturnom kiselinom stvaraju kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Sadržaj malondialdehida bio je najveći u listovima starim 120 dana te se smanjivao u mlađim listovima (Slika 9). U listovima tretiranim s H_2O_2 sadržaj MDA bio je sličan onomu u uzorcima starim 30 dana. Lipidna peroksidacija bila je najmanja u listovima starosti 270 dana.



SLIKA 9. Sadržaj malondialdehida (µmol/g svježe tvari) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* starim 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima starim 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (P≤0,05). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.4. OŠTEĆENJE MOLEKULE DNA

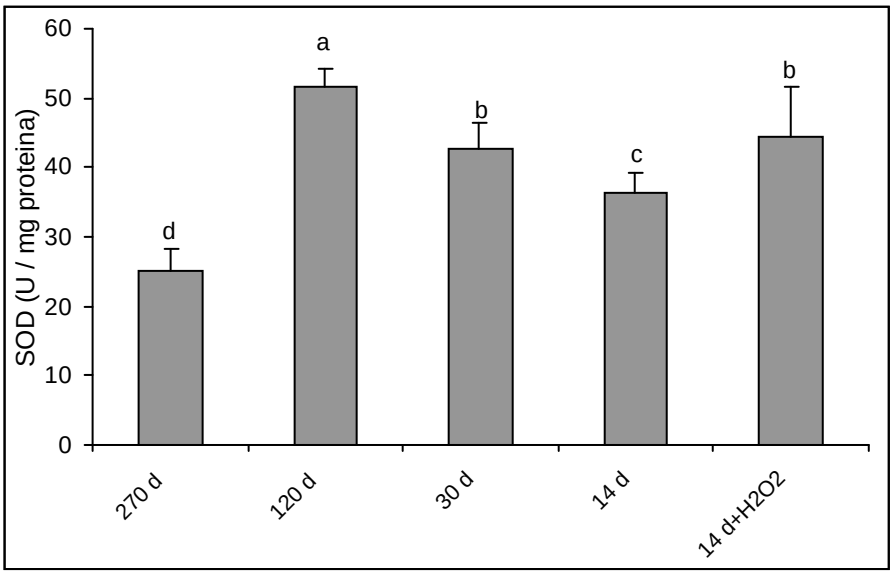
Oštećenje DNA u stanicama listova duhana izmjereno je korištenjem parametra „head extent“ računalnog programa Komet 5, te je procijenjeno na temelju dva parametra komet-testa: dužine repa (μm) i repnog momenta (μm). Repni moment kao i dužina repa nisu se statistički razlikovali osim u listovima starim 270 dana u kojima je oštećenje DNA bilo najveće, ali ipak ne u velikoj mjeri.



SLIKA 10. Oštećenje DNA izraženo dužinom repa (μm) i repnim momentom (μm) u jezgrama listova biljne vrste *Nicotiana tabacum* starim 14, 30, 120 i 270 dana, te u listovima starim 14 dana tretiranim s H_2O_2. Svaki broj predstavlja srednju vrijednost 100 jezgara ± standardna pogreška. Brojevi označeni različitim slovima razlikuju se statistički značajno ($P<0,05$).

4.5. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE

Aktivnost superoksid dismutaze (U/mg proteina) se postupno povećava od četrnaestog dana te dosiže najvišu vrijednost u listovima starim 120 dana (Slika 11). Aktivnost superoksid dismutaze u listovima tretiranim s H_2O_2 nije se bitno razlikovala od aktivnosti tog enzima u listovima starim 30 dana. Najniža aktivnost superoksid dismutaze izmjerena je u uzorcima najstarijih listova (270 dana).

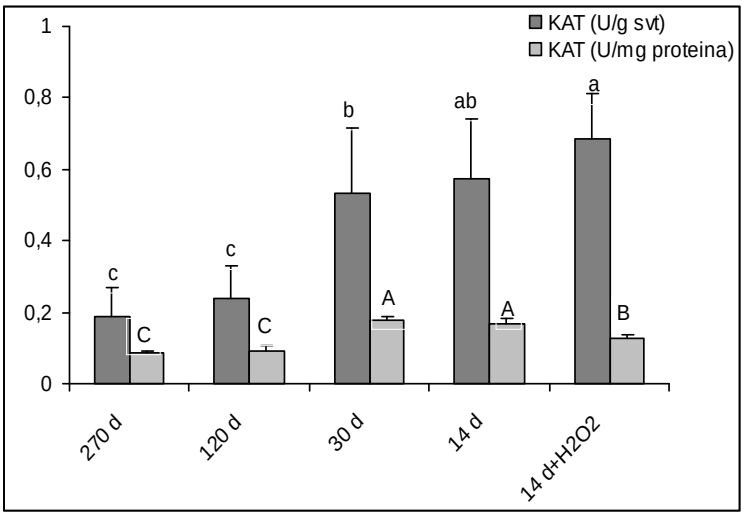


SLIKA 11. Aktivnost superoksid dismutaze (U/mg proteina) u biljne vrste *Nicotiana tabacum* tijekom različite starosti listova (14, 30, 120 i 270 dana), te u listovima starosti 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.6. AKTIVNOST KATALAZE

Aktivnost katalaze izražena u jedinicama (U=µmol/min) po gramu svježe tvari se u listovima duhana postupno smanjivala sa starošću tkiva (Slika 12). Najviša aktivnost tog enzima zabilježena je u listovima tretiranim s vodikovim peroksidom u koncentraciji od 10 mM.

Specifična aktivnost katalaze tj. aktivnost izražena u jedinicama po miligramu proteina podudarala se s aktivnošću tog enzima izraženog u jedinicama po gramu svježe tvari. Jedino odstupanje je primijećeno kod listova tretiranih vodikovim peroksidom gdje je aktivnost KAT bila značajno niža u odnosu na aktivnost u listovima starim 30 i 14 dana.

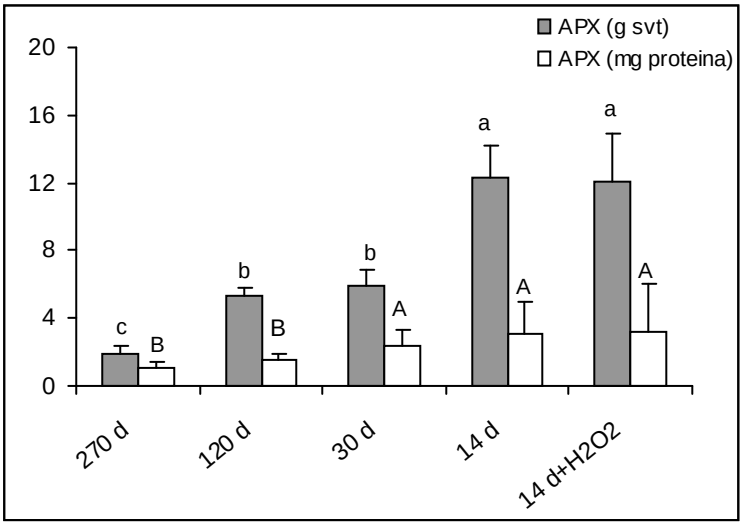


SLIKA 12. Aktivnost KAT izražena po gramu svježe tvari (U/g svt) i po miligramu proteina (U/ mg proteina) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* starim 14, 30, 120 i 270 dana te u listovima starim 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (P≤0,05). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.7. AKTIVNOST ENZIMA PEROKSIDAZE

4.7.1. AKTIVNOST ASKORBAT PEROKSIDAZE

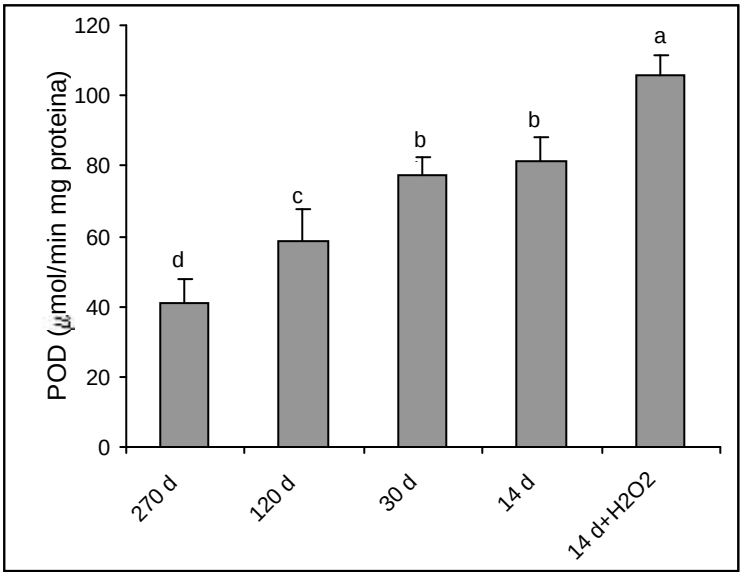
Aktivnost askorbat peroksidaze izražena bilo po gramu svježe tvari ili po miligramu proteina pokazala postupno se smanjivala sa starošću listova duhana te je najniža vrijednost zabilježena u najstarijim listovima (Slika 13). Razlika između aktivnosti i specifične aktivnosti APX zamijećena je u listovima duhana starim 30 dana gdje je aktivnost izražena po g svježe tvari bila jednaka onoj u listovima starim 120 dana dok je aktivnost izražena po mg proteina bila slična kao u listovima starim 14 dana te onima tretiranim s 10 mM H_2O_2.



SLIKA 13. Aktivnost APX izražena po gramu svježe tvari (U/g svt) i po miligramu proteina (U / mg proteina) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* starim 14, 30, 120 i 270 dana te u listovima od 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (P≤0,05). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.7.2. AKTIVNOST PIROGALOL PEROKSIDAZE

Aktivnost pirogalol peroksidaze u listovima duhana postupno se smanjivala sa starošću listova te je bila podjednaka u uzorcima starim 14 i 30 dana (Slika 14). Najviša aktivnost POX zabilježena je u u listovima od 14 dana tretiranim sa H_2O_2.



SLIKA 14. Aktivnost POX izražena po miligramu proteina (U / mg proteina) u listovima biljne vrste *Nicotiana tabacum* starim 14, 30, 120 i 270 dana te u listovima od 14 dana tretiranim s H_2O_2. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (P≤0,05). Na stupcima je označena standardna devijacija.

Opsežniji podaci o starenju duhana do sada nisu objavljeni te nije moguća direktna usporedba rezultata dobivenih u ovom radu s istraživanjima drugih autora. No, na drugim vrstama modelnih biljaka provedena su brojna istraživanja u kojima je kao poticaj starenja korišten vodikov peroksid.

Istražena je djelotvornost fotosintetskog aparata u listovima duhana različite starosti, te u onima od 14 dana tretiranim s 10 mM vodikovim peroksidom na temelju parametara dobivenih mjerenjem stvaranja i utroška kisika kisikovom elektrodom te spektofotometrijskim određivanjem sadržaja klorofila i karotenoida.

Uspješna oksidacija molekula vode i produkcija kisika ovisi o učinkovitosti fotosistema II. Najviše vrijednosti produkcije kisika izmjerene su u mlađim listovima, a stvaranje kisika se smanjivalo sa starošću listova. Zanimljivo je da su po stvaranju kisika najveće sličnosti uočene između listova od 30 dana i onih od 14 dana tretiranih vodikovim peroksidom što upućuje na veći udio apsorbirane svjetlosne energije koja se koristi u fotokemijskim reakcijama što je povezano i s većim stvaranjem kisika u tim listovima. Vrijednosti utrošenog kisika bile su najveće za listove stare 120 dana, značajno manje za listove od 14 dana i 14 dana tretiranim vodikovim peroksidom te najmanje za listove stare 30 i 270 dana. Prema ovome bismo mogli zaključiti da su najbolju respiraciju pokazale biljke stare 120 dana koje su dosegle optimalnu zrelost za razliku od biljaka starih 14 i 30 dana. Naime, poznato je da tijekom starenja dolazi do povećane stope respiracije čija je uloga vjerojatno stvaranje dovoljno energije potrebne za odvijanje kataboličkih procesa. Također je pokazano da se nakon određenog vremenskog razdoblja tj. daljnjim starenjem stopa respiracije smanjuje što je zamijećeno i u najstarijim listovima duhana (Pastori i del Río 1997).

Tijekom razvoja listova, biogeneza kloroplasta obuhvaća njihovu diobu, povećanje volumena i formiranje funkcionalnih tilakoidnih membrana (Pyke 1999). Biogeneza fotosintetskog aparata također obuhvaća i sintezu fotosintetskih pigmenata poput klorofila i karotenoida. U funkcionalnom fotosistemu s proteinima povezano je nekoliko stotina molekula fotosintetskih pigmenata. Sadržaj klorofila *a* i *b* najveći je u listovima starim 14 i 30 dana, te se smanjuje sa starošću listova. Smanjenje sadržaja klorofila zamijećeno je i u senescentnim listovima graha i pistacija (Fang i sur. 1998, Munné-Bosch i Penuelas 2003). U mojem radu je u svim uzorcima omjer klorofila *a* i *b* bio 2:1 osim u listovima tretiranim s 10 mM vodikovim peroksidom gdje iznosi 3:1. Ti rezultati nisu u u skladu s istraživanjem Yoo i sur.

(2003) na listovima djeteline koje je pokazalo visok omjer u mladim listovima, a manjih vrijednosti tijekom razvoja. Listovi tretirani vodikovim peroksidom pokazali su slične vrijednosti sadržaja klorofila *a* i *b* kao i listovi stari 120 dana. Značajno smanjenje sadržaja klorofila u odnosu na kontrolu zabilježeno je i u listovima bundeve tretirane s 10 mM H_2O_2 (El-Shora 2003).

Sadržaj karotenoida značajno je najveći u listovima starosti 14 i 30 dana te naglo opada sa starošću listova. Sadržaj tih antioksidansa je u listovima tretiranim vodikovim peroksidom bio podjednak sadržaju u listovima starim 120 dana. Nagli pad sadržaja karotenoida u poodmakloj fazi starenja listova zabilježen je i u senescentnim listovima pistacija (Munné-Bosch i Penuelas 2003). Smatra se da, s obzirom da karotenoidi imaju značajnu ulogu u «gašenju» pobuđenog stanja klorofila tj. u fotozaštiti, njihov povećan sadržaj u početnim stadijima starenja održava fotosintetski aparat funkcionalnim dok je u poodmakloj fazi starenja ta zaštita izgubljena (Munné-Bosch i Penuelas 2003).

Poludebeli prerezi pregledani svjetlosnim mikroskopom dali su nam uvid u brojnost kloroplasta s obzirom na starost listova duhana. Uočila sam da se brojnost kloroplasta u stanicama smanjuje sa starošću listova dok se istovremeno povećava brojnost i veličina plastoglobula. To je u skladu sa zabilježenim padom sadržaja klorofila. U mnogim je istraživanjima dokazano da se broj i veličina plastoglobula u kloroplastima povećavaju kako se tilakoidi razgrađuju tijekom starenja (Ghosh i sur. 2001, Simpson i sur. 1978). Njihov povećani broj često se može primijetiti i nakon učinka teških metala poglavito kadmija koji izaziva ubrzano starenje listova (Dalla Vecchia i sur. 2005). Smatralo se da su plastoglobuli skladišta tilakoidnih sastojaka jer su u njima osim lipida nađene i male količine klorofila, karotenoida, glikolipida i proteina. To se novijim istraživanjima pokazalo samo donekle točnim jer je dokazano da plastoglobuli iz kloroplasta sadrže samo triacilglicerole, lipofilne kinone i α-tokoferol (Steinmüller i Tevini 1985).

Pregledom ultratankih prereza listova elektronskim mikroskopom uočljiv je dobro razvijen tilakoidni sustav u svim listovima osim u onima starim 14 dana gdje još nije u potpunosti razvijen. Osim tilakoidnih membrana uočljive su i strukture kao što su plastoglobuli i škrobna zrnca. Kao i u poludebelim tako je i u ultratankim prerezima zamjetljivo da veličina i broj plastoglobula raste sa starošću listova. S obzirom da su kloroplasti listova tretiranih vodikovim peroksidom izgledom najsličniji kloroplastima listova starih 30 dana može se zaključiti je da vodikov peroksid za otprilike dvostruko

ubrzao proces starenja listova. Ta je pretpostavka potvrđena i na temelju stvaranja kisika u fotosintezi. U najmlađim listovima nisu primijećena škrobna zrnca koja nastaju akumulacijom ugljikohidrata nastalih u procesu fotosinteze.

Osim ovih parametara vezanih uz djelotvornost fotosintetskog aparata promatrani su i pokazatelji oksidacijskog stresa s obzirom da se tijekom starenja povećava količina reaktivnih radikala kisika. Jedan od praćenih pokazatelja je sadržaj vodikovog peroksida koji nastaje u kloroplastima i peroksisomima reakcijama oksidacije te u mitohondrijima u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji. Veliku važnost u nastanku vodikovog peroksida imaju i superoksid dismutaze koje uklanjaju superoksidne ione i pri tome stvaraju vodikov peroksid (Casano i sur. 1994). Glavni štetni učinak vodikovog peroksida jest indukcija lipidne peroksidacije čime se ubrzava proces starenja. Mjerenja endogenog sadržaja H_2O_2 pokazala su da se količina povećava sa starošću listova do 120 dana što je u skladu s istraživanjem starenja u listovima graška (del Rio i sur. 2003). Najmanje su vrijednosti endogenog sadržaja H_2O_2 zabilježene upravo u listovima tretiranim vodikovim peroksidom što je zabilježeno i u istraživanju starenja u listovima bundeve također potaknutim 10 mM vodikovim peroksidom (El-Shora 2003). Razlog maloj količini H_2O_2 izmjerenoj u najstarijim listovima je vjerojatno upravo razgradnja klorofila i karotenoida pri čemu se smanjuje funkcionalnost kloroplasta, a time i mogućnost nastanka velikih količina H_2O_2.

Povećanje sadržaja karbonila upućuje na oštećenje proteina izazvano oksidacijskim stresom. U mojem istraživanju sadržaj karbonila se povećavao sa starošću listova dok je sadržaj karbonila u listovima tretiranim s 10 mM vodikovim peroksidom bio jednak kao u listovima starim 30 dana. Oksidacijski stres osim što negativno djeluje na proteinsku komponentu, oštećuje i lipidnu komponentu u procesu lipidne peroksidacije rezultat koje je nastanak malondialdehida. Naime, tijekom razvitka lista dolazi do stalnog nastanka reaktivnih kisikovih oblika osobito u kloroplastima zbog utroška i stvaranja kisika (Asada 1997). Posljedica njihova stvaranja je peroksidacija lipida. Moja mjerenja pokazala su povećanje sadržaja malondialdehida sa starošću listova do 120 dana. Povećani sadržaj malondialdehida i karbonila je zamijećen i u senescentnim listovima pistacija i graška (Munné-Bosch i Penuelas 2003, Vanacker i sur. 2006). Najmanja vrijednost sadržaja malondialdehida uočena je u najstarijim listovima duhana što bi se moglo objasniti činjenicom da su i vrlo niska količina vodikova peroksida kao i najmanje stvaranje kisika prisutni upravo

u tim listovima. Sličnost između listova starih 30 dana i listova tretiranih s 10 mM H_2O_2 prisutna je i u podjednakom sadržaju malondialdehida. El-Shora (2003) je u svom istraživanju također utvrdio da 10 mM H_2O_2 uzrokuje porast sadržaja malondialdehida u usporedbi s prirodno senescentnim listovima pistacija.

Svojim istraživanjem pokušala sam utvrditi dolazi li do oštećenja molekule DNA tijekom starenja listova duhana. Komet-testom sam utvrdila da su oštećenja statistički značajna samo u najstarijim listovima, no s obzirom na relativno niske vrijednosti promatranih parametara (repni moment i dužina repa) i u tim listovima oštećenje je bilo zanemarivo. Ti se rezultati podudaraju s istraživanjem Simeonove i sur. (2000) koji u zelenim senescentnim listovima duhana komet-testom također nisu uočili oštećenja molekule DNA. U tom su istraživanju pronađena oštećenja DNA tek u žutim senescentnim listovima.

Osim navedenih pokazatelja starenja pokušala sam utvrditi sposobnost biljke da se suprotstavi oksidacijskom stresu putem antioksidacijskih enzima čijom aktivnošću dolazi do razgradnje reaktivnih oblika kisika. Jedan od njih je superoksid dismutaza koja razgrađuje superoksidne radikale na vodikov peroksid i kisik. Stoga taj enzim ima dvostruku ulogu tj. djeluje i kao antioksidacijski i kao oksidacijski enzim jer se njegovom aktivnošću stvara vodikov peroksid koji lako može prijeći u štetan hidroksilni radikal. Poznato je da je upravo taj radikal najodgovorniji za proces peroksidacije lipida. Moje istraživanje je pokazalo porast superoksid dismutaze sa starošću listova što je u skladu s istraživanjima starenja u listovima graška i duhana u kojima je također utvrđen porast tog enzima sa starošću listova (del Rio i sur. 2003, Vanacker i sur. 2006). Aktivnost SOD u listovima tretiranim s 10 mM H_2O_2 jednaka je onima od 30 dana što znači da je H_2O_2 uzrokovao povećanje aktivnosti SOD. Slično je zamijećeno i u senescentnim listovima uročnjaka (Drążkiewicz i sur. 2003).

Istraživanjem mutanti vrste *Nicotiana plumbaginifolia* sa smanjenom aktivnošću katalaza dokazano je da upravo katalaze uklanjaju nastali vodikov peroksid dok peroksidaze sudjeluju u uklanjanju njegove manje količine koristeći vodikov peroksid prilikom oksidacije različitih supstrata (Willekens i sur. 1997). Moje istraživanje pokazalo je da se aktivnost katalaza smanjuje sa starošću listova, a njihova najveća aktivnost uočena je u listovima od 14 dana tretiranim s H_2O_2. Veća aktivnost katalaza uočena je i u mlađim stadijima drugih biljnih organa kada se usporede s potpuno razvijenim stadijem (Scandalios i sur. 1997). Istraživanje starenja u listovima graška pokazalo je smanjenu aktivnost katalaza uslijed povećanog sadržaja vodikovog

peroksida što je u skladu s mojim rezultatima (del Rio i sur. 2003) do starosti listova od 120 dana. Naime, u najstarijim listovima je aktivnost katalaza kao i drugih istraženih antioksidacijskih enzima bila vrlo niska. To bi se moglo objasniti činjenicom da je najveće oksidacijsko oštećenje karbonila zamijećeno upravo u najstarijim listovima što navodi na zaključak da je vjerojatno došlo i do oštećenja samih enzima. Tretiranje listova s 10 mM H_2O_2 vrste *Arabidopsis thaliana* povećalo je aktivnost katalaza (Drążkiewicz i sur. 2003) što smo zamijetili i u našem istraživanju.

Osim katalaza u uklanjanju H_2O_2 sudjeluju i peroksidaze. U svojem istraživanju sam mjerila aktivnost peroksidaza s dva supstrata - askorbatom i pirogalolom. Njihova najveća aktivnost zabilježena je u listovima tretiranim s vodikovim peroksidom te postupan pad aktivnosti tih enzima sa starošću listova. Nađeno je da vodikov peroksid inhibira aktivnost askorbat i pirogalol peroksidaze u listovima uročnjaka (Drążkiewicz i sur. 2003).

Predmet istraživanja ovog rada bilo je prirodno starenje u listovima duhana i starenje u listovima od 14 dana inducirano vodikovim peroksidom. Gledajući sastav pigmenata, funkcionalnost fotosintetskog aparata, te sadržaj pokazatelja oksidacijskog stresa mogu se uočiti sličnosti tretiranih listova i listova starih 30 dana pa možemo zaključiti da je vodikov peroksid uistinu potaknuo starenje. Međutim, isto tako je primjetljivo da je najveća razlika između listova starih 30 dana i tretiranih listova upravo u različitoj indukciji antioksidacijskih enzima. Starenje potaknuto vodikovim peroksidom je potaknulo snažnu aktivnost antioksidacijskih enzima u usporedbi s listovima starim 30 dana u kojima je aktivnost tih enzima bila vrlo niska. S obzirom da je vodikov peroksid nenabijena molekula koja vrlo lako može proći kroz biomembrane u ostale dijelove stanice te obnaša i ulogu važne signalne molekule (Foyer i sur. 1997), moglo bi se pretpostaviti da je djelovao na ekspresiju gena antioksidacijskih enzima (Neill i sur. 2002) što bi onda za posljedicu moglo imati povećanu aktivnost tih enzima. Takvi zaključci doneseni su i u proučavanju solnog stresa u listovima vrste *Zea mays* gdje je H_2O_2 također imao signalnu ulogu u ekspresiji gena antiosidacijskih enzima (de Azevedo Neto i sur. 2005).

Na temelju provedenih istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

Stvaranje i utrošak kisika bili su najmanji u najstarijim listovima. U ostalim listovima utrošak kisika se povećavao sa starošću, a stvaranje kisika bilo je slično vrijednostima listova starih 14 dana .

Sadržaj klorofila *a* i *b* te karotenoida u listovima duhana se smanjuje sa starošću listova. Sadržaj pigmenata u listovima tretiranim vodikovim peroksidom sličan je sadržaju pigmenata u listovima starim 30 dana.

Svjetlosna mikroskopija je pokazala smanjenje broja kloroplasta i povećanje plastoglobula sa starošću listova. Elektronskom mikroskopom je uočen dobro razvijen tilakoidni sustav u svim listovima, osim onima od 14 dana. Listovi tretirani vodikovim peroksidom su po svom izgledu slični onima od 30 dana.

Sadržaj vodikovog peroksida povećava se sa starošću listova do 120 dana, a najmanji sadržaj izmjeren je upravo u listovima tretiranim s 10 mM H_2O_2.

Sadržaj karbonilnih skupina koje ukazuju na oksidacijsko oštećenje proteina raste usporedo sa starošću listova. Sadržaji karbonila su u listovima starim 30 dana i listovima tretiranim vodikovim peroksidom podjednaki.

Sadržaj malondialdehida, pokazatelja lipidne peroksidacije, raste sa starošću listova do 120 dana, a najmanji je u najstarijim listovima. Isto tako se uočava sličnost sadržaja malondialdehida u listovima tretiranim vodikovim peroksidom i listovima starim 30 dana.

Oštećenje molekule DNA procijenjeno komet-testom uočeno je samo u najstarijim listovima iako je i to oštećenje relativno malo.

Aktivnost enzima superoksid dismutaze postupno se povećava sa starošću listova do 120 dana, dok je uočljivo najmanja aktivnost prisutna u najstarijim listovima.

Aktivnost enzima koji razgrađuju vodikov peroksid tj. katalaze, askorbat peroksidaze i pirogalol peroksidaze smanjuje se sa starošću listova.

1. Adam Z, Clarke AK (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. Trends Plant Sci 7: 451-456

2. Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Meth Enzymol 105: 121-126

3. Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris.* Plant Physiol 24: 1-15

4. Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxid-scavenging enzyme in plants. Physiol Plant 85: 235-241

5. Asada K (1997) The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H_2O_2 scavenging in plants. U: J. G. Scandalios (ur.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str. 343-406

6. Bate NJ, Rothstein SJ, Thompson JE (1991) Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. J Exp Bot 42: 801-811

7. Beyer W, Imlay J, Fridovich I (1991) Superoxide dismutases. Prog Nucl Acid Res 40: 221-253

8. Blank A, McKeon TA (1991) Three RNases in senescent and nonsenescent wheat leaves. Plant Physiol 97: 1402-1408

9. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a rewiew. Ann Bot 91: 179-194

10. Bowler C, Fluhr R (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. Trends Plant Sci 5: 241-246

11. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

12. Braidot E, Petrussa E, Vianello A, Macri F (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I of complex II substrates. FEBS Lett 451: 347-350

13. Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. J Exp Bot 48: 181-199

14. Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α-tocopherol and ascorbate. Arch Biochem Biophys 300: 535-543

15. Callis J (1995) Regulation of protein degradation. Plant Cell 7: 845-857

16. Casano LM, Martin M, Sabater B (1994) Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. Plant Physiol 106: 1033-1039

17. Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. U: Colowick SP, Kaplan NO (ur.) Methods in Enzymology. Academic Press, New York, str. 764-775

18. Coruzzi GM, Zhou L (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effect'. Curr Opin Plant Biol 4: 247-253

19. Dalla Vecchia F, La Rocca N, Moro I, De Faveri S, Andreoli C, Rascio N (2005) Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of Elodea canadensis exposed to cadmium. Plant Sci. 168: 329-338

20. de Azevedo Neto AD, Prisco JT, Filho JE, Rolim Medeiros J-V, Gomes-Filho E (2005) Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants. J Plant Physiol. 162: 1114-1122

21. Distefano S, Palma JM, McCarthy I, del Río LA (1999) Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. Planta 209: 308-313

22. Drążkiewicz M, Skórzyńska E, Wanke M, Swieżewska E (2003) The activity of antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana* exposed to colchicine and H_2O_2. Plant Physiol 8: 777-781

23. El-Shora H M (2003) Activities of antioxidative enzymes and senescence in detached C*ucurbita pepo* under Cu- and oxidative stress by H_2O_2. Вестн Моск Ун-Та. 44: 66-71

24. Fang Z, Bouwkamp JC, Solomos T (1998) Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. J Exp Bot 49: 503-510

25. Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. Physiol Plant 92: 696-717

26. Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytol 146: 359-388

27. Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α-tocopherol). Plant Cell Environ 15: 381-392

28. Gaspar, Th., Penel, C., Hagege, D. and Greppin, H. (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. U: Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. i Gaspar Th. (ur.) Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Universety M. Curie-Sklodowska, Lublin and University of Geneva, Geneva. str. 249-280

29. Ghosh S, Mahoney SR, Penterman JN, Peirson D, Dumbroff EB (2001) Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. Plant Physiol Biochem. 39: 777−784

30. Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol 59: 309-314

31. Gichner T, Ptáček O, Stavreva DA, Wagner ED, Plewa MJ (2000) A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. Mut Res 470: 1-9

32. Halliwell B (1997) Generation of H_2O_2, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxyfumaric acid by peroxidase. Biochem J 163: 441-448

33. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I - Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125: 189-198

34. Huang F-Y, Philosoph-Hadas S, Meir S, Callaham DA, Sabato R, Zelcer A, Hepler PK (1997) Increses in cytosolic Ca^{2+} in parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. Plant Physiol 115: 51-60

35. Huffaker RC (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. New Phytol 116:199-231

36. Inzé D, Van Montagu M (2002) Oxidative Stress in Plants. Taylor and Francis, London.

37. John I, Drake R, Farrel A, Cooper W, Lee P, Horton P, Grierson D (1995) Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. Plant J 7: 483-490

38. Kanawaza S, Sano S, Koshiba T, Ushimaru T (2000) Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural sensecence: comparison with those during dark-induced senescence. Physiol Plant 109: 211-216

39. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Meth Enzymol 186: 464-478

40. Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Meth Enzymol 148: 350-382

41. Lin J-N, Kao CH (1998) Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. Bot Bull Acad Sin 39: 161-165

42. Marschner H (1986) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

43. Masclaux C, Valadier M-H, Brugière N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. Planta 211: 510-518

44. Mukherjee SP, Choudhouri MA (1981) Water stress – induced changes in glycolate metabolism in *Vigna* seedlings. Indian J Exp Biol 19: 666-668

45. Munné-Bosch S, Penuelas J (2003) Photo-and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus L*. grown under Mediterranean field conditions. Ann Bot 92: 385-391

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

47. Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22: 867-880

48. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst R D, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. J Exp Bot 53: 1237-1247

49. O'Brien IE, Murray BG, Baguley BC, Morris BA, Ferguson IB (1998) Major changes in chromatin condensation suggest the presence of an apoptotic pathway in plant cells. Exp Cell Res 241: 46-54

50. Park J-H, Oh SA, Kim YH, Woo HR, Nam HG (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence inducing factors in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 37:445-454

51. Parker CA, Joyce TA (1967) Delayed fluorescence and some properties of the chlorophyll triplets. Photochem Photobiol 6: 395

52. Pastori GM, del Río LA (1997) Natural senescence in pea leaves. An activated oxygenmediatedfunction for peroxisomes. Plant Physiol 113: 411-418

53. Paul MJ, Driscoll SP (1997) Sugar repression of phosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. Plant Cell Environ 20: 110-116

54. Pérez-Amador M, Abler ML, De Rocher EJ, Thompson DM, van Hoof A, LeBrasseur ND, Lers A, Green PJ (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. Plant Physiol 122: 169-179

55. Pevalek-Kozlina B (2003) Fiziologija bilja*,* Profil International, Zagreb, str. 156-219

56. Pla M, Jofré A, Martell M, Molinas M, Gómez J (2000) Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant senescent tissue. FEBS Lett 472: 14-16

57. Pyke KA (1999) Plastid division and development. Plant Cell 11: 549-556

58. Reggiani R, Bertani A (1989) Effect of decreasing oxygen concentrancion on polyamine metabolism in rice and wheat shoots. J Plant Physiol 135: 375-377

59. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17: 208-212

60. Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2000) His-Asp phosphorelay signaling: a communication avenue between plants and their environment. Plant Mol Biol 42: 273-278

61. Scandalias JG (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Adv Genet 28: 1-41

62. Scandalias JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol 101: 7-12

63. Scandalias JG, L. Guan i A. N. Polidoros (1997) Catalases in plants: gene structures, properties, regulation and expresion, u: J. G. Scandalias (ur.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str. 343-406

64. Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. Physiol Plant 112: 487-494

65. Sillanpää M (2003) Leaf senescence in silver birch (*Betula pendula* Roth). Doktorska disertacija, Helsinki, str. 9-17

66. Simpson DJ, Baqar MR, Lee TH (1978) Chromoplast ultrastructure in fruits of *Solanum aviculare* Forth. Var. *brisbanese*. Aust J Bot. 26: 783-792

67. Singh S, Letham DS, Palni LMS (1992) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. Physiol Plant 86: 388-397

68. Simeonova E, Sikora A, Charzyllska M, Mostowska A (2000) Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. Protoplasma 14: 93-101

69. Smeekens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 49-81

70. Smirnoff N (1995) Antioxidant systems and plant response to the enviroment. U: Smirnoff, N. (ur.) Enviroment and plant metabolism: flexibility and acclimation. BIOS Scientific Publishers, Oxford, str. 217-243

71. Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. Nature 407: 585-591

72. Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. Physiol Plant 121: 58-65

73. Steinmüller D, Tevini M (1985) Composition and function of plastoglobuli. I. Isolation and purification from chloroplasts and chromoplasts. Planta 163: 201-207

74. Thompson JE, Legge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytol 105: 317-344

75. Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y (1998) Lipid metabolism during plant senescence. Prog Lipid Res 37: 119-14

76. Uno G, Storey R, Moore R (2001) Principles of botany, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, str. 232-253

77. Vanacker H, Sandalio LM, Jiménez A, Palma JM, Corpas FJ, Meseguer V, Gómez M, Sevilla F, Leterrier M, Foyer CH, LA del Río (2006) Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. J Exp Bot. 57: 1735–1745

78. Vierstra RD (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. Plant Mol Biol 32: 275-302

79. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langerbartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defence in C3 plants. EMBO J 16: 4806-4816

80. Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Quick WP (1998) Regulation of leaf senescnce by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. Plant Physiol 116: 329-335

81. Xiao W, Sheen J, Jang J-C (2000) The role of hexokinase on plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Mol Biol 44: 451-461

82. Yang T, Poovaiah BW (2000) An early ethylene up-regulated gene encoding a calmodulinbinding protein involved in plant senescence and death. J Biol Chem 275: 38467-38473

83. Yen C-H, Yang C-H (1998) Evidence for programmed cell death during leaf sensecence in plants. Plant Cell Physiol 39: 922-927

84. Yoo SD, Greer DH, Laing WA, McManus MT (2003) Changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition in leaves of white clover at different developmental stages. Plant Physiol. Biochem 41: 887-893