

Aktivnost superoksid dismutaze i peroksidaze u embriogenom tkivu bundeve (Cucurbita pepo L.)

Boljkovac, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:779203>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek**

Anamarija Boljkovac

**AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE I PEROKSIDAZE U
EMBRIOGENOM TKIVU BUNDEVE (*Cucurbita pepo* L.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad sam izradila u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom doc.dr.sc. Sandre Radić Brkanac radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvala

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na iskazanom povjerenju, pomoći i podršci tijekom rada kao i na korisnim savjetima tijekom izrade rukopisa.

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

Hvala mojim roditeljima na podršci za vrijeme čitavog studija te zahvaljujem također suprugu na potpori tijekom izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE I PEROKSIDAZE U EMBRIOGENOM TKIVU BUNDEVE (*Cucurbita pepo* L.)

Anamarija Boljkovac

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek
Botanički zavod s Botaničkim vrtom
Roosveltov trg 6, Zagreb

Somatska embriogeneza je pojava nastanka embrija iz somatskih stanica. Iz somatskih embrija mogu se razviti čitave biljke sličnim načinom na koji nastaju iz zigotskih embrija. Osim dodatkom hormona 2,4D, somatska embriogeneza se u bundevi (*Cucurbita pepo* L.) može potaknuti i na podlozi bez hormona uz dodatak amonijevih iona. Upotrebom NH_4^+ kao jedinog izvora dušika u embriogenom tkivu bundeve prevladavaju globularni embriji dok dodatak reduciranih (NH_4^+) i nereduciranih (NO_3^-) oblika dušikovih soli potiče sazrijevanje embrija.

U ovom su radu praćene promjene u razvoju embrija bundeve određivanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima – superoksid dismutaze (SOD) i peroksidaze uz dva supstrata pirogalol (PPOD) i gvajakol (GPOD). Embriogeno tkivo uzgajano je uz različite izvore dušika i regulatora rasta. Za analizu aktivnosti enzima SOD i nespecifičnih POD, uzorci embriogenog tkiva bundeve uzimani su nakon 4, 8 i 11 dana.

Rezultati ovog rada pokazuju da postoji korelacija između aktivnosti SOD i PPOD kao biokemijskih pokazatelja razvoja i stresa i razvojnih stadija u embriogenoj kulturi bundeve uzgajane na podlogama s različitim izvorima dušikovih soli i regulatora rasta; općenito aktivnost SOD i PPOD bila je povećana u proembriogenom tkivu bundeve, a smanjena u embriogenim linijama bundeve s odvedenijim stadijima somatskih embrija. Stoga se može zaključiti da bi se ti enzimi (posebice PPOD) mogli koristiti kao rani pokazatelji embriogeneze i diferencijacije. Na osnovu aktivnosti SOD u tkivima uzgojenim uz različite izvore i količinu dušika, nije moguće utvrditi dovodi li 1mM NH_4Cl do oksidacijskog stresa jer se aktivnost tog enzima nije razlikovala između različitih podloga.

(39 stranica, 7 slika, 4 tablice, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: bundeva / somatska embriogeneza / superoksid dismutaza / peroksidaza

Voditelj: Doc. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

THE ACTIVITY OF SUPEROXID DISMUTASE AND PEROXIDASE IN EMBRIOGENIC TISSUE OF PUMPKIN (*Cucurbita pepo* L.)

Anamarija Boljkovac

University of Zagreb
Faculty Of Science
Division of Biology
Department of Botany
Rooseveltova trg 6, Zagreb

In somatic embryogenesis, embryo-like structures, which can develop into whole plants in a way analogous to zygotic embryos, are formed from somatic tissues. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) can be obtained from mechanically wounded mature zygotic embryos cultured on media supplemented with 2,4D, but also on hormone-free medium containing NH_4Cl as the sole source of nitrogen. Globular embryo stages predominate in media supplemented with NH_4^+ as the sole source of nitrogen and later-stage embryos in media with combination of reduced (NH_4^+) and unreduced (NO_3^-) forms of nitrogen.

Developmental response of pumpkin embryogenic tissue to reduced and unreduced nitrogen supply was studied by measuring activities of two antioxidant enzymes - superoxide dismutase (SOD) and peroxidase. The activity of the latter was assayed with pyrogallol (PPOD) and guaiacol (GPOD). The enzyme activities were investigated after 4, 8 and 11 days of experiment.

The results of the present study show correlation between antioxidant enzyme activities and developmental stages in embryogenic pumpkin lines grown in media supplemented with different forms and amount of nitrogen and growth regulators. Generally, SOD and PPOD activities increased in proembryogenic pumpkin tissue and decreased in embryogenic lines of pumpkin in which later-stage embryo predominated. Alternations in SOD and especially PPOD activities in pumpkin embryogenic cultures occurred in a stage-specific fashion and thus have a potential to function as early markers of somatic embryogenesis. Based on the SOD activity in tissues grown with different sources and amount of nitrogen, it was not possible to determine whether 1mM NH_4Cl leads to oxidative stress because SOD activity was similar between different treatments.

(39 pages, 7 figures, 4 tables, 39 references, original in Croatian)

Key words: pumpkin / somatic embryogenesis / superoxide dismutase / peroxidase

Supervisor: Ass. Prof. Sandra Radić Brkanac, Ph. D.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
1.1. KULTURA BILJNOG TKIVA	2
1.2. KULTURA KALUSNOG TKIVA	2
1.3. HRANJIVE PODLOGE	3
1.4. SOMATSKA EMBRIOGENEZA	3
1.5. BILJNI HORMONI	4
1.5.1. AUKSIN	4
1.5.2. BIOSINTEZA AUKSINA	4
1.5.3. UČINAK AUKSINA	4
1.6. DUŠIK U BILJCI	5
1.7. NEDOSTATAK DUŠIKA	5
1.8. SOMATSKA EMBRIOGENEZA I IZVOR DUŠIKA	6
1.8.1. INDUKCIJA SOMATSKE EMBRIOGENEZE U BUNDEVI	7
1.9. OKSIDACIJSKI STRES	7
1.9.1. AKTIVNI OBLICI KISIKA	7
1.10. ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI	8
1.10.1. SUPEROKSID DISMUTAZA	9
1.10.2. PEROKSIDAZE	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. BILJNI MATERIJAL	14
3.1.1. BUNDEVA (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	14
3.2. BILJNI MATERIJAL	14
3.2.1. UZGOJ EMBRIOGENIH KULTURA BUNDEVE U UVJETIMA <i>IN VITRO</i>	14
3.2.2. EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOPIVIH PROTEINA	16
3.2.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE	17
3.2.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI NESPECIFIČNIH PEROKSIDAZA	18
3.2.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	19
4. REZULTATI	21
4.1. SADRŽAJ TOPIVIH PROTEINA	21
4.2. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE	23
4.3. AKTIVNOST NESPECIFIČNIH PEROKSIDAZA	25
4.3.1. AKTIVNOST PIROGALOL PEROKSIDAZE	25
4.3.2. AKTIVNOST GVAJAKOL PEROKSIDAZE	27
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČAK	35
7. LITERATURA	37

1. UVOD

1.1. KULTURA BILJNOG TKIVA

Uzgajanje dijela biljke u sterilnim in vitro uvjetima nazivamo kulturom biljnog tkiva. Dio biljke koji se izolira i uvodi u kulturu nazivamo eksplantatom.

Dva su osnovna tipa rasta kulture, organizirani i neorganizirani. Organizirani rast podrazumijeva čuvanje postojeće početne strukture ili razvitak struktura (organa) iznova iz neorganiziranih tkiva. Proces razvoja organa nazivamo organogeneza ili morfogeneza. Ovisno o vrsti eksplantata razlikujemo kulture čitavih biljaka, kulture embrija, kulture korijena, kulture antera, kulture meristema, vegetacijskog vrška izdanka i kulturu pojedinačnog nodija. Neorganiziranim rastom razvije se tkivo koje ne sadrži ni jednu prepoznatljivu strukturu biljnog organizma. Takvo tkivo ima i ograničen broj diferenciranih stanica. Neorganiziranim rastom razvijaju se kulture biljnog tkiva u užem smislu (kalusne kulture) te kulture stanica u suspenziji, kulture pojedinačnih stanica i kulture protoplasta. Nerijetko se u kulturi zbivaju oba tipa rasta pa se one nazivaju neorganizirane/organizirane kulture (Jelaska, 1994).

1.2. KULTURA KALUSNOG TKIVA

Kultura kalusa je bila jedna od prvih metoda iz kulture biljnog tkiva. Prva takva kultura uspostavljena je još tridesetih godina prošlog stoljeća. Kultura kalusnog tkiva upotrebljavana je u mnogim fiziološkim, genetičkim i biokemijskim istraživanjima.

Kalusno tkivo razvija se neorganiziranim rastom. Dobivene kalusne kulture pokazivale su i neograničen rast, a sastojale se većinom od parenhimskih, vakuoliziranih, stanica u kojima postoje središta meristemske aktivnosti. Kalusi imaju oblik nepravilne mase stanica. Kulture se znatno međusobno razlikuju u intenzitetu rasta, boji, izgledu i građi staničja. Mogu biti mekani, glatki i rahli ili pak tvrdi, kvrgavi, zbijeni. Mogu imati sluzasti ili staklasti izgled. Kakav je izgled kalusa ovisit će o sastavu podloge, izabranom eksplantatu i o biljnoj vrsti. Kalusno tkivo nije jednoliko. U istoj kulturi postoje razlike ovisno o postojećim aktivnim genetičkim informacijama unutar stanice. Stanice eksplantata se izvorno međusobno razlikuju i te razlike se zadrže u stvaranju staničnih linija.

Danas je moguće razviti kalusno tkivo od gotovo bilo kojeg biljnog organa ili tkiva (listovi, stabljika, antera, plod, sjemenka, vršni pup izdana i korijen).

Iako je u prirodnim uvjetima neorganizirani rast rijedak (npr. kalus rane), u kulturi in vitro vrlo je čest. Za održavanje aktivnog rasta kalusne kulture potrebno je trajno dodavanje anorganskih soli, vitamina, šećera i regulatora rasta (Jelaska, 1994).

1.3. HRANJIVE PODLOGE

Za rast kulture odlučujući je sastav medija. Hranjive podloge sadrže mineralne soli, ugljikohidrate (najčešće saharozu), vitamine i regulatore rasta. Najčešće se upotrebljava MS podloga (Murashige i Skoog, 1962).

1.4. SOMATSKA EMBRIOGENEZA

Regeneracija u kulturi biljnog tkiva može se odvijati putem adventivne organogeneze ili somatske embriogeneze.

Somatska embriogeneza je proces u kojem diploidne ili haploidne somatske stanice prolaze kroz karakteristične embrijske stadije bez fuzije gameta i mogu stvarati kompletne biljke.

Zajedničke karakteristike embrionalnih stanica su: brzo dijeljenje (karakteristično za meristemske stanice), malih su dimenzija, imaju gustu citoplazmu i velike jezgre s istaknutom jezgričicom, male vakuole te obiluju škrobnim zrcima. Somatski embriji se ne razlikuju od zigotskih embrija ni strukturno ni biokemijski (Jelaska, 1994).

Početa istraživanja somatske embriogeneze provedena su na mrkvi (*Daucus carota* L.), no ubrzo se taj proces počeo proučavati i na drugim vrstama.

Regulatori rasta, ponajviše auksin 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kiselina), nezaobilazni su za inicijaciju embriogeneze. Dušik u obliku amonijevih iona u mnogim je slučajevima bio kritičan faktor u embriogenezi. Kada je ograničen dušik, kalij potiče embriogenezu. Velike koncentracije kalcija koče embriogenezu. Velike koncentracije soli kao u MS podlozi potiču stvaranje embrija. Osim toga, čimbenici koji utječu na uspjeh somatske embriogeneze su količina svjetlosti, temperatura te koncentracija saharoze. Kako sve vrste ne reagiraju jednako na određene omjere i veličine tih čimbenika, nužna su brojna istraživanja da bi u potpunosti razumjeli proces somatske embriogeneze.

Novija istraživanja ukazuju na povezanost stresa i indukcije somatske embriogeneze, čak i u odsutnosti hormona (Kiyosue i sur., 1989). Prisutnost redukcijskog dušika te nekih aminokiselina i amida vrlo je bitna za kvalitetu, oblik i strukturu embrija.

Embriji se mogu razviti na dva načina. U neposrednoj (direktnoj) embriogenezi se stvara minimalna količina kalusnog tkiva ili ga uopće nema. Kod posredne (indirektno) embriogeneze najprije se razvija kalusno tkivo u kojem se kasnije zameću embriji iz takozvanih determiniranih embriogenih stanica. Diferencirane stanice se najprije dediferenciraju i zatim redeterminiraju kao embrijske stanice nakon stanične diobe. Takav razvoj primijećen je kod hipokotila bundeve, ali i u kulturi drugih vrsta.

1.5. BILJNI HORMONI

Biljni hormoni ili regulatori rasta su kemijski signali koji putuju iz jednog dijela biljke u drugi te vezanjem na specifične receptore reguliraju i koordiniraju biljni metabolizam, rast i morfogenezu. Ovi hormoni grupiraju se u pet skupina: auksini, giberelini, citokinini, etilen i abscizinska kiselina (ABA).

1.5.1. AUKSIN

Naziv auksin potječe od grčke riječi auxein, što znači rasti. Kemijska struktura auksina je struktura indol-3-octene kiseline (IAA). To je najvažniji i najobilniji prirodni auksin. Glavna mjesta nastanka prirodnih auksina su meristemska tkiva i tkiva embrija te fotosintetizirajući organi. Također, u spremišnim tkivima poput endosperma i supki, IAA može biti obilno prisutna. Postoje i brojni sintetski auksini koji imaju široku primjenu u hortikulturi i agrikulturi. U kulturi biljnog tkiva najčešće korišteni auksin je 2,4-diklorofenoksiocetna kiselina (2,4-D). Auksinsko djelovanje pokazuju spojevi vrlo raznolikih kemijskih struktura. Uvjet za djelovanje je razmak od 0.5nm između slabijeg pozitivnog naboja i jačeg negativnog naboja nastalog odvajanjem protona iz karboksilne skupine (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.5.2. BIOSINTEZA AUKSINA

Auksini se sintetiziraju u biljkama iz aminokiseline triptofan. Mjesta biosinteze tih regulatora rasta su povezana s mjestima brze stanične diobe, kao što su vršni meristemi izdanaka, mladi listovi i plodovi u razvoju, ali i pelud i embrio. Auksini se mogu deaktivirati, ako je potrebno, reverzibilnom konjugacijom sa drugim spojevima ili se mogu razgraditi, enzimskom oksidacijom te fotooksidacijom. IAA se prenosi pasivnim nepolarnim prijenosom floemom ili jednosmjerno polarnim prijenosom (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.5.3. UČINAK AUKSINA

Fiziološki odgovori potaknuti auksinom zahtijevaju trajnu prisutnost hormona. Uzrokuju promjene već pri niskim koncentracijama ($10^{-6}M$). Promjene se zbivaju na tkivnoj razini (brzi rast), subcelularnoj (preko receptora) i genskoj razini (promjene u ekspresiji gena uzrokovane auksinom). Učinci auksina su razni i ovise o mnogim čimbenicima: organu u kojem djeluju, razvojnom stadiju tkiva, koncentraciji auksina, vrsti auksina (prirodni ili sintetički) te o uključenosti drugih hormona. Ti regulatori rasta također pojačavaju izlučivanje protona u staničnu stjenku uslijed čega se smanjuje pH

vrijednost. Protoni aktiviraju enzime koji kidaju poprečne veze između celuloznih mikrofibrila čime je omogućeno klizanje molekula i rastezanje stanične stjenke uslijed ulaska vode. Taj proces je ključan za produžni rast stanica. Auksini stimuliraju produžni rast stabljike i koleoptila te su odgovorni za apikalnu dominaciju tj. kočenje rasta bočnih pupova. Ako je koncentracija auksina veća od 10^{-8} M produžni rast primarnog korijena je inhibiran, ali stimuliran je rast bočnog i adventivnog korijenja. Auksinima možemo odgoditi apsciziju (otpadanje listova, cvjetova, plodova). Auksini također posreduju u orijentaciji biljaka, fototropizmu i geotropizmu.

Auksini potiču staničnu dediferencijaciju koja je preduvjet somatskoj embriogenezi. Nakon indukcije somatske embriogeneze obično je potrebno smanjiti koncentraciju auksina kako bi se potakao daljnji razvoj embrija (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.6. DUŠIK U BILJCI

Za normalan razvitak biljkama su potrebni određeni elementi, makroelementi u većim količinama i mikroelementi u manjim količinama. Makroelementi su ugljik, kisik, vodik, dušik, sumpor, fosfor, kalcij, kalij i magnezij. Dušik biljka može primati u plinovitom obliku (N_2), kao anion (NO_3^-) i kao kation (NH_4^+). Dušik je sastojak nukleinskih kiselina, proteina, klorofila, hormona i koenzima. Biljke ga najčešće primaju u obliku nitrata, a ugrađuju se u reduciranom obliku. Većina dušika u biljci nalazi se u kloroplastima. Dostupnost dušika je glavni ograničavajući čimbenik mnogih važnih funkcija u biljkama, od metabolizma, prijenosa asimilata, do rasta i razvoja biljaka (Crawford, 1995). Najzastupljeniji oblik anorganskog dušika u tlu su nitrati. Koncentracija nitrata u tlu je 10 do 1000 puta veća od koncentracije amonijevih iona. Za optimalan rast i razvoj potrebna su oba oblika. Nitrati djeluju i kao signalne molekule u metabolizmu dušika i ugljikohidrata (Crawford, 1995; Stitt, 1999), potiču produživanje bočnog korijenja (Zhang i sur., 1999), razvoj gomolja, starenje (Crawford, 1995) te uzrokuju mobilizaciju asimilata (Stitt, 1999). Prisutnost nitrata aktivira gene uključene u procese prijenosa i asimilacije dušika. Kod ostalih hranjiva nedostatak istog aktivira gene asimilacijskog procesa.

1.7. NEDOSTATAK DUŠIKA

Krčljiv rast biljke i nježne drvenaste stabljike uslijed stvaranja viška ugljikohidrata posljedica su manjka dušika za sintezu aminokiselina. Kloroza starijih listova pri bazi jedan je od znakova nedostatka dušika. Dušik se mobilizira u mlađe listove te stoga mlađi listovi u početku ne pokazuju simptome. Nedostatak nitrata uzrokuje smanjen rast korijena i izdanka biljke duhana (*Nicotiana*

tabacum L.). Smanjeni rast direktna je posljedica smanjenog broja staničnih dioba i smanjenog rasta stanica. Listovi biljaka koje su rasle samo uz dodatak amonijevih iona sadržavali su 50% manji broj stanica epiderme i te su stanice bile 30% manje rastom od onih uzgojenih na podlozi koja je sadržavala i amonijeve i nitratne ione (Walch-Liu i sur., 2000).

Koncentracija citokinina (regulatora rasta koji utječu na diobu i rast stanica) pada na manje od 50% početne koncentracije samo 24h nakon presađivanja na podlogu s amonijevim ionima kao jedinim izvorom dušika.

Istraživanja ukazuju da različiti oblici soli dušika utječu na količinu i djelovanje biljnih hormona. NH_4^+ ioni povećavaju koncentraciju ABA u listovima graška (Zdunek i Lips, 2001). Djelovanje NO_3^- i auksina se podudara u regulaciji izduživanja bočnog korijenja (Zhang i Forde, 2000).

Uslijed abiotičkog ili biotičkog stresa može doći do nakupljanja NH_4^+ u stanicama biljke i ta pojava može biti pokazatelj razine stresa (Barker, 1999).

1.8. SOMATSKA EMBRIOGENEZA I IZVOR DUŠIKA

U indukciji somatske embriogeneze uobičajeno je korištenje auksina. U nekim slučajevima somatska embriogeneza može se potaknuti i na podlozi bez auksina.

Istraživanja utjecaja izvora dušika na somatsku embriogenezu mrkve (*Daucus carota* L.) pokazala su da je embriogenezu moguće potaknuti na podlozi bez hormona, uz dodatak NH_4^+ iona kao jedinog izvora dušika (Smith i Krikorian, 1989). U kasnijim istraživanjima pokazalo se da je učinak različitih izvora dušika na somatsku embriogenezu mrkve uglavnom posredan, jer različiti izvori anorganskog dušika u podlozi imaju različiti učinak na promjenu vrijednosti pH podloge za vrijeme kultivacije (Smith i Krikorian 1990a, b). Pri asimilaciji nitrata nastaju hidroksilni ioni koji pridonose povećanju pH vrijednosti podloge i citoplazme, dok asimilacija NH_4^+ snižava pH vrijednost. P-tip H^+ -ATPaza je protonska pumpa koja luči ekvimolarne količine H^+ iona koje prate apsorpciju NH_4^+ iona iz podloge (Howitt i Udvard 2000). Nizak pH podloge u embriogenoj kulturi mrkve kočio je izduživanje stanica, no kada se pH vrijednost digla na 5.8 došlo je do razvoja odvedenih stadija embrija.

1.8.1. INDUKCIJA SOMATSKE EMBRIOGENEZE U BUNDEVI

Somatska embriogeneza u kulturi bundeve (*Cucurbita pepo* L.) također je uspješno potaknuta i održavana na podlozi bez hormona uz dodatak NH_4^+ (podloga MSNH4) kao jedinog izvora dušika (Leljak-Levanić i sur., 2004). U tom je istraživanju uspoređivan razvoj embrija i rast spomenute embriogene linije s linijama potaknutim i održanim na podlogama s 2,4D i na podlozi bez hormona (dobivena presađivanjem linije rasle s 2,4D na podlogu bez hormona). Kontinuiranim presađivanjem

embriogene linije rasle na podlozi MSNH4 dobivene su visoko uniformne kulture u kojima nije dolazilo do sazrijevanja embrija. Takvo se tkivo sastojalo od proembriogenih globula i/ili globularnih stadija embrija. Sazrijevanje globularnih embrija bundeve postignuto je dodatkom reduciranih (NH_4^+) i nereduciranih (NO_3^-) oblika dušikovih soli u hranjive podloge.

Slično rastu na podlozi MSNH4, tkivo embriogenih linija bundeve uzgajane na podlozi MS2,4D sadržavalo je nakupine proembriogenih stanica i globularnih embrija, a embriogeno tkivo uzgajano na MS0 embrije u svim razvojnim stadijima.

1.9. OKSIDACIJSKI STRES

1.9.1. AKTIVNI OBLICI KISIKA

Kisik se može aktivirati apsorpcijom energije dovoljno velike da okrene spin jednom od nesparenih elektrona (s obzirom da su oni inače paralelnog spina). Tako nastaje sigletni kisik koji može sudjelovati u reakcijama divalentne redukcije (istovremeni prijenos dva elektrona). Singletni kisik pokazuje veliku reaktivnost prema organskim molekulama. Kada svjetlosni sustav kloroplasta primi previše energije, višak se može trošiti otpuštanjem topline, fluorescencijom ili prijenosom na kisik, pri čemu nastaju aktivni oblici kisika (AOS).

Drugi način aktivacije kisika jest monovalentna redukcija (prijenos jednog elektrona). Postepeno tako nastaju superoksidni radikal (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH) i voda. Vodikov peroksid je neradikalni štetni produkt kisika, a može ponovno krenuti u reakciju dajući najjači poznati oksidans, hidroksilni radikal, u Fentonovoj reakciji u kojoj kompleks divalentnog željeza reagira s vodikovim peroksidom.

Toksičnost otrovnih kisikovih spojeva i radikala proizlazi iz njihove sposobnosti da potaknu kaskadne reakcije radikala. One vode oštećivanju proteina, DNA, membranskih lipida i na kraju smrti stanice. Oksidacija organskih molekula može se odvijati tako da se hidroksilni radikal veže na nju ili može oduzeti vodikov atom molekuli i stvoriti organski radikal uz nastajanje vode. Organski radikal reagirajući s kisikom stvara peroksi radikal koji dovodi do lančane reakcije oksidirajući druge organske molekule (Arora i sur., 2002).

Najvećim izvorom radikala tijekom fotosinteze se smatraju reducirani akseptori elektrona u fotosistemu I, posebno feredoksin (Foyer, 2002). U mitohondrijima na respiratornom lancu gdje se četiri elektrona postepeno prenosi na kisik također mogu nastati aktivni oblici kisika. Male količine mogu nastati i na endoplazmatskom retikulumu, peroksisomima, glioksisomima, staničnoj membrani i apoplastu (Mano, 2002).

Otrovni radikali nastaju i djelovanjem pojedinih enzima. Takav enzim je i ksantin oksidaza koja kao donore elektrona koristi ksantin, hipoksantin ili acetaldehid, a njenim djelovanjem superoksidni radikal (Bolwell i Wojtaszek, 1997). Lipoksigenaza katalizira hidroperoksidaciju polinezasićenih masnih kiselina. Nastali hidroperoksidi mogu potaknuti lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Sofo i sur., 2004).

Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima i kloroplastima u reakcijama oksidacije (Del Rio i sur., 1992). Značajan izvor aktivnih oblika kisika je fotorespiracija. Fotorespiracija, koja započinje u kloroplastima još je jedan proces koji je izvor AOS odnosno velikih količina H_2O_2 . Naime, Rubisco katalizira prijenos kisika na drugi C-atom ribuloza-1,5-bisfosfata pri čemu se stvara fosfoglikolat i fosfoglicerat. Daljnjim metabolizmom glikolata u peroksisomima nastaje H_2O_2 . Fotorespiracija se može interpretirati kao zaštitni mehanizam koji reciklira akceptore elektrona i time omogućava da se nastavi fotosintetski tok elektrona u uvjetima niske asimilacije ugljika.

Enzimi koji pridonose nastanku vodikovog peroksida su oksalat oksidaza (Bolwell i Wojtaszek, 1997), amin oksidaza (Regianni i Bertani, 1989), glikolat oksidaza, Acil-CoA oksidaza (koja sudjeluje u β -oksidaciji lipida u peroksisomima) (Mano, 2002)

U uvjetima stresa povećano je i stvaranje radikala te se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme koji radikale uklanjaju (Perl-Treves i Perl, 2002). Međutim, lipidna peroksidacija nije samo destruktivan proces jer njezini produkti mogu sudjelovati u kaskadi prijenosa signala koji upozoravaju na trpljenje stresa (Tarchevskii, 1992).

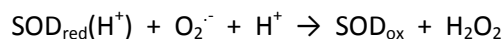
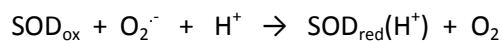
1.10. ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI

Obzirom da se aktivni oblici kisika razlikuju u svojim svojstvima (topivost, mogućnost difuzije i reagiranja s različitim biološkim molekulama) a također nastaju i u raznim staničnim i međustaničnim odjeljcima, biljnoj stanici je u svim njenim dijelovima potreban kompleksan antioksidacijski sustav obrane (Smirnoff, 1993). Antioksidacijski sustav kao odgovor biljnih stanica na stres uključuje različite enzimske i neenzimske mehanizme za uklanjanje štetnih spojeva kisika. Neenzimski mehanizmi uključuju antioksidanse male molekularne mase kao što su glutation, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E), karotenoide, antocijane i neke druge fenolne spojeve. Enzimski mehanizmi uključuju glavne antioksidacijske enzime – katalazu, peroksidaze i superoksid dismutazu (Blokina i sur., 2000) te enzime koji sudjeluju u obnavljanju supstrata za obrambene reakcije – glutation reduktaza, monodehidro- i dehidroaskorbat reduktaza (ciklus Halliwell-Asada).

1.10.1. SUPEROKSID DISMUTAZA

Superoksid dismutaza (SOD) je stanični metaloenzim koji katalizira dismutaciju dva superoksidna radikala ($O_2^{\cdot-}$) u vodikov peroksid i molekularni kisik. Ovaj enzim prisutan je u svim aerobnim organizmima. Pretpostavlja se da ima središnju ulogu u obrani o oksidacijskog stresa (Bowler i sur. 1992). SOD razgrađuje superoksidni radikal u vodikov peroksid tako da je ujedno, uz obrambenu ulogu, izvor otrovnog kisikovog spoja.

SOD privlači negativne superoksidne radikale pozitivnim elektrostatskim potencijalom blizu aktivne strane. Osim supstrata vežu se i serije malih aniona. Mehanizam se odvija u dva koraka. U dvije polu-reakcije SOD reagira s jednom po jednom molekulom superoksidnog radikala. U prvoj polu-reakciji SOD uzima jedan proton i tako se reducira uz nastanak O_2 . U drugoj polu-reakciji SOD se ponovno oksidira uz nastanak H_2O_2 (Miler, 2004).



S obzirom na metalni kofaktor postoje četiri izoforme superoksid dismutaze : bakar/cink (Cu^{2+}/Zn^{2+} -SOD), mangan (Mn^{2+} -SOD), nikal (Ni^{3+} -SOD) i željezo (Fe^{3+} -SOD). Ove izoforme su različito osjetljive na inhibitore KCN i H_2O_2 . Mn^{2+} -SOD je otporna na ove inhibitore, Cu^{2+}/Zn^{2+} -SOD je osjetljiva na oba, a Fe^{3+} -SOD je osjetljiva samo na vodikov peroksid.

Ove izoforme mogu se odvojiti elektroforezom u nativnom poliakrilamidnom gelu.

1.10.2. PEROKSIDAZE

Vodikov peroksid - produkt SOD-a - zahtijeva daljnju detoksikaciju koja se postiže drugim enzimskim antioksidansima koji se razlikuju u pojedinim staničnim odjeljcima. Jedan od tih enzimskih kompleksa su i peroksidaze (vodik peroksid oksidoreduktaze), široko rasprostranjeni enzimi nađeni u biljnom i životinjskom svijetu (Vianello i sur., 1997). 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 različitih staničnih sastojaka (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 grupe (Asada, 1992):

- Prva skupina peroksidaza su nespecifične peroksidaze, koje koriste H_2O_2 za različite oksidacijske reakcije i imaju slabu supstratnu specifičnost. Zbog slabe supstratne specifičnosti kao donori elektrona mogu poslužiti fenolne molekule kao gvajakol i

pirogalol. Uključene su u procese diferencijacije stanica, biosinteze lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zaraštavanje rana te obranu od patogena zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava (Laloue i sur., 1997).

- Drugoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza 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 sastojke i uzrokuju oštećenja stanica. Za redukciju vodikovog peroksida potreban je reducirajući supstrat, a to je u biljaka uglavnom askorbat.

Askorbat peroksidaza najvažnija je za detoksikaciju 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.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osim dodatkom 2,4D, somatska embriogeneza se u bundevi može potaknuti i na podlozi bez hormona uz dodatak NH_4Cl . No, upotreba NH_4^+ kao jedinog izvora dušika utječe negativno na razvitak embrija dok dodatak reduciranih (NH_4^+) i nereduciranih (NO_3^-) oblika dušikovih soli potiče sazrijevanje embrija. Kako bi se istražili učinci NO_3^- i glutamina (Gln) na razvoj embrija, u podlogu MSNH4 dodan je KNO_3 u koncentracijama od 2 i 20 mM (podloge označene kao MSNH4+2mM KNO_3 i MSNH4+20mM KNO_3) i Gln u koncentracijama od 1 i 10 mM (podloge označene kao MSNH4+1mM Gln i MSNH4+10mM Gln).

Ciljevi ovog rada bili su:

- 1) utvrditi postoji li korelacija između aktivnosti superoksid dismutaze i peroksidaze kao biokemijskih pokazatelja razvoja i stresa i razvojnih stadija u embriogenoj kulturi bundeve uzgajane na podlogama s različitim izvorima dušikovih soli i regulatora rasta
- 2) utvrditi da li se peroksidaze mogu koristiti kao rani pokazatelji embriogeneze i diferencijacije
- 3) utvrditi, na osnovu aktivnosti superoksid dismutaze, da li upotreba 1mM NH_4Cl kao jedinog izvora dušika u embriogenoj kulturi bundeve dovodi do oksidacijskog stresa zbog moguće NH_4^+ toksičnosti na rast i razvoj embrija

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

3.1.1. BUNDEVA (*Cucurbita pepo* L.)

Bundeva (*Cucurbita pepo* L.) je kultivirana biljka iz porodice Cucurbitaceae podrijetlom vjerojatno iz sjeverne Amerike. Vrste iz porodice bundeva uglavnom se koriste kao ukrasne ili poljoprivredne biljke. Osim plodova, jestivi su cvjetovi i sjemenke. Sjemenke bundeva su izvor vrlo hranjivog ulja (~ 35 %), a bogate su i proteinima (~ 38%), ugljikohidratima (~ 37%) i α -tokoferolima (3 mg/100 g), a posebice vitaminom E. Bundevino ulje se upotrebljava u liječenju parazitskih infekcija i povećane prostate, u snižavanju kolesterola, preventivno u sprečavanju bubrežnih kamenaca te je efikasan diuretik.

Boja cvjetova i plodova biljaka iz porodice bundeva potječe od pigmenta luteina i karotena (slika 1).



Slika 1. *Cucurbita pepo* L.

3.2. METODE

3.2.1. UZGOJ EMBRIOGENIH KULTURA BUNDEVE U UVJETIMA *IN VITRO*

Utjecaj različitih oblika dušikovih soli u hranjivoj podlozi na fiziološki status i razvoj embriogenog tkiva bundeva (*Cucurbita pepo* L.) ispitan je u tri embriogene linije opisane u radu Leljak-Levanić i sur. (2004). Sve tri linije uspostavljene su iz hipokotila klijanaca bundeva. Jedna linija

inducirana je i ustaljena na kompletnoj hranjivoj podlozi MS (Murashige i Skoog, 1962) uz dodatak 4,5 μM 2,4-D i svih organskih dodataka navedenih u Tablici 1 (podloga je u daljnjem tekstu označena kao MS 2,4D). Druga linija dobivena je prijenosom prve linije uzgojene na MS2,4D na podlogu MS bez regulatora rasta (u daljnjem tekstu označena kao MS 2,4D/MS0). Treća linija inducirana je i ustaljena na hranjivoj podlozi MS uz dodatak 1 mM NH_4Cl kao jedinog izvora dušika i 1 mgL^{-1} vitamina B1 kao jedinog organskog dodatka (označena kao MSNH4). Kako asimilacija amonijevih iona u kulturi tkiva izaziva zakiseljavanje hranjive podloge, u jednom pokusnom tretmanu u podlogu MSNH4 dodano je 25 mM 2-N-morfolinoetansulfonske kiseline (MES) (podloga označena kao MSNH4MES). MES u toj podlozi ima ulogu održavanja konstantne vrijednosti pH podloge tijekom kultivacije. Tkivo embriogenih linija bundeve uzgajanih na podlogama MS2,4D i MSNH4 sadržavalo je nakupine proembriogenih stanica i globularnih embrija, a embriogeno tkivo uzgajano na MS0 embrije u svim razvojnim stadijima.

Kako bi se istražili učinci NO_3^- i glutamina (Gln) na razvoj embrija, u podlogu MSNH4 dodan je KNO_3 u koncentracijama od 2 i 20 mM (podloge označene kao MSNH4+2mM KNO_3 i MSNH4+20mM KNO_3) i Gln u koncentracijama od 1 i 10 mM (podloge označene kao MSNH4+1mM Gln i MSNH4+10mM Gln).

Sve podloge su sadržavale 4,5% glukoze (250 mM) te je njihov pH podešen na 5,8 s par kapi 0,2 M KOH. Dio kultura održavan je na podlozi s dodatkom 0,8% agara (Sigma^R). Tekuće podloge sterilizirane su filtriranjem (0,22 μm flitar), a krute podloge autoklaviranjem 10 min pri temperaturi od 118 °C i tlaku od 150 kPa.

Pribor za rad s embriogenim tkivom u aseptičnim uvjetima steriliziran je autoklaviranjem 20 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 150 kPa i spaljivanjem na plameniku nakon uranjanja u 96%-tni etanol. Svi postupci koji su zahtijevali aseptične uvjete provedeni su u komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka tzv. laminaru.

Kulture su rasle u klima-komori, pri temperaturi od 23 ± 2 °C, u uvjetima dugog dana (16 sati svjetlo i 8 sati mrak) uz intenzitet osvjetljenja od 17 Wm^{-2} . Izvor svjetla bile su fluorescentne lampe (40 W, 400-700 nm).

Tkivo je presađivano i supkultivirano na svježu krutu podlogu svaka četiri tjedna. Kulture u tekućim podlogama rasle su 4-15 dana u tikvicama na tresilici uz učestalost trešnje od 100 okretaja u minuti.

Za analizu aktivnosti enzima superoksid dismutaze i nespecifičnih peroksidaza, uzorci embriogenog tkiva bundeve uzimani su nakon 4, 8 i 11 dana.

Tablica 1. Sastav hranjivih podloga za održavanje embriogenih linija bundeve

MS		
MAKROELEMENTI	mgL ⁻¹	mM
KNO ₃	1900	18,80
NH ₄ NO ₃	1650	20,60
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	2,99
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	1,50
MIKROELEMENTI	mgL ⁻¹	μM
H ₃ BO ₃	6,2	100,0
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	1,0
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,1
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	1000,0
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6	27,0
ŽELJEZO	mgL ⁻¹	μM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	100,0
Na ₂ EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI	mgL ⁻¹	μM
glicin	2,0	26,6
m-inozitol	100,0	500,0
nikotinska kiselina	0,5	4,1
piridoksin·HCl	0,5	2,4
tiamin·HCl	0,1	0,3
hidrolizat kazeina	1000,0	/

3.2.2. EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOPIVIH PROTEINA

Uzorke embriogenog tkiva homogenizirala sam u 1,0 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM EDTA i uz dodatak PVPP-a (polyvinylpyrrolidone). Homogenat sam centrifugirala u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 °C 30 minuta na 25 000 g. Dobiveni ekstrakt koristila sam za određivanje aktivnosti enzima i koncentracije 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 duljini 595 nm. U 1 ml radne otopine Bradford – 15 ml etanola, 30 ml 88%-tne H₃PO₄, 30 ml Bradford stock otopine (100 ml 96%-tnog etanola, 200 ml 88%-tne H₃PO₄ i 350 mg Coomassie brilliant blue G 250) i 450 ml H₂O – 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).

3.2.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE

Aktivnost superoksid dismutaze 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 µM 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 (40, 60 i 100 µl). U reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja dodala sam 10 µl riboflavina. 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:

$$\% \text{ inhibicije} = (\text{kontrola } A_{560} - \text{uzorak } A_{560}) / \text{kontrola } A_{560}$$

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 svježje tvari s koncentracijom proteina izraženom u miligramima proteina po gramu svježje tvari (U / mg proteina). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri replike ± standardna devijacija.

3.2.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI NESPECIFIČNIH PEROKSIDAZA

Nespecifične peroksidaze sam mjerila s dva različita supstrata koji su služili kao elektron donori – gvajakolom i pirogalolom. Kao reakcijsku otopinu za određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze koristila sam otopinu po Chanceu i Maehlyu (1955) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0, 18 mM gvajakola i 5 mM H₂O₂. Vodikov peroksid dodala sam u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 990 μl ove otopine dodala sam 10 μl sirovog ekstrakta i mjerila povećanje apsorbancije uslijed stvaranja tetragvajakola svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute pri valnoj duljini od 470 nm.

Kao reakcijsku smjesu za određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze koristila sam otopinu koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer pH vrijednosti 7,0, 20 mM pirogalola i 1 mM H₂O₂. Postupak mjerenja je bio isti, ali pri valnoj duljini od 430 nm.

Aktivnost GPOD odnosno PPOD je izražena kao količina nastalih produkata u jedinicama (1U=μmol min⁻¹) po miligramu proteina koristeći ε₄₃₀ = 2,47 mM⁻¹cm⁻¹ za pirogalol te ε₄₇₀ = 26,6 mM⁻¹cm⁻¹ za gvajakol. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri replike ± standardna devijacija.

$$\text{POD} = \frac{\Delta A_{sv} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol}/\text{minml}]$$

$$\text{POD} = \frac{\Delta A_{\mu\text{mol min ml}}}{m(\text{g})} \quad [\mu\text{mol}/\text{ming}_{svt}]$$

λ = 430 ili 470 nm

ΔA sv = srednja vrijednost promjene aporbancije u 15 s

V_{r.s.} = volumen reakcijske smjese

F.R. = faktor razrjeđenja uzorka

V_{uzor.} = volumen uzorka

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

ε₄₃₀ = 2,47 mM⁻¹cm⁻¹, ε₄₇₀ = 26,6 mM⁻¹cm⁻¹

l = duljina optičkog puta (1 cm)

m = masa uzorka

Specifična aktivnost PPOD i GPOD:

$$\frac{\text{aktivnost POD } \frac{\Delta A \mu\text{mol}}{\text{min g}_{\text{sv.t.}}}}{\text{sadržaj proteina } \frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{sv.t.}}}}$$

3.2.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

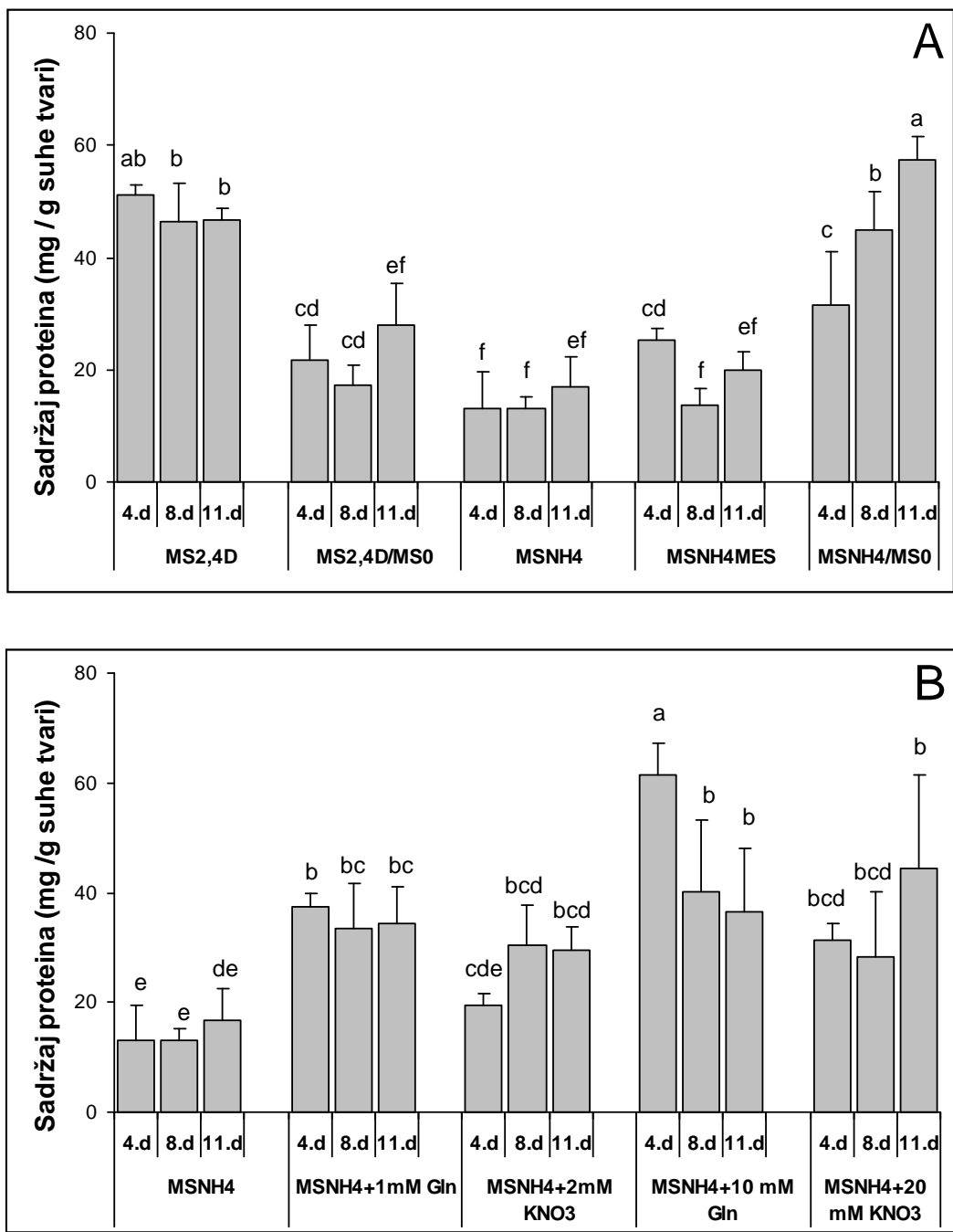
Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom ili tablicom aritmetička je sredina određenog broja replika. Usporedba različitih podloga provedena je testom "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT) za svaki pojedini dan (Duncan, 1955). Statistički značajnim smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$. Koristila sam računalni program STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., SAD).

4. REZULTATI

4.1. SADRŽAJ TOPIVIH PROTEINA

Sadržaj proteina statistički se značajno smanjio u tkivu bundeve presađenom s podloge MS s dodatkom 4,5 μM 2,4D u podlogu MS bez hormona (slika 2A). U usporedbi s linijom raslom na podlozi uz dodataka 2,4D, sadržaj proteina bio je znatno smanjen u tkivu bundeve uzgajane samo uz dodataka 1 mM NH_4Cl kao jedinog izvora dušika (podloga MSNH4) te tkivu raslom na istoj podlozi uz dodatak MES-a (MSNH4MES). Nakon prijenosa tkiva s podloge MSNH4 u podlogu bez hormona (MS0) primjetljiv je postepeni porast proteina tijekom 11 dana rasta tako da je na kraju pokusa sadržaj proteina u tom tkivu bitno veći u odnosu na tkivo održavano na MS2,4D ili ono presađeno s MS2,4D u MS0.

Dodatkom različitih izvora dušika (nitratni ioni ili glutamin), sadržaj proteina u tkivu bundeve znatno je porastao u usporedbi s tkivom uzgajanim na podlozi MS samo uz dodatak 1 mM NH_4Cl (slika 2B) te se taj odnos održao tijekom cijelog pokusa.

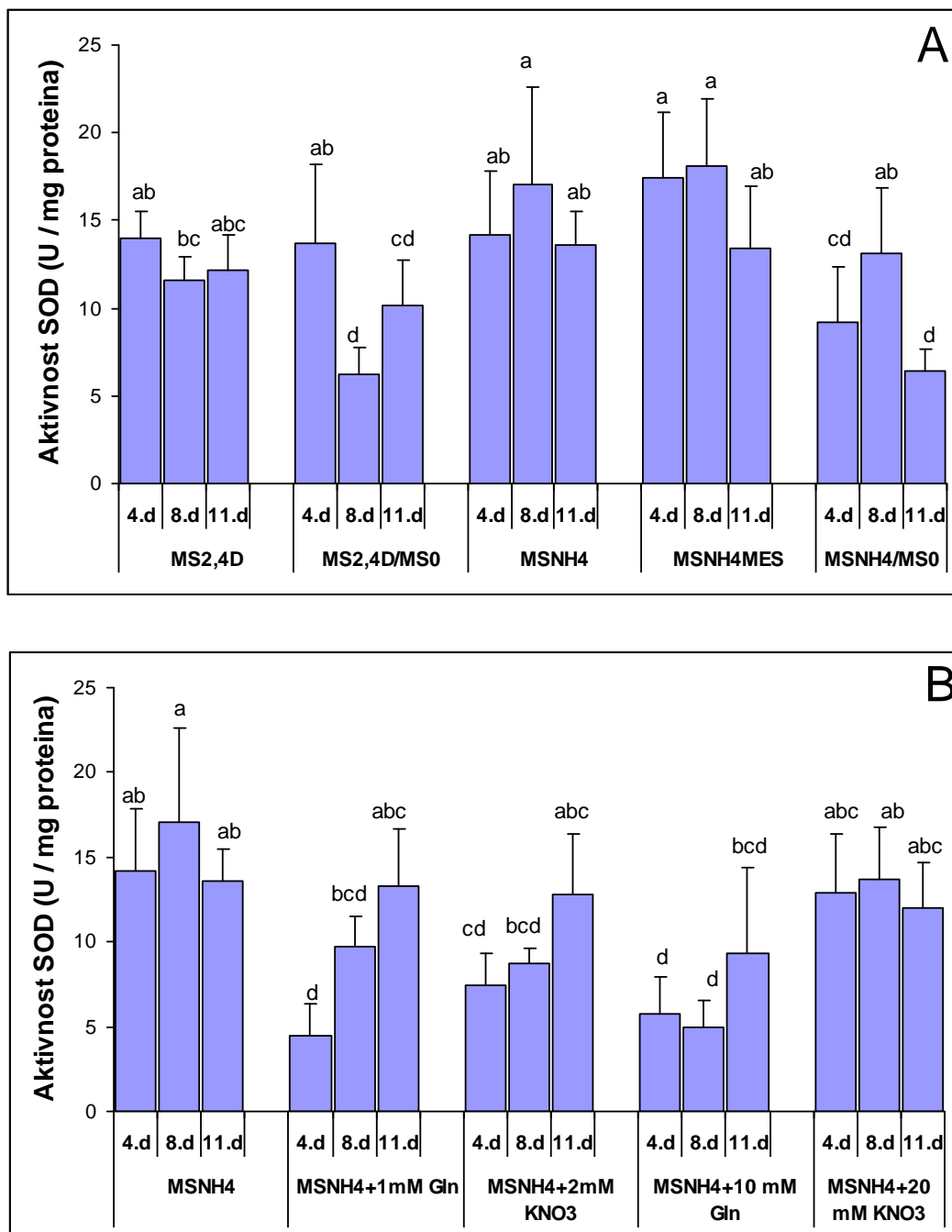


Slika 2. Sadržaj topivih proteina u embriogenom tkivu bundeve uzgajane tijekom 11 dana na podlogama (A) MS2,4D, nakon prebacivanja s MS2,4D u MS0, MSNH4, MSNH4MES i nakon prebacivanja s MSNH4 u MS0 te na podlozi (B) MSNH4 bez i s dodatkom 1 ili 10 mM Gln, ili 2 ili 20 mM KNO₃. Rezultati su srednja vrijednost tri replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($P \leq 0,05$ prema DNMR).

4.2. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE

Aktivnost superoksid dismutaze (slika 3A) u embriogenom tkivu bundeve statistički je značajno snižena četiri dana nakon presađivanja tkiva s podloge MSNH4 u MS0 u usporedbi s tkivom stalno uzgajanim u podlozi MSNH4 kao i ostalim ispitanim podlogama. Nakon osam dana pokusa, statistički značajne razlike u aktivnosti SOD zabilježene su između tkiva uzgajanog u podlozi MS2,4D i nakon presađivanja s MS2,4D u MS0 s jedne strane te onim na podlogama MSNH4 i MSNH4MES s druge strane: aktivnost SOD bila je znatno viša u tkivu uzgajanom na MSNH4 i MSNH4MES podlogama u usporedbi s tkivom presađenim s podloge MSNH4 u podlogu MS0 (s uobičajenim sadržajem dušika). Aktivnost SOD u tkivu raslom u podlozi MSNH4 (sa ili bez MES-a) nakon 11 dana pokusa bila je slična aktivnosti tog enzima u tkivu uzgajanom uz dodatak 2,4D. U embriogenim je linijama, nakon što su prebačene s podloga za održavanje embriogenog potencijala (MS2,4D i MSNH4) na podlogu za regeneraciju embrija (MS0), zabilježen pad aktivnosti SOD.

Aktivnost superoksid dismutaze u tkivu uzgajanom u podlozi MSNH4 uz dodatak glutamina ili niže koncentracije nitrata bila je značajno smanjena nakon četiri i osam dana pokusa u usporedbi s izvorišnom kulturom raslom u MSNH4 (slika 3B). Na kraju pokusa tj. nakon 11 dana, aktivnost SOD se nije bitno razlikovala između različitih tretmana.



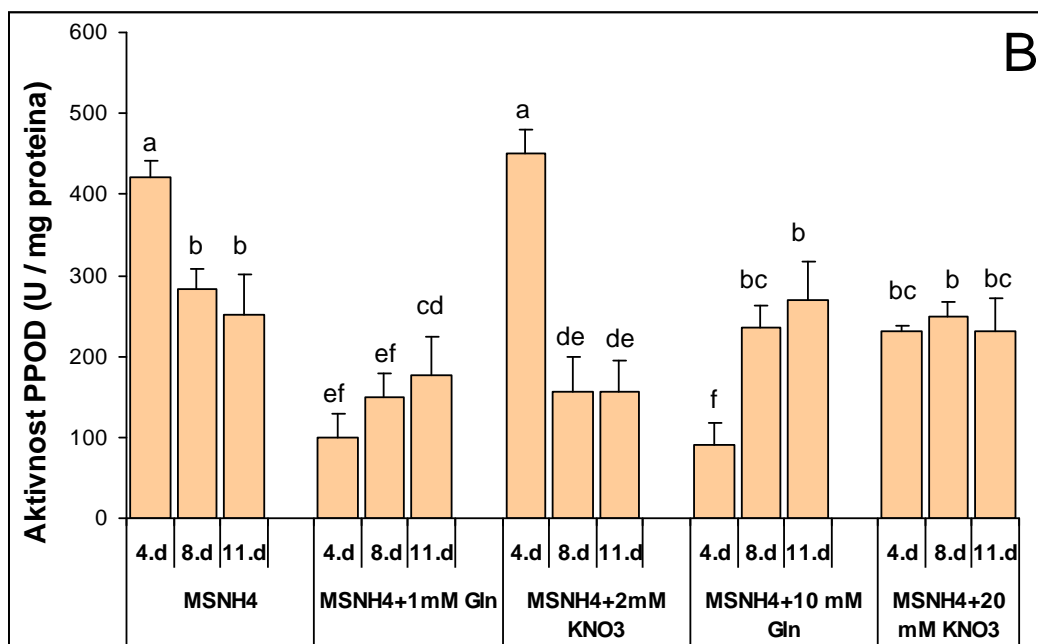
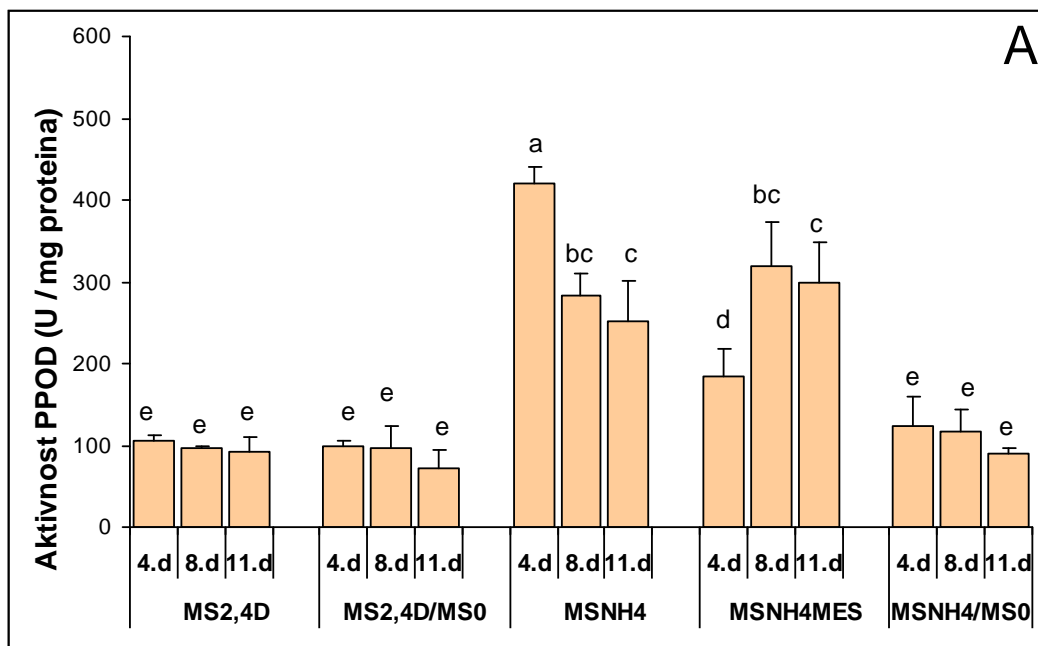
Slika 3. Aktivnost superoksid dismutaze u embriogenom tkivu bundeve uzgajane tijekom 11 dana na podlogama (A) MS2,4D, nakon prebacivanja s MS2,4D u MS0, MSNH4, MSNH4MES i nakon prebacivanja s MSNH4 u MS0 te na podlozi (B) MSNH4 bez i s dodatkom 1 ili 10 mM Gln, ili 2 ili 20 mM KNO₃. Rezultati su srednja vrijednost tri replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($P \leq 0,05$ prema DNMRT).

4.3. AKTIVNOST NESPECIFIČNIH PEROKSIDAZA

4.3.1. AKTIVNOST PIROGALOL PEROKSIDAZE

Aktivnost nespecifičnih peroksidaza mjerena upotrebom pirogalola kao supstrata bila je znatno viša u odnosu na aktivnost peroksidaze izmjerene upotrebom gvajakola kao supstrata. Također, vidljiva su i značajna odstupanja u aktivnosti PPOD i GPOD u tkivu raslom uz dodataka 2,4D i tkivu raslom na podlogama sa smanjenim sadržajem dušika osmog i jedanaestog dana pokusa (slike 4 i 5). Naime, aktivnost PPOD u tkivima raslim u podlozi MSNH₄ i MSNH₄MES bila je tijekom cijelog pokusa statistički značajno veća u odnosu na druge tretmane.

Još veće razlike između aktivnosti GPOD i PPOD primjetljive su na slici 4B gdje je prikazana usporedba tkiva raslog u podlozi s dodatkom 1 mM NH₄ (MSNH₄) i u istoj podlozi obogaćenoj drugim izvorima dušika (Gln i KNO₃). U tkivu raslom četiri dana na podlogama MSNH₄ i MSNH₄ s dodatkom 2 mM KNO₃ zabilježene su bitno veće vrijednosti aktivnosti PPOD u odnosu na druge tretmane (slika 4B). Nakon osam i 11 dana pokusa, aktivnost PPOD bila je značajno smanjena u tkivima raslim u podlogama s dodatkom 2 mM KNO₃ ili 1 mM Gln.

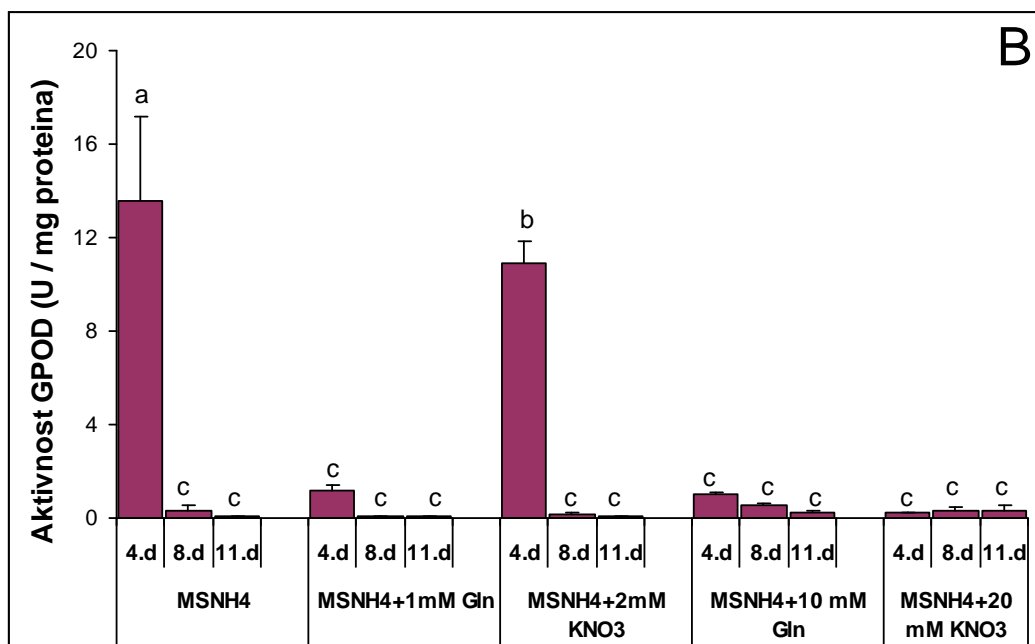
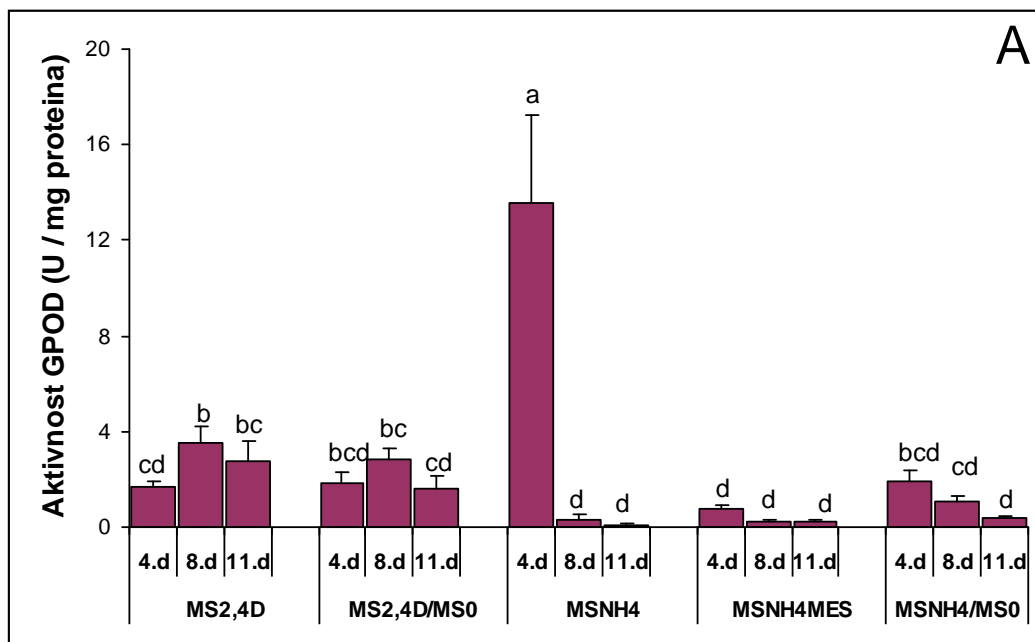


Slika 4. Aktivnost pirogalol peroksidaze u embriogenom tkivu bundeve uzgajane tijekom 11 dana na podlogama (A) MS2,4D, nakon prebacivanja s MS2,4D u MS0, MSNH4, MSNH4MES i nakon prebacivanja s MSNH4 u MS0 te na podlozi (B) MSNH4 bez i s dodatkom 1 ili 10 mM Gln, ili 2 ili 20 mM KNO₃. Rezultati su srednja vrijednost tri replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($P \leq 0,05$ prema DNMRT).

4.3.2. AKTIVNOST GVAJAKOL PEROKSIDAZE

Aktivnost gvajakol peroksidaze u liniji rasloj u MSNH4 je nakon četvrtog dana pokusa bila višestruko povećana u odnosu na ostale tretmane (slika 5A). Nakon osam i 11 dana rasta, aktivnost GPOD bila je povećana u embriogenoj liniji rasloj u MS2,4D i nakon presađivanja s MS2,4 u MS0 u usporedbi s linijom raslom u MSNH4, MSNH4MES i nakon presađivanja s MSNH4 u MS0.

U pokusu u kojem je tkivo bilo presađeno s podloge MSNH4 na podloge s različitim dodatnim izvorom dušika, nakon četvrtog dana pokusa aktivnost GPOD u tkivima raslim u MSNH4 i MSNH4+2 mM KNO₃ bila je višestruko povećana u odnosu na ostale tretmane (slika 5B). Nakon osam dana pokusa aktivnost GPOD bila je izrazito niska u svim tkivima nakon dodatka različitih koncentracija Gln ili KNO₃ te se su te vrijednosti zadržale do kraja pokusa.



Slika 5. Aktivnost gvajakol peroksidaze u embriogenom tkivu bundeve uzgajane tijekom 11 dana na podlogama (A) MS2,4D, nakon prebacivanja s MS2,4D u MS0, MSNH4, MSNH4MES i nakon prebacivanja s MSNH4 u MS0 te na podlozi (B) MSNH4 bez i s dodatkom 1 ili 10 mM Gln, ili 2 ili 20 mM KNO₃. Rezultati su srednja vrijednost tri replike. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ($P \leq 0,05$ prema DNMRT).

5. RASPRAVA

U ovom su radu praćene promjene u razvoju embrija bundeve određivanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima – superoksid dismutaze i peroksidaze. Embriogeno tkivo uzgajano je uz različite izvore dušika i regulatora rasta. Za analizu aktivnosti enzima superoksid dismutaze i nespecifićnih peroksidaza, uzorci embriogenog tkiva bundeve uzimani su nakon 4, 8 i 11 dana.

Aktivnost nespecifićnih peroksidaza mjerena je uz dva različita supstrata – pirogalol (PPOD) i gvajakol (GPOD). Nespecifićne peroksidaze ćiju sam aktivnost pratila u embriogenim linijama bundeve imaju ulogu u oksidacijskom povezivanju prekursora lignina, tirozinskih ostataka u glikoproteinima i esterski vezanog hidroksicimetnog ostatka pektina pomoću vodikovog peroksida (Asada, 1992). Te peroksidaze također sudjeluju u detoksikaciji vodikovog peroksida i štite membrane od lipidne peroksidacije.

Interesantno je da se u embriogenim linijama bundeve aktivnost POD mjerena uz pirogalol kao supstrat prilićno razlikovala od one koja je mjerena uz gvajakol. Ta je razlika najviše bila zamjetna između tkiva uzgojenog na podlogama s ili bez hormona i tkiva uzgojenog uz dodatak NH_4Cl (s ili bez MES-a). Naime, aktivnost pirogalol peroksidaze (PPOD) u embriogenim linijama bundeve uzgojenim uz prisutnost NH_4^+ kao jedinog izvora dušika bila je znatno povećana u odnosu na aktivnost PPOD u tkivima uzgojenim na podlogama s ili bez hormona. Upotrebom gvajakola kao supstrata, aktivnost POD (GPOD) u tkivu raslom na podlozi MSNH_4Cl bila je 8. i 11. dana pokusa smanjena u usporedbi s tkivom uzgojenim na podlozi $\text{MS}_2,4\text{D}$. Također, dodatak NO_3^- ili Gln u podlogu MSNH_4Cl nije utjecao na aktivnost GPOD. Zabilježene razlike vjerojatno odražavaju sklonost peroksidaze prema određenom donoru elektrona ovisno o porijeklu enzima u stanici. Peroksidaze su, naime, nađene ne samo u citosolu, vakuoli, stanićnoj stijenci i izvanstanićnom prostoru nego i u mitohondrijima i kloroplastima (Prasad i sur., 1994; Laloue i sur., 1997).

Aktivnost PPOD u tkivima raslim na podlogama MSNH_4 i MSNH_4MES bila je tijekom cijelog pokusa statistićki znaćajno veća u odnosu na tkiva rasla na podlozi s ($\text{MS}_2,4\text{D}$) ili bez hormona (podloge za regeneraciju embrija). S porastom aktivnosti PPOD, zamijećena je proliferacija proembriogenog tkiva (Mihaljević i sur., 2010). Dodatkom NO_3^- , a posebice Gln, aktivnost PPOD se smanjila a sadržaj proteina je porastao. Kao što je već spomenuto, u podlogama s dodatkom oba oblika dušikovih soli (NH_4^+ i NO_3^- ili NH_4^+ i Gln) prevladavali su zreliji stadiji embrija. U nekoliko istraživanja su aktivnost peroksidaze i sastav njenih izoenzima korišćeni kao pokazatelji somatske embriogeneze (Joersbo i sur., 1989; Kormutak i sur., 2003). Općenito, indukcija proembriogenog tkiva i njegova proliferacija karakterizirani su povećanom aktivnosti POD dok razvoju kasnih stadija embrija prethodi smanjenje aktivnosti POD. Takav uzorak promjene aktivnosti POD primijećen je i u embriogenoj kulturi bundeve. Temeljem toga, mođe se zakljućiti da bi se peroksidaze mogle koristiti kao pouzdani pokazatelji somatske embriogeneze (SE).

Kao što je već spomenuto, osim njihove uloge u razgradnji AOS, topive peroksidaze također imaju ulogu u strukturi stanične stjenke i njenoj funkciji te na taj način utječu i na oblik somatskih embrija. Mnoga su istraživanja pokazala obrnutu korelaciju između aktivnosti peroksidaze i rasta (Siegel i Galston, 1967; Bacon i sur., 1997; Lin i Kao, 2001) tj. s porastom aktivnosti peroksidaze (koja kontrolira proces lignifikacije) smanjuje se plastičnost stanične stjenke, a time i rast.

Slično je primijećeno i u embriogenoj kulturi bundeve. Povećana aktivnost PPOD u tkivima raslim uz dodatak NH_4^+ je u skladu s rezultatima istraživanja Garić (2006) koji su pokazali negativan učinak NH_4^+ kao jedinog izvora dušika na rast embriogenog tkiva. Naime, masa svježe i suhe tvari kao i promjer stanica bili su bitno manji u tkivu uzgojenom na podlozi MSNH4Cl nego u tkivu uzgojenom na podlozi s oba oblika dušikovih soli (Leljak-Levanić i sur., 2004; Garić, 2006). S usporavanjem rasta embriogenog tkiva u podlozi MSNH4Cl, istovremeno je uočeno i značajno zakiseljavanje podloge tijekom pokusa. U tom je tkivu potrošnja glukoze bila gotovo nemjerljiva, a zabilježena je i vrlo niska koncentracija proteina što ukazuje na nisku metaboličku aktivnost stanica te embriogene linije. S druge strane, s povećanjem promjera stanica i povećanim prirastom mase svježe i suhe tvari u linijama uzgojenim u podlogama s dodatkom oba oblika dušikovih soli (NH_4^+ i NO_3^- ili NH_4^+ i Gln), zabilježeno je i smanjenje aktivnosti POD. Također, sadržaj proteina kao i potrošnja glukoze u tim su tkivima bili povećani u odnosu na ona uzgojena na podlozi MSNH4Cl (Garić, 2006; Mihaljević i sur., 2010).

Općenito je prihvaćeno mišljenje da je dušik ponuđen biljci isključivo u obliku NH_4^+ štetan za mnoge biljne vrste (Von Wiren i sur., 2000). Naime, u usporedbi s biljkama koje primaju dušik u obliku NH_4NO_3 , dušik prisutan isključivo u obliku NH_4^+ dovodi do smanjenja sadržaja minerala (kationa) potrebnih biljci te na taj način dovodi i do smanjenog rasta biljke. Smatra se da je smanjenje rasta direktno povezano sa uzimanjem NH_4^+ jer je apsorpcija tog oblika dušika praćena sa stvaranjem jednakih količina protona. Ti se protoni izlučuju zbog povećane aktivnosti P-tip H^+ -ATPaze (protonska pumpa) što dovodi do zakiseljavanja tla i smanjenog primanja kationa. Drugi razlog za smanjeni rast biljaka koje primaju dušik isključivo u obliku NH_4^+ može biti povezan s nedostatkom nitrata. NO_3^- služi ne samo kao važan osmotik već je i nezamjenjiv ion u translokaciji kationa u ksilem te služi kao signal koji potiče ekspresiju gena uključenih u primanje i asimilaciju dušika, metabolizam organskih kiselina i sintezu škroba.

I u istraživanjima somatske embriogeneze pokazano je da se upotrebom NH_4^+ kao jedinog izvora dušika stanice krastavca (Burza i Malepszy, 1995) i mrkve (Smith i Krikorian, 1990a) zadržavaju u vrlo ranim stadijima SE. Dakle, upotreba NH_4^+ kao jedinog izvora dušika utječe negativno na razvitak embrija dok dodatak reduciranih (NH_4^+) i nereduciranih (NO_3^-) oblika dušikovih soli potiče sazrijevanje embrija (Higashi i sur., 1996). Jedan od načina kako izvor dušika utječe na razvoj somatskih embrija je

i promjena pH vrijednosti u podlozi. Kao što je već spomenuto, dušik prisutan isključivo u obliku NH_4^+ rezultira zakiseljavanjem podloge dok će dodatak nitrata dovesti do promjene pH vrijednosti prema alkalnom području. Povezanost između zakiseljavanja podloge i razvoja embrija dokazana je u embriogenim kulturama mrkve potaknute i održavane upravo uz dodatak 1 mM NH_4Cl kao jedinog izvora dušika (Smith i Krikorian, 1990). Ta su istraživanja pokazala da je upravo niska vrijednost pH podloge, a ne izvor dušika ili prisutnost auksina, dovela do sprečavanja produživanja stanice i razvoja embrija u mrkvi.

Puferiranje pH podloge koja sadrži isključivo NH_4^+ kao jedini izvor dušika u embriogenoj suspenziji bundeve dodatkom MES-a, stabiliziralo je pH na 5.5 što je izazvalo umjerenu proliferaciju tkiva. Međutim, daljnja diferencijacija u odvedenije stadije embrija nije zamijećena čak ni nakon nekoliko presađivanja. Proembriogene strukture su potaknute na sazrijevanje tek kad je u podlogu dodana kombinacija nitrata i amonijaka. Drugi razlog za zaustavljeni razvoj somatskih embrija bundeve u podlozi koja sadrži dušik samo u obliku NH_4Cl , mogao bi biti nedostatak dušika ili njegovih nereduciranih oblika, posebice nitrata. U istraživanju Steiner i Dougall (1995) koji su upotrijebili 3 mM NH_4Cl kao jedini izvora dušika u staničnoj kulturi mrkve, sadržaj amonijevih iona bio je iscrpljen iz podloge u roku od 24h. Higashi i sur. (1996) su zaključili da je za razvoj kasnijih stadija embrija važna uravnotežena i istovremena upotreba reduciranih oblika dušika i nitrata. U istraživanju Mihaljević i sur. (2010) na bundevi, pokazano je da je za prijelaz proembrija u globularni embrio odlučujuća količina dušika u podlozi a ne sam izvor dušika. U usporedbi s 20 mM KNO_3 , 10 mM Gln je stimulirao daljnji razvoj somatskih embrija što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima (Higashi i sur. 1996, Morcillo i sur. 1999).

Obzirom da su rani stadiji somatske embriogeneze karakterizirani indukcijom stresnih gena, postoji mišljenje da je SE odgovor kultiviranih biljnih stanica na ekstremne stresne uvjete (Davletova, 2001; Zavattieri i sur., 2010). Stresni uvjeti kao osmotski stres, povišena temperatura ili nagla promjena pH vrijednosti te drugi mehanički ili kemijski stresni čimbenici pokazali su se bitnima u indukciji somatske embriogeneze u nekoliko biljnih vrsta (Smith i Krikorian, 1990b; Decout i sur., 1994, Ikeda-Iwai i sur., 2003). Veliki broj istraživanja ukazuje na povezanost aktivnih oblika kisika i SE. Dokazano je da stresni čimbenici koji dovode do oksidacijskog stresa, povećavaju endogeni sadržaj auksina u stanicama i potiču dediferencijaciju (Pasternak i sur., 2002). Leljak-Levanić i sur. (2004) su zaključili da prisutnost 2,4D u podlozi te niskih koncentracija NH_4Cl kao jedinog izvora dušika u podlozi bez hormona, mogu uzrokovati stres u embriogenoj kulturi bundeve te da SE može biti potaknuta stresnim uvjetima koji uzrokuju promjene u metilaciji DNA.

Kairong i sur. (2002) su utvrdili korelaciju između vodikovog peroksida i indukcije SE. Njihovi rezultati na grmolikoj biljci *Lycium barbarum* pokazali su da vodikov peroksid djeluje kao sekundarni glasnik koji potiče ekspresiju gena i sintezu proteina te proces SE. Također su utvrdili da se aktivnost superoksid dismutaze postepeno povećava u ranim danima diferencijacije kulture a zatim postepeno smanjuje s daljnjim diobama i razvojem odvedenijih stadija embrija.

Takav uzorak promjene aktivnosti SOD primijećen je i u embriogenoj kulturi bundeve. Aktivnost tog enzima bila je povećana u embriogenim linijama uzgojenim na podlogama za održavanje embriogenog potencijala (MS2,4D i MSNH4 s ili bez MES-a), a nakon njihovog presađivanja na podlogu za regeneraciju embrija (MS0) ili podloge s dodatkom oba oblika dušikovih soli zabilježen je pad aktivnosti SOD. Povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima kao SOD i POD ukazuju na povećano stvaranje superoksida i vodikovog peroksida. Na osnovu toga, moglo bi se zaključiti da u tkivu uzgojenom na podlogama s dodatkom hormona 2,4D i NH_4^+ kao jedinog izvora dušika dolazi do povećanog stvaranja AOS tj. do oksidacijskog stresa. Tome u prilog ide istraživanje na šafranu gdje je porast aktivnosti SOD i katalaze također primijećen u proembriogenom tkivu te početnim stadijima SE dok se kasnije aktivnost SOD smanjila (Blazquez i sur., 2009). U istraživanju Pfeiffer i Höftberger, (2001) dokazano je da i 2,4-D može potaknuti oksidacijski stres u suspenziji stanica *Chenopodium rubrum* stvarajući velike količine aktivnih oblika kisika.

Ti nam rezultati također ukazuju na potencijal SOD kao još jednog mogućeg pokazatelja somatske embriogeneze.

Nekoliko istraživanja je pokazalo da u biljaka sa smanjenim unosom dušika dolazi do oksidacijskog stresa i povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima (Logan i sur. 1999; Shin i sur. 2005). Suprotno tome, ponovna opskrba biljke dušikom dovodi do smanjivanja količine AOS (Ramalho i sur., 1998) i rezultira velikim promjenama u ekspresiji specifičnih gena uključenih u redoks status i onih koji kodiraju enzime koji sudjeluju u modifikaciji stanične stijenke (Scheible i sur., 2004).

Stoga bi se moglo zaključiti da je moguće da upotreba NH_4^+ kao jedinog izvora dušika u tkivu bundeve dovodi do oksidacijskog stresa zbog brzog iscrpljivanja amonijevih iona iz podloge tj. nedostatka dušika. Tome bi u prilog išla smanjenje aktivnosti SOD nakon 4. i 8. dana u tkivima raslim uz prisutnost oba oblika dušika (NH_4^+ i NO_3^- ili NH_4^+ i Gln). Međutim, aktivnost tog antioksidacijskog enzima na kraju pokusa (nakon 11. dana) bila je podjednaka (ili tek lagano snižena) u tkivima uzgojenim bilo samo uz prisutnost NH_4^+ bilo uz istovremenu prisutnost tog oblika dušika s NO_3^- ili Gln.

Ipak, neophodna su daljnja i detaljnija istraživanja AOS u embriogenim linijama bundeve kao i istraživanja drugih antioksidacijskih enzima na molekularnom i subcelularnom nivou kako bi se razjasnila moguća uloga NH_4^+ u indukciji oksidacijskog stresa.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da:

1. postoji korelacija između aktivnosti superoksid dismutaze i peroksidaze kao biokemijskih pokazatelja razvoja i stresa i razvojnih stadija u embriogenoj kulturi bundeve uzgajane na podlogama s različitim izvorima dušikovih soli i regulatora rasta;
općenito aktivnost SOD i PPOD bila je povećana u proembriogenom tkivu bundeve, a smanjena u embriogenim linijama bundeve s odvedenijim stadijima somatskih embrija
2. obzirom na simultani uzorak promjene tih enzima sa stupnjem diferencijacije somatskih embrija, oba enzima (posebice PPOD) bi se mogla koristiti kao rani pokazatelji embriogeneze i diferencijacije
3. na osnovu aktivnosti superoksid dismutaze u tkivima uzgojenim uz različite izvore i količinu dušika, nije moguće utvrditi dovodi li NH_4^+ kad je prisutan kao jedini oblik dušika (1mM NH_4Cl) do oksidacijskog stresa; naime aktivnost SOD se nije razlikovala između tkiva uzgojenih uz različite izvore i količinu dušika

7. LITERATURA

- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82: 1227-1238.
- Asada, K. (1992): Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxid-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 235-241.
- Bacon, M., Thompson, D., Davies, W. (1997): Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought?. *Journal of Experimental Botany*, 48: 2075-2085.
- Barker, A. V. (1999): Foliar ammonium accumulation as an index of stress in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30: 167-174.
- Blazquez, S., Olmos, E., Hernández, J. A., Fernández-García, N., Fernández, J.A., Piqueras, A. (2009): Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97:49–57.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., Hoikalla, A., Wähälä, K., Chirkova, T.L. (2000): Antioxidant status of anoxia-tolerant and -intolerant plant species under anoxia and reaeration. *Physiologia Plantarum*, 109: 396-403.
- Bolwell, G.P., Wojtaszek, P. (1997): Mechanisms for generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 347-366.
- Bowler, C., van Montagu, M., Inzé, D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83-116.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Burza, W., Malepszy, S. (1995): *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. XVIII. Plants from protoplast through direct somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41:259-66.
- Chance, B., Maehly, A.C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. *U: Colowick SP, Kaplan NO (izd.) Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 764-775.
- Crawford, N. M. (1995): Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. *Plant Cell*, 7: 859-868.
- Davletova, S., Mészáros, T., Miskolcz, P., Oberschall, A., Török, K., Magyar, Z., Dudits, D., Deák, M. (2001): Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *Journal of Experimental Botany*, 52: 215-221
- Decout, L., Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J., Audran, J.C., Vasseur, J.(1994): Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 45:1859-65.
- Del Rio, L.A., Saudalio, L.M., Palma, J.M., Bueno, P., Corpas, F.J. (1992): Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 13: 557-580.
- Duncan, D.B. (1955): Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.

Foyer, C.H. (2002): The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. U: Inzé D, van Montagu M (izd.) Oxidative stress in plants. Taylor & Francis Inc, London, New York , 33-69.

Garić, R. (2006): Utjecaj dušikovih spojeva na izlučivanje proteina i topivih fenola u embriogenoj kulturi bundeve (*Cucurbita pepo* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977): Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59: 309-314.

Higashi, K., Kamada, H., Harada, H. (1996): The effects of reduced nitrogenous compounds suggest that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45:109-14.

Howitt, S. M., Udvardi, M. K. (2000): Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. Biochimica and Biophysica Acta, 1465: 152-170.

Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., Kamada, H. (2003): Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 34:107-14.

Jelaska, S. (1994): Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga, Zagreb.

Joersbo, M., Andersen, J.M., Okkels, F.T., Rajagopal, R.(1989): Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures. Physiologia Plantarum, 76:10-16.

Kormutak, A., Salaj, T., Matusova, R., Vookova, B.(2003): Biochemistry of zygotic and somatic embryogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.) Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 45:59-62.

Laloue, H., Weber-Lotfi, F., Lucau-Danila, A., Guillemaut, P. (1997): Identification of ascorbate and guaiacol peroxidases in needle chloroplasts of spruce trees. Plant Physiology and Biochemistry, 35: 341-346.

Leljak-Levanić, D., Bauer, N., Mihaljević, S., Jelaska, S. (2004): Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. Journal of Plant Physiology, 161: 229-236.

Lin, C.C., Kao, C.H. (2001): Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. Plant and Soil, 230: 135-143.

Logan, B.A., Demming-Adams, B., Rosenstiel, T.N., Adams III, W.W. (1999): Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. Planta, 209:213-20.

Mano, J. (2002): Early events in environmental stresses in plants: induction mechanisms of oxidative stress. U: Inzé D, van Montagu M (izd.) Oxidative stress in plants. Taylor & Francis Inc, London, New York, 217-247.

Miller, A.F. (2004): Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. Current Opinion in Chemical Biology, 8: 162–168.

- Mihaljević, S., Radić, S., Garić, R., Horvat G., Leljak-Levanić D., Jelaska S. (2010): Callose accumulation and peroxidase and esterase activity in NH_4^+ -induced proembryogenic tissue of pumpkin (*Cucurbita pepo*). *Journal of Plant Physiology* (article in press).
- Morcillo, F., Aberlenc-Bertosi, F., Noirot, M., Hamon, S., Duval, Y.(1999): Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 18:868-72.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for the rapid growth and biassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Pasternak, T.P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Vanonckelen, H. A., Dudits, D., Fehér, A. (2002): The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplastderived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129: 1807-1819.
- Perl-Treves, R., Perl, A. (2002): Oxidative stress: an introduction. *U: Inzé D, van Montagu M (izd.) Oxidative stress in plants*. Taylor & Francis Inc, London, New York, 1-33.
- Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.
- Pfeiffer, W.; Höftberger, M. (2001):Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: induction by auxin and osmotic changes. *Physiologia Plantarum*, 111: 144-150.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994): Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6: 65-74.
- Ramalho, J.C., Campos, P.S., Teixeira, M., Nunes, M.A. (1998): Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135:115-24.
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., Stitt, M. (2004): Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136: 2483-99.
- Shin, R., Berg, R.H., Schachtman, D.P. (2005): Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiology*, 46:1350-57.
- Siegel, B.Z., Galston, A.W. (1967): The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology*, 42: 221-226.
- Smirnoff, N. (1998): Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 214-219.
- Smirnoff, N. (1993): The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125: 27-58.

Smith, D. L. i Krikorian, A. D. (1989): Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *American journal of Botany*, 76: 1832-1843.

Smith, D. L. i Krikorian, A. D. (1990a): Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D-initiated embryogenic cells of carrot. *Physiologia Plantarum*, 80: 329-336.

Smith, D. L. i Krikorian, A. D. (1990b): Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. *American journal of Botany*, 77: 1634-1647.

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. *Physiologia Plantarum*, 121: 58-65.

Stitt, M. (1999): Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 178-186.

Tarchevskii, I.A. (1992): Regulatory role of degradation of biopolymers and lipids. *Fiziologiya Rastenii*, 39: 1215-1223.

Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G., Macrì, F. (1997): Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *Journal of Plant Physiology*, 150: 573-577.

von Wiren, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., Frommer, W. (2000): The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:254-61.

Walch-Liu, P., Neumann, G., Bangerth, F., Engels, C. (2000): Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 51: 227-237.

Zdunek, E., Lips, S. H. (2001): Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1269-1276.

Zhang, H., Forde, B. G. (2000): Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*, 51: 51-59.

Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P. W. i Forde, B. G. (1999): Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96: 6529-6534.

Zavattieri, M. A., Frederico, A.M., Lima, M., Sabino, R., Arnholdt-Schmitt, B. (2010): Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13: 1-9.