

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Бранка В. Узелац

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПРОЦЕСА
ПРОГРАМИРАНЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ
И СЕНЕСЦЕНЦИЈЕ У ЛИСТОВИМА
Nicotiana tabacum L. *in vitro***

докторска дисертација

Београд, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branka V. Uzelac

**CHARACTERISATION OF PROGRAMMED CELL
DEATH AND SENESCENCE IN LEAVES OF
Nicotiana tabacum L. *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

КОМИСИЈА

Др Снежана Будимир, научни саветник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Др Душица Јаношевић, доцент
Институт за ботанику и ботаничка башта „Јевремовац“
Биолошки факултет
Универзитет у Београду

Др Ана Симоновић, научни сарадник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Датум одбране

Експериментални део докторске дисертације урађен је на Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

Срдечно се захваљујем својим менторима др Снежани Будимир, др Душици Јаношевић и др Ани Симоновић на стручној помоћи, корисним саветима, разумевању и указаном поверењу током израде дисертације. Част је и задовољство радити са њима.

Експериментални део истраживања ове дисертације који се тиче анализе ендогенних биљних хормона урађен је на Институту за експерименталну ботанику Чешке академије наука у Прагу, чију реализацију је омогућио Dr. Václav Motyka, коме овом приликом желим да се захвалим. Такође се захваљујем и др Ани Лазаревић, Љубомиру Боровићу и Рајку Пешировићу на љубазности и помоћи у експерименталном делу рада.

Хвала свим мојим драгим колегама са Одељења за физиологију биљака и са Института за мултидисциплинарна истраживања. Посебно се захваљујем Милану Драјићевићу, др Сузани Живковић, др Снежани Милошевић, др Зорици Појовић и Ghahawenji Nabili на помоћи и сарадњи током израде дисертације.

Дубоку захвалност дујем Кајарини и Расику Самуровићу на оптимизму, ироницљивим коментарима и графичком обликовању текста.

Захваљујем се породици на љубави, подршци и разумевању, а највише Душану на неуморном ентузијазму и бескрајном стрпљењу.

Карактеризација процеса програмиране ћелијске смрти и сенесценције у листовима *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*

САЖЕТАК

Сенесценција листа представља комплексну, генетички контролисану последњу фазу онтогенезе листа која резултира координисаном разградњом макромолекула и мобилизацијом његових компоненти у друге делове биљке. На ћелијском нивоу, она обухвата промене структуре, метаболизма и генске експресије које доводе до смрти, чији се тип означава као програмирана ћелијска смрт (*PCD*). Као експериментални модел у овом раду коришћене су *in vitro* гајене биљке дувана (*Nicotiana tabacum* L.) које обезбеђују сет листова у којима постоји градација сенесценције. Истраживање је обухватило цитохистолошку и имунохистохемијску анализу динамике структурних промена мезофила листова, као и испитивање метаболичких, биохемијских и молекуларних процеса током сенесценције листа. Утврђен је редослед дегенеративних промена у структури ћелија током физиолошког старења листова. У сенесцентним листовима детектовани су типични симптоми програмиране ћелијске смрти, која по својим морфолошким одликама одговара аутофагној ћелијској смрти, и показано да интернуклеозомална фрагментација ДНК претходи ултраструктурним променама као што су деградација хлоропласта и кондензација хроматина. Садржај хлорофила и цитосолних протеина идентификовани су као поуздани биомаркери степена сенесценције листова. Хемијском анализом ендогених регулатора растења идентификовано је и квантификовано више од 20 различитих цитокинина и показано да је напредовање сенесценције у корелацији са опадањем садржаја укупних цитокинина, као и са смањењем нивоа цитокинина *trans*-зеатинског типа. Такође је уочена јасна корелација између смањења нивоа ендогене *IAA*, односно *ABA* и напредовања сенесценције. Имунохистохемијском анализом мезофила листова биљака третираних цитокининима показано је да високе дозе цитокинина БА убрзавају сенесценцију, чиме индукују програмирану смрт ћелија. Анализа активности појединих ензимских компоненти

антиоксидативног система показала је значајне промене у антиоксидативном статусу листова током физиолошког старења. Напредовање сенесценције је у јасној корелацији са смањењем активности *CAT* и повећањем укупне активности *POD*. Примарну антиоксидативну заштиту током старења обезбеђују *SOD*, а у процес одбране од штетног дејства *ROS* у иницијалној фази сенесценције укључују се *POD*. Молекуларна анализа сенесценције показала је активацију гена који кодирају ензиме укључене у конверзију и ремобилизацију продуката разлагања у сенесцентним листовима. *qRT-PCR* методом показана је индукција експресије гена који кодирају цистеин протеазе одговорне за ремобилизацију аминокиселина, као и цистеин протеазу из групе метакаспаза укључену у контролу ћелијске смрти. Индукција експресије *Gln1-3* и *GDH2*, *SAG*-гена укључених у мобилизацију азота у сенесцентним листовима, напореда са падом експресије *GS2* указала је да се асимилација амонијума током сенесценције постепено премешта из хлоропласта у цитосол мезофилних ћелија.

Кључне речи: антиоксидативни ензими, цитокинини, *Nicotiana tabacum* L., програмирана ћелијска смрт, *qRT-PCR*, ремобилизација азота, сенесценција листа, *TUNEL* реакција, ултраструктура.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Физиологија биљака

УДК број: 581.1:582.951.4(043.3)

Characterisation of programmed cell death and senescence in leaves of *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*

ABSTRACT

Leaf senescence constitutes the final stage of leaf development that results in the coordinated degradation of macromolecules and the subsequent nutrient relocation to other plant parts. Leaf senescence involves an integrated action at the cellular, tissue, organ and organism levels under the control of a highly regulated genetic program. During senescence, leaf cells undergo orderly changes in cell structure, metabolism and gene expression leading to cell death, recognized as a form of programmed cell death (PCD). *In vitro* grown *Nicotiana tabacum* L. has been chosen as a model plant system, since a single plant provides a large set of leaves in which there is a gradation of senescence. The dynamics of ultrastructural changes in leaf mesophyll cells, as well as metabolic, biochemical and molecular changes during leaf senescence were investigated. We determined the time sequence of senescence-related events in mesophyll cells during physiological ageing of leaves. Typical symptoms of autophagic PCD were detected in senescing leaves using cytological analysis and TUNEL assay. We showed that PCD-specific nuclear DNA fragmentation occurs during natural tobacco leaf senescence but that it starts early in leaf development, thus preceding ultrastructural changes such as chloroplast degradation and chromatin condensation. Chlorophyll and soluble protein content were identified as reliable biomarkers for estimating the relative age of a particular leaf along the main plant axis. Using HPLC/MS more than 20 different cytokinins were identified and quantified in tobacco leaves. The correlation of senescence with decline in total cytokinin content and the levels of *trans-Z* was found. The progression of leaf senescence correlated with a gradual decrease in endogenous levels of both IAA and ABA. Immunohistological analysis showed that high levels of cytokinin benzyladenine accelerate senescence thus inducing PCD. The activities of different antioxidative enzymes were analyzed during physiological ageing of leaves. Progression of senescence is correlated with decrease in CAT

activity and a concomitant increase in POD activity. Primary antioxidative protection in the course of ageing is provided by SOD, whereas POD are implicated in defense against detrimental ROS action in an initial phase of senescence. Molecular analysis of leaf senescence has revealed activation of genes encoding enzymes involved in conversion and remobilization of degradation products in senescing leaves. Quantitative RT-PCR showed that the expression of cysteine proteases responsible for amino acid remobilization, typically associated with leaf senescence and not found in other forms of PCD, was induced in senescent leaves. Induced expression of SAGs involved in nitrogen mobilization in senescing leaves, Gln1-3 и GDH2, contiguous with decrease in GS2 expression indicated that, during senescence, ammonia assimilation is progressively shifted from the chloroplasts to the cytosol of leaf mesophyll cells.

Key words: antioxidative enzymes, cytokinins, leaf senescence, *Nicotiana tabacum* L., nitrogen remobilization, programmed cell death, qRT-PCR, TUNEL assay, ultrastructure.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 581.1:582.951.4(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1 Сенесценција листа.....	2
1.2 Оксидативни стрес и сенесценција листова	6
1.3 Метаболички флуks у сенесцентним листовима	9
1.3.1 Разградња протеина и ремобилизација азота	10
1.3.1.1 Разградња протеина у сенесцентним листовима.....	11
1.3.1.2 Метаболизам аминокиселина у сенесцентним листовима	14
1.4 Хормонална модулација сенесценције	15
1.5 Ћелијска смрт повезана са сенесценцијом као облик програмиране ћелијске смрти	18
1.6 Структурне и биохемијске промене током ћелијске смрти повезане са сенесценцијом листа.....	19
1.7 Типови развојне ћелијске смрти.....	21
1.7.1 Апоптоза у анималним ћелијама	24
1.7.2 Апоптозијски пут код биљака	25
1.8 Дуван (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	28
2. ЦИЉ РАДА	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	31
3.1 Биљни материјал.....	32
3.2 Стерилизација семена	32
3.3 Услови гајења биљака	32
3.4 Хранљиве подлоге.....	33
3.5 Хистоанатомска и цитолошка анализа	34
3.5.1 Припрема биљног материјала за светлосну микроскопију (парафинска метода)	34
3.5.2 Припрема биљног материјала за светлосну и електронску микроскопију (метода калуљења у смоле).....	35
3.6 PCD-специфична фрагментација једарне ДНК.....	36
3.6.1 Електрофоретска анализа фрагментације ДНК (DNA laddering) ...	36
3.6.2 In situ детекција фрагментације ДНК	37
3.7 Квантитативни RT-PCR (qRT-PCR).....	39

3.7.1	Изолација РНК	39
3.7.2	Реверзна транскрипција – синтеза првог ланца.....	40
3.7.3	qRT-PCR.....	41
3.8	Екстракција протеина и анализа ензимске активности.....	43
3.8.1	Нативна електрофореза (Native PAGE)	44
3.8.2	Одређивање активности ензима	44
3.9	Анализа ендогених биљних хормона.....	46
3.10	Одређивање садржаја хлорофила.....	47
3.11	Статистичка обрада података	48
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	49
4.1	Морфолошка карактеризација	50
4.2	Хистоанатомска и ултраструктурна анализа мезофила листа	51
4.2.1	Млађи јувенилни листи (C1)	51
4.2.2	Старији јувенилни листи (C2)	53
4.2.3	Млађи зрели зелени листи (C3)	55
4.2.4	Старији зрели зелени листи (C4).....	57
4.2.5	Млађи сенесцентни листи (C5).....	59
4.2.6	Старији сенесцентни листи (C6).....	61
4.3	Фрагментација једарне ДНК специфична за програмирану ћелијску смрт (PCD) током сенесценције	64
4.3.1	Електрофоретска анализа фрагментације ДНК (DNA laddering) ...	64
4.3.2	In situ детекција програмиране ћелијске смрти	65
4.4	Идентификација биомаркера сенесценције	67
4.4.1	Садржај хлорофила.....	67
4.4.2	Садржај протеина	68
4.4.3	Свежа маса листова	69
4.5	Анализа ендогених регулатора растења.....	70
4.5.1	Садржај ендогених цитокинина.....	70
4.5.2	Садржај ендогене IAA	76
4.5.3	Садржај ендогене абсцисинске киселине.....	77
4.6	Ефекат цитокинина на програмирану ћелијску смрт.....	78
4.7	Активност антиоксидативног система током сенесценције листова дувана.....	80

4.7.1	<i>Супероксиг дисмутазе</i>	80
4.7.2	<i>Каталазе</i>	82
4.7.3	<i>Пероксидазе</i>	83
4.8	Разградња протеина и ремобилизација азота.....	86
4.8.1	<i>Разградња протеина у сенесценћним листовима</i>	86
4.8.2	<i>Метаболизам аминокиселина у сенесценћним листовима</i>	88
4.8.2.1	<i>Промене нивоа транскрипћна гена за кључне ензиме асимилације нитрата и амонијака (азота)</i>	88
4.8.2.2	<i>Акћивност укућне глутамин синтетазе</i>	91
5.	ДИСКУСИЈА	93
5.1	Морфолошка карактеризација.....	95
5.2	Структурне промене мезофилних ћелија и аспекти програмиране ћелијске смрти током сенесценције листова.....	95
5.3	<i>PCD</i> -специфична фрагментација једарне ДНК.....	99
5.4	Садржај хлорофила и протеина у листовима.....	100
5.5	Анализа ендогених биљних хормона.....	102
5.5.1	<i>Садржај ендогених цитокинина</i>	102
5.5.2	<i>Садржај ендогене IAA и ABA</i>	104
5.6	Ефекат цитокинина на програмирану ћелијску смрт током сенесценције.....	105
5.7	Акћивност антиоксидативног система током сенесценције листова дувана.....	106
5.7.1	<i>Супероксиг дисмутазе</i>	106
5.7.2	<i>Каталазе</i>	108
5.7.3	<i>Пероксидазе</i>	109
5.8	Разградња протеина и ремобилизација азота.....	110
5.8.1	<i>Разградња протеина у сенесценћним листовима</i>	110
5.8.2	<i>Метаболизам аминокиселина у сенесценћним листовима</i>	114
6.	ЗАКЉУЧЦИ	118
7.	ЛИТЕРАТУРА	121

СКРАЋЕНИЦЕ

- ABA (*abscisic acid*) – абсцисинска киселина
ATP – аденозин трифосфат
БА – бензиладенин
BSA (*Bovine Serum Albumin*) – говеђи серум албумин
CAT – каталаза
cDNA (*complementary DNA*) – комплементарна ДНК
Chl (*Chlorophyll*) – хлорофил
CLP (*Caspase-like protease*) – протеаза слична каспазама
CP – цистеин протеаза
СТАВ (*cetyltrimethylammonium bromide*) – хексадецил-триметил-амонијум бромид
cis-Z – cis-зеатин
cis-Z7G – cis-зеатин 7-глукозид
cis-Z9G – cis-зеатин 9-глукозид
cis-ZOG – cis-зеатин O-глукозид
cis-Z9R – cis-зеатин 9-рибозид
cis-Z9RMP – cis-зеатин 9-рибозид-5'-монофосфат
cis-Z9ROG – cis-зеатин 9-рибозид O-глукозид
DAB (*Diaminobenzidine*) – диаминобензидин
DEPC (*Diethylpyrocarbonate*) – диетилпирокарбонат
dUTP (*2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate*) – деоксиуридин трифосфат
2D-HPLC (*2D High Pressure Liquid Chromatography*) – дводимензионална течна хроматографија под високим притиском
DHZ – дихидрозеатин
DHZ7G – дихидрозеатин 7-глукозид
DHZ9G – дихидрозеатин 9-глукозид
DHZOG – дихидрозеатин O-глукозид
DHZ9R – дихидрозеатин 9-рибозид
DHZ9RMP – дихидрозеатин 9-рибозид-5'-монофосфат
DHZ9ROG – дихидрозеатин 9-рибозид O-глукозид
DNA, ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина
EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) – етилендиаминтетрасирћетна киселина
FW (*Fresh Weight*) – свежа маса
GS – глутамин синтетаза
GDH – глутамат дехидрогеназа
HPLC/MS (*High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy*) – високо ефикасна течна хроматографија/масена спектроскопија
IAA – индол-3-сирћетна киселина
iP – N⁶-(2-изопентенил)аденин
iP7G – N⁶-(2-изопентенил)аденин 7-глукозид

iP9G – N^6 -(2-изопентенил)аденин 9-глюкозид
iP9R – N^6 -(2-изопентенил)аденин 9-рибозид
iP9RMP – N^6 -(2-изопентенил)аденин 9-рибозид-5'-монофосфат
IPT (*isopentenyl transferase*) – изопентенил трансфераза
MC – метакаспаза
MS Murashige & Skoog хранљива подлога
NIA – нитрат редуктаза
NBT (*Nitrotetrazolium Blue Chloride*) – нитротетразолијум хлорид
PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) – електрофореза на полиакриламидном гелу
PBS (*Phosphate Buffered Saline*) – натријум фосфатни пуфер
PCD (*Programmed Cell Death*) – програмирана ћелијска смрт
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – реакција ланчаног умножавања
POD – пероксидаза
PSA – α -субјединица протеазома
qRT-PCR (*Quantitative Real-Time PCR*) – квантитативни *RT-PCR*
PHK – рибонуклеинска киселина
ROS (*Reactive Oxygen Species*) – реактивне кисеоничне врсте
RT (*Reverse Transcription*) – реверзна транскрипција
SAG (*Senescence-Associated Genes*) – гени повезани са сенесценцијом
SOD – супероксид дисмутаза
TBE – Tris-boratni-EDTA пуфер
TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) – терминална деоксинуклеотидил трансфераза
TE – Tris-EDTA пуфер
TEMED (*N,N,N',N'-Tetramethyl-ethane-1,2-diamine*) – *N,N,N',N'*-тетраметилетан-1,2-диамин
Tris – трис(хидроксиметил)аминометан
TUNEL (*terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) – реакција обележавања једноланчаних прекида (у ДНК) модификованим *dUTP* нуклеотидима помоћу ензима терминалне деоксинуклеотидил трансферазе
trans-Z – *trans*-зеатин
trans-Z7G – *trans*-зеатин 7-глюкозид
trans-Z9G – *trans*-зеатин 9-глюкозид
trans-ZOG – *trans*-зеатин *O*-глюкозид
trans-Z9R – *trans*-зеатин 9-рибозид
trans-Z9RMP – *trans*-зеатин 9-рибозид-5'-монофосфат
trans-Z9ROG – *trans*-зеатин 9-рибозид *O*-глюкозид

1. УВОД

1.1 Сенесценција листа

Сенесценција је процес детериорације завистан од старости, на нивоу ћелије, ткива, органа или организма, који доводи до смрти или краја животног циклуса (*Noodén* 1988). Зависно од тога да ли се посматра интактна биљка или поједини органи, могу се издвојити различити типови сенесценције (*Smart* 1994). Монокарпна сенесценција је последица репродуктивног развића и, након цветања и доношења плода, обухвата целу биљку. И код поликарпних биљака репродуктивни органи изумиру, с тим да код њих постоје многи прелазни облици, па тако сенесценција може да обухвати само надземне органе или може бити ограничена само на листове и репродуктивне органе, као код вишегодишњих дрвенстих биљака. Секвенцијална сенесценција обухвата поједине органе (котиледоне, репродуктивне органе, листове) и ћелије који су обавили своју функцију, а у случају појединачних ћелија јавља се као завршни стадијум диференцијације (*Nešković et al.* 2003).

Сенесценција листа је сенесценција на нивоу органа и представља комплексну, високо уређену, генетички контролисану последњу фазу онтогенезе листа која резултира координисаном разградњом макромолекула и мобилизацијом његових компоненти у друге делове биљке (*Pennell & Lamb* 1997, *Buchanan-Wollaston* 1997). Сенесценција обично напредује од врха листа ка његовој бази, док проводни снопићи остају интактни до финалних ступњева (*Feller & Fischer* 1994). Код *Arabidopsis thaliana*, сенесценција напредује од старијих (спољашњих) ка млађим (унутрашњим) листовима розете, који остају живи све до касних фаза у развићу (*Wingler et al.* 2004). Код многих једногодишњих биљака, сенесценција листова постепено напредује од базе ка врху стабла, што резултира у градацији сенесценције дуж главне осе.

Сенесценција листа није пасиван дегенеративни процес. Током сенесценције ћелије листа подлежу организованим променама структуре, метаболизма и генске експресије. Најранија и најзначајнија промена у

структури ћелије јесте разградња хлоропласта, органела које садрже и до 75% укупних протеина листа. Метаболички, асимилација угљеника се замењује катаболизмом хлорофила и макромолекула (протеина, мембранских липида, РНК). Захваљујући повишеној катаболичкој активности, ћелијски материјал акумулиран током фазе растења листа се конвертује у извозне хранљиве материје којима се снабдевају семена или други органи који расту.

Када се одвија као део нормалног развића, сенесценција листа се обично означава као **развојна сенесценција** или **сенесценција зависна од старости**, обзиром да њу индукују и контролишу ендогени фактори који делују током растења и сазревања листа. Међутим, под неповољним условима спољашње средине, који за биљку представљају стрес, сенесценција листа може прерано отпочети (*Lim et al. 2003, Lers 2007*). Средински фактори који утичу на сенесценцију могу бити биотички (резултат интеракције са другим организмима) или абиотички (резултат промене физичких или хемијских компоненти спољашње средине, у односу на оптималне услове раста). Стога је сенесценција листа интегрисани одговор ћелија листа на старосну информацију и друге унутрашње и спољашње сигнале, који обезбеђује оптимални фитнес биљке тако што се средински и ендогени статус биљке уграђују у дати еколошки оквир помоћу финог подешавања времена иницијације, брзине напредовања и природе процеса сенесценције.

Природна сенесценција одвија се координисано на нивоу целог листа, обично крећући од врха или маргина према бази листа. Ипак, када неједначени средински стрес делује локално, тада стресирани регион раније подлеже сенесценцији него други делови листа.

Сенесценција листа код неких биљака може да се одвија без очигледне корелације са сенесценцијом других органа, иако је често развојно координисана са сенесценцијом других органа или целе биљке. Код неких монокарпних биљака, репродуктивно развиће често управља сенесценцијом листова. Ова тзв. корелативна контрола је драстично изражена код грашка или

соје, где уклањање репродуктивних органа може ревертирати сенесцентне листове у јувенилни ступањ (*Thomas & Stoddart 1980, Noodén & Letham 1993*). Међутим, код неких биљака као што је *Arabidopsis thaliana*, сенесценција листова изгледа није под корелативном контролом, већ је сенесценција на нивоу целе биљке донекле корелисана са животним веком биљке (*Hensel et al. 1993*).

Скуп морфолошких, физиолошких и молекуларних промена током сенесценције листа (означених као „синдром сенесценције“) укључује видљиве промене боје, разградњу хлоропласта, деградацију РНК, протеина и ДНК и транслокацију молекула из сенесцентних листова у друге биљне делове, што резултира у смрти листа (*Bleecker & Patterson 1997, Schippers et al. 2007*). Овај процес још увек није могуће прецизно дефинисати у биохемијском смислу због тога што су неке од промена које прате сенесценцију вероватно периферне или секундарне а не узрочне (*Noodén 2004*). Наиме, ензими глиоксилатног циклуса и металотионеини чија се количина повећава током сенесценције (*Buchanan-Wollaston 1997*) не изазивају сенесценцију. Исто тако, разарање хлоропласта и процеси „спашавања“ хранљивих материја, иако важни аспекти синдрома сенесценције, нису директни узрочници смрти листова (*Noodén 1988*).

Молекуларна анализа сенесценције листа подразумева идентификацију и карактеризацију гена који показују појачану или смањену експресију током сенесценције. Премда се током овог процеса смањује ниво укупне РНК, као и експресија гена чији продукти учествују у фотосинтези и синтези протеина, сенесценцију листа такође прати и повишена експресија раније мање активних као и експресија нових гена који су раније били неактивни, заједно означених као гени повезани са сенесценцијом (*senescence-associated genes, SAG*). Поређењем нивоа експресије гена на три различита ступња развића листа: зрели зелени, рано сенесцентни (без хлорозе) и средње сенесцентни (5-15% хлоротични) лист, *Buchanan-Wollaston* и сарадници (2003) су код *Arabidopsis thaliana* идентификовали преко 1400 гена који показују релативне

промене експресије током развића листа. Ови гени се, зависно од обрасца експресије, могу сврстати у најмање 4 групе. Групу 1 чине гени чија се експресија појачава рано у процесу сенесценције и одржава на високом нивоу и током каснијих стадијума. Група 2 се у сличној мери експримира у зрелом зеленом листу и током ране сенесценције али ниво експресије расте око средине овог процеса. Овде спада и *SAG12*, цистеин протеиназа типично повезана са сенесценцијом, која уопште није присутна у млађим листовима. Гени групе 3 се у већој мери експримирају у зеленим листовима, док им током сенесценције експресија опада. Коначно, групи 4 припада мали број гена који се експримирају рано током сенесценције, а затим ниво њихове експресије опада са напредовањем сенесценције.

Нека од кључних питања везаних за сенесценцију листа тичу се начина иницијације сенесценције, природе сигнала који је иницира, начина препознавања развојне старости да би се уопште иницирао програм сенесценције, као и природе развојне старости. Сенесценција листа би требало да буде блиско повезана са претходним развојним ступњевима, као што су иницијација, растење и сазревање листа, па је могуће да гени који контролишу ове процесе, укључујући и меристемску активност, могу да утичу на сенесценцију зависну од старости (*Lim et al. 2007*).

Код биљака које расту у условима довољне снабдевености хранљивим материјама, у одсуству патогена и без абиотичких стресова, сенесценција листа се у крајњој линији иницира и одвија на начин који зависи од старости листа (*Gan & Amasino 1997, Quirino et al. 2000*). Хормонална модулација, реактивне кисеоничне врсте, метаболички флукс и разградња протеина су основни ћелијски и молекуларни процеси битни за регулацију сенесценције (*Schippers et al. 2007*).

1.2 Оксидативни стрес и сенесценција листова

Оксидативни стрес узрокује група екстремно реактивних молекула која укључује слободне радикале кисеоника (супероксид радикал, $O_2^{\bullet-}$; хидроксил радикал, OH^{\bullet} ; хидропероксил радикал, $HO_2^{\bullet-}$), синглетни кисеоник (1O_2) и водоник пероксид (H_2O_2), познатије под именом реактивне кисеоничне врсте (*reactive oxygen species, ROS*). ROS имају важну улогу током сенесценције листа са аспекта сигнализације и деградације макромолекула. Ови токсични интермедијери који настају услед непотпуне редукције кисеоника представљају екстремно реактивне молекуле и у стању су да оксидују биомолекуле попут ДНК, протеина и липида (Dat et al. 2000). Због своје реактивности, слободни радикали или апстрахују H^+ са другог молекула или му преносе електроне, стварајући на тај начин још више слободних радикала. ROS се разликују по својој реактивности, као и по покретљивости у ћелији. На пример, хидроксил радикал је екстремно реактиван, док је синглетни кисеоник мање реактиван (Halliwell & Gutteridge 1985). Од свих ROS, H_2O_2 је најмање реактиван али се он, пошто није наелектрисан, може кретати кроз мембране. Разлагање H_2O_2 може дати екстремно реактивни хидроксил радикал, $^{\bullet}OH$, што је заправо један од главних разлога токсичности водоник пероксида (Cadenas 1989).

За разлику од старења код животиња и хиперсензитивног одговора биљака, у којима су митохондрије основни генератори ROS (Finkel & Holbrook 2000, Lam et al. 2001), основни извори ROS у сенесцентним листовима су хлоропласти (Quirino et al. 2000). Током фотосинтезе, у њима настају супероксид радикали ($O_2^{\bullet-}$) и такође значајне количине синглетног кисеоника (1O_2). Други важан извор ROS, пре свега H_2O_2 , су пероксизоми, као и митохондрије у којима се аутооксидацијом редукованих компоненти респираторног ланца ствара супероксид радикал. ROS генерисане из различитих ћелијских извора учествују у сенесценцији листа, а оштећења изазвана њима представљају важну старосну промену која ће коначно

резултирати отпочињањем сенесценције (*Thompson et al.* 1987, *Leshem* 1988, *Scebba et al.* 2001).

Оксидативни стрес настаје због неравнотеже између генерисања и елиминације ROS, односно када се ова критична равнотежа наруши услед исцрпљивања антиоксиданаса или услед прекомерне акумулације ROS. ROS могу да узрокују липидну пероксидацију чиме се нарушава интегритет различитих мембрана, затим мутације, разградњу хлорофила, инактивацију ензима, тако да повећање количине интрацелуларних оксиданаса резултира оштећењем различитих ћелијских компоненти. Оксидативна оштећења биљних ткива су нарочито важна током сенесценције и карактерише их значајно повећање метаболизма ROS (*Thompson et al.* 1987, *Halliwell & Gutteridge* 1989). Губитак антиоксидативног капацитета са напредовањем сенесценције примећен је код различитих биљака (*McRae & Thompson* 1983, *Pauls & Thompson* 1984, *Pastori & del Rio* 1994, *Orendi et al.* 2001), а постоје докази да ROS иницирају сенесценцију листа (*Navabpour et al.* 2003, *Zimmermann et al.* 2006).

Од суштинског је значаја да сенесцентне ћелије остану вијабилне што је могуће дуже како би њихове ћелијске компоненте могле бити максимално искоришћене. Стога је вероватно да ће током сенесценције деловати механизми који *in situ* штите ћелије од оштећења изазваних унутрашњим или спољашњим факторима. Сенесценција листа је оксидативни процес, у коме разградња хлорофила и мембрана узрокује повећање производње слободних радикала. Нивои слободних радикала и редукованих кисеоничних врста као што је водоник пероксид расту током процеса сенесценције (*Merzlyak & Hendry* 1994). Биљка реагује на пораст нивоа ових токсичних једињења синтезом низа антиоксидативних ензима као што су супероксид дисмутаза, аскорбат пероксидаза и каталаза (*Foyer et al.* 1994a). Током напредовања сенесценције код различитих врста запажене су промене у обрасцу изоформи и активности антиоксидативних ензима, али су трендови ових промена за поједине ензиме често контрадикторни (*McRae & Thompson* 1983, *del Rio et al.*

1998, Scebba et al. 2001, Agüera et al. 2010). Ипак, уопштено се може рећи да антиоксидативни статус листа током сенесценције опада и да многи антиоксидативни ензими показују смањену активност (Navabpour et al. 2003).

Каталаза (CAT; EC 1.11.1.6) је лоцирана у пероксизомима, који се у сенесцентним листовима конвертују у глиоксизоми (Vicentini & Matile 1993). Функција каталазе, која делује наредо са аскорбат пероксидазом, јесте детоксикација водоник пероксида који се, између осталог, производи током фотореспирације у фотосинтезишћим ћелијама, а такође и током разградње макромолекула током сенесценције (Foyer et al. 1994b). Каталазе су присутне у свим фазама развића листа, а код *Nicotiana plumbaginifolia* идентификована су три гена за каталазу која показују диференцијалну експресију (Willekens et al. 1994). Код *Brassica napus* идентификован је ген за каталазу који показује висок ниво експресије у касним фазама сенесценције, а ензим кодиран овим геном највероватније функционише како би заштитио сенесцентну ћелију од оштећења онда када аскорбат пероксидазни систем лоциран у хлоропластима постане мање активан (Buchanan-Wollaston & Ainsworth 1997).

Пероксидазе (POD; EC 1.11.1.7) катализују оксидацију супстрата у присуству пероксида, при чему се он преводи у воду и молекуларни кисеоник, и на тај начин уклања из система. Присутне су у цитоплазми, вакуоли, пероксизомима и ћелијском зиду и имају бројне физиолошке улоге важне за растење и развиће биљака. Код дувана постоји барем 12 изоензима, од којих су најбоље проучене високо анјонске POD изоловане из листова, које се налазе у ћелијском зиду и учествују у лигнификацији (Mäder et al. 1980).

Супероксид дисмутазе (SOD; EC 1.15.1.1) катализују дисмутацију супероксид анјон радикала до молекуларног кисеоника и водоник пероксида, чиме се смањује ризик од формирања хидроксил радикала. Класификација SOD извршена је на основу металног кофактора у активном месту ензима, па разликујемо три основне групе SOD у биљкама. FeSOD је углавном лоцирана у хлоропластима, али је откривена и у митохондријама, пероксизомима и

цитосолној фракцији; *MnSOD* је углавном лоцирана у митохондријама и пероксизомима, а може се јавити и у солубилној цитосолној фракцији; *CuZnSOD* се у биљним ћелијама налазе у цитосолној фракцији, хлоропластима и другим ћелијским одељцима.

1.3 Метаболички флуks у сенесцентним листовима

Изразита одлика сенесценције листа је јасан метаболички прелаз са примарног анаболизма на катаболизам (*Smart 1994, Buchanan-Wollaston 1997*), при чему је број катаболичких гена са повишеном експресијом у сенесцентним листовима готово двоструко већи од броја анаболичких гена (*Guo et al. 2004*). Снабдевеност угљеником и азотом су две кључне компоненте које одражавају регулаторну улогу метаболичког флуksа у сенесценцији листа (*Masclaux et al. 2000, Schippers et al. 2007*). Ниво шећера расте током сенесценције код *Arabidopsis thaliana*, дувана и других биљних врста (*Noodén et al. 1997, Winkler et al. 1998*). Показано је да висока концентрација шећера може да снизи фотосинтетичку активност и индукује сенесценцију листа када ниво шећера порасте изнад прихватљиве границе (*Moore et al. 2003, Quirino et al. 2000*). У том смислу, стопа метаболизма шећера би могла бити механизам који регулише процес развојног старења, а централну улогу у контроли сенесценције би имала хексокиназа, сензор глукозе који модулира вишеструке сигналне путеве (*Moore et al. 2003*). Смањење ефикасности фотосинтезе би могло бити рани сигнал за индукцију сенесценције (*Hensel et al. 1993*).

Гашење фотосинтетичке активности је једна од најранијих промена у сенесценцији, а прате је губитак протеина, разградња хлорофила и липида. Финални продукти катаболизма хлорофила се депонују у вакуоли, без рециклирања азота садржаног у њима (*Hinder et al. 1996*). Стога циљ енергетски скупог процеса разградње хлорофила није ремобилизација хранљивих материја, већ детоксикација високо реактивних једињења након њиховог ослобађања из комплекса пигмената и протеина, што је од

суштинског значаја за одржавање вијабилности биљне ћелије током сенесценције.

Губитак структурног и функционалног интегритета ћелијских мембрана током сенесценције је резултат убрзаног метаболизма мембранских липида у коме учествују различити ензими, док гени који их кодирају показују експресију поспешену сенесценцијом (*Buchanan-Wollaston et al.* 2003).

Нуклеинске киселине, нарочито РНК, представљају значајан извор фосфора у зрелом листу. Експресија гена који кодирају различите нуклеазе је поспешена током сенесценције. Ниво укупне РНК рапидно опада са напредовањем сенесценције, док се једарна ДНК одржава како би генска експресија могла континуирано да се одвија све до касних фаза овог процеса.

1.3.1 Разградња протеина и ремобилизација азота

Сенесценција листа је период масивне мобилизације азота, угљеника и минерала из зрелих листова у друге делове биљке, и представља високо уређени скуп процеса који укључују престанак фотосинтезе, дезинтеграцију хлоропласта, разградњу протеина листа, губитак хлорофила и уклањање аминокиселина. Стога је финални ступањ у развићу листа критичан за фитнес биљака, јер се овим процесом постиже транслокација хранљивих материја из листова у друге биљне делове (*Buchanan-Wollaston 1997, Fischer 2007*).

Квантитативно, азот је најважнији минерални састојак биљака и често представља ограничавајући фактор раста (*Gastal & Lemaire 2002*). У већини биљних ткива, највећа фракција органског азота, који је потенцијално доступан за ремобилизацију током сенесценције, је садржана у протеинима. У фотосинтетички активним ткивима C_3 врста, преко 50% овог азота налази се у протеинима хлоропласта (*Feller & Fischer 1994*), због чега су напори да се разуме ремобилизација азота током сенесценције фокусирани на биохемију

деградације пластидијалних протеина. Експериментално је доказано да хлоропласти садрже велики број протеаза и да се разградња пластидијалних протеина одвија или је барем иницирана унутар интактних органела, али се не може занемарити ни улога високо активних протеаза које се акумулирају у литичким вакуолама (*Hörtensteiner & Feller 2002*).

1.3.1.1 Разградња протеина у сенесценцијним листовима

Класификација пептидаза

Разградња макромолекула и рециклирање хранљивих материја су значајни процеси током сенесценције, па је стога разградња протеина, селективна или масовна, веома важна за њену регулацију (*Schippers et al. 2007*). Протеини се разграђују на веће фрагменте, олигопептиде и аминокиселине деловањем протеолитичких ензима, који секу пептидне везе између суседних аминокиселина било унутар полипептидног ланца или на његовим крајевима. Један од система за класификацију протеаза заснива се на хемијском механизму катализе, и према њему разликујемо серин, цистеин, аспартат, метало-, треонин и глутамат протеазе, а онедавно се пептидазе такође класификују на основу молекулске структуре и хомологије (*Rawlings et al. 2010*).

Најбоље проучен протеолитички систем у биљкама је убиквитин-протеазомски пут, у коме је „пептидаза“ одговорна за сечење убиквитинских конјугата 26S протеазомски комплекс сачињен од 20S (треонин) протеазе и 19S регулаторне честице (*Smalle & Vierstra 2004*). Протеазоми су лоцирани у цитосолу и једру. „Комплексне“ протеазе се такође могу наћи у различитим органелама, укључујући хлоропласте. Међутим, ови протеолитички системи учествују у специфичној деградацији оштећених и регулаторних протеина, и мало је вероватно да учествују у масовној деградацији протеина током сенесценције листа. Ипак, идентификација *ORE9 Arabidopsis thaliana* као *F-box* протеина (*Woo et al. 2001*) показала је важност селективног уклањања

специфичних протеина, вероватно кључних регулаторних репресора сенесценције, убиквитин-посредованим протеолитичким путем у сенесценцији листа.

Компартиментализација ћелијских ензима

Пептидазе су присутне у свим ћелијским одељцима, укључујући и апопласт (Feller 2004). Протеазе способне за разградњу ензима рибулозо-1,5-бифосфат карбоксилазе оксигеназе (*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco*) и других стромалних ензима нађене су у хлоропластима грашка, указујући на учешће металопептидаза у разградњи стромалних протеина (Roulin & Feller 1998). Недавно је у хлоропластима виших биљака показано присуство већег броја пептидаза прокариотског порекла, укључујући *Clp* протеазу (серин пептидазу) у којој су, слично 26S протеазому, протеолитичка и регулаторна функција распоређене на различите субјединице у функционалном комплексу (Clarke *et al.* 2005), и друге пластидне серин пептидазе. *Clp* протеазе су суштински важне за функционисање хлоропласта, али још није доказано да учествују у ремобилизацији азота током сенесценције листа. С друге стране, постоје директни докази за функционално учешће ДНК-везујуће протеазе *CND41* у *in vivo* протеолизи *Rubisco* протеина (Kato *et al.* 2004).

Литичке вакуоле садрже велики број високо активних пептидаза, укључујући аспартат, цистеин и серин ендопептидазе и серин карбоксипептидазе (Feller 2004). Неки од ових ензима се акумулирају у њима у току процеса сенесценције. Осим у великим вакуолама, показано је да се одређене пептидазе такође акумулирају у мањим везикулама (Schmid *et al.* 2001). Постоје микроскопски докази који указују на то да вакуоле „гутају“ хлоропласте, при чему вакуоларни ензими разграђују њихове компоненте, укључујући и протеине (Minamikawa *et al.* 2001). Иако важност овог механизма током сенесценције листа није опште прихваћена (Hörtensteiner & Feller 2002), Chiba и сарадници (2003) су показали присуство *Rubisco* протеина

и његових фрагмената у малим сферичним телима ($0.4-1.2 \mu m$) природно сенесцентних листова јечма. Ова тела су пронађена и у цитоплазми и у вакуолама, што указује на још један механизам помоћу кога би вакуоларне пептидазе могле да допринесу разградњи пластидијалних протеина. Захваљујући напретку у молекуларној генетици, потврђено је присуство аутофагних процеса код биљака (*Thompson & Vierstra 2005*).

Важну улогу у разградњи макромолекула имају различите вакуоле које функционишу током сенесценције (*Matile 1997*). Масовни обрт протеина се углавном постиже процесом вакуоларне аутофагије која је важан аспект „синдрома сенесценције“. Код *Arabidopsis thaliana* и соје недавно је запажен и нови тип вакуола повезаних са сенесценцијом, које садрже бројне протеолитичке ензиме попут *SAG12*, цистеин протеазе типично повезане са сенесценцијом (*Otegui et al. 2005*). Главна група *SAG*-гена кодира цистеин протеазе (*Bhalerao et al. 2003, Guo et al. 2004*).

Регулација пептидаза током сенесценције листова

У складу са повећаном потребом за разградњом протеина, показана је повишена експресија пептидаза (укључујући аспартат, цистеин и серин ендопептидазе и карбоксипептидазе) на почетку или током каснијих фаза сенесценције, на шта указују повишени нивои транскрипата или повишена ензимска активност или обоје (*Feller & Fischer 1994, Buchanan-Wollaston 1997, Guo et al. 2004*). Осим директне регулације пептидаза на транскрипционом и/или пост-транскрипционом нивоу, постоје и додатни механизми који регулишу разградњу протеина у сенесцентним ткивима, кроз промену подложности супстратног протеина разградњи активним пептидазама помоћу оштећења супстрата, ковалентних модификација или других промена њихове тродимензионалне структуре (*Feller 2004*).

1.3.1.2 Метаболизам аминокиселина у сенесцентним листовима

Амиди аспарагин и глутамин су преовлађујуће транспортне форме органског азота код већине виших биљака, па је експресија ензима укључених у биосинтезу ових аминокиселина такође повишена у сенесцентним листовима. У том контексту, највише података је доступно за глутамин синтетазу (GS; Е.С. 6.3.1.2). Разликују се две класе GS изоензима, једна лоцирана у цитосолу (GS1) и друга у хлоропластима (GS2) (Hirel & Gadal 1980, Lam et al. 1996). GS2 је типично кодирана једним једарним геном, док GS1 субјединице кодира неколико гена. На нивоу ткива, GS2 се преваходно експримира у мезофилним (фотосинтетичким) ћелијама. Цитосолна GS1 се експримира у васкуларном ткиву (Kamachi et al. 1991), али је комбинацијом имуноцитохемијских и молекуларних техника показана специфична индукција GS1 гена у мезофилним ћелијама сенесцентних листова дувана (Brugière et al. 2000). Показано је да се GS2 деградира рано током сенесценције листа и да је нестабилна у изолованим хлоропластима (Kamachi et al. 1991), па расположиви резултати указују да су GS1 а не GS2 полипептиди укључени у реасимилацију азота пореклом из других аминокиселина и азотних једињења у сенесцентним листовима, а можда чак и у припрему овог азота за пребацивање у флоем.

Слично томе, различити изоензими нађени су и за глутамат синтетазу (GOGAT). Основна форма у зеленим листовима обично је фередоксин-зависна GOGAT, док NADH-зависна изоформа доминира у не-зеленим ткивима, мада је такође нађена и у листовима. Постоје индикације да NADH-GOGAT има важну улогу у ремобилизацији азота, али вероватније у младим листовима и зрнима који представљају примаоце или увир (енг. „sink“), него у сенесцентним листовима (Yamaya et al. 2002).

GS и GOGAT ензими укључени у синтезу глутамата катализују иреверзибилне реакције. Трећи ензим, глутамат дехидрогеназа (GDH, Е.С. 1.4.1.2), катализује реверзибилну реакцију аминације/деаминације, која може

довести било до синтезе или катаболизма глутамата. Код већине биљних врста нађено је седам изоформи овог ензима састављеног од α - и β -субјединице које се комбинују у ензимски активне хексамере (Loulakakis & Roubelakis-Angelakis 1996). Највећи број биљних *GDH* може да користи само *NAD(H)* као коензим и ова *GDH* форма је лоцирана у митохондријама, а у извесним околностима, као на пример током сенесценције листова, може такође бити локализована и у цитоплазми (Tercé-Laforgue et al. 2004). Два гена која кодирају β - и α -субјединице код *Arabidopsis thaliana* означена су као *GDH1* и *GDH2* (Melo-Oliveira et al. 1996). Гени који кодирају *GDH* изоловани су из различитих врста рода *Nicotiana*, при чему код *Nicotiana tabacum* највероватније постоје два гена за β -субјединицу (Masclaux-Daubresse et al. 2002, Purnell et al. 2005).

Након инкорпорације у глутамин и глутамат кроз *GS-GOGAT* циклус, азот се дистрибуира на друге аминокиселине деловањем аминокиселин-трансфераза (трансаминаза). Показано је повећање нивоа транскрипта аспартат аминокиселин-трансферазе (Yoshida et al. 2001), као и аспарагин синтетазе у сенесцентним ткивима. Значајно повећање нивоа транскрипта неколико гена за аминокиселин-трансферазе на почетку сенесценције указује на функционалну улогу одговарајућих протеина у интермедијерном метаболизму азота у сенесцентним листовима.

1.4 Хормонална модулација сенесценције

Различити фитохормони утичу на програм сенесценције, при чему су најобимније документоване улоге цитокинина и етилена у одлагању односно индукцији сенесценције листа (Schippers et al. 2007).

Цитокинини имају најјачи ефекат на одлагање сенесценције листа. Ниво цитокинина у сенесцентном лисном ткиву опада (Singh et al. 1992). Егзогена примена цитокинина може да одложи сенесценцију у одрезаним листовима тако што спречава разградњу хлорофила (Richmond & Lang 1957).

Повећање продукције ендогених цитокинина може да одложи сенесценцију листа (*Gan and Amasino 1995, Ori et al. 1999*), док редукција нивоа ендогених цитокинина може резултирати убрзаном сенесценцијом (*Masferrer et al. 2002*), а супротно очекивањима, чак и одлагањем њеног почетка (*Werner et al. 2003, Mýtinova et al. 2010*). Сматра се да је пад нивоа цитокинина пре почетка сенесценције кључни сигнал за њену иницијацију (*Noodén et al. 1990, Gan & Amasino 1995*). Трансгене биљке дувана које експримирају *IPT* ген за биосинтезу цитокинина са промотором који се индукује током сенесценције (*SAG12*) остају зелене и несенесцентне током дужег временског периода (*Gan and Amasino 1995*). При том су у њиховим листовима одложени сви аспекти сенесценције, укључујући разградњу хлорофила и протеина, као и губитак фотосинтетичког статуса, што указује да се процес сенесценције одлаже још на раном ступњу. Експресија *knotted1* гена кукуруза, који кодира транскрипциони фактор укључен у одржавање меристема, са истог промотора карактеристичног за сенесценцију резултира сличним фенотипом трансгених биљака и повишеним нивоом цитокинина у старијим листовима (*Ori et al. 1999*). У оба случаја, биосинтеза цитокинина је била иницирана након индукције *SAG12*, чиме је блокиран синдром сенесценције и значајно одложена сенесценција листа (*Gan and Amasino 1995, Ori et al. 1999*). *Balibrea Lara* и сарадници (2004) су идентификовали екстрацелуларну инвертазу чија се активност индукује током одлагања сенесценције посредованог цитокининима; када се активност ове инвертазе инхибира, цитокинини више не могу да инхибирају сенесценцију листова у трансгеним *SAG12-IPT* биљкама. Међутим, листови *SAG12-IPT* трансгених биљака ипак на крају подлежу сенесценцији, па се стога сматра да је деловање цитокинина ограничено на одређену развојну фазу листа.

Током сенесценције листова забележено је смањење транскрипције гена за биосинтезу цитокинина, као и гена за компоненте њиховог сигналног пута (*Buchanan-Wollaston et al. 2005*). Регулација сенесценције помоћу цитокинина повезана је са ауксинима, шећерима и светлом, обзиром да примена цитокинина утиче на експресију гена укључених у ове сигналне путеве.

Цитокинини индукују гене који кодирају рибозомалне протеине (*Crowell et al.* 1990) и гене повезане са фотосинтезом (*Mok & Mok* 2001). Уопштено се може рећи да цитокинини стимулишу фотосинтетичку фазу листа. Још увек није јасно на који начин цитокинини одржавају ову фазу и одлажу сенесценцију. Новија истраживања су показала да примењени у високим дозама цитокинини могу блокирати пролиферацију ћелија и индуковати програмирану ћелијску смрт убрзавајући сенесценцију код *Arabidopsis thaliana* и *Daucus carota* (*Carimi et al.* 2003, 2004).

Улога ауксина у сенесценцији листова још увек је нејасна, нарочито због њиховог учешћа у различитим аспектима развића биљака. Ниво ендогених ауксина, као и осетљивост ћелија према њему, често опада са старењем листова, мада се у сенесцентним листовима у неким случајевима могу детектовати повишени нивои IAA (*Noodén* 1988, *Quirino et al.* 1999, *Lim et al.* 2007). Ауксини се генерално сматрају ретардантима сенесценције, а њихова улога у регулацији сенесценције листова је вероватно повезана са другим фитохормонима и метаболичким флуксом (*Schippers et al.* 2007). Насупрот томе, абсцисинска киселина (ABA) је повезана са индукцијом сенесценције, највероватније преко промена метаболичког флукса (*Bleecker & Patterson* 1997). Ниво ABA, као и експресија гена укључених у њену синтезу, повећавају се током сенесценције (*Buchanan-Wollaston et al.* 2005).

1.5 Ћелијска смрт повезана са сенесценцијом као облик програмиране ћелијске смрти

Сенесценција листа укључује ћелијску смрт контролисану старошћу, под утицајем других ендогених и срединских фактора. Програмирана ћелијска смрт (*programmed cell death, PCD*) је аутодеструктивни ћелијски процес, кога активирају спољашњи или унутрашњи фактори, а који је посредован активним генетичким програмом. Ћелијска смрт током сенесценције листа је под контролом већег броја активних генетичких програма (Cao et al. 2003), па стога по типу припада PCD-у. Лист је орган састављен од различитих типова ћелија, а ћелијска смрт током његове сенесценције започиње од мезофилних ћелија и затим се наставља и у другим ћелијским типовима. Она се не одвија кохерентно, већ почиње локално, у групама рано умирућих ћелија, а затим се шири на читаву површину листа.

PCD код биљака игра важну улогу у различитим развојним процесима и одбрамбеним одговорима, а типични примери су формирање трахеарних елемената, дегенерација алеуронског слоја током клијања и хиперсензитивни одговор индукован патогеним организмима (van Doorn 2005). Организована деструкција ћелија у вишећелијским организмима свих еукариота је важна за формирање плана грађе тела и специфичног облика органа, као и за уклањање нежељених, оштећених или инфицираних ћелија (Lam 2004). Биљке користе овај процес као један од механизма потребних за нормално развиће и окончање животног циклуса. Програмирана ћелијска смрт се током развића користи за диференцирање специјализованих ћелијских типова, уклањање ткива која су изгубила функцију и морфогенезу органа (Fukuda 1997, Pennel & Lamb 1997, Gunawardena et al. 2004). Примарни сигнали који иницирају PCD у овим случајевима нису познати, али су вероватно унутрашњи и јављају се у одговору на временске и просторне сигнале настале током развића биљке. Насупрот овоме, и спољашња средина тј. абиотички и биотички спољашњи сигнали могу индуковати PCD, као у случају развића аеренхима иницираног

хипоксичним стресом или хиперсензитивног одговора који је инициран инвазијом патогена.

PCD током сенесценције листа се по неким обележјима разликује од свих других видова *PCD*-а (*van Doorn & Woltering 2004*). Пре свега, сенесценција листа подразумева ћелијску смрт на нивоу органа што значи да она коначно обухвата читав лист, док други облици *PCD*-а укључују прилично локализовану ћелијску смрт или се одвијају у одређеним ткивима и типовима ћелија. Осим тога, брзина ћелијске смрти током сенесценције листа је мања него у случају других типова програмиране смрти ћелија. Што се тиче биолошке функције, *PCD* током сенесценције углавном служи за ремобилизацију хранљивих материја из листа у друге биљне органе. Како је лист главни фотосинтетички орган, то је оптимално коришћење хранљивих материја акумулираних током фотосинтетичког периода критично за фитнес биљке. У том смислу, спора дегенерација ћелија током сенесценције листа делимично има функцију да обезбеди ефикасну ремобилизацију хранљивих материја које настају хидролизом макромолекула током сенесценције.

1.6 Структурне и биохемијске промене током ћелијске смрти повезане са сенесценцијом листа

У ћелијама листа током сенесценције запајају се карактеристичне структурне и биохемијске промене. Упадљива одлика структурних промена ћелија током сенесценције листа јесте редослед дезинтеграције ћелијских органела (*Noodén 1988*). Најраније структурне промене се дешавају у хлоропластима, тј. у структури грана и садржају и формирању липидних пластоглобула. Насупрот томе, нуклеус и митохондрије који су суштински важни за генску експресију односно производњу енергије, остају интактни све до касних ступњева сенесценције. То указује да ћелије листа морају да остану функционалне све до касних фаза процеса сенесценције, вероватно ради ефикасне мобилизације ћелијског материјала. У последњој фази сенесценције

листа, типични симптоми *PCD*-а, као што су контролисани колапс вакуоле, кондензација хроматина и фрагментација ДНК, детектовани су у природно сенесцентним листовима различитих биљака (*Yen & Yang 1998, Simeonova et al. 2000, Cao et al. 2003*). Коначно, јавља се видљива дезинтеграција плазма мембране и тонопласта. Губитак интегритета плазма мембране доводи до поремећаја ћелијске хомеостазе, чиме се окончава живот ћелије у сенесцентном листу.

Биохемијске промене у ћелијама сенесцентних листова праћене су редукованим анаболизмом (*Bate et al. 1990, Bleecker & Patterson 1997*). Укупни ћелијски садржај полизома и рибозома опада прилично рано, што одражава пад у синтези протеина (*Brady 1988*). Напоредо долази до редукције синтезе рибозомалних и транспортних РНК. Даље биохемијске промене у ћелији усмерене су ка спасавању хранљивих материја и укључују хидролизу макромолекула и потом ремобилизацију тако насталих продуката; ови процеси захтевају деловање комплексног низа метаболичких путева. Дегенерација хлоропласта је праћена деградацијом хлорофила и прогресивним губитком протеина хлоропласта, као што су *Rubisco* и *CAB (Chl a/b binding protein)*. Хидролиза протеина до слободних аминокиселина зависи од активности неколико ендо- и екзопептидаза (*Hörtensteiner & Feller 2002, Otegui et al. 2005*). Цистеин протеазе повезане са сенесценцијом, које се акумулирају у вакуоли, такође учествују у деградацији протеина. Ензими деградације липида учествују у хидролизи и метаболизму мембранских липида у сенесцентним листовима (*Thompson et al. 1998, 2000*), а већина насталих масних киселина се или оксидује, како би се обезбедила енергија за процес сенесценције, или конвертује у α -кетоглутарат путем глиоксилатног циклуса. Настали α -кетоглутарат се може конвертовати у шећере у процесу глуконеогенезе или искористити за мобилизацију аминокиселина ослобођених током деградације протеина листа (*Thompson et al. 1998, Hörtensteiner & Feller 2002*). Током сенесценције листова долази до великог пада у садржају нуклеинских киселина (*Taylor et al. 1993*). Ниво укупне РНК рапидно опада са напредовањем сенесценције, а нарочито је упечатљив

иницијални пад нивоа хлоропластних односно цитоплазматских рибозомалних РНК, за чиме следи опадање садржаја цитоплазматских информационих и транспортних РНК. Пад нивоа различитих РНК праћен је повишеном активношћу неколико рибонуклеаза.

1.7 Типови развојне ћелијске смрти

Према *Clarke* (1990), постоје три основна морфолошка типа програмиране ћелијске смрти (Табела 1-1). Вероватно постоји и већи број ендогених путева од ова три основна, као и њихове бројне варијације.

Табела 1-1. Кључне карактеристике три различита типа развојне (програмиране) ћелијске смрти. Из *Clarke* (1990).

1. Апоптоза	2. Аутофагна (лизозомална) ћелијска смрт	3. Нелизозомална везикуларна дегенерација
Кондензација нуклеуса, хроматина и цитоплазме	Формирање бројних аутофагних везикула	Лизозоми нису изражени, али може доћи до вакуолизације цитоплазме
Конволуција ћелијске мембране		

Аутофагија је основни деградацијски систем у еукариотским ћелијама, који представља механизам за деградацију или мобилизацију конституената ћелије пре њене смрти. Том приликом делови цитоплазме уносе се у лизозомалне вакуоле, где подлежу дигестији (Табела 1-2). У зависности од величине цитоплазматског дела који се одваја и стапа са површином вакуоле, разликујемо микроаутофагију и макроаутофагију. Микроаутофагија је захватање мањих делова цитоплазме са површине лизозомалне вакуоле и уношење у њу цитоплазматског садржаја који ће бити деградиран. Макроаутофагија подразумева формирање јединствене двојно-мембранске структуре, аутофагозома, који обухвата и „гута“ део цитоплазме са великим органелама. Аутофагозом се затим стапа са лизозомалном вакуолом. Трећи тип, мега-аутофагија, јесте аутофагија пермеабилитацијом лизозома или

тонопласта. Она резултира ослобађањем вакуоларних хидролаза које затим деградирају остатак ћелије. Мега-аутофагија не искључује претходна два типа аутофагије и може да уследи било након микро- или макроаутофагије. Пермеабилзација тонопласта и затим брзи нестанак ћелијског садржаја опажени су у случају *PCD*-а током развића киселемских елемената, формирања аеренхима, развоја флоема, уклањања ћелија коренске капе и током сенесценције листова у ћелијама које садрже хлоропласте. **Апоптозу** дефинишу три морфолошке карактеристике: фрагментација једра, формирање апоптотских тела и њихово „гутање“ и финална деградација у лизозому друге ћелије (Табела 1-2). Према *van Doorn & Woltering* (2005), обухватање („гутање“) апоптотских тела и деградација у другој ћелији до сада нису нађени током *PCD*-а ни једне биљне ћелије, тако да се, према овим ауторима, права апоптоза код биљака заправо ни не дешава. Претпоставља се да дебео ћелијски зид биљне ћелије спречава фагоцитозу. За апоптозу су такође карактеристични учешће каспаза, кондензација хроматина, инвагинације једрове мембране (*nuclear blebbing*), деградација ДНК као што показују *DNA laddering* (фрагментација ДНК у интернуклеозомалне фрагменте) и *TUNEL* метод (Табела 1-2). Међутим, каспазе могу такође бити регулатори аутофагне *PCD*, а могу бити и одсутне из система који су заиста апоптотски. Друге одлике апоптозе су такође примећене код аутофагне *PCD* и могу бити саставни део свих типова *PCD*-а. За описивање тих морфолошких одлика *PCD*-а код биљака често се користи термин “*apoptotic-like*” (слична апоптози). Трећи морфолошки тип метазојске *PCD* не укључује ни лизозоме умируће ћелије, нити лизозоме других ћелија, па се назива **нелизозомална *PCD***. Ове ћелије умиру тако што инхибирају неке главне биосинтетске путеве, дестабилизују своје мембране или на неки други начин.

Програмирана ћелијска смрт која се дешава током нормалне диференцијације и као резултат абиотичког стреса може се означити као **развијна *PCD***, насупрот одговору на патогене микроорганизме који представља засебну категорију *PCD* и означава се као **хиперсензитивни одговор** (*hypersensitive response, HR*). Већина примера развијне *PCD* одговара

дефиницији аутофагне *PCD*, када долази до постепеног нестајања цитоплазме и различитих органела.

Табела 1-2. Преглед три основна типа ћелијске смрти. Из *Clarke (1990)*.

		Нуклеус	Ћелијска мембрана	Цитоплазма	Хетерофагна елиминација
Тип 1	Апоптоза; нуклеарни тип ћелијске смрти	Кондензација нуклеуса, кондензација хроматина	Увијена, формира испусте ("blebs")	Губитак рибозома са ГЕР-а и полизома; редуција волумена цитоплазме која постаје електронски густа	Изразита и важна
Тип 2	Аутофагна ћелијска смрт	Пикноза у неким случајевима. Делови нуклеуса могу да се одвоје.	Ендоцитоза барем у неким случајевима; може се јавити "blebbing"	Бројне аутофагне вакуоле; ЕР и митохондрије понекад проширени; Голџи апарат често увећан	Повремена и касна
Тип 3А	Нелизозомална деградација	Касна вакуолизација, потом дезинтеграција	Цепање	Општа дезинтеграција; дилатација органела, формирање „празних“ простора који се фузионишу међусобно и са екстрацелуларним простором	Не постоји
Тип 3Б	Цитоплазматски тип ћелијске смрти	Касни пораст гранулираности хроматина	Заокруљивање ћелије	Дилатација ЕР-а, нуклеарног овоја, Голџи комплекса и понекад митохондрија; формирање „празних“ простора	Постоји

Једно од универзалних обележја *PCD*-а јесте ненасумична, интернуклеозомална фрагментација једарне ДНК (*DNA laddering*), која настаје као резултат активације специфичних ендонуклеаза (*Bortner et al. 1995*). Ово специфично сечење у интернуклеозомалним линкер регионима које резултира настајањем олигонуклеозомалних фрагмената ДНК сматра се једним од основних критеријума за разликовање некрозе од *PCD*-а (*Bortner et al. 1995*). *DNA laddering* је активан процес који захтева ензимску активност и указује да се фрагментација ДНК дешава док су ћелијске структуре попут вакуоле или лизосома још увек очуване (*Danon et al. 2000*). Интернуклеозомална фрагментација једарне ДНК, специфична за *PCD*, је један од најранијих симптома сенесценције листа (*Yen & Yang 1998, Lesniewska et al. 2000*) и претходи ултраструктурним променама као што су кондензација хроматина и деградација хлоропласта (*Inada et al. 1998, 1999; Simeonova et al.*

2000). Међутим, иако најлакши за детекцију, *DNA laddering* се ретко када може поуздано детектовати у сенесцентним листовима (*Lee & Chen 2002*).

Једноланчани прекиди („*nicks*“) у високомолекулској ДНК могу се детектовати ензиматским обележавањем слободних 3'-ОН крајева модификованим нуклеотидима помоћу погодних екзогенних ензима. *TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)* реакција *in situ* обележава слободне 3'-ОН једноланчане прекиде у ДНК и представља специфични критеријум *PCD-a* (*Danon et al. 2000*).

1.7.1 Апоптоза у анималним ћелијама

Апоптоза у анималним ћелијама се састоји од три фазе: (1) иницијације, (2) егзекуције и (3) „чишћења“ ћелијских остатака (нпр. аутофагом елиминацијом). Редослед цитолошких и биохемијских промена које карактеришу овај процес дат је у Табели 1-3, мада у њему постоје извесне варијације тако да неће све апоптотичне ћелије показати све ове симптоме.

Табела 1-3. Основне одлике апоптозе у анималним ћелијама. Из *Noodén (2004)*.

Цитолошке карактеристике	Биохемијске карактеристике
Скупљање цитоплазме, вакуолизација и фрагментација	Каскада активације каспаза
Кондензација и маргинализација хроматина	Ендолитичко сечење многих ћелијских протеина, нпр. ламина (структурних протеина једрове мембране) и <i>poly-ADPribose polymerase (PARP)</i> , ензима који учествује у репарацији ДНК
Нуклеарна кондензација и фрагментација	Сечење (<i>cleavage</i>) ДНК у дискретне нуклеозомалне фрагменте
Конволуција (<i>blebbing</i>) ћелијске мембране → везикуле (апоптотска тела) које могу садржати фрагменте једра	Излагање фосфатидил серина на спољашњој површини плазма мембране
Фагоцитоза ћелијских фрагмената	Везивање фагоцита

Апоптозу може иницирати велики број фактора, почевши од унутрашњег програма па до спољашњих фактора као што су хемикалије или

средински стрес (*Raff* 1992), чиме се активира сигнални пут који укључује флуks Ca^{2+} и фосфорилацију протеина. Интеракција лиганада са трансмембранским рецепторима регрутује извесне унутарћелијске протеине према одговарајућем домену рецептора и иницира каскаду каспаза. Каспазе су цистеин протеазе које специфично секу супстрат иза аспартата. Постоји неколико различитих типова каспаза и оне су присутне у цитосолу као неактивни проензими који се активирају „смртоносним“ сигналом. Иако ослобађање цитохрома *c* из митохондрија може започети каспазну каскаду, постоји и алтернативни пут који не укључује митохондрије (*Finkel* 2001). Антагонистичке интеракције између протеина су такође важне за регулацију апоптозе. На пример, *BCL-2* фамилија протеина већином инхибира апоптозу инхибицијом активације каспаза и спречавањем промене пермеабилности митохондријалне мембране. Међутим, један члан ове фамилије, *BAX*, заправо изазива апоптозу, што илуструје комплексност интеракција међу овим протеинима. Ендоцитичка разградња каспазних супстрата је директно одговорна за многе карактеристичне промене које се дешавају током апоптозе (*Cohen* 1997). Ипак, упркос истакнутој улози каспаза, постоје докази који указују да се апоптоза може одвијати и у одсуству специфичних каспаза (*Borner & Monney* 1999). Формирање једноланчаних прекида у ДНК и интернуклеозомална фрагментација сматрају се обележјима апоптотског процеса и представљају добре мада не и апсолутне маркере апоптозе.

1.7.2 Апоптозошки пут код биљака

Постоје бројни примери ћелијске смрти током нормалног развића биљака који показују неке од структурних промена карактеристичних за апоптозу (*O'Brien et al.* 1997, *Buckner et al.* 2000, *Danon et al.* 2000). Ове цитолошке и биохемијске промене укључују нуклеарну кондензацију, агрегацију хроматина на маргинама једра, скупљање ћелија, формирање апоптотских тела, миграцију фосфатидил серина на спољашњу површину плазма мембране (преференцијално везивање анексина), фрагментацију

једарне ДНК на олигонуклеозомалне фрагменте (*laddering*) и *TUNEL* реакцију. Вероватно највећа тежина је дата фрагментацији ДНК иако она није непроменљива компонента апоптозе, те стога није дефинитивна. Како су биљне ћелије ограничене ћелијским зидом, то код њих не може доћи до фрагментације ћелија и фагоцитозе. Стога би апоптотски пут код биљака требало дефинисати у смислу апоптотске молекуларне машинерије, односно протеина који учествују у извршењу ћелијске смрти.

У биљкама су откривени хомолози гена/протеина за које се сматра да имају важну улогу у анималној апоптози, као што су *Apoptosis Inducing Factor* (Lorenzo *et al.* 1999), *Bax Inhibitor 1* (Sanchez *et al.* 2000), *PIRIN*, који стабилизује кватернанрне комплексе апоптотских протеина (Orzáez *et al.* 2001) и *dad-1* (*defender against death*). У биљкама нису нађене класичне кичмењачке каспазе, али су у њима присутне протеазе чија је активност слична каспазама (*caspase-like protease, CLP*). То су тзв. метакаспазе, фамилија цистеин протеаза које садрже хомологе секвенце и домене који су структурно сродни метазојским каспазама. Њихова тачна улога у биљкама није позната, мада постоје докази о учешћу цистеин ендопротеаза у биљној *PCD* (Solomon *et al.* 1999, Lam & del Pozo 2000). Ослобађање цитохрома *c* и других фактора из митохондрија запажено је и код биљака (Orzáez *et al.* 2001, Yu *et al.* 2002), али још увек није показано да ли његова транслокација у цитосол заиста има улогу *PCD* сигнала као код животиња, или је само последица деструкције самих митохондрија.

Чланови *BCL-2/BAX* фамилије протеина спадају у кључне регулаторе апоптозе код животиња, тако што је инхибирају (*BCL-2*) или стимулишу (*BAX*). Иако структурни ортолози ових протеина до данас нису нађени код биљака, присуство *BAX* инхибитора, попут *AtBI-1* код *Arabidopsis thaliana*, у њима је јасно доказано. Контролни механизми *PCD* код биљака су и даље недовољно разјашњени, а метакаспазе и *BI-1* хомолози представљају добре кандидате за регулаторе ћелијске смрти код биљака (Watanabe & Lam 2004, Vercauteren *et al.* 2007).

Процес веома сличан, мада не идентичан, анималној апоптози постоји и код биљака, код којих се још увек мало зна о његовом механизму. Показано је да се низ структурних промена нуклеуса, које представљају обележје апоптозе, дешава у касним фазама сенесценције листова (*Yen & Yang 1998, Simeonova et al. 2000*), па се на основу тога може претпоставити да је апоптоза интегрална компонента сенесценције органа, нарочито важна у терминалној фази процеса (*Noodén et al. 1997, Delorme et al. 2000*).

1.8 Дуван (*Nicotiana tabacum* L.)

Дуван (*Nicotiana tabacum* L.) је једногодишња зељаста биљка која припада фамилији *Solanaceae* и најчешће је комерцијално гајена од свих врста рода *Nicotiana*. Пореклом из тропске и суптропске Америке, дуван је половином XVI века пренет у Европу, као и на друге континенте. Дуван је врло осетљив на температурне услове, па најбоље успева у топлијим подручјима умереног појаса, и то на растреситом, калцијумом богатом земљишту (Stjepanović-Veseličić 1974).

Стабло висине 80-200 *cm* је негранато или слабо гранато и покривено жлезданим длакама, које се јављају и на листовима, чашици и круници. Листови су крупни, наизменични, по ободу цели, на врху зашиљени. Листови у доњем делу стабла су издужено-елиптични, при основи сужени и спуштају се низ стабло; у горњем делу, они су издужено-ланцетасти, седећи или на кратким дршкама. Цветови, са звонастом чашицом дугом 1-2 *cm* и кратким шиљатим режњевима по ободу, формирају метличасту цваст. Круница је левкаста и ружичасто-црвене, ређе беличасте боје. Плод је издужена јајаста и шиљата чаура, а семе ситно, јајасто до бубрежасто и по повржини мрежасто наборано (Stjepanović-Veseličić 1974).

Постоји велики број сорти које се углавном разликују по особинама листа. Дуван садржи алкалоиде, међу којима је најзначајнији никотин.

Дуван је одабран као модел систем јер је код ове биљке сенесценција листа независна од развића цвета (Thomas & Stoddart 1980, Gan & Amasino 1995) и јер појединачна биљка обезбеђује велики сет листова у којима постоји градација сенесценције.

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог рада био је испитивање динамике структурних промена, као и метаболичких, биохемијских и молекуларних процеса током сенесценције листа као завршног стадијума у његовом развићу, на модел биљци *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*. Заједно са упоредном анализом аспеката програмиране ћелијске смрти током овог процеса, сазнања о временском обрасцу промена повезаних са сенесценцијом у листовима на различитим ступњевима развића би требало да допринесу утврђивању времена и начина иницијације, као и различитих аспеката регулације процеса сенесценције.

Реализација овог циља извршена је кроз неколико задатака:

- Идентификација биомаркера сенесценције листа.
- Цитохистолошка анализа мезофила ради утврђивања редоследа дегенеративних промена у структури ћелија листа на различитим ступњевима развића.
- Имунохистохемијска анализа мезофила током физиолошког старења листа и листа биљака третираних цитокининима, ради детекције програмиране ћелијске смрти повезане са сенесценцијом.
- Хемијска идентификација и квантификација ендогених регулатора растења у листовима карактеристичних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана.
- Биохемијска анализа промена у антиоксидативном систему листа одабраних морфогенетских стадијума.
- Анализа експресије гена укључених у метаболизам азота у листовима одговарајућих морфогенетских стадијума, у процесу кога карактерише прелаз од асимилације ка ремобилизацији хранљивих материја.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Биљни материјал

Током експерименталног рада, основни биљни материјал били су листови дувана *Nicotiana tabacum* L. cv. *Wisconsin 38*. Листови су изоловани са *in vitro* гајених биљака. Семена коришћена за успостављање култура добијена су љубазношћу *Botanical garden of Nijmegen*.

3.2 Стерилизација семена

Стерилизација семена, као и сви експерименти са биљним културама *in vitro* извршени су у ламинарној комори (Термовент, Београд) у којој је стерилни радни простор обезбеђен ламинарном филтрацијом ваздуха. Семена су површински стерилисана 20%-ним раствором варикине (са 0.8% активног хлора) током 10 минута. Након стерилизације, семена су пет пута испрана стерилном дејонизованом водом, а затим осушена у ламинару.

3.3 Услови гајења биљака

Биљке су гајене *in vitro* у климатизованој соби у условима беле флуоресцентне светлости јачине $47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, при светлосном режиму 16 h дан / 8 h ноћ и температури од 25 ± 2 °C.

3.4 Хранљиве подлоге

Састав основне хранљиве подлоге *Murashige & Skoog* (MS; 1962) дат је у Табели 2. Пре стерилизације хранљивих подлога у аутоклаву на температури од 114 °C, у трајању од 25 минута, pH вредност подлоге је подешавана на 5.8 помоћу 1N NaOH.

Табела 2. Састав основне хранљиве подлоге *Murashige & Skoog* (1962).

Макроелементи	mg/l	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20.6
KNO ₃	1900	18.8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	3.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	1.5
KH ₂ PO ₄	170	1.2
Микроелементи	mg/l	μM
KI	0.83	5.0
H ₃ BO ₃	6.2	100
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.1
EDTA-Fe	43.0	100
Витамини	mg/l	
Никотинска киселина	0.5	
Пиридоксин·HCl	0.5	
Тиамин·HCl	0.1	
Мио-инозитол	100	
Сахароза	3 %	
Агар	0.7 %	

Семена су исклијавана и биљке даље гајене на MS хранљивој подлози упола разблаженог минералног састава (1/2MS) и са 1% шећера, у просеку током осам недеља, односно док нису развиле 9-10 листова.

Ради испитивања утицаја цитокинина на програмирану ћелијску смрт, апекси биљака гајених на 1/2MS са 1% шећера током шест недеља су даље гајени на MS подлози са додатком 1 μM ; 3 μM ; 10 μM ; 30 μM ; и 100 μM бензиладенина (БА), током три недеље.

3.5 Хистоанатомска и цитолошка анализа

За хистолошка и ултраструктурна испитивања листова различитих морфогенетских стадијума, односно листова биљака третираних бензиладенином, коришћен је средишњи део листа близу проводног снопића.

3.5.1 Припрема биљног материјала за светлосну микроскопију (парафинска метода)

Узорци листова фиксирани су у 4%-ном раствору параформалдехида у 0.1 М натријум фосфатном пуферу (PBS, pH 7.4). Ради бољег продирања фиксатива, узорци су у фиксативу држани 1 сат у вакууму, а потом остављени у фиксативу преко ноћи на температури од 4°C. По завршеној фиксацији, након кратког испирања истим пуфером, материјал је поступно дехидриран спровођењем кроз серију алкохола растућих концентрација. Ради просветљавања ткива, материјал је поступно спровођен кроз мешавину 100%-ног алкохола и ксилола, са растућим уделом ксилола све до чистог ксилола. Након тога је ксилол поступно замењен парапластом, на температури од 59°C. Материјал је укалупљен у парапласту и сечен на ротационом микротому на пресеке дебљине 5 μm . Пресеци су, након депарафинизације и рехидратације, обојени хематоксилином, а затим инклузирани у канада балзам. Препарати су снимани на светлосном микроскопу *Leitz DMRB (Leica, Wetzlar, Germany)*.

3.5.2 Припрема биљног материјала за светлосну и електронску микроскопију (метода калуљења у смоле)

За фиксацију биљног материјала, коришћен је 3% раствор глутаралдехида у фосфатном пуферу (pH 7.3), током 2 дана на температури од 4 °C. У току фиксације, узорци у фиксативу су држани 1 сат у вакууму ради бољег продирања фиксатива. По завршеној фиксацији, узорци су испрани хладним фосфатним пуфером, након чега је уследила постфиксација 1%-ним раствором осмијумтетроксида у фосфатном пуферу. Постфиксација је трајала 24 h на температури од 4 °C. Након кратког испирања расхлађеном водом, извршено је контрастирање 0.5%-ним уранил ацетатом, а затим је након кратког испирања уследио процес поступне дехидратације материјала спровођењем кроз серију алкохола растућих концентрација. Узорци су затим поступно спровођени кроз мешавину смоле и апсолутног алкохола, са постепеним повећањем процента смоле у односу на алкохол. У следећем кораку, узорци су држани у смеси аралдита и харденера (*Araldit kit*, *Fluka* и *Serva*) 24 сата на 60 °C. Затим је материјал пренет у смешу аралдита, харденера и акцелератора где је на собној температури држан 24 сата. Узорци су калупљени у смеси аралдита, харденера и акцелератора на 60 °C.

Материјал за светлосну микроскопију је сечен на *LKB III* ултрамикротому на пресеке дебљине 1-1.5 μm . Пресеци су обојени 0.1%-ним раствором метилен-плавог, а посматрање и снимање препарата извршено је на светлосном микроскопу *Axio Vert* (*Carl Zeiss*).

Материјал за електронску микроскопију је сечен на *Leica Ultracut UCT* ултрамикротому и обојен уранил ацетатом и олово цитратом, а препарати посматрани на трансмисионом електронском микроскопу *MORGAGNI 268* (*FEI*) под напоном од 100 kV и снимани *MegaView III* камером.

3.6 PCD-специфична фрагментација једарне ДНК

3.6.1 Електрофоретска анализа фрагментације ДНК (DNA laddering)

Геномска ДНК је изолована из појединачних листова одговарајућих морфогенетских стадијума према методи Zhou и сарадника (1994). Узорци листова су механички уситњени до ситног праха у течном азоту, а затим пребачени у стерилне епендорф тубице запремине 1.5 ml и хомогенизовани у 600 μ l екстракционог пуфера (2% СТАВ; 20 mM NaEDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8; 1.4 M NaCl) са 0.5% β -меркаптоетанола. Након инкубације у воденом купатилу на 56 °C током 20 минута, епендорф тубице су охлађене на собној температури и у сваку је додато по 600 μ l смеше хлороформ:изоамил алкохол (24:1). Након центрифугирања на 20000 rpm на собној температури током 10 минута, супернатант је пребачен у нове епендорф тубице. Цео поступак је поновљен још једном, а затим је супернатант пребачен у нове епендорф тубице где је додато по 250 μ l 4M NaCl и све добро измешано. Потом је сваком узорку додато по 750 μ l хладног изопропанола и епендорф тубице остављене на +4 °C током 30 минута. Садржај је затим центрифугиран на 8000 rpm на собној температури 5 минута. Супернатант је одстрањен, а талог опран додавањем 1 ml хладног 70% етанола, благо промућкан и поново центрифугиран под истим условима. Супернатант је одливен, а талог осушен у ламинару. Затим је талог ресуспендован додавањем 200 μ l TE пуфера (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) на +4 °C током ноћи. Након растварања талоба додато је по 200 μ l смеше хлороформ:изоамил алкохол (24:1) у сваку епендорф тубицу и садржај је центрифугиран на 13000 rpm на собној температури током 10 минута. Затим је по 140 μ l супернатанта пребачено у нове епендорф тубице, додато је 75 μ l (10 mg/ml) рибонуклеазе, промућкано и инкубирано у воденом купатилу на 37 °C током 45 минута. Потом је у сваки узорак додато по 140 μ l смеше хлороформ:изоамил алкохол (24:1), поново центрифугирано на 13000 rpm на собној температури током 10 минута, а затим је по 100 μ l горње фазе пребачено у нове епендорф тубице.

Квантификација ДНК је извршена спектрофотометријски мерењем оптичке густине (OD_{260}) према протоколу *Sambrook* и сарадника (1989). За анализу фрагментације ДНК, по 5 μg сваког узорка је подвргнуто електрофорези на 1.5% (w/v) агарозном гелу који је садржавао 1xTBE пуфер (89 mM Tris база, 89 mM борат, 2 mM Na_2EDTA ; pH 8.0), у 1xTBE пуферу са 0.5 $\mu\text{g/ml}$ етидијум бромидом и при константном напону од 55 V. По завршетку електрофорезе, гелови су фотографисани на трансилуминатору (*UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA*).

3.6.2 In situ детекција фрагментације ДНК

PCD-специфична фрагментација једарне ДНК анализирана је у листовима одговарајућих морфогенетских стадијума, односно у листовима биљака третираних бензиладенином помоћу TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) реакције, која *in situ* обележава слободне 3'-OH једноланчане прекиде у високомолекулској ДНК. Принцип методе заснива се на специфичном везивању терминалне деоксинуклеотидил трансферазе (*TdT*) за 3'-OH крајеве ДНК, настале дејством активираних ендонуклеаза, на које она додаје модификоване *dUTP* нуклеотиде. Коришћени су *dUTP* нуклеотиди модификовани везивањем за флуоресцеин, чија инкорпорација омогућава визуализацију PCD-специфичних промена у ДНК на флуоресцентном микроскопу. За конверзију флуоресцентног сигнала коришћена су анти-флуоресцеин антитела конјугована са пероксидазом (*POD*); додавањем диаминобензидина (*DAB*) као ензимског супстрата, настаје обојени реакциони продукт који обележене ћелије чини видљивим под светлосним микроскопом.

Биљни материјал за TUNEL реакцију припремљен је на исти начин као за светлосну микроскопију, закључно са калупљењем у парапласту. Пресеци дебљине 5 μm сечени су на ротационом микротому и постављани на фабрички припремљене *SuperFrost®Plus* стаклене плочице. Након депарафинизације и рехидратације према стандардној процедури (ксилол; серија алкохола опадајућих концентрација 100%-30%), ткивни пресеци су

инкубирани са протеиназом К ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$ у 20 mM Tris-HCl пуферу ($\text{pH } 7.5$) који је садржавао и 2 mM CaCl_2), током 30 минута на $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

За *TUNEL* реакцију је коришћен *In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)*. *TUNEL* реакциона смеша се припрема на леду, а добија се мешањем раствора за обележавање (смеса нуклеотида у реакционом пуферу) и $10\times$ концентрованог раствора ензима (*TdT*). Након инкубације у радном раствору протеиназе К, пресеци се испирају у 0.1 M PBS пуферу ($\text{pH } 7.4$), а затим се на њих наноси припремљена *TUNEL* реакциона смеша и инкубира 1 сат на $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

У сваку експерименталну поставку укључене су две негативне и једна позитивна контрола. Негативна контрола је припремљена без *TdT* ензима у реакционој смеши, инкубацијом узорка само у раствору за обележавање. Позитивна контрола је припремљена инкубацијом узорка са 1000 U/ml ДНК-азе *I (Roche)* у 50 mM Tris-HCl пуферу ($\text{pH } 7.4$), који је садржавао 10 mM MgCl_2 и 1 mg/ml BSA (енг. *Bovine Serum Albumin*), током 30 минута на $37 \text{ }^\circ\text{C}$, пре третмана протеиназом К, како би се индуковали прекиди у ДНК пре процедуре обележавања.

По завршетку *TUNEL* реакције, плочице су испране у *PBS* пуферу и затим поклапане у смеши *PBS*:глицерол ($1:1$), ради посматрања под флуоресцентним микроскопом *Leica DMLB (Leica, Wetzlar, Germany)*, са ексцитационим филтером *BP 450-490* и емисионим филтером *BP 510-550* за флуоресцеин-обележене пресеке. Алтернативно, извршена је конверзија *TUNEL* сигнала помоћу анти-флуоресцеин антитела конјугованих са пероксидазом (*POD*). Након блокирања ендogene *POD* активности 3% -ним (v/v) раствором H_2O_2 , узорци су инкубирани са *POD* конвертером током 30 минута на $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Након испирања у *PBS* пуферу, узорци су даље инкубирани са *DAB* супстратом током 3-10 минута на собној температури, а затим испрани дестилованом водом и контрастирани хематоксилином. Након дехидратације и инклузије у канада балзам, пресеци су анализирани под светлосним микроскопом *Leitz DMRB (Leica, Wetzlar, Germany)*.

За бојење нуклеуса коришћена је флуоресцентна боја пропидијум јодид у финалној концентрацији $50 \mu\text{g/ml}$ у 0.01 M PBS пуферу ($\text{pH } 7.4$) који је садржавао $50 \mu\text{g/ml}$ рибонуклеазе А, 0.1% Triton X-100TM и 0.1 mM EDTA . Пресеци су инкубирани у радном раствору пропидијум јодида током 30-60 минута на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ у мраку. Након испирања у PBS пуферу и фиксације боје 1% -ним (w/v) раствором фенилен диамина у PBS пуферу, пресеци су поклапани у смеси PBS : глицерол (1:1) и посматрани под флуоресцентним микроскопом *Leica DMLB (Leica, Wetzlar, Germany)*, са конфигурацијом филтера: ексцитација - 543 nm , емисија - 570 nm .

3.7 Квантитативни *RT-PCR* (*qRT-PCR*)

3.7.1 Изолација РНК

Укупна РНК из листова одабраних морфогенетских стадијума (C2-C6) изолована је коришћењем *Trizol* реагенса (*Invitrogen*). Вода, сви раствори као и сви коришћени стаклени судови претходно су третирани диетилпирокарбонатом (енг. *DEPC*), снажним инхибитором рибонуклеаза. Узорци листова самлевени су у течном азоту, а затим хомогенизовани у расхлађеном *Trizol* реагенсу (1 ml реагенса на 500 mg биљног ткива) и инкубирани 5 минута на собној температури да би се обезбедила комплетна дисоцијација нуклеопротеинских комплекса. Потом је сваком узорку додато 0.2 ml смеше хлороформ:изоамил алкохол (24:1), промућкано и инкубирано 3 минута на собној температури. Фазе су раздвојене центрифугирањем на $12000\times g$ током 10 минута на $+4 \text{ }^\circ\text{C}$, након чега је горња безбојна фаза пребачена у нове епендорф тубице. Супернатанту је додато по $250 \mu\text{l}$ изопропанола и $250 \mu\text{l}$ раствора за преципитацију РНК (1.2 M NaCl и 0.8 M динатријум цитрат), кратко промућкано на вортексу и инкубирано 10 минута на собној температури. Након преципитације, садржај је центрифугиран на $12000\times g$ на $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ током 10 минута. Супернатант је одстрањен, а талог испран додавањем 1 ml хладног 75% етанола и затим центрифугиран на $7500\times g$ на $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ током 10 минута.

Талог РНК је осушен на ваздуху у ламинару, а затим ресуспендован у 50 μl DEPC-воде и даље чуван на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Квалитет изоловане РНК верификован је електрофорезом на 2% агарозном гелу у 1×TBE пуферу са 0.5 $\mu\text{g/ml}$ етидијум бромада и при константном напону од 120 V, као и спектрофотометријски, одређивањем односа A_{260}/A_{280} узорака, који за чисту РНК износи 1.9-2.1. Квантификација изоловане РНК извршена је мерењем апсорбанце узорака на таласној дужини 260 nm на спектрофотометру (Agilent 8453), а концентрација РНК у узорцима израчунавана је према формули:

$$[\text{укупна РНК}] = 40\ \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{разблажење}$$

3.7.2 Реверзна транскрипција – синтета првог ланца

У реакцији реверзне транскрипције (енг. “reverse transcription”, RT), по 2 μg укупне РНК је најпре третирано ДНК-азом. Овај третман вршен је у реакционој смеши укупне запремине 20 μl (Табела 3).

Табела 3. Састав реакционе смеше за третман ДНК-азом.

Компоненте реакционе смеше за третман узорака ДНК-азом	μl
РНК (2 μg) у DEPC-води	15.5
DEPC-вода	
10× реакциони пуфер за ДНК-азу I (Fermentas)	2
ДНК-аза I (Fermentas)	2
Инхибитор РНК-азе (Fermentas, 40 U/ μl)	0.5
	20

Третман РНК узорака ДНК-азом одвијао се на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ током 30 минута, а затим је ДНК-аза инхибирана додавањем 2 μl 2.5 mM EDTA и инкубацијом узорака на $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ током 10 минута.

Реакција реверзне транскрипције одвијала се у реакционој смеши укупне запремине 40 μl , чије су компоненте приказане у Табели 4. Све RT реакције урађене су помоћу *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit*-а (*Fermentas*), коришћењем PCR уређаја (*Techne Genius Thermocycler, Cambridge, UK*). Услови RT реакције били су исти за све гене: инкубација на 42 °C током 60 минута, након чега је реакција окончана загревањем узорака 5 минута на 70 °C.

Табела 4. Састав реакционе смеше RT реакције.

Компоненте реакционе смеше RT реакције	μl
РНК (2 μg) након третмана ДНК-азом	22
Олиго (dT) ₁₈ прајмер	2
5× реакциони пуфер	8
<i>RiboLockTM</i> инхибитор РНК-азе (20 U/ μl)	2
10 mM dNTP микс	4
<i>RevertAidTM M-MuLV</i> реверзна транскриптаза (200 U/ μl)	2
	40

3.7.3 qRT-PCR

Добијена једноланчана ДНК (*cDNA*) је затим коришћена у квантитативној *real-time PCR* (*qRT-PCR*) реакцији, која је постављена на оптичкој плочи са 96 бунарића. Свака појединачна *qRT-PCR* реакција одвијала се у смеши запремине 25 μl , чији је састав приказан у Табели 5.

Табела 5. Састав реакционе смеше појединачне *qRT-PCR* реакције.

Компоненте реакционе смеше <i>qRT-PCR</i> реакције	μl
<i>SYBR Green I Master Mix</i>	12.5
15 μM <i>Forward (F)</i> прајмер	0.5
15 μM <i>Reverse (R)</i> прајмер	0.5
H_2O	9.5
50 ng/ μl <i>cDNA</i>	2
	25

SYBR Green I Master Mix (Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X), Fermentas, Lithuania) је, од стране произвођача, већ припремљена смеша Taq ДНК полимеразе, dNTP-а, флуоресцентне интеркалирајуће боје SYBR Green I и пасивне референтне боје ROX у одговарајућем qPCR пуферу.

Прајмери за qRT-PCR (Applied Biosystems UK) су приказани у Табели 6. Они су дизајнирани помоћу рачунарског програма Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и пре употребе додатно проверени помоћу NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

Табела 6. Прајмери коришћени у qRT-PCR реакцијама.

Ген	GenBank™	Прајмер	Ампликон
Цитосолна глутамин синтетаза, GS1 (EC 6.3.1.2)			
NtGln1-3	X95933	Forward (F): 5'-TGGTTGCTCAATTTGGGAT-3'	156 bp
		Reverse (R): 5'-AGGCGAATGAAATCAGCATT-3'	
NtGln1-5	X95932	Forward (F): 5'-GGATCCATTCGTCGTGACTT-3'	152 bp
		Reverse (R): 5'-TGTGAGGAAAGGGTTGTTCC-3'	
Пластидна глутамин синтетаза, GS2 (EC 6.3.1.2)			
NsGS2	X66940	Forward (F): 5'-ACGCCATAAAGCTGCTCAGA-3'	107 bp
		Reverse (R): 5'-GCCACTTCACATTTTGTGG-3'	
Глутамат дехидрогеназа, GDH (EC 1.4.1.2)			
NtGDH1	AY366369	Forward (F): 5'-CAATGGGCTTGATATACCCG-3'	151 bp
		Reverse (R): 5'-GTTCAAAACTCCTCCCAAAGC-3'	
NtGDH2	AY366370	Forward (F): 5'-TGGGCTGCACAАСТCATTAC-3'	148 bp
		Reverse (R): 5'-CGCCATGGAAACSTTTAACT-3'	
Нитрат редуктаза, NIA (EC 1.6.1.1)			
NtNIA	X06134	Forward (F): 5'-CCTCTGACTCTCCTGGCAAC-3'	139 bp
		Reverse (R): 5'-TTGTGATGAGTTTGCATGG-3'	
Цистеин протеаза, CP1			
NtCP1	AY881011	Forward (F): 5'-GACGTTCTTATCCCACTGC-3'	110 bp
		Reverse (R): 5'-GTCTGCCTCAAACCCACAAC-3'	

Цистеин протеаза, CP23			
NtCP23	AB032168	Forward (F): 5'- CAAAGGGCAATCTCAAAGTCA-3'	131 bp
		Reverse (R): 5'- TGCACCAGTAGTGCTGAATGT-3'	
Метакаспаза (тип II)			
NtMC	EU869285	Forward (F): 5'- GGTCTTCCAGACAGTGGCAT-3'	146 bp
		Reverse (R): 5'-TTGGTGATTGGACCATCTGA- 3'	
α-субјединица протеазома			
NtPSA1	Y16644	Forward (F): 5'- GCCATCAGTGAGCGTGA-3'	157 bp
		Reverse (R): 5'-GGATGATCCCGAGAAATGTT- 3'	
Актин			
NtAct	AB158612	Forward (F): 5'-AAGATCAAGGTGGTGGCG-3'	138 bp
		Reverse (R): 5'-GTGGACAATGGAAGGACCAG- 3'	

Специфичност коришћених прајмера потврђена је гел електрофорезом *RT-PCR* продуката и анализом криве топљења после *qRT-PCR* реакције.

Све *qRT-PCR* реакције урађене су у три биолошка репликата у термоциклеру *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Co., Foster City, USA)*, према следећем програму: иницијална денатурација на 95 °C, 10 минута; 40 циклуса (денатурација на 95 °C, 15 s; везивање прајмера на 60 °C, 30 s; екстензија на 72 °C, 30 s); финална екстензија на 72 °C, 10 минута. Релативна експресија гена израчуната је на основу ефикасности њихове амплификације према методи *Liu & Saint (2002)*, користећи ген за актин као референтни (тзв. „housekeeping“) ген.

3.8 Екстракција протеина и анализа ензимске активности

Узорци листова су механички уситњени до ситног праха у течном азоту, а затим хомогенизовани у екстракционом пуферу (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 30% глицерол, 1.5% PVPP; pH 8) коме су непосредно пре

хомогенизације додати 10 mM DTT и 1 mM PMSF (инхибитор протеиназа). Након хомогенизације, узорци су центрифугирани 10 минута на 12000×g (Sorvall Heareus Biofuge Stratos Centrifuge), на температури од +4 °C. Горња фаза је профилирана кроз газу и затим још једном центрифугирана 10 минута на 12000×g на +4 °C. Концентрација укупних протеина у супернатанту (тзв. „*crude extract*“ који садржи растворљиве ћелијске протеине) одређена је спектрофотометријски (Bradford 1976), уз коришћење BSA као протеинског стандарда.

3.8.1 Нативна електрофореза (Native PAGE)

Детерминација изоформи ензима вршена је након раздвајања растворљивих ћелијских протеина нативном електрофорезом на полиакриламидном гелу (енг. *Native PAGE*). За нативну електрофорезу је коришћен 5% гел за концентровање (енг. *stacking gel*) и 7% или 10% гел за раздвајање (енг. *separating gel*). Раздвајање протеина је вршено на температури од +4 °C у систему за вертикалну електрофорезу (SE 600 Ruby, Amersham Biosciences, USA), у пуферу који је садржао 25 mM Tris и 192 mM глицин (pH 8.3).

3.8.2 Одређивање активности ензима

Активност ензима је одређивана ензимским есејем на гелу и спектрофотометријски. За детекцију каталазне (CAT) активности на гелу коришћена је метода Woodbury и сарадника (1971), модификована према Prasad (1997). Гелови су након завршене електрофорезе преинкубирани у 0.01% (v/v) раствору H₂O₂, а затим третирају мешом 2% раствора калијум ферицијанида (K₃Fe(CN)₆) и 2% раствора ферихлорида (FeCl₃). За детекцију пероксидазне (POD) активности према методи Kukavica & Veljović-Jovanović (2004), гелови су инкубирани у 50 mM калијум фосфатном пуферу (pH 6.5) који је садржао 10% (w/v) метанолски раствор 4-хлоро- α -нафтола и 0.03%

(v/v) раствор H_2O_2 . Метода по *Beauchamp & Fridovich* (1971) је коришћена за испитивање активности супероксид дисмутаза (SOD). Гелови су инкубирани на собној температури 30 минута у мраку, у смеси која је садржала 100 mM EDTA, 0.098 mM NBT (*Nitrotetrazolium blue chloride, Sigma-Aldrich, USA*), 0.03 mM рибофлавин и 2 mM TEMED (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma-Aldrich, USA*) у калијум фосфатном пуферу (pH 7.8). Различите изоформе супероксид дисмутаза су идентификоване тако што су гелови пре бојења инкубирани у раствору инхибитора: 1 mM KCN у калијум фосфатном пуферу (инхибитор CuZn-SOD) и 5 mM H_2O_2 у калијум фосфатном пуферу (инхибитор CuZn-SOD и Fe-SOD), а као контрола коришћен је калијум фосфатни пуфер у коме су активне све изоформе.

Детекција глутамин синтетазне (GS) активности вршена је према протоколу који су дали Симоновић и сарадници (2004). Гелови су након завршене електрофорезе инкубирани у 100 mM Tris-HCl пуферу (pH 7.7) који је садржавао 50 mM калијум хлорид, 20 mM магнезијум хлорид, 2 mM EDTA, 20 mM натријум глутамат, 10 mM ATP и 20 mM амонијум хлорид на 35 °C, а затим у реагенсу за преципитацију фосфата који је садржавао 1% (w/v) амонијум хептамолибдат, 100 mM триетиламин и 1 M азотну киселину.

Гелови су фотографисани на трансилуминатору (*UltraLum Inc, Gel Explorer-u, Exton, PA*), а за њихову анализу коришћен је графички пакет TL120 v2008 (*Nonlinear Dynamics Ltd, UK*).

Спектрофотометријска квантификација активности каталазе вршена је праћењем кинетике нестајања водоник пероксида ($A_{240} \epsilon=0.0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), према методи *Aebi* (1984). Коришћени су 50 mM K-Na фосфатни пуфер (pH 7.0) и 30% H_2O_2 . Активност каталазе је мерена 3 минута, на температури од 20 °C, на сваких 20 s и израчунавана је према формули:

$$A_{CAT} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) * V_k * 1000}{0,0436 * V_e}$$

ΔA – промена апсорбанце у min , ΔA_0 – промена апсорбанце бланк раствора у min , V_k – запремина реакционе смеше у кивети (ml), V_e – запремина узорка у кивети (ml).

Активност ензима изражена је у односу на концентрацију укупних протеина (U/mg), где се јединица U дефинише као количина ензима која разгради $1 \mu mol H_2O_2$ за $1 min$.

Спектрофотометријска анализа активности укупних пероксидаза извршена је мерењем промене апсорбанце узорка на $430 nm$, уз коришћење пирогалола ($A_{430} \epsilon = 2.47 mM^{-1} cm^{-1}$) као електрон-донора, према протоколу који су дали *Jiménez-Atiénzar* и сарадници (2007), са одређеним изменама. Реакциона смеша је, осим узорка, садржавала $0.5 mM$ раствор H_2O_2 и $10 mM$ пирогалол у $50 mM$ калијум фосфатном пуферу ($pH 6.5$). Активност ензима је праћена током 3 минута, при температури од $20 ^\circ C$ и израчунавана према једначини:

$$A_{POD} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) * V_k * 1000}{2,47 * V_e}$$

ΔA – промена апсорбанце у min , ΔA_0 – промена апсорбанце бланк раствора у min , V_k – запремина реакционе смеше у кивети (ml), V_e – запремина узорка у кивети (ml).

Активност ензима је изражена у односу на концентрацију укупних протеина (U/mg).

3.9 Анализа ендогених биљних хормона

Ендогени биљни хормони (citoкинини, ауксини и абсцисинска киселина) екстраховани су из листова карактеристичних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана према методи *Dobrev & Kamínek* (2002). Узорци (око $1 g$ свеже масе биљног материјала) су самлевени у течном азоту и пребачени у смешу метанола, мравље киселине и воде ($15:1:4, v:v:v$), а пречишћавање је вршено из чврсте фазе.

Концентрације молекулских врста цитокининских нуклеотида одређене су прерачунавањем из концентрација одговарајућих рибозида након њихове дефосфорилације алкалном фосфатазом. За детекцију и квантификацију коришћена је *HPLC/MS* (високо ефикасна течна хроматографија/масена спектроскопија). Као интерни стандарди за конструкцију калибрационе криве коришћени су одговарајући [²H] обележени цитокинини. Граница детекције различитих молекулских врста цитокинина кретала се између 0.5-1.0 *pmol* по узорку.

Концентрације индол-3-сирћетне и абсцисинске киселине одређене су применом дводимензионалне течне хроматографије под високим притиском (*2D-HPLC*) по методи *Dobrev* и сарадници (2005). За квантификацију је коришћен флуоресцентни детектор *LC 240 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)*.

Одређивање количине ендогених биљних хормона у сваком биолошком узорку поновљено је два пута.

3.10 Одређивање садржаја хлорофила

Садржај хлорофила у ткиву листова карактеристичних морфогенетских стадијума је одређен спектрофотометријски, на основу апсорпције светлости одређене таласне дужине раствора који је добијен након екстракције 80%-ним ацетоном. За анализу су коришћени цели листови, који су самлевени у течном азоту и екстраховани са 2 *ml* 80% ацетона (*v/v*), уз додаток кварцног песка и калцијум карбоната. Хомогенат, комбинован са три додатна испирања авана и кварцног песка истим растварачем (по 2 *ml*), је центрифугиран на 2000×*g* током 10 минута. Одливени супернатанти су спојени и подешени до финалног волумена од 10 *ml*. Након тога, мерена је апсорбација сваког узорка на таласним дужинама 750, 663.6 и 646.6 *nm* на спектрофотометру *Shimadzu UV 160*.

Садржај хлорофила израчунат је помоћу екстинкционих коефицијената и једначина које су дали *Porra* и сарадници (1989):

$$C_a = (12.25 \times A_{663.6} - 2.55 \times A_{646.6}) \times V/m$$

$$C_b = (20.31 \times A_{646.6} - 4.91 \times A_{663.6}) \times V/m$$

$$C_{a+b} = (17.76 \times A_{646.6} + 7.34 \times A_{663.6}) \times V/m$$

где су C_a и C_b концентрације хлорофила a и b , а C_{a+b} количина укупног хлорофила (у $\mu g/g$ свеже масе биљног материјала); $A_{663.6}$ и $A_{646.6}$ апсорбанције раствора хлорофила на 663,6 и 646,6 nm умањене за вредност апсорбанције истог раствора на 750 nm ; V запремина раствора (cm^3); m свежа маса узорка (g).

За сваки морфогенетски стадијум (C2-C6), анализирано је по 6 репликата појединачних узорака.

3.11 Статистичка обрада података

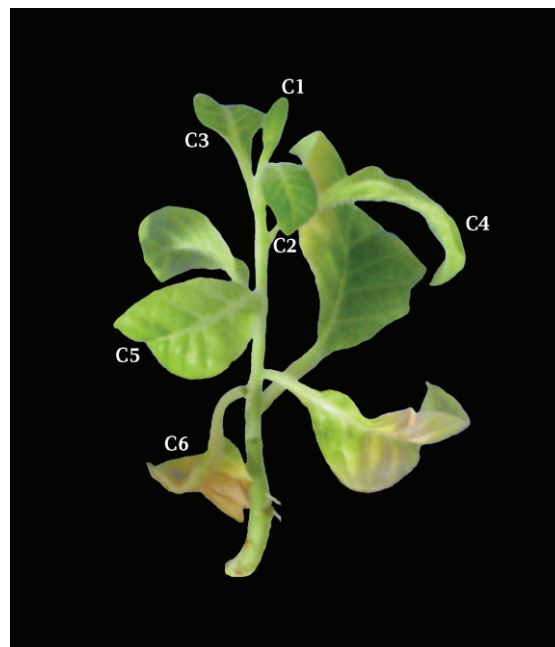
За статистичку анализу коришћен је софтвер *STATGRAPHICS Centurion XV.I*, верзија 15.01.0002 (*StatPoint, Inc.* 1982-2006, USA). Подаци су подвргнути једнофакторској анализи варијансе (*ANOVA*), а поређења између средњих вредности су извршена помоћу *Fisher's LSD (least significant difference)* теста, са нивоом значајности од $p \leq 0.05$. Финална графичка обрада података урађена је помоћу програма *Microsoft Office Excel*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Морфолошка карактеризација

Биљке дувана гајене *in vitro* током ~8 недеља достигле су просечну висину од 7.2 ± 2.0 cm и развиле у просеку 9-10 листова. У датим условима, први видљиви симптоми сенесценције (жућење и губитак тургора) у доњем листу јављају се након 6-7 недеља гајења, да би након 8-9 недеља ове промене дошле до пуног изражаја у најстаријем листу, при чему су се симптоми сенесценције сада могли уочити и у млађим листовима.

Код дувана, као и код многих других виших биљака, најмлађи листови су позиционирани на врху биљке, а најстарији при основи стабла. Користећи предност оваквог распореда, сенесценција листова је анализирана у материјалу прикупљеном са различитих нивоа осе стабла (Слика 1). Развиће листа је арбитрарно подељено на следеће ступњеве: млађи јувенилни (први лист с врха; ступањ C1), старији јувенилни лист (ступањ C2), млађи (C3) и старији (C4) зрели зелени лист, млађи (C5) и старији (C6) сенесцентни лист.



Слика 1. Морфологија биљке дувана (*Nicotiana tabacum*) гајене *in vitro* током осам недеља. Секвенцијална сенесценција листова одвија се од базе према врху биљке.

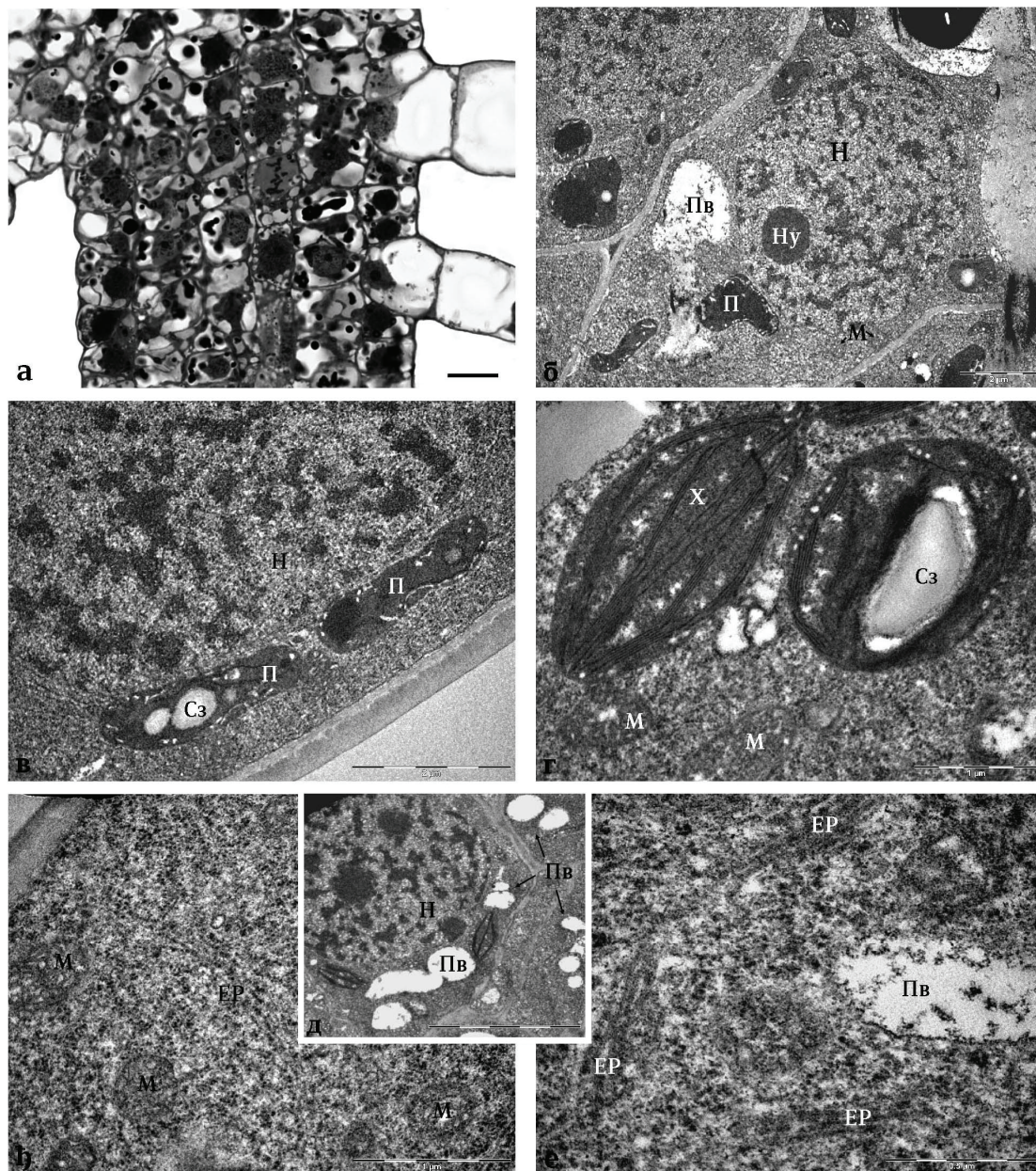
4.2 Хистоанатомска и ултраструктурна анализа мезофила листа

Хистолошком анализом праћене су анатомске промене у листовима на различитим ступњевима развића *in vitro* гајених биљака дувана. Електронском микроскопијом анализирана је ултраструктура мезофила одабраних карактеристичних стадијума у развићу листа са циљем да се детектују ране цитолошке промене које претходе умирању ћелија и утврди редослед деградационих процеса у њима.

4.2.1 Млађи јувенилни листи (С1)

На попречном пресеку кроз млађи јувенилни лист уочава се шест до седам слојева густо збијених меристемских ћелија. Са изузетком ћелија жлезданих длака у области будућег епидермиса, остале ћелије су изодијаметричне, са крупним, централно постављеним једром које заузима скоро читаву ћелију (Слика 2а, б). Осим у ћелијама које оивичавају проводне снопиће, централна вакуола углавном није диференцирана, а уместо ње се запажа већи број ситних вакуола (Слика 2а, д).

У густој, електрон непробојној цитоплазми уочава се еухроматинско једро са једним до два једарцета, оивичено једровом опном (Слика 2б, в, д), затим мноштво ситних пропластида са малим бројем спљоштених ламела и ситним скробним зрнима (Слика 2б, в), као и хлоропласти (Слика 2г), митохондрије (Слика 2г, ђ), цистерне ендоплазматичног ретикулума и полирибозоми (Слика 2ђ, е). У бројним ситним вакуолама оивиченим тонопластом, које ће се у току даљег развића фузионисати у крупну централну вакуолу, местимично се запажа електрон непробојни материјал (Слика 2б, д, е).



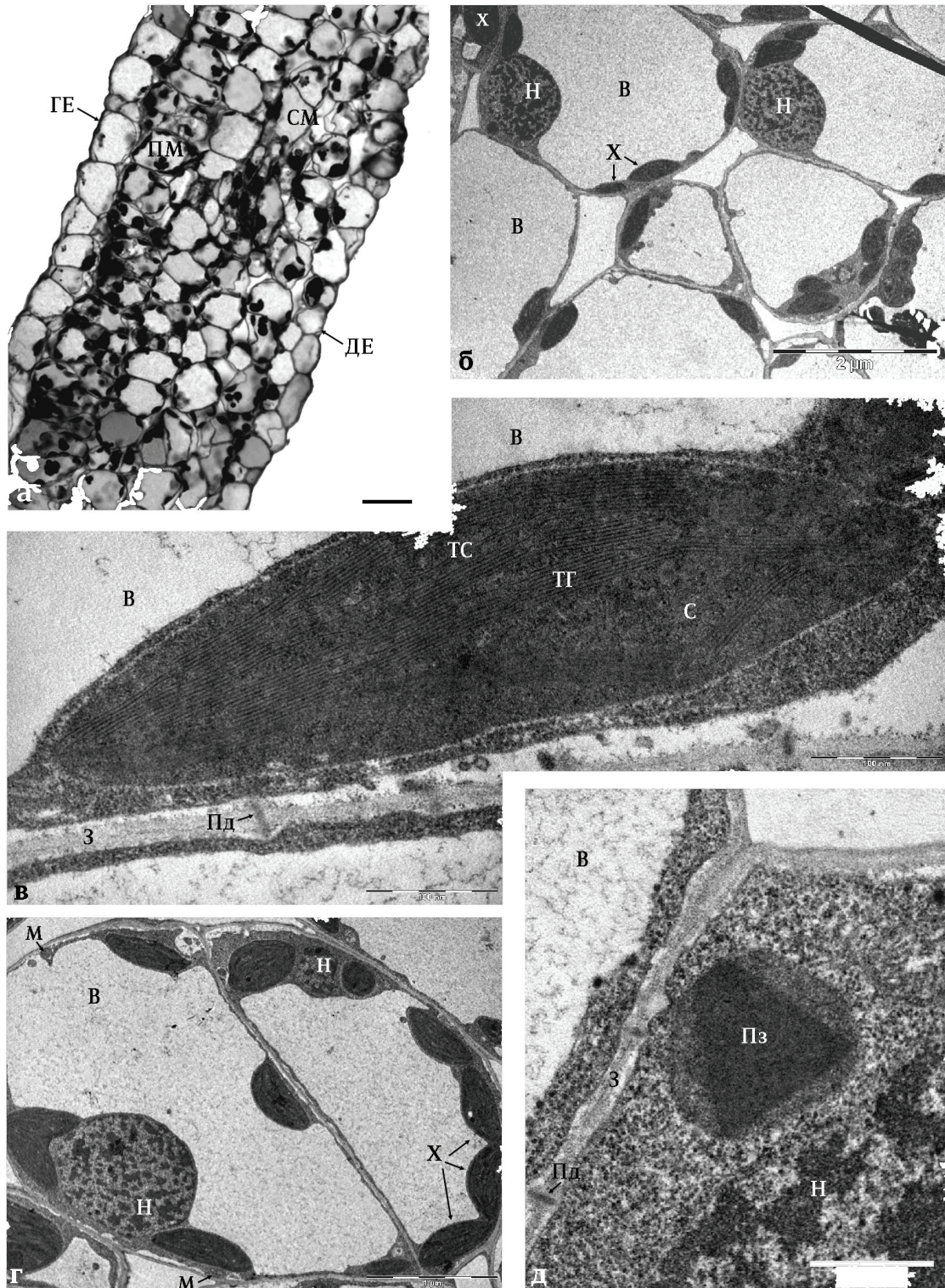
Слика 2. Хистоанатомска (а) и ултраструктурна (б-е) анализа мезофила млађег јувенилног (С1) листа. (а) Попречни пресек кроз млађи јувенилни лист (Бар = 16 μm); (б) Меристемска ћелија са електрон непробојном цитоплазмом и крупним еухроматинским једром (Бар = 2 μm); (в) Пропластиди са скробним зрнима (Бар = 2 μm); г) Митохондрије и хлоропласти испуњени стромом у којој се налази мали број спљоштених ламела (Бар = 1 μm); (д) Распршени вакуоларни простори оивичени тонопластом (Бар = 5 μm); (ђ) Митохондрије и цистерне ендоплазматичног ретикулума (Бар = 1 μm); (е) Ендоплазматични ретикулум, полирибозоми и провакуола у чијој се унутрашњости налази електрон непробојни материјал

(Бар = 0.5 μm). Једро (Н), једарце (Ну), пропластиди (П), скробно зрно (Сз), митохондрије (М), хлоропласт (Х), провакуоле (Пв), ендоплазматични ретикулум (ЕР).

4.2.2 Спорији јувенилни листи (С2)

На овом ступњу већ су диференцирани адаксијални и абаксијални епидермис, са стомама углавном ограниченим на абаксијалну површину. Епидермалне ћелије имају уочљива једра, потиснута ка периферији крупном централном вакуолом (Слика 3а). И адаксијална и абаксијална површина имају дебеле целулозне ћелијске зидове, који се задржавају до сенесцентних ступњева. Хлоренхиматозно основно ткиво састоји се од једног палисадног слоја густо збијених цилиндричних ћелија и дебљег слоја сунђерастог мезофила са нешто мање збијеним ћелијама, у којима централна вакуола потискује једро са органелама у узани појас цитоплазме, уз ћелијски зид (Слика 3а, б).

Ћелије мезофила имају сферично једро, са уочљивим једарцетом и јасно дефинисаном једровом опном (Слика 3б, г). У електронски густој цитоплазми запажају се крупнији хлоропласти елипсоидног облика, готово без скробних зрна, али са већ добро развијеним системом унутрашњих мембрана које су организоване у граналне и стромалне тилакоиде (Слика 3в). У периферном слоју цитоплазме смештене су бројне митохондрије, док централни положај у ћелији заузима крупна вакуола оивичена тонопластом (Слика 3г). На периферији ћелије, у близини једра, могу се запазити добро дефинисани пероксизоми (Слика 3д), а бројне плазмодезме сведоче о блиској међусобној повезаности суседних ћелија (Слика 3в, д).



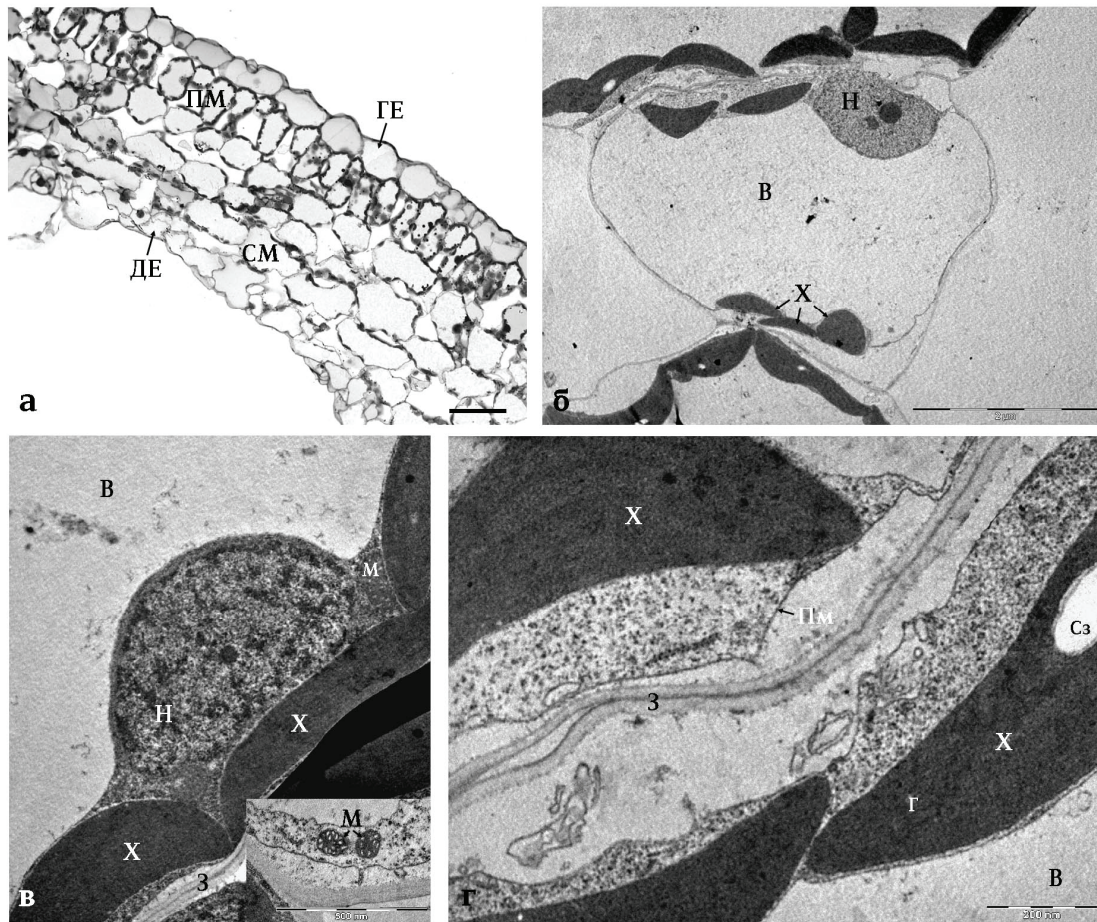
Слика 3. Хистоанатомска (а) и ултраструктурна (б-д) анализа мезофила старијег јувенилног (С2) листа. (а) Попречни пресек кроз млади, непотпуно диференциран лист (Бар = 25 μm); (б) Мезофилне ћелије са диференцираном централном вакуолом и малим међућелијским просторима (Бар = 2 μm); (в) Пресек кроз хлоропласт мезофилне ћелије

(Бар = 0.1 μm); (г) Цитоплазма са органелама ограничена на паријеталну површину централно постављеном вакуолом (Бар = 1 μm); (д) Пероксизом на периферији ћелије која је бројним плазмодезмама блиско повезана са суседном ћелијом (Бар = 0.1 μm). Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ); једро (Н), хлоропласт (Х), тилакоиди грана (ТГ), тилакоиди строма (ТС), строма (С), митохондрије (М), вакуола (В), пероксизом (Пз), ћелијски зид (З), плазмодезма (Пд).

4.2.3 Млађи зрели зелени листи (СЗ)

Анатомску структуру зрелих зелених листова на ступњу СЗ карактеришу добро дефинисан горњи и доњи епидермис; у мезофилном слоју уочава се компактан палисадни паренхим, као и сунђерасти паренхим са бројним међућелијским просторима (Слика 4а).

Мезофилне ћелије млађих зрелих листова карактеришу електрон непробојна периферна цитоплазма, као и крупна, централно постављена вакуола без уочљивих абнормалности. Бројни хлоропласти и митохондрије смештени су у узаном слоју цитоплазме уз плазма мембрану (Слика 4б, в). Хлоропласти имају дефинисани облик и структуру, са видљивим гранама и скробним зрнима, а у њима се повремено запажају осмиофилне пластоглобуле (Слика 4б, г). Већина једара је типична за мезофилне ћелије зелених листова и садржи дисперговани хроматин (Слика 4в). Местимично се запажа да је плазма мембрана, иако још увек интактна, одвојена од ћелијског зида, а међупростор мале густине садржи мембранозне везикуле различитог облика и величине (Слика 4г).



Слика 4. Хистоанатомска (а) и ултраструктурна (б-г) анализа мезофила млађег зрелог зеленог (С3) листа. (а) Попречни пресек кроз млађи зрели лист (Бар = 50 μm); (б) Типична мезофилна ћелија зрелог зеленог листа са еухроматинским једром (Бар = 2 μm); (в) Органеле у густој периферној цитоплазми и централна вакуола су без уочљивих абнормалности (Бар = 0.5 μm); (г) Хлоропласти елипсоидног облика, са гранама и скробним зрнима у узаном слоју цитоплазме, уз плазма мембрану која је местимично одвојена од ћелијског зида (Бар = 0.2 μm). Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ); једро (Н), хлоропласт (Х), грана (Г), скробно зрно (Сз), митохондрије (М), вакуола (В), плазма мембрана (Пм), ћелијски зид (З).

4.2.4 Старији зрели зелени листови (С4)

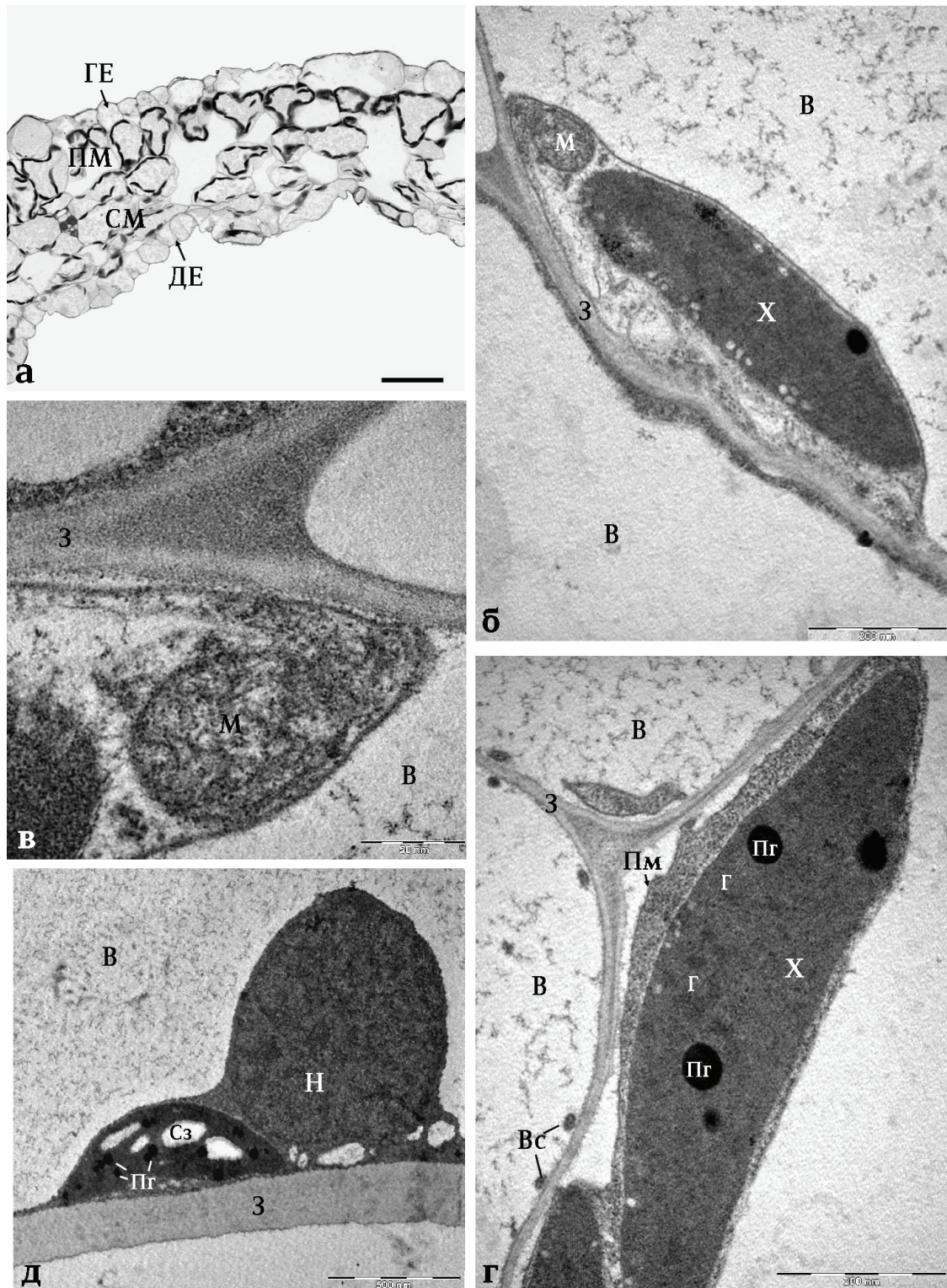
Старији зрели зелени листови (С4) имају још увек релативно уређен горњи епидермис, док је организација доњег епидермиса на овом ступњу већ донекле нарушена (Слика 5а). У епидермису се више готово не уочавају једра, а ћелије подлежу аутолизи. Слој мезофила карактерише се губитком уређености, а крупни међућелијски простори присутни су на овом стадијуму не само у сунђерастом, већ и у палисадном мезофилу (Слика 5а).

На ултраструктурном нивоу, уочава се повећана дезорганизација цитоплазме мезофилних ћелија у односу на претходни стадијум, праћена акумулацијом везикула у цитоплазми (Слика 5б, в). Губитак пермеабилности или перфорација тонопласта повезани су са разређивањем цитоплазме и последичним смањењем њене густине, иако су митохондрије, ендоплазматични ретикулум, пластиди и једра још увек присутни и имају нормалну структуру (Слика 5б, в, д).

Унутар вакуоле, на њеној периферији, запажају се електрон непробојне сферичне структуре. Наиме, на овом ступњу долази до специфичне фрагментације цитоплазме, односно формирања у вакуоли једномембранских везикула испуњених цитоплазматским матриksom (Слика 5г), али при том није запажена њена кондензација.

Хлоропласти и даље задржавају елипсоидни облик, унутрашњи ламеларни систем је очуван мада понекад без јасне граналне организације, док у њима долази до повећања броја и величине осмиофилних пластоглобула (Слика 5б, г, д).

Једра садрже бројне регионе кондензованог хроматина, док нуклеарни овој остаје готово непромењен (Слика 5д). Плазма мембрана такође изгледа целовита, иако се местимично запажају њене инвагинације (Слика 5г).



Слика 5. Хистоанатомска (а) и ултраструктурна (б-д) анализа мезофила старијег зрелог зеленог (С4) листа. (а) Попречни пресек кроз старији зрели лист (Бар = 50 μ m); (б) Местимична дезорганизација цитоплазме мезофилних ћелија у којој су присутне органеле још увек нормалне

структуре (Бар = $0.2 \mu m$); (в) Митохондрија у цитоплазматском простору смањене густине, детаљ са (б) (Бар = $0.05 \mu m$); (г) Појава већег броја крупнијих пластоглобула у хлоропластима и електрон непробојних сферичних структура на периферији вакуоле (Бар = $0.2 \mu m$); (д) Једро са бројним регионима кондензованог хроматина и интактним нуклеарним овојем (Бар = $0.5 \mu m$). Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ); једро (Н), хлоропласт (Х), грана (Г), пластоглобуле (Пг), скробно зрно (Сз), митохондрије (М), вакуола (В), везикуларне структуре (Вс), плазма мембрана (Пм), ћелијски зид (З).

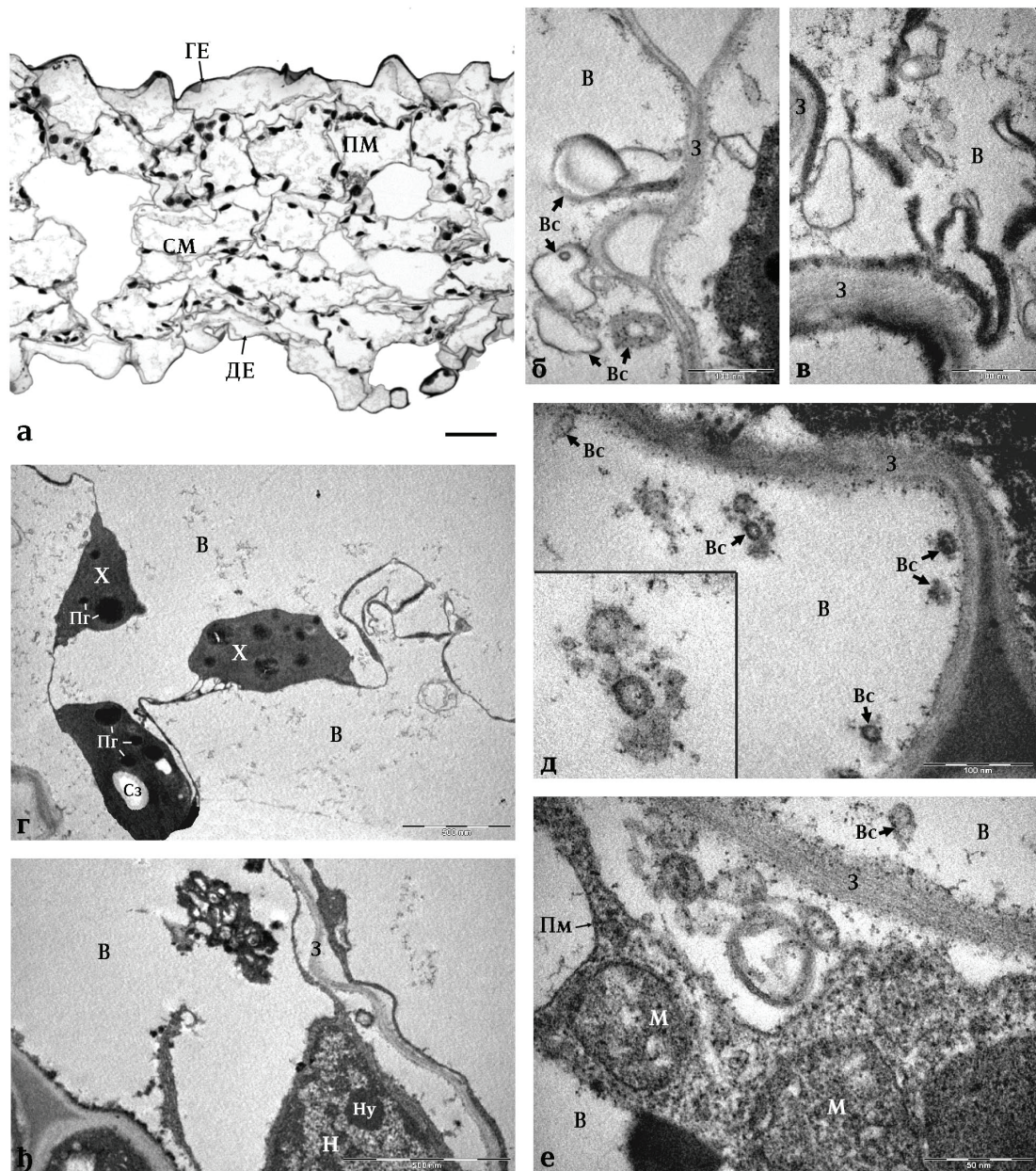
4.2.5 Млађи сенесцентни листи (С5)

Сенесцентне жућкасте листове на ступњу С5 карактерише даљи губитак уређености епидермиса. Организација мезофила у палисадни и сунђерасти слој је нарушена, а у њему се запајају екстензивни међућелијски простори и високо вакуолизиране ћелије (Слика 6а), чије изражене вакуоле садрже партикуларне и глобуларне депозите (Слика 6а, б, в, д).

У мезофилним ћелијама листова С5 стадијума присутне су бројне везикуларне структуре, лоциране не у цитоплазми већ у вакуоларном простору (Слика 6б, в, д). Наиме, са старењем, тонопласт постаје слабије дефинисан, док вакуоларни простор постепено постаје мање структуриран и гушћи у поређењу са ћелијама мезофила зелених листова. Тонопласт формира избочине испуњене цитоплазмом које се касније одвајају, што има за последицу појаву суспендованих полиморфних тела у вакуоли (Слика 6б, в, д, ђ).

Ултраструктурне промене хлоропласта обухватају прелаз из елипсоидног у сферични облик и редукцију тилакоидног мембранског система (Слика 6г). Разарање хлоропласта се манифестује као губитак скробних зрна, значајан пораст величине и броја пластоглобула, и као

губитак нормалне структуре тилакоидних мембрана при чему долази до бубрења ламела (Слика 6г).



Слика 6. Хистоанатомска (а) и ултраструктурна (б-е) анализа мезофила млађег сенесцентног (С5) листа. (а) Попречни пресек кроз сенесцентни жућкасти лист (Бар = 50 μm); (б) Везикуларне структуре унутар вакуоле (Бар = 0.1 μm); (в) Електрон непробојни материјал у области вакуоларног простора (Бар = 0.1 μm); (г) Бубрење хлоропласта уз редукцију тилакоидног мембранског система и појаву веома крупних осмиофилних пластоглобула (Бар = 0.5 μm); (д) Везикуларне структуре испуњене цитоплазматским

матриksom у унутрашњости вакуоле (Бар = 0.1 μm); (ђ) Кондензација и маргинализација хроматина у дегенеришућем једру (Бар = 0.5 μm); (е) Бубрење унутрашњих митохондријалних мембрана и скупљање протопласта (Бар = 0.05 μm). Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ); једро (Н), хлоропласт (Х), пластоглобуле (Пг), скробно зрно (Сз), митохондрије (М), вакуола (В), везикуларне структуре (Вс), плазма мембрана (Пм), ћелијски зид (З).

Велике масе електрон непробојног материјала, које указују на кондензацију хроматина и његову агрегацију, опажене су у дегенеришућим нуклесима (Слика 6ђ). Митохондрије имају набубреле унутрашње мембране (Слика 6е).

У мезофилним ћелијама које се ближе аутолизи, смањење густине цитоплазме је често праћено скупљањем протопласта, са последичним одвајањем плазма мембране од ћелијског зида (Слика 6ђ, е).

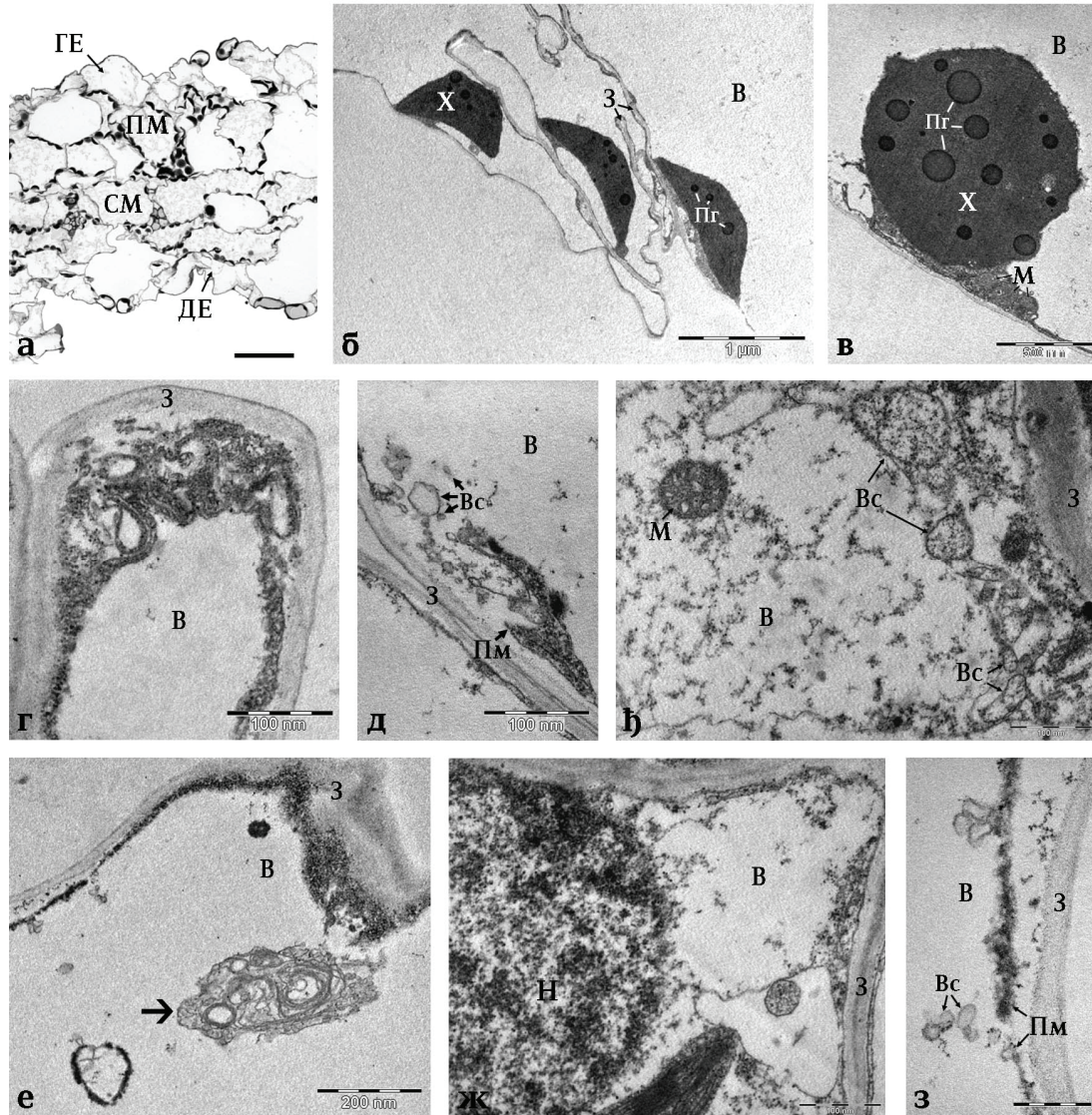
4.2.6 Старији сенесцентни листи (С6)

Епидермис старијих сенесцентних листова чине компримоване, често раскинуте траке ћелија са таласастим антиклиним зидовима. На овом ступњу више се готово не опажа организација мезофилних ћелија у палисадни и сунђерасти слој, у којима се уочавају огромни међућелијски простори (Слика 7а).

Структура мезофилних ћелија сенесцентних жутих листова још је више нарушена, обзиром да је у њима дошло до разградње многих ћелијских компоненти. Стога је и количина електрон непробојног материјала у ћелијама овог ступња значајно смањена.

У угловима неких ћелија накупља се преостала цитоплазма мале густине, са пластидима (Слика 7б). Присутни пластиди су већином

набубрели геронтопласти, испуњени крупним осмиофилним пластоглобулама (Слика 7в). Тилакоидни мембрански систем у њима је снажно редукован, а велики део строме је лишен граналних структура.



Слика 7. Хистоанатомска (а) и ултраструктурна (б-з) анализа мезофила старијег сенесцентног (С6) листа. (а) Попречни пресек кроз сенесцентни жути лист (Бар = 50 μm); (б) Изглед мезофилне ћелије након разградње већине ћелијских компоненти (Бар = 1 μm); (в) Набубрели пластиди испуњени крупним пластоглобулама, са снажно редукованим тилакоидним системом и местимично раскинутом мембраном овојницом (Бар = 0.5 μm); (г) Кондензација цитоплазме и везикулација цитоплазматских мембрана (Бар = 0.1 μm); (д) Разарање тонопласта и дегенерација плазма мембране

(Бар = 0.1 μm); (ћ) Мембранске структуре испуњене цитоплазматским матриксом и распадајуће органеле у вакуоларном простору (Бар = 0.1 μm); (е) Губитак интегритета плазма мембране и појава мијелину-сличних структура (*сирелица*) у вакуоли (Бар = 0.2 μm); (ж) Значајна кондензација хроматина у дегенеришућем једру (Бар = 0.1 μm); (з) Лиза фрагментираних плазма мембрана (Бар = 0.05 μm). Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ); једро (Н), хлоропласт (Х), пластоглобуле (Пг), митохондрије (М), вакуола (В), везикуларне структуре (Вс), плазма мембрана (Пм), ћелијски зид (З).

Мембране хлоропласта, као и друге цитоплазматске мембране попут тонопласта и митохондријалних мембрана, су раскинуте у многим ћелијама (Слика 7в, г, д). Тонопласт ових ћелија потпуно губи свој интегритет, тако да се вакуола често више не може разликовати од цитоплазме (Слика 7д, ћ). Везикулација цитоплазматских мембрана на овом ступњу је још израженија, па се унутар дигестивног одељка запажају једномембранске структуре испуњене цитоплазматским матриксом и распадајуће органеле (Слика 7д, ћ), као и мијелину сличне структуре које вероватно указују на дигестију ћелијских мембрана (Слика 7е).

Ретка преостала једра у мезофилним ћелијама сенесцентних жутих листова, одликује још екстензивнија кондензација и маргинализација хроматина, док нуклеарни овој више није тако јасно дефинисан као на претходним ступњевима (Слика 7ж). Унутрашње мембране преосталих митохондрија су снажно набубреле (Слика 7ћ).

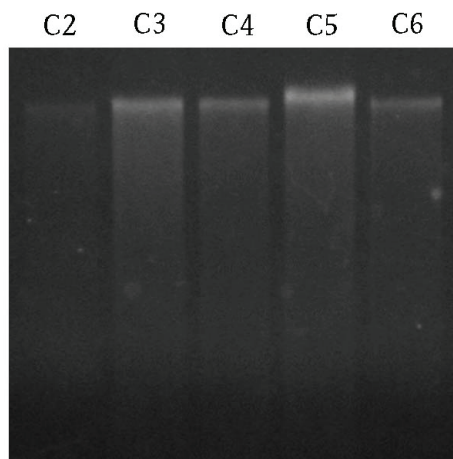
Најупадљивија карактеристика мезофилних ћелија у овом стадијуму је дегенерација њихових плазма мембрана, које су често раскинуте и одвојене од ћелијског зида (Слика 7д, з), док су преостали пластиди једине још препознатљиве органеле у ћелији.

4.3 Фрагментација једарне ДНК специфична за програмирану ћелијску смрт (PCD) током сенесценције

PCD-специфична фрагментација једарне ДНК анализирана је у листовима одговарајућих морфогенетских стадијума помоћу *DNA ladder* и *TUNEL* реакције, која *in situ* обележава слободне 3'-OH једноланчане прекиде у високомолекулској ДНК настале дејством ендонуклеаза.

4.3.1 Електрофоретска анализа фрагментације ДНК (DNA laddering)

Геномска ДНК изолована из појединачних листова одговарајућих морфогенетских стадијума је подвргнута електрофорези на 1.5% агарозном гелу (Слика 8). На фрагментацију ДНК указује упадљив "smear" (нејасне траке у виду дужих „мрља“) ДНК из листова стадијума С3, С4, С5 и С6, који није примећен код ДНК изоловане из најмлађих (С2) листова. Лествичаста образац ДНК трака (*DNA ladder*) који указује на интернуклеозомалну фрагментацију једарне ДНК није запажен ни на једном од посматраних стадијума. Слични резултати добијени су из три независне екстракције ДНК.



Слика 8. Анализа фрагментације ДНК у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum*. За електрофорезу је коришћено по 10 μ г ДНК.

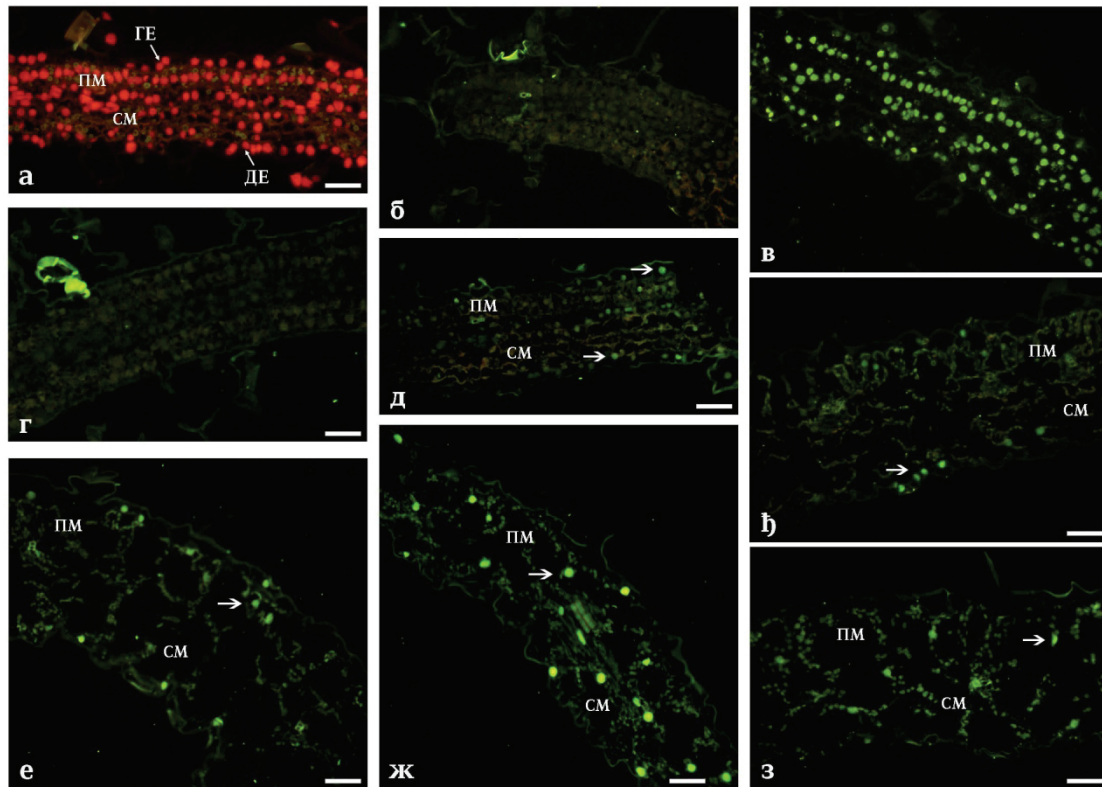
4.3.2 *In situ* детекција програмиране ћелијске смрти

Фрагментација једарне ДНК детектује се као жуто-зелена флуоресценција (тј. позитивно *TUNEL* бојење) у нуклеусима ћелија ексцитираних плавом светлошћу (Слика 9). Како би се искључила могућност лажног позитивног односно негативног бојења, резултати су интерпретирани поређењем *TUNEL*-позитивних сигнала са интерном позитивном (Слика 9в) и негативном (Слика 9б) контролом, као и са пресецима обојеним пропидијум јодидом (Слика 9а).

TUNEL реакција је показала да се фрагментација ДНК може детектовати већ у раним фазама морфогенезе листа, на ступњу С2 (Слика 9д), као и код каснијих развојних стадијума (Слика 9ђ-з), али не и у млађим јувенилним листовима (ступањ С1), у којима процес диференцијације још није завршен (Слика 9г). Позитивно *TUNEL* бојење је јасно опажено у нуклеусима ћелија сенесцентних листова, као што је показано на Сликама 9ж и 9з.

У млађим листовима, на ступњу С2 и С3, већина нуклеуса у горњем и доњем епидермису и свега неколико нуклеуса палисадних ћелија и ћелија сунђерастог мезофила даје *TUNEL* позитивну реакцију (Слика 9д, ђ). Већ на старијем С4 ступњу, и број *TUNEL* позитивних једара и јачина сигнала су значајно већи (Слика 9е).

У видљиво сенесцентним листовима (ступњеви С5 и С6), нуклеуси епидермалних ћелија се више не запажају под плавом ексцитацијом. Већина нуклеуса мезофилних ћелија је *TUNEL* позитивна (Слика 9ж, з), док се интактни нуклеуси у њима више не опажају. Изразито зелени флуоресцентни нуклеуси ћелија палисадног и сунђерастог мезофила су индикатори високог нивоа фрагментације ДНК.

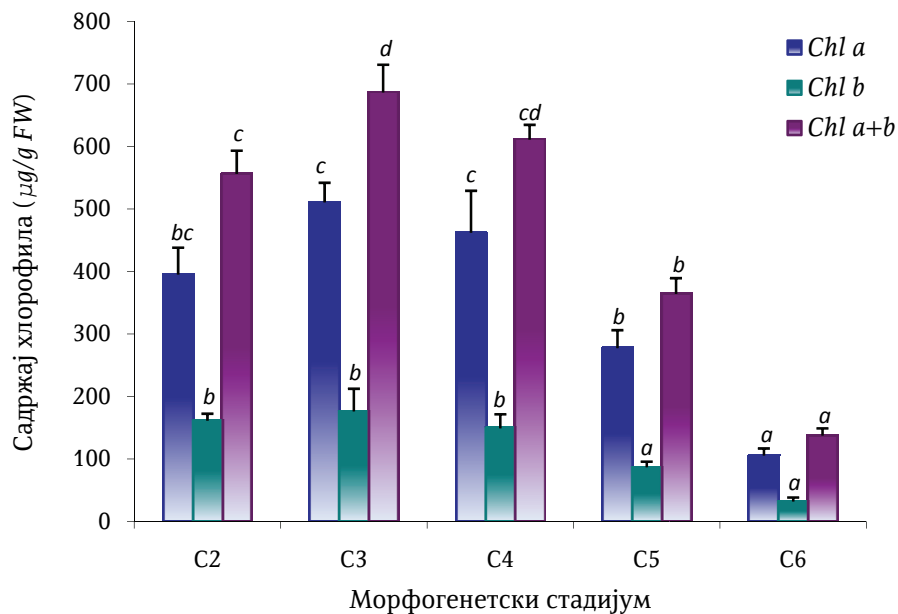


Слика 9. *In situ* детекција *PCD*-специфичне фрагментације ДНК у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* помоћу *TUNEL* анализе. (а-в) Попречни пресек кроз млади С2 лист: обојен пропијидијум јодидом (а); третиран смешом за обележавање из које је изостављен *TdT* ензим, као негативна контрола (б); и третиран ДНАзом да би се добило *TUNEL*-позитивно бојење нуклеуса, као позитивна контрола (в). (г-з) Попречни пресек кроз листове различитих морфогенетских стадијума обојене помоћу *TUNEL* реакције: млађи јувенилни (С1) лист (г); старији јувенилни (С2) лист (д); млађи, С3 (ђ) и старији, С4 (е) зрели зелени лист; млађи сенесцентни (С5) лист (ж); старији сенесцентни (С6) лист (з). Бар = 40 μ m. Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ). Стрелице показују *TUNEL*-позитивне нуклеусе.

4.4 Идентификација биомаркера сенесценције

4.4.1 Садржај хлорофила

Садржај хлорофила у листовима *in vitro* гајених биљака дувана на различитим стадијумима развића (C2-C6) приказан је на Слици 10.



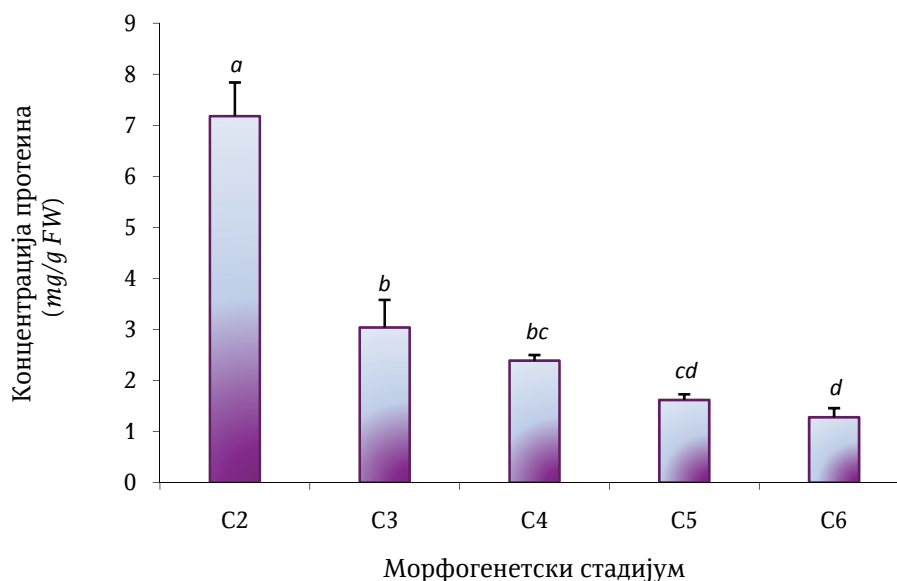
Слика 10. Садржај хлорофила *a* и *b* у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента $\pm SE$, $n = 6$. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

Садржај хлорофила је био највећи у млађим зрелим зеленим листовима, а најмањи у старијим сенесцентним жућким листовима (Слика 10). Садржај хлорофила у зрелим C3 листовима већи је него у јувенилним C2 листовима, што је у складу са ултраструктуром мезофилних ћелија ових листова, где се запажа даље формирање нових тилакоидних мембрана у неким хлоропластима. Садржај хлорофила остаје релативно висок све до каснијих фаза у развићу листа. У млађим сенесцентним жућкастим

листовима (C5), који на ултраструктурном нивоу показују симптоме узрапредовале сенесценције, садржај хлорофила је готово двоструко нижи него у зрелим зеленим листовима (Слика 10). Са одмицањем сенесценције он наставља да опада, тако да је количина укупног хлорофила у старијим сенесцентним жутим листовима C6 стадијума око пет пута нижа од измерених вредности у зрелим зеленим листовима C3 стадијума. Однос хлорофила *a* према хлорофилу *b* расте током експанзије листа, али се вредност достигнута у зром зеленом листу даље не мења значајно током процеса сенесценције.

4.4.2 Садржај протеина

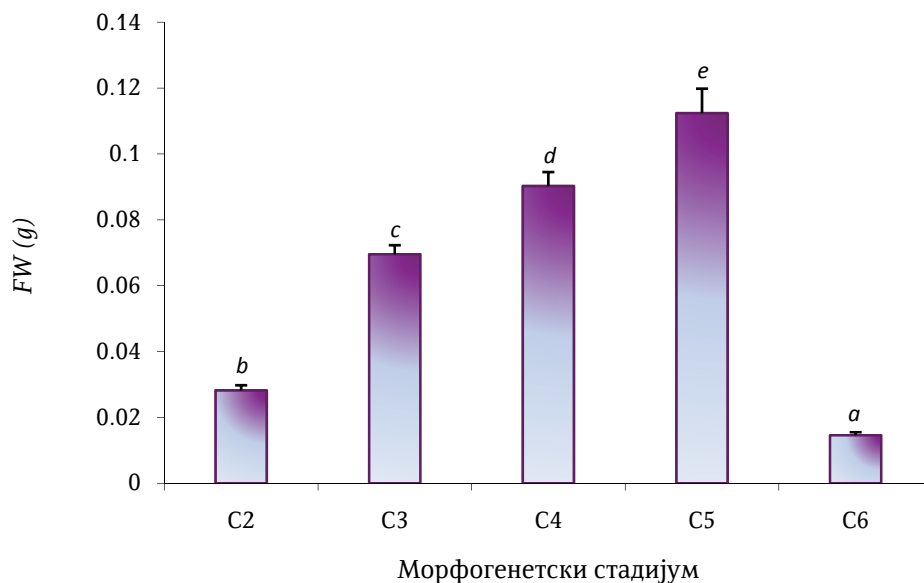
Осим анализом фотосинтетичких пигмената, степен сенесценције листова дувана је окарактерисан и садржајем цитосолних протеина. Садржај растворљивих ћелијских протеина је највећи у младим, непотпуно диференцираним листовима и континуирано опада са старошћу листа (Слика 11). Садржај протеина се значајно редукује током диференцијације младих листова, па је њихова концентрација у зром зеленом листу C3 за преко 50% нижа у односу на претходни стадијум. Током сенесценције садржај протеина постепено опада, тако да је у касној фази (C6 стадијум) за преко 50% нижи од вредности измерене у зром C3 листу.



Слика 11. Концентрација протеина у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента $\pm SE$, $n = 6$. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

4.4.3 Свежа маса листова

Промене свеже масе листова посматраних морфогенетских стадијума приказане су на Слици 12. Свежа маса постепено расте са физиолошком старашћу листова све до C5 стадијума, када достиже максималну вредност. Након тога се уочава њен драстичан пад, тако да свежа маса старијих сенесцентних листова износи свега 7.5% вредности измерене у претходном стадијуму.



Слика 12. Свежа маса (FW) листова различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента $\pm SE$, $n = 34$. Вредности означене различитим словима се статистички значајно разликују ($p < 0.0001$).

4.5 Анализа ендогених регулатора растења

4.5.1 Садржај ендогених цитокинина

У листовима *in vitro* гајених биљака дувана је идентификовано и квантификовано више од 20 различитих цитокинина (Табела 7). Цитокинини су на основу структуре и физиолошке активности груписани у пет функционално различитих група (према *Ananieva et al.* 2004): (1) биоактивне цитокининске базе и рибозиди [*trans*-зеатин (*trans-Z*), *trans*-зеатин 9-рибозид (*trans-Z9R*), N^6 -(2-изопентенил)аденин (*iP*), N^6 -(2-изопентенил)аденин 9-рибозид (*iP9R*), дихидрозеатин (*DHZ*), дихидрозеатин 9-рибозид (*DHZ9R*)], који испољавају високу цитокининску активност у различитим биоесејима и које препознају цитокинински рецептори; (2) транспортни и резервни облици представљени цитокининским О-глукозидима, који се могу хидролизовати до активних форми [*trans*-зеатин О-глукозид (*ZOG*), *trans*-зеатин 9-рибозид О-глукозид (*Z9ROG*), дихидрозеатин О-глукозид (*DHZOG*), дихидрозеатин 9-рибозид О-глукозид (*DHZ9ROG*)]; (3) ирверзибилно неактивни N-глукозиди [*trans*-зеатин 7-глукозид (*Z7G*), *trans*-зеатин 9-глукозид (*Z9G*), дихидрозеатин 7-глукозид (*DHZ7G*), дихидрозеатин 9-глукозид (*DHZ9G*), N^6 -(2-изопентенил)аденин 7-глукозид (*iP7G*), N^6 -(2-изопентенил)аденин 9-глукозид (*iP9G*)]; (4) цитокинински рибозид фосфати [*trans*-зеатин 9-рибозид-5'-монофосфат (*Z9RMP*), дихидрозеатин 9-рибозид-5'-монофосфат (*DHZ9RMP*), N^6 -(2-изопентенил)аденин 9-рибозид-5'-монофосфат (*iP9RMP*)], који се сматрају примарним, физиолошки неактивним, продуктима биосинтезе цитокинина и прекурсорима одговарајућих активних облика; и (5) *cis*-зеатини [*cis*-зеатин (*cis-Z*), *cis*-зеатин 9-рибозид (*cis-Z9R*), *cis*-зеатин 9-рибозид-5'-монофосфат (*cis-Z9RMP*), *cis*-зеатин О-глукозид (*cis-ZOG*) и *cis*-зеатин 9-рибозид О-глукозид (*cis-Z9ROG*)], који испољавају веома ниску цитокининску активност. Осим тога, за нека разматрања цитокинини *trans-Z* типа (*trans-Z*, *trans-Z9R*, *trans-Z9RMP*, *trans-ZOG* и *trans-Z9ROG*) су представљени као засебна подгрупа.

Табела 7. Ендогени нивои цитокинина у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента.

Цитокинин	Садржај цитокинина (pmol/g FW)				
	Морфогенетски стадијум				
	C2	C3	C4	C5	C6
<i>trans-Z</i>	0.34	0.12	0.22	0.18	0.11
<i>trans-Z9R</i>	0.04	0.03	0.05	0.01	0.01
<i>trans-Z7G</i>	0.48	0.37	0.73	0.72	0.42
<i>trans-Z9G</i>	0.12	0.11	0.14	0.11	0.14
<i>trans-ZOG</i>	0.37	0.16	0.16	0.16	0.30
<i>trans-Z9ROG</i>	/	/	/	/	/
<i>trans-Z9RMP</i>	0.14	0.06	0.00	0.00	0.00
<i>cis-Z</i>	0.14	0.00	0.06	0.00	0.00
<i>cis-Z9R</i>	0.17	0.04	0.04	0.04	0.12
<i>cis-Z7G</i>	2.78	5.88	5.65	4.50	3.16
<i>cis-Z9G</i>	0.10	0.08	0.12	0.10	0.00
<i>cis-ZOG</i>	0.23	1.46	0.00	1.37	0.92
<i>cis-Z9ROG</i>	0.28	0.32	0.22	0.28	0.19
<i>cis-Z9RMP</i>	0.80	0.18	0.29	0.00	0.00
<i>DHZ</i>	0.32	0.41	0.48	0.20	0.35
<i>DHZ9R</i>	0.00	0.00	0.04	0.03	0.08
<i>DHZ7G</i>	0.48	0.45	0.50	0.32	0.18
<i>DHZ9G</i>	/	/	/	/	/
<i>DHZOG</i>	0.06	0.06	0.09	0.14	0.20
<i>DHZ9ROG</i>	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
<i>DHZ9RMP</i>	0.15	0.09	0.19	0.09	0.08
<i>iP</i>	/	/	/	/	/
<i>iP9R</i>	0.00	0.03	0.02	0.02	0.12
<i>iP7G</i>	/	/	/	/	/
<i>iP9G</i>	/	/	/	/	/
<i>iP9RMP</i>	0.56	0.35	0.61	0.31	0.55
Укупни цитокинини	7.56	10.20	9.63	8.58	6.93

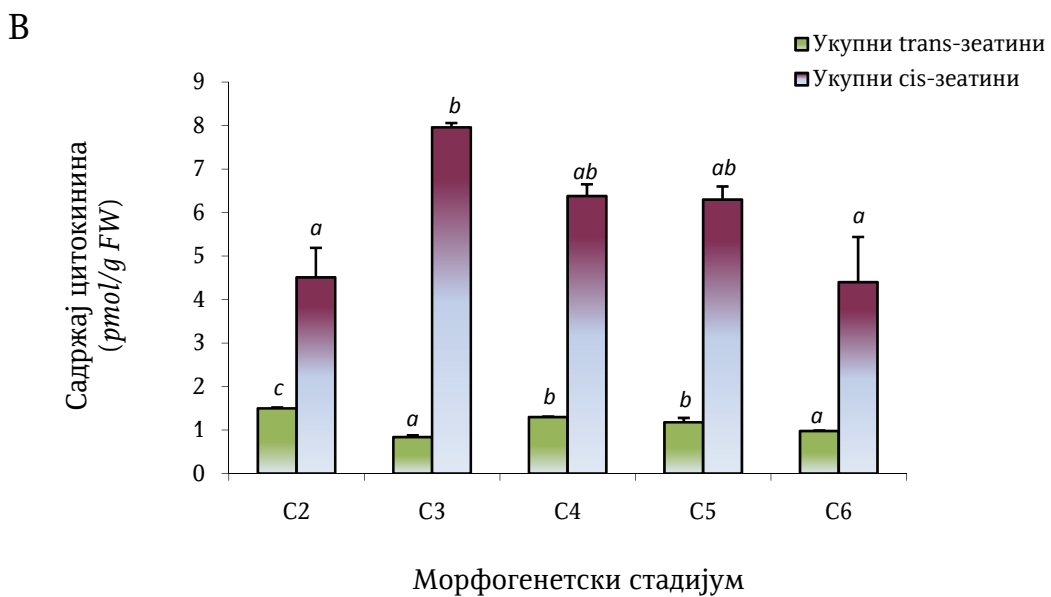
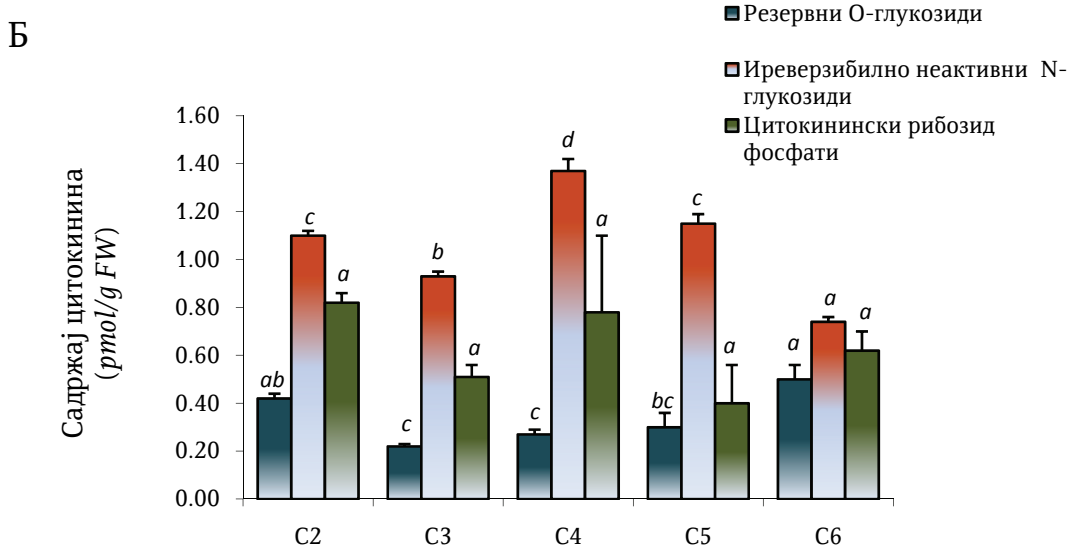
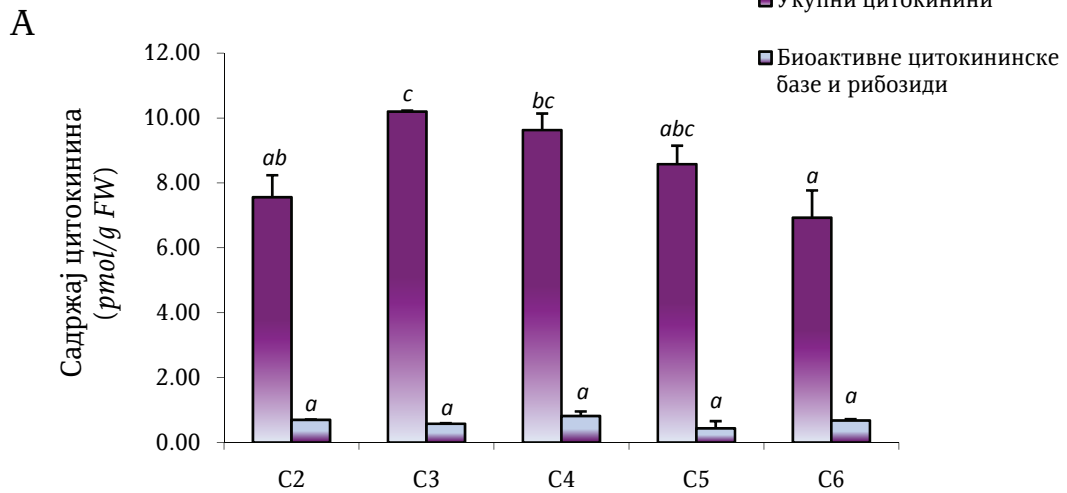
Сума цитокинина који припадају различитим функционалним групама (% укупних цитокинина)					
Биоактивне цитокининске базе и рибозиди	9.3	5.7	8.7	4.9	10.0
Резервни цитокинински <i>O</i> -глукозиди	5.6	2.2	2.8	3.6	7.5
Ирверзибилно неактивни <i>N</i> -глукозиди	14.6	9.1	14.2	13.5	10.8
Цитокинински рибозид фосфати	11.1	5.0	8.0	4.5	9.2
Укупни <i>cis</i> -зеатини	59.4	78.0	66.3	73.5	62.5

Током онтогенезе листова дувана, садржај укупних цитокинина се значајно повећава на прелазу из јувенилног (С2) у зрели С3 стадијум, у коме достиже максималну вредност (Табела 8, Слика 13а). Садржај укупних цитокинина се одржава на релативно високом нивоу и на почетку сенесценције, а значајан пад забележен је тек у касној фази сенесценције (стадијум С6), где је ниво укупних цитокинина смањен за око 30% у односу на вредност измерену у зрелим зеленим листовима (Табела 8, Слика 13а). Садржај физиолошки активних цитокинина, као и њихових прекурсора не мења се значајно у посматраним морфогенетским стадијумима, док ниво резервних *O*-глукозида показује тренд супротан ономе који је уочен код укупних цитокинина (Табела 8, Слика 13а, б). Садржај резервних *O*-глукозида и, у мањој мери, неактивних *N*-глукозида значајно опада током сазревања младог, непотпуно диференцираног листа. Са одмицањем сенесценције, садржај *O*-глукозида расте (2.3 пута већи у сенесцентним него у млађим зрелим листовима), док садржај неактивних *N*-глукозида опада готово на половину вредности од оне измерене у старијем зрелом зеленом листу (Табела 8, Слика 13б).

Табела 8. Ендогени нивои цитокинина који припадају различитим функционалним групама у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента $\pm SE$. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

Функционалне групе citoкнина	Садржај цитокинина (<i>pmol/g FW</i>)				
	Морфогенетски стадијум				
	C2	C3	C4	C5	C6
Биоактивне citoкнинске базе и рибозиди	0.70 \pm 0.01 <i>a</i>	0.58 \pm 0.02 <i>a</i>	0.82 \pm 0.14 <i>a</i>	0.44 \pm 0.22 <i>a</i>	0.68 \pm 0.04 <i>a</i>
Резервни citoкнински O-глукозиди	0.42 \pm 0.02 <i>ab</i>	0.22 \pm 0.01 <i>c</i>	0.27 \pm 0.02 <i>c</i>	0.30 \pm 0.06 <i>bc</i>	0.50 \pm 0.06 <i>a</i>
Ирверзибилно неактивни N- глукозиди	1.10 \pm 0.02 <i>c</i>	0.93 \pm 0.02 <i>b</i>	1.37 \pm 0.05 <i>d</i>	1.15 \pm 0.04 <i>c</i>	0.74 \pm 0.02 <i>a</i>
Цитокинински рибозид фосфати	0.82 \pm 0.04 <i>a</i>	0.51 \pm 0.05 <i>a</i>	0.78 \pm 0.32 <i>a</i>	0.40 \pm 0.16 <i>a</i>	0.62 \pm 0.08 <i>a</i>
Укупни <i>cis</i> -зеатини	4.51 \pm 0.68 <i>a</i>	7.96 \pm 0.10 <i>b</i>	6.38 \pm 0.27 <i>ab</i>	6.30 \pm 0.30 <i>ab</i>	4.40 \pm 1.04 <i>a</i>
Укупни citoкнини	7.56 \pm 0.68 <i>ab</i>	10.20 \pm 0.03 <i>c</i>	9.63 \pm 0.51 <i>bc</i>	8.58 \pm 0.57 <i>abc</i>	6.93 \pm 0.84 <i>a</i>

Садржај *cis*- и *trans*-зеатинских изоформи (као сума њихових слободних база, рибозида, риботида, O-глукозида и N-глукозида) и њихов однос мењају се током онтогенезе листова дувана (Слика 13в, Табела 9). За све морфогенетске стадијуме карактеристичан је упадљиво висок удео цитокинина *cis*-зеатинског типа (59-78% укупних цитокинина) (Табела 8, Слика 14). Њихова количина се драстично повећава (за више од 75%) на прелазу из C2 у C3 стадијум, где достиже максималну вредност (Табела 9, Слика 13в). Насупрот томе, ниво *trans*-зеатина је највиши у младим непотпуно диференцираним листовима, и на прелазу из C2 у C3 стадијум долази до његове значајне редукције, за преко 40% (Табела 9, Слика 14). Током даљег сазревања и сенесценције, ниво *trans*-зеатина постепено опада (Табела 9, Слика 13в).

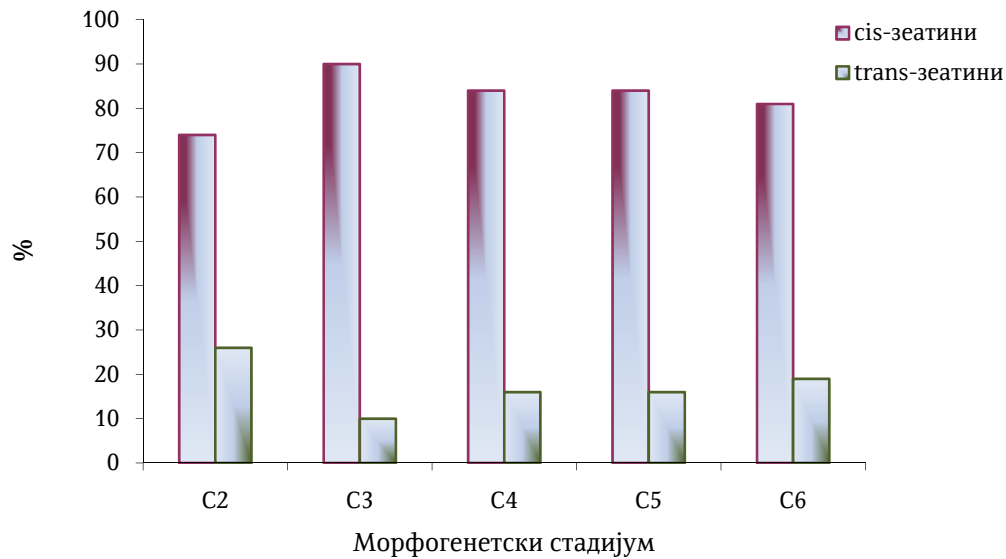


Слика 13. Ендогени нивои цитокинина у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. (А) Укупни и биоактивни цитокинини (*Z*, *DHZ*, *iP* и њихови рибозиди); (Б) Резервни цитокинински *O*-глукозиди (*ZOG*, *Z9ROG*, *DHZOG*, *DHZ9ROG*, *DHZ9G*), иреверзибилно неактивни *N*-глукозиди (*Z7G*, *Z9G*, *DHZ7G*, *iP7G*, *iP9G*) и цитокинински рибозид фосфати (*Z9RMP*, *DHZ9RMP*, *iP9RMP*); (В) укупни *trans*-зеатини (*trans-Z*, *trans-Z9R*, *trans-Z9RMP*, *trans-ZOG* и *trans-Z9ROG*) и одговарајући *cis*-изомери. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента $\pm SE$. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

Табела 9. Ендогени нивои цитокинина *cis*- и *trans*-зеатинског типа и њихов однос у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента $\pm SE$. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

Морфогенетски стадијум	<i>trans</i> -зеатини (<i>pmol/g FW</i>)	<i>cis</i> -зеатини (<i>pmol/g FW</i>)	Однос <i>trans:cis</i>
C2	1.50 \pm 0.02 <i>c</i>	4.51 \pm 0.68 <i>a</i>	0.34
C3	0.84 \pm 0.04 <i>a</i>	7.96 \pm 0.10 <i>b</i>	0.10
C4	1.30 \pm 0.01 <i>b</i>	6.38 \pm 0.27 <i>ab</i>	0.20
C5	1.18 \pm 0.10 <i>b</i>	6.30 \pm 0.30 <i>ab</i>	0.19
C6	0.98 \pm 0.01 <i>a</i>	4.40 \pm 1.04 <i>a</i>	0.24

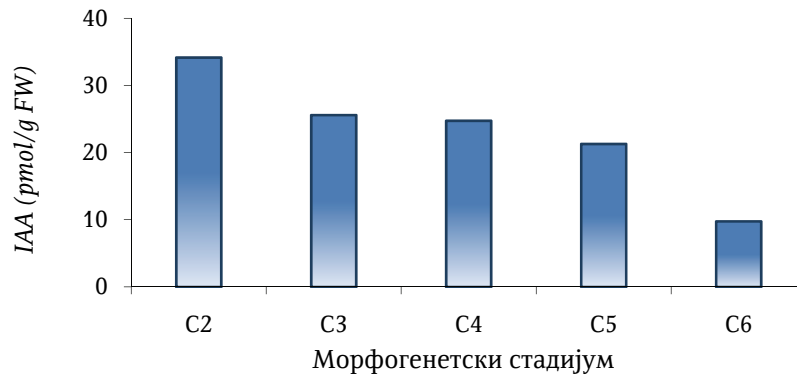
Релативно висок ниво цитокинина *cis*-зеатинског типа у листовима дувана углавном је резултат високог садржаја *cisZ-N⁷*-глукозида (*cisZ7G*) као преодминантног цитокининског једињења (Табела 7). Уопштено се може рећи да су, независно од стадијума развића, преовлађујуће цитокининске форме у листовима дувана *N*-глукозиди, док су нивои свих биоактивних цитокининских база, рибозиди и риботида прилично ниски на свим посматраним стадијумима.



Слика 14. Ендогени нивои цитокинина *cis*- и *trans*-зеатинског типа као % укупних зеатина у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља.

4.5.2 Садржај ендогене IAA

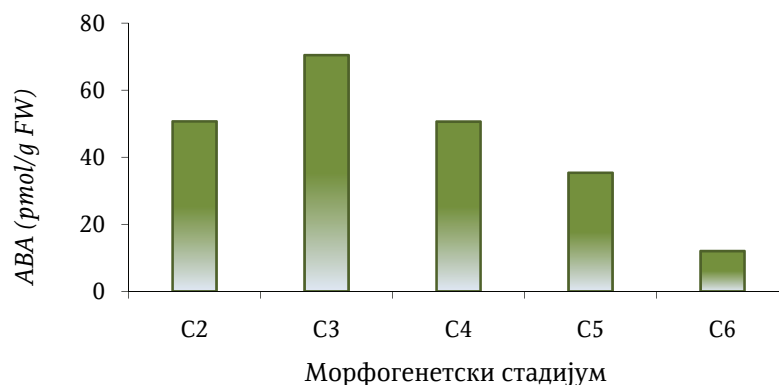
Садржај индол-3-сирћетне киселине (IAA) у листовима на различитим стадијумима развића *in vitro* гајених биљака дувана приказан је на Слици 15. Количина овог ауксина је највећа у младим C2 листовима и током онтогенезе листа она континуирано опада. Садржај IAA се значајно редукује приликом диференцијације младих листова, тако да је њена концентрација у зрелом зеленом C3 листу за 25% нижа у односу на претходни стадијум. У почетним фазама сенесценције садржај IAA наставља да опада, али се одржава на релативно високом нивоу (Слика 15). У касној фази сенесценције (стадијум C6) запажа се драстично смањење садржаја IAA у односу на претходни стадијум (редукција за преко 50%), тако да је њена концентрација у старијем сенесцентном листу 2.5 пута нижа него на почетку процеса сенесценције.



Слика 15. Ендогени нивои слободне IAA у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља.

4.5.3 Садржај ендогене абсцисинске киселине

Садржај абсцисинске киселине (ABA) у листовима на различитим стадијумима развића *in vitro* гајених биљака дувана приказан је на Слици 16. Динамика промена у садржају ABA током онтогенезе листова дувана показује извесну сличност са променама у садржају укупних цитокинина које прате овај процес. Наиме, концентрација ABA се значајно повећава (за 39%) на прелазу из C2 у C3 стадијум, у коме достиже максималну вредност (Слика 16). Садржај ABA опада већ на почетку сенесценције, па је у млађем сенесцентном листу (C5) он редукован за 50% у односу на зелени C3 лист. У касној фази сенесценције, садржај ABA се драстично смањује (за 66%) у односу на претходни стадијум, а њена концентрација је на овом ступњу 4.2 пута нижа него на почетку процеса сенесценције.



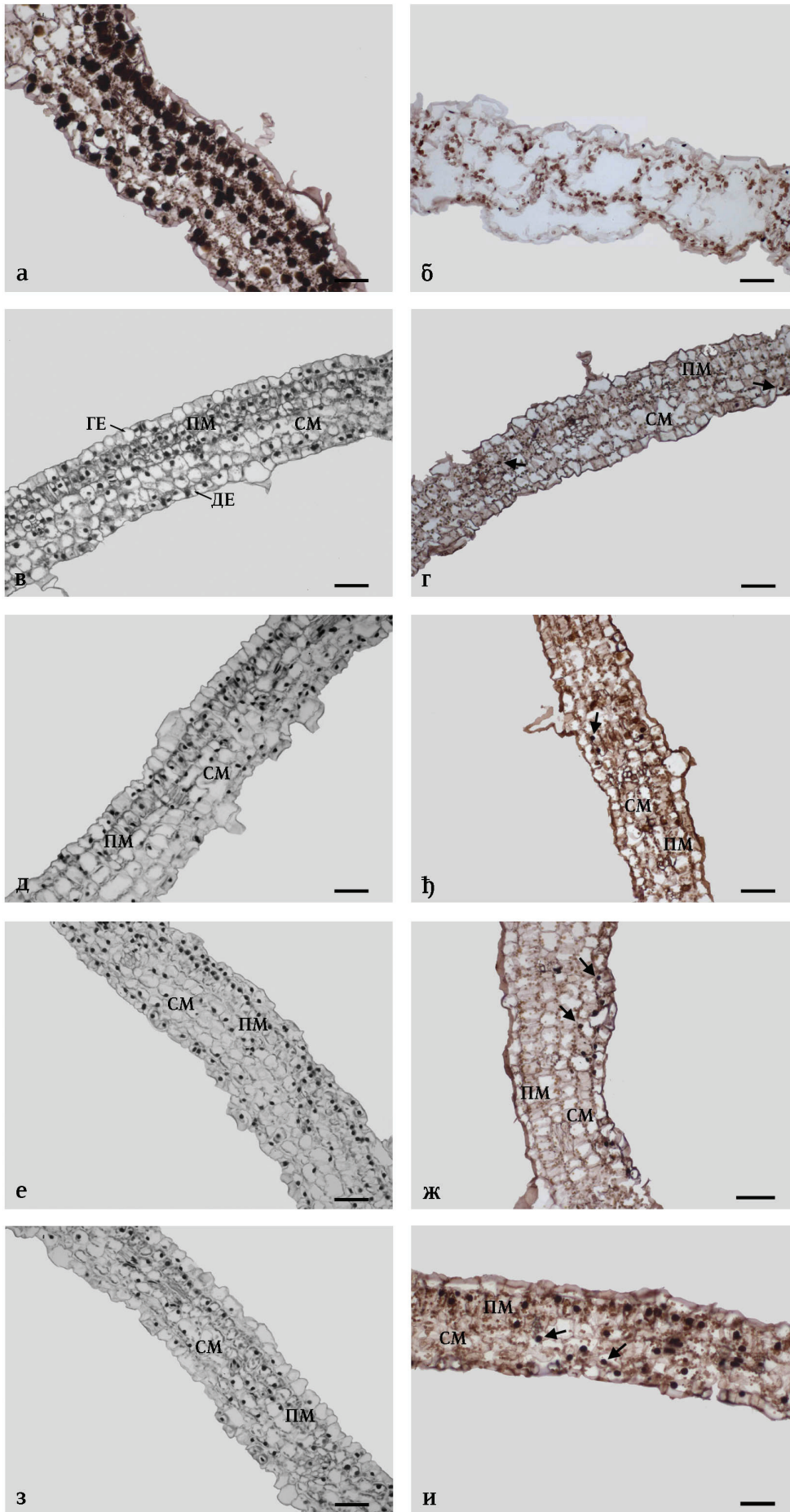
Слика 16. Ендогени нивои ABA у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља.

4.6 Ефекат цитокина на програмирану ћелијску смрт

TUNEL есеј је такође коришћен за анализу утицаја егзогено примењених цитокина на процес сенесценције. У ту сврху коришћени су млади, непотпуно диференцирани листови (С2 стадијум) изданака дувана гајених на подлози са бензиладенином (БА), који су у тренутку постављања експлантата на подлогу били још у фази лисних примордија.

Хистолошком анализом је показано да са порастом концентрације цитокина у подлози долази до промена у слоју мезофила, у поређењу са контролом (Слика 17в). Услед повећања међућелијских простора, ћелије сунђерастог мезофила више нису тако густо збијене (Слика 17д, е, з). Палисадне ћелије при највишим концентрацијама БА (30 μM и 100 μM) нису више тако упадљиво издужене само у једном правцу, и на 100 μM БА изгледају готово изодијаметричне (Слика 17з).

Како би се искључила могућност лажног позитивног, односно негативног бојења, резултати су интерпретирани поређењем *TUNEL*-позитивних сигнала са интерном позитивном (Слика 17а), односно негативном (Слика 17б) контролом. У мезофилу контролних листова, фрагментација ДНК је запажена у свега неколико ћелија, тако што је инкорпорирани флуоресцеин детектован помоћу анти-флуоресцеин антитела конјугованог са пероксидазом, у присуству одговарајућег ензимског супстрата, при чему се *TUNEL*-позитивни нуклеуси боје тамно браон (Слика 17г). Позитивно *TUNEL* бојење је опажено у листовима свих БА-третираних изданака. При том је реакција слична оној код контролних листова, са свега неколико *TUNEL* позитивних нуклеуса у мезофилу и епидермалном слоју, запажена и на 1 μM (Слика 17ђ) и на 10 μM БА (Слика 17ж). У листовима изданака третираних 100 μM бензил аденином, већина нуклеуса мезофилних ћелија је *TUNEL* позитивна, док је јачина сâмог сигнала далеко већа него при нижим концентрацијама цитокина и указује на висок ниво фрагментације ДНК (Слика 17и).



Слика 17. Ефекат бензиладенина (БА) на сенесценцију у младим, непотпуно диференцираним (С2) листовима дувана. Као позитивна контрола, пресек је третиран ДНАзом да би се добило *TUNEL*-позитивно бојење нуклеуса (а). Као негативна контрола, *TdT* ензим је изостављен из реакционе смеше (б). Попречни пресек кроз нетретирани контролни С2 лист обојен хематоксилином (в) и *TUNEL* бојењем (г). Попречни пресек кроз С2 лист након третмана 1 μM БА, обојен хематоксилином (д) и *TUNEL* бојењем (ђ). Попречни пресек кроз С2 лист након третмана 10 μM БА, обојен хематоксилином (е) и *TUNEL* бојењем (ж). Попречни пресек кроз С2 лист након третмана 100 μM БА, обојен хематоксилином (з) и *TUNEL* бојењем (и). Бар = 40 μm . Горњи епидермис (ГЕ), доњи епидермис (ДЕ), палисадни мезофил (ПМ), сунђерасти мезофил (СМ). Стрелице показују *TUNEL*-позитивне нуклеусе.

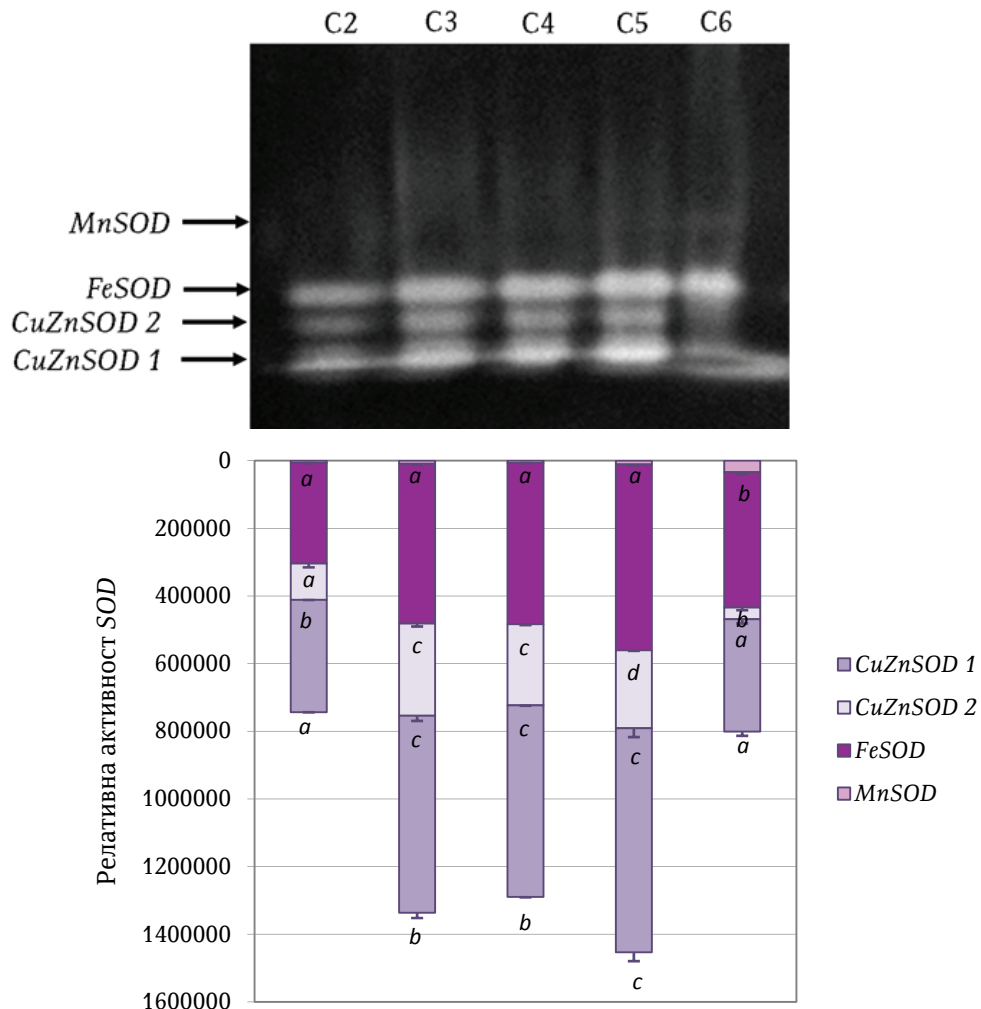
4.7 Активност антиоксидативног система током сенесценције листова дувана

4.7.1 Супероксид дисмутаза

Активност и заступљеност различитих изоформи супероксид дисмутаза у листовима *in vitro* гајених биљака дувана испитивана је ензимским есејем на гелу. Укупни солубилни протеини из екстракта листова карактеристичних морфогенетских стадијума раздвојени су нативном електрофорезом, а идентификација различитих изоформи извршена је на основу њихове различите осетљивости на дејство инхибитора *KCN* и H_2O_2 (Слика 18).

Појава различитих изоформи констатована је поређењем трака на контролном и геловима третираним инхибиторима. Детектована је активност једне *MnSOD* изоформе (неосетљиве на дејство инхибитора), једне *FeSOD* (осетљиве на дејство H_2O_2) и две *CuZnSOD* изоформе (осетљиве на дејство оба инхибитора, *KCN* и H_2O_2). Активност обе *CuZnSOD* изоформе

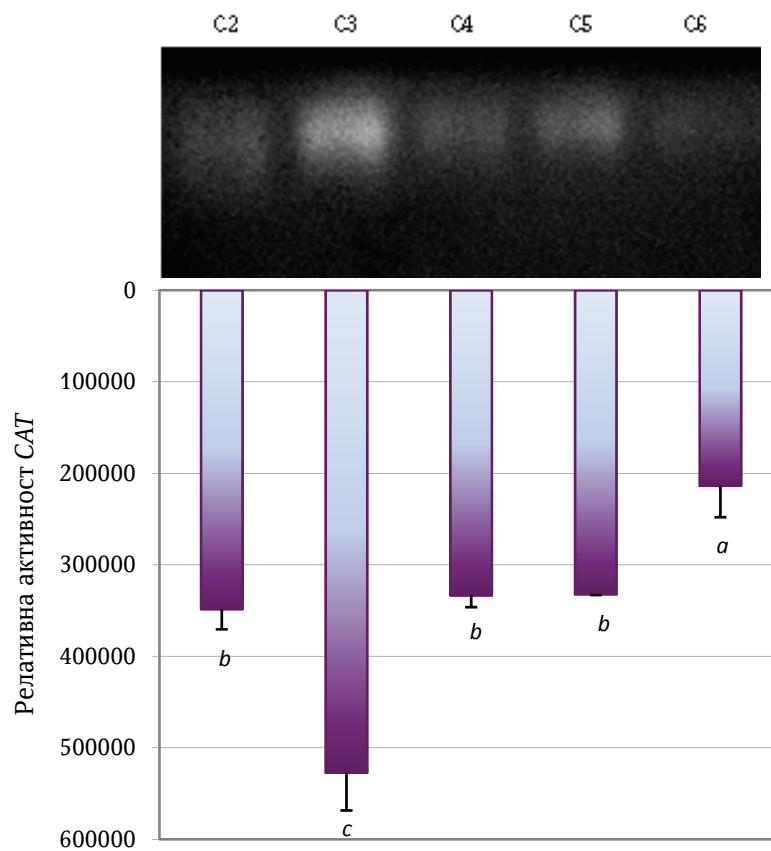
највећа је у иницијалној фази сенесценције и опада са одмицањем овог процеса, тако да се спорије мигрирајућа *CuZnSOD 2* више готово не може детектовати у екстрактима сенесцентних С6 листова (Слика 18). Активност *FeSOD*, као и *MnSOD* расте са старошћу листа. Активност *FeSOD* највећа је у млађим сенесцентним листовима, а у касној фази сенесценције она представља главну изоформу овог ензима (Слика 18).



Слика 18. Нативна електрофореза солубилних протеина из листова различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum*. За електрофорезу је коришћено 50 μ g протеина. Различите SOD изоформе су посебно обележене (ширелице). Релативна активност ензима изражена је у арбитрарним денситометријским јединицама. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента \pm SE. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

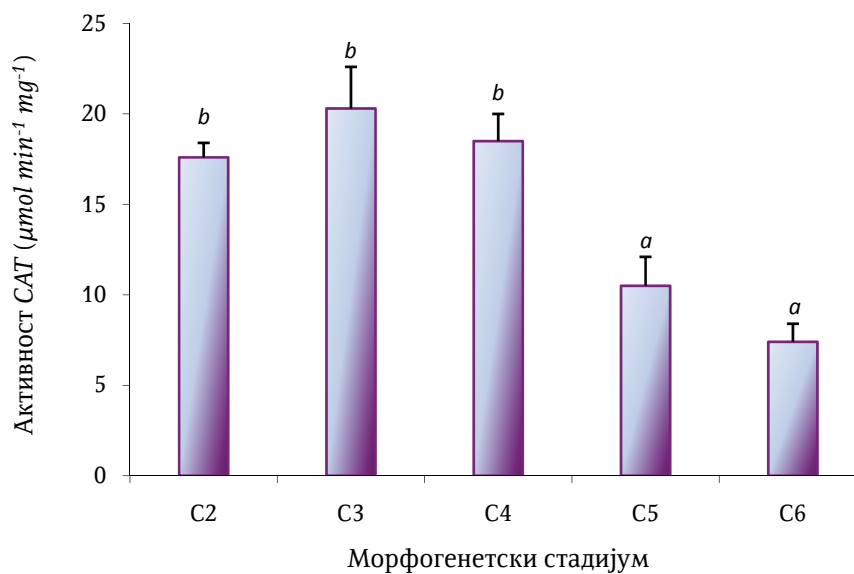
4.7.2 Каталазе

Промена активности каталазе праћена је у листовима карактеристичних морфогенетских стадијума. Укупни солубилни протеини раздвојени су методом нативне електрофорезе на 10%-ном полиакриламидном гелу. Међутим, ензимским тестом нису могле бити раздвојене и идентификоване различите CAT изоформе, на чије постојање указују нејасне траке у виду „мрља“ (енг. *smears*) различите дужине (Слика 19).



Слика 19. Нативна електрофореза солубилних протеина из листова различитих морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака *Nicotiana tabacum*. За електрофорезу је коришћено 15 μ g протеина. Релативна активност ензима изражена је у арбитрарним денситометријским јединицама. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента \pm SE. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

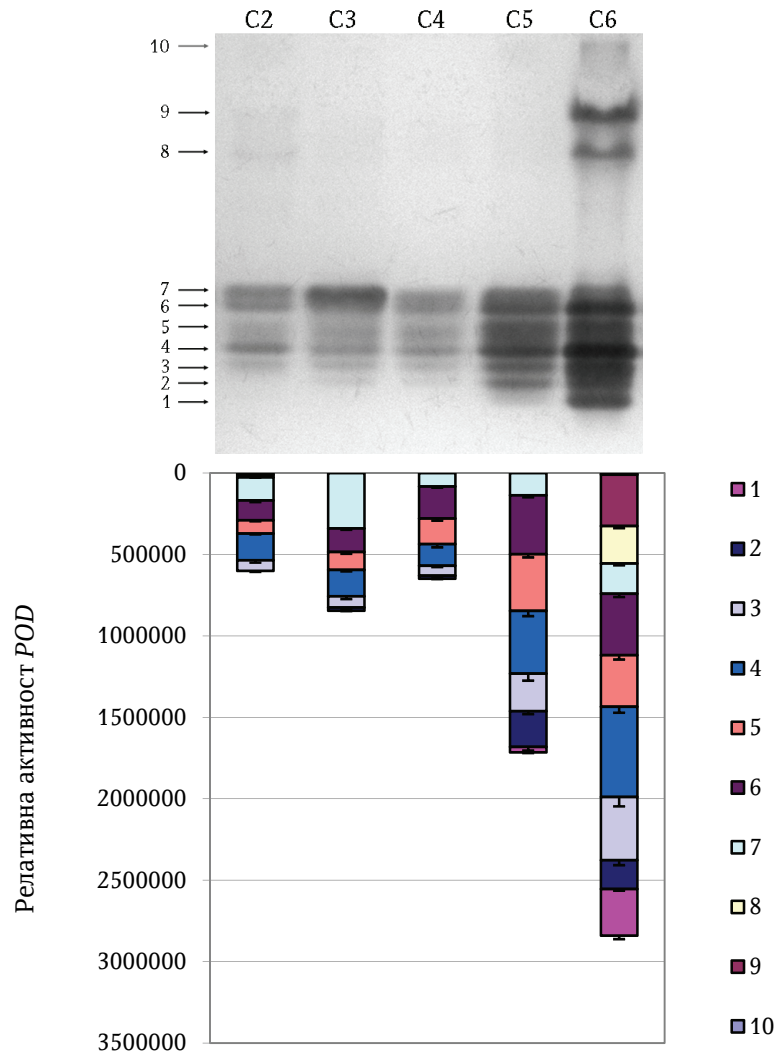
Релативна активност *CAT* највећа је у зрелим зеленим *C3* листовима (Слика 19). У раној фази сенесценције она опада за више од трећине вредности измерене у *C3* стадијуму, а у касној *C6* фази сенесценције износи свега 40% максималне вредности. На основу добијених резултата спектрофотометријске квантификације активности укупних каталаза уочава се драстичан пад *CAT* активности у раној фази сенесценције, на 50% вредности детектоване у зрелим зеленим листовима (Слика 20).



Слика 20. Специфична активност каталазе у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum*, одређена спектрофотометријском методом. Резултати представљају средњу вредност три независна експеримента $\pm SE$. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

4.7.3 Пероксидазе

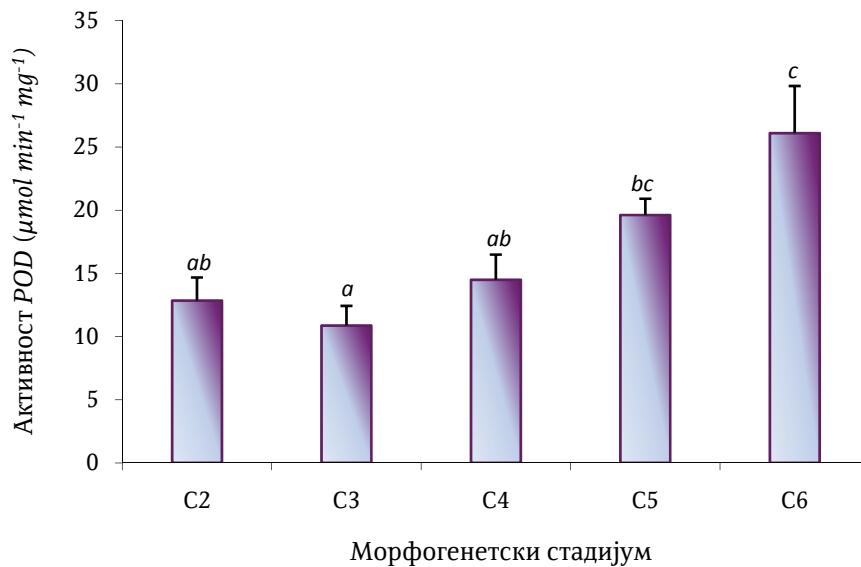
Активност и заступљеност различитих изоформи пероксидаза у листовима *in vitro* гајених биљака дувана испитивана је ензимским тестом на гелу. Укупни солубилни протеини из екстракта листова карактеристичних морфогенетских стадијума раздвојени су нативном електрофорезом на 10%-ном полиакриламидном гелу (Слика 21).



Слика 21. Нативна електрофореза солубилних протеина из листова различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum*. За електрофорезу је коришћено 25 μ g протеина. Различите *POD* изоформе (1-10) су посебно обележене (сврелице). Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента \pm SE. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

Специфичним бојењем гелова детектовано је десет различитих изоформи пероксидаза, чија се заступљеност и активност у листовима посматраних морфогенетских стадијума значајно разликују (Слика 21). У младом C2 листу јасно се разликује пет *POD* изоформи (3, 4, 5, 6 и 7), док су изоформе 8 и 9 једва уочљиве. У зрелим зеленим листовима појављује се и *POD* 2; изоформа 7 у њима достиже максималну активност, док се изоформе

8 и 9 више не запајају. Током сенесценције расте активност изоформе *POD* 6, а најупадљивији је драстичан пораст активности *POD* 4 изоформе: она је на C5 ступњу већа за 140%, а на C6 ступњу за чак 240% у односу на вредност забележену у зрелом зеленом C3 листу. У сенесцентним листовима појављује се *POD* 1 изоформа која није запажена на претходним морфогенетским ступњевима, а чија активност значајно расте са напредовањем сенесценције, па је тако релативна активност *POD* 1 у C6 стадијуму 8.5 пута пута већа него у раној фази сенесценције (C5 стадијум). Такође, за касни стадијум сенесценције (C6) карактеристичне су и споро мигрирајуће изоформе *POD* 8 и 9, као и *POD* 10 која није запажена ни на једном од претходних морфогенетских ступњева.



Слика 22. Укупна *POD* активност у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum*, одређена спектрофотометријском методом. Резултати представљају средњу вредност два независна експеримента \pm SE. Вредности означене истим словом не показују статистички значајну разлику ($p < 0.05$).

Специфична активност укупних пероксидаза значајно зависи од развојног стадијума листа (Слика 22). Она расте са физиолошком старошћу листа, тако да су у раној фази сенесценције измерене вредности за око 80% веће од оних у зрелом зеленом листу C3, док је у касном стадијуму сенесценције забележена чак 2.4 пута већа активност пероксидаза.

4.8 Разградња протеина и ремобилизација азота

Са циљем да се окарактеришу промене генске експресије повезане са сенесценцијом, примењена је *qRT-PCR* метода. За све реакције коришћена је РНК екстрахована из листова посматраних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана, а ниво експресије циљних гена нормализован је у односу на ген за актин (*NtAct*) као референтни ген.

4.8.1 Разградња протеина у сенесцентним листовима

Цистеин протеазе са разноврсним протеолитичким функцијама учествују у различитим физиолошким и развојним процесима код биљака. *NtCP1* је цистеин протеаза дувана специфична за сенесценцију, ортологна *SAG12* протеази *Arabidopsis thaliana*. Као и *SAG12*, и *NtCP1* припада класи *I* *SAG*-гена, који су специфични за сенесценцију јер се експримирају само у сенесцентним листовима. Насупрот томе, класа *II* *SAG*-гена има ниску базалну експресију током читавог развића листа, али се њихова експресија значајно повећава на почетку сенесценције. Овој групи припада цистеин протеаза дувана *NtCP23*. *NtMC* је цистеин протеаза дувана из групе метакаспаза, хомологих анималним каспазама које имају централну улогу у програмираној ћелијској смрти код животиња. Код биљака метакаспазе учествују у регулацији *PCD*-а у условима стреса, током старења и ембриогенезе.

Експресија ове три цистеин протеазе праћена је у листовима карактеристичних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана, а резултати су приказани у Табели 10.

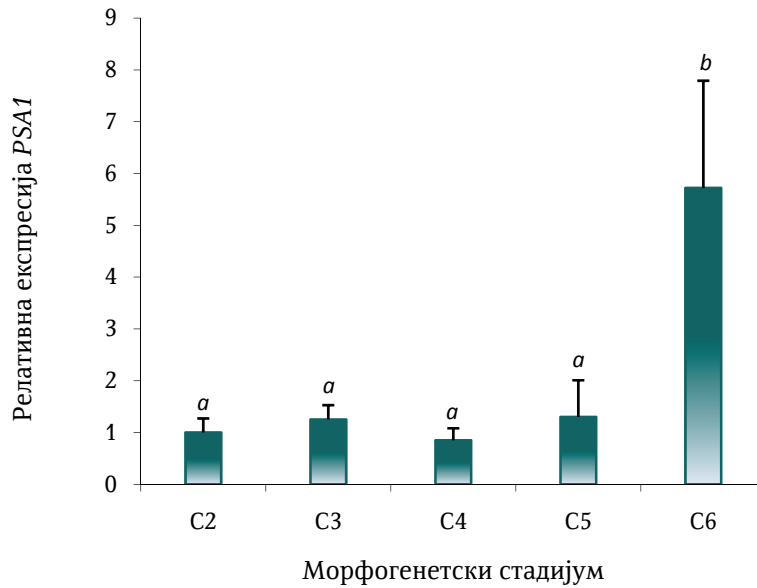
Табела 10. Ниво транскрипта цистеин протеаза у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum* старих ~8 недеља. Релативне количине су прерачунате и нормализоване у односу на ниво транскрипта *NtAct* ($n=2$).

Морфогенетски стадијум	<i>NtCP1</i>	<i>NtCP23</i>	<i>NtMC</i>
C2	0.005 ± 0.005 <i>a</i>	0.576 ± 0.241 <i>a</i>	0.333 ± 0.153 <i>a</i>
C3	0.002 ± 0.002 <i>a</i>	0.234 ± 0.106 <i>a</i>	0.204 ± 0.154 <i>a</i>
C4	0.023 ± 0.022 <i>a</i>	0.656 ± 0.190 <i>a</i>	0.339 ± 0.021 <i>a</i>
C5	0.146 ± 0.133 <i>a</i>	0.667 ± 0.196 <i>a</i>	0.507 ± 0.092 <i>a</i>
C6	5.941 ± 1.806 <i>b</i>	4.954 ± 0.324 <i>b</i>	2.553 ± 1.450 <i>a</i>

($p < 0.05$ за *NtCP1*; $p = 0.0001$ за *NtCP23*; $p = 0.1947$ за *NtMC*)

Експресија *NtCP1* гена током развића листа налази се готово на граници детекције све до иницијалне фазе сенесценције (C5 стадијума) када долази до пораста нивоа *NtCP1* транскрипта 67 пута у односу на зрели C3 лист. Са одмицањем процеса сенесценције, забележен је драстичан пораст експресије *NtCP1* (више од 2700 пута већи него у C3 стадијуму). Слично томе, експресија гена који кодира *NtCP23* не мења се значајно све до касне фазе сенесценције, када је ниво транскрипта овог гена више од 20 пута већи него у зромом C3 листу. Ниво транскрипта *NtMC* гена се такође повећава у касној фази сенесценције у односу на млађе стадијуме, мада ово повећање није статистички значајно.

За процес сенесценције листа, осим масовне деградације протеина, велики значај има и селективно уклањање специфичних протеина убиквитин-посредованим протеолитичким путем. Експресија α -субјединице протеазома (енг. „*proteasome A-type subunit*“) дувана, *NtPSA1*, анализирана је помоћу *qRT-PCR* методе у листовима на различитим стадијумима развића (Слика 23). Ниво транскрипта *NtPSA1* не мења се значајно у посматраним морфогенетским стадијумима све до касне фазе сенесценције, у којој је забележена његова индукција (петоструки пораст експресије у односу на јувенилни C2 стадијум).



Слика 23. Експресија *PSA1* у листовима различитих морфогенетских стадијума биљака *Nicotiana tabacum*, приказана у односу на експресију у најмлађем (C2) листу, која је нормализована на 1.

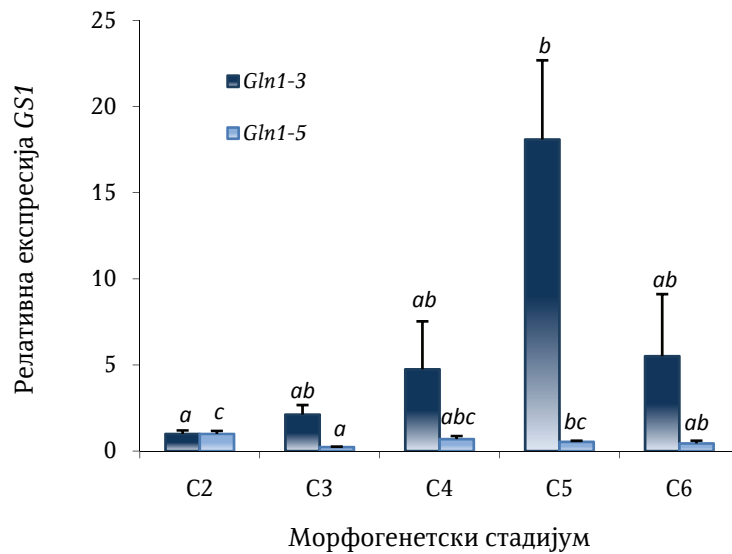
4.8.2 Метаболизам аминокиселина у сенесцентним листовима

4.8.2.1 Промене нивоа транскрипција гена за кључне ензиме асимилације нитрата и амонијака (азота)

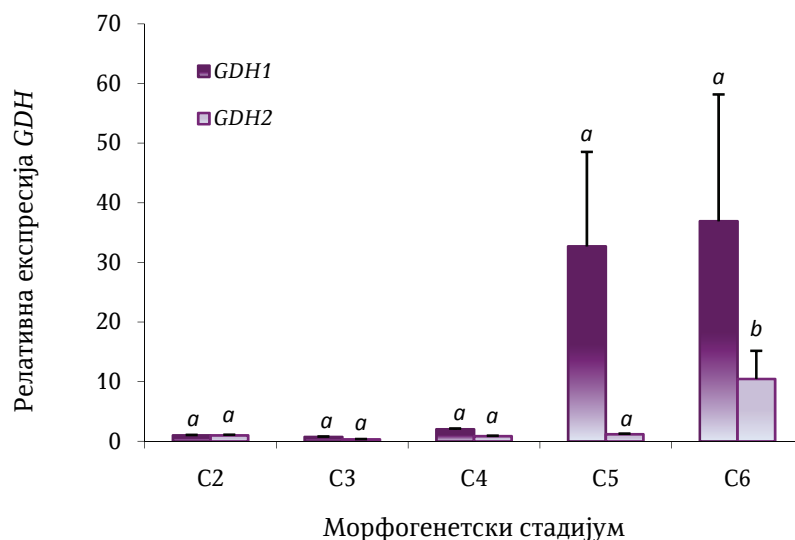
Основне молекуларне промене везане за асимилацију азота, које се дешавају током сенесценције листова, испитиване су праћењем нивоа транскрипата репрезентативних маркер ензима укључених у асимилацију азота (нитрат редуктазе, глутамин синтетазе и глутамат дехидрогеназе) у листовима на различитим стадијумима развића *in vitro* гајених биљака дувана помоћу квантитативне *RT-PCR* методе.

У циљу проучавања процеса асимилације и ремобилизације азота током физиолошког старења листа, анализирана је експресија гена маркера повезаних са сенесценцијом, *GS1* (цитосолне глутамин синтетазе, *E.C.* 6.3.1.2) и *GDH* (глутамат дехидрогеназе, *E.C.* 1.4.1.2), укључених у мобилизацију азота у сенесцентним листовима. Такође је анализирана и експресија гена укључених у примарну асимилацију азота, *NIA* (нитрат

редуктазе, E.C. 1.6.1.1), односно реасимилацију амонијака продукованог током фотореспирације, GS2 (хлоропластне глутамин синтетазе).

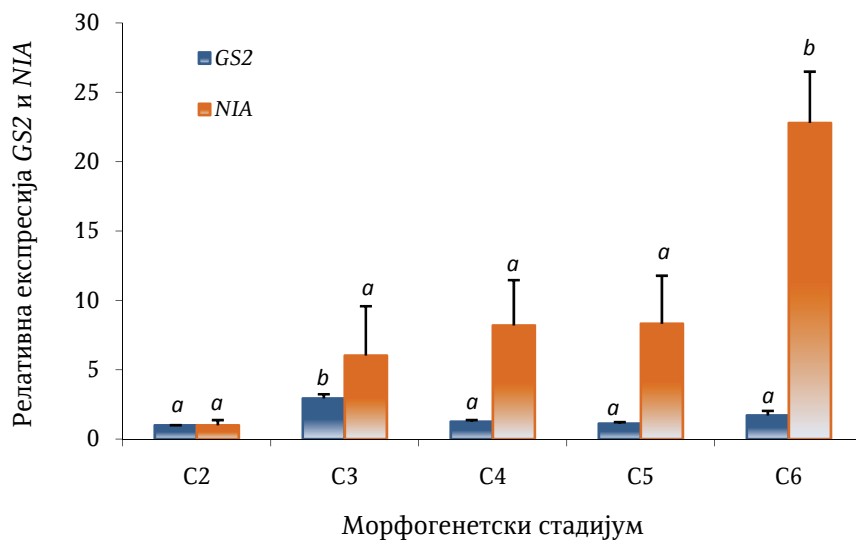


Слика 24. Експресија цитосолних GS1 изоформи Gln1-3 и Gln1-5 у листовима различитих морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака *Nicotiana tabacum*, приказана у односу на експресију у најмлађем (C2) листу, која је нормализована на 1.



Слика 25. Експресија GDH у листовима различитих морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака *Nicotiana tabacum*, приказана у односу на експресију у најмлађем (C2) листу, која је нормализована на 1.

Експресија два гена који кодирају цитосолну *GS1* (*Gln1-3* и *Gln1-5*) у листовима карактеристичних морфогенетских стадијума приказана је на Слици 24. Ниво транскрипта *Gln1-3* гена постепено расте са физиолошком старошћу листа, све до C5 стадијума, када је забележен његов нагли пораст (18 пута већа експресија у односу на вредност забележену у C2 стадијуму), док се експресија *Gln1-5* не мења значајно током матурације и сенесценције листа. Нивои транскрипата оба гена за глутамат дехидрогеназу налазе се на граници детекције и у јувенилним и у зрелим зеленим листовима (Слика 25). *GDH1* показује нагли пораст експресије (готово 33 пута) у C5 стадијуму у односу на C2, док се експресија *GDH2* одржава на веома ниском нивоу све до касне фазе сенесценције, када је забележен њен 10-оструки пораст у односу на C2 стадијум.



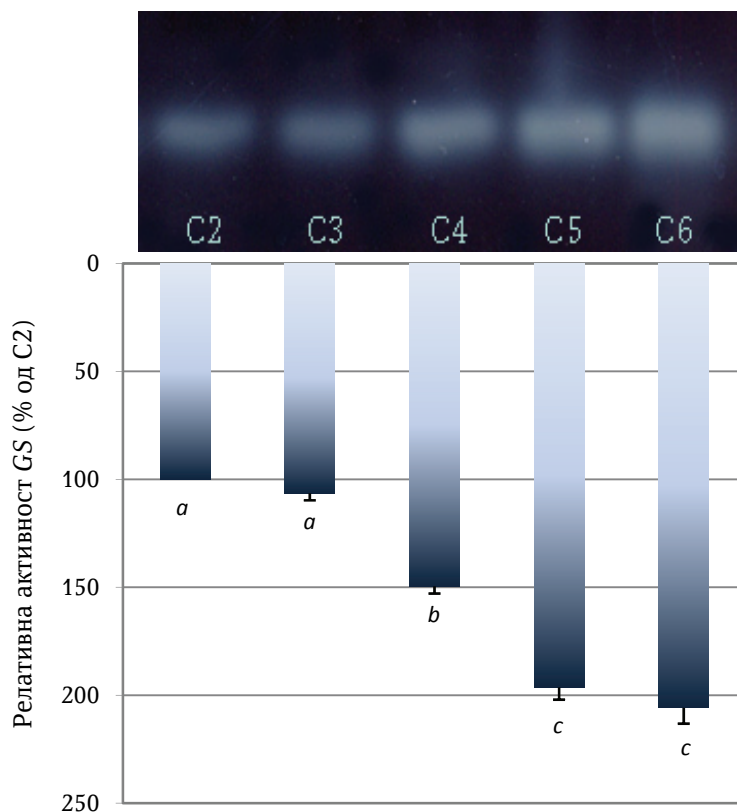
Слика 26. Експресија *GS2* и *NIA* у листовима различитих морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака *Nicotiana tabacum*, приказана у односу на експресију у најмлађем (C2) листу, која је нормализована на 1.

Експресија гена укључених у примарну асимилацију азота, *NIA*, односно реасимилацију амонијака продукованог током фотореспирације, *GS2*, приказана је на Слици 26. Током процеса диференцирања листа долази до индукције *GS2* па је ниво *GS2* транскрипта највећи у зрелом зеленом C3 листу. Већ у следећем стадијуму (C4) забележен је пад његове експресије, а ниво *GS2* транскрипта се више не мења значајно током даље морфогенезе

листа. Експресија гена за нитрат редуктазу постепено расте током диференцирања и сазревања листа (Слика 26). До наглог пораста нивоа транскрипта *NIA* долази у касној фази сенесценције, у С6 стадијуму.

4.8.2.2 Активност укупне глутамин синтетазе

Ради испитивања промена активности глутамин синтетазе у листовима карактеристичних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана, укупни солубилни протеини из екстракта листова раздвојени су методом нативне електрофорезе на 7%-ном полиакриламидном гелу (Слика 27). Међутим, ензимским тестом на гелу нису могле бити раздвојене и идентификоване различите *GS* изоформе (цитосолна и хлоропластна).



Слика 27. Нативна електрофореза солубилних протеина из листова различитих морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака *Nicotiana tabacum*. За електрофорезу је коришћено 50 μ g протеина.

Активност укупне глутамин синтетазе расте са физиолошком старошћу листа (Слика 27). Релативна *GS* активност незнатно се мења током диференцирања јувенилног C2 листа, а затим снажно расте током матурације, па је она у старијем зрелом зеленом листу (C4) за око 50% већа него у млађем (C3) стадијуму. Следећи нагли пораст *GS* активности (за готово 50% у односу на претходни стадијум) забележен је у раној фази сенесценције (C5), а у касној C6 фази она достиже максималну вредност (Слика 27).

5. ДИСКУСИЈА

Сенесценција листова се обично дефинише као низ биохемијских и физиолошких процеса који чине финални ступањ развића све до смрти ћелија (*Smart 1994*). Она представља кључну развојну фазу у животу и једногодишњих и вишегодишњих биљака, која је подједнако уређена и комплексна као и било која друга фаза у развићу. Током свог животног века, лист пролази кроз барем три фазе развића. У почетку се он развија брзо, усвајајући угљеник и азот, уз рапидну синтезу протеина, све док не досегне пун фотосинтетички капацитет. Зрели лист представља важан фактор који доприноси снабдевању читаве биљке угљеником, док се за то време промет протеина одржава на доследно ниском нивоу. Ово се наставља све док унутрашњи или спољашњи услови не иницирају почетак сенесценције, период масовне мобилизације азота, угљеника и минерала из зрелог листа у друге делове биљке (*Feller & Keist 1986, Buchanan-Wollaston 1997, Fischer 2007*).

Све ћелије мезофила листа подлежу сличном програму сенесценције, који укључује рециклирање и експортовање хранљивих материја у друге биљне делове и разградњу ћелијских компоненти, што резултира смрћу ћелија. Први видљиви симптом сенесценције јесте жућење листова услед деградације хлорофила, иако се до тог времена већ збила већина корака у процесу сенесценције (*Buchanan-Wollaston et al. 2003*). Финална фаза започетог процеса сенесценције јесте смрт листа, која се активно одлаже све док из њега не буду експортоване све хранљиве материје.

До сада су проучавани различити аспекти сенесценције листа, нпр. физиолошки, биохемијски, молекуларни и анатомски (*Noodén 1988, Matile 1992, Buchanan-Wollaston 1997, Quirino et al. 2000, Simeonova & Mostowska 2001*). Анализа сенесценције у различитим биљним системима и експериментима који користе различите методе индукције је често давала опречне резултате које је понекад тешко интерпретирати, па су упркос опсежним биохемијским и физиолошким истраживањима, многа питања везана за сенесценцију остала без одговора.

5.1 Морфолошка карактеризација

У раду су коришћене биљке гајене *in vitro*, исклијане из стерилних семена на хранљивим подлогама дефинисаног састава, у асептичним и контролираним условима средине, чиме је обезбеђено добијање релативно униформног биљног материјала ослобођеног од патогена и инфекција бактеријама и гљивама. Специфични услови *in vitro* културе могу довести до појаве абнормалности у морфологији, анатомији и физиологији биљака (Pospíšilová *et al.* 1998). По правилу, листови *in vitro* гајених биљака обично имају измењену анатомију, укључујући издигнуте стоме у облику прстена, слабо диференциран палисадни паренхим, крупне међућелијске просторе у мезофилу, као и редуковану дебљину кутикуле и епикутикуларног воска (Pospíšilová *et al.* 1999, Radochová & Tichá 2009). Ове модификације могу бити последица ниске осветљености, ниске концентрације CO_2 током фотопериода, сахарозе у медијуму, слабе аерације и високе релативне влажности у судовима за гајење.

5.2 Структурне промене мезофилних ћелија и аспекти програмиране ћелијске смрти током сенесценције листова

Цитолошком анализом одредили смо редослед промена повезаних са сенесценцијом у мезофилним ћелијама листова *in vitro* гајених биљака дувана. На ултраструктурном нивоу, први корак у сенесценцији листа укључује промене у структури грана лоцираних у хлоропластима, за чим следи појава липидних пластоглобула. Сматра се да је формирање пластоглобула повезано са разградњом тилакоидних мембрана која прати сенесценцију, тачније да оне представљају преостале хидрофобне компоненте деградираних тилакоидних мембрана које се стапају у липидне капљице (Biswal & Biswal 1988, Matile 1992). Ове ране деградационе промене хлоропласта, које осим разарања ултраструктуре, укључују и губитак хлорофила и протеина, запажене су већ у старијим зрелим зеленим

листовима, који још не показују видљиве симптоме сенесценције. Осим тога, на овом ступњу је у појединим мезофилним ћелијама јасно детектована *PCD*-специфична фрагментација ДНК. Ипак, већина једара мезофилних ћелија је инатктна, што им омогућава да правилно функционишу све до финалних фаза сенесценције и програмиране ћелијске смрти повезане са њом. Током каснијих ступњева *PCD*-а у сенесцентним листовима долази до даље фрагментације ДНК, кондензације хроматина и вакуоларног колапса. Ово доводи до дезинтеграције плазма мембране и осталих ћелијских мембрана, и коначно до губитка ћелијске хомеостазе.

Губитак структурног интегритета ћелијских мембрана се иницира веома рано и важна је карактеристика сенесценције. Сенесценција различитих ћелијских мембрана није синхронизована. Анализа сенесцентних листова јечма и кукуруза је показала да мембране тилакоида прве подлежу деградацивним променама. За њима следе структурне промене унутрашњих митохондријалних мембрана, а затим коначно долази до разградње двојне мембране овојнице хлоропласта (Kolodziejek et al. 2003). Несинхронизована разградња ћелијских мембрана током сенесценције је у складу са чињеницом да су катаболизам макромолекула и деградација мембрана и органела метаболички повезани са производњом енергије и транслокацијом угљеника, азота и минерала у друге делове биљке (Matile 1992). Ради ефикасности овог процеса, структурни интегритет појединих ћелијских мембрана се мора очувати до касних ступњева сенесценције.

Разградња хлоропласта и њихових компоненти је један од најзначајнијих аспеката синдрома сенесценције, који резултира смањењем фотосинтетичке активности (Noodén et al. 1997, Krupinska & Humbeck 2004). Ултраструктурне промене хлоропласта током сенесценције подсећају на промене узроковане различитим срединским агенсима који индукују оксидативни стрес (Kolodziejek et al. 2003). Приликом оксидативног стреса, као и током сенесценције, долази до бубрења тилакоида и повећања броја пластоглобула, што је праћено фотодеструкцијом пигмената и инхибицијом фотосинтезе. Оксидативни стрес у хлоропластима обично расте са старошћу листа (Munné-Bosch & Alegre 2002). Због тога се фотосинтетички апарат мора

организовано демонтирати, како би се предупредили фотооксидативни процеси који могу довести до липидне пероксидације и ћелијске смрти.

Ултраструктурне промене митохондрија запажене су релативно рано, у појединим ћелијама старијег зрелог (С4) листа, иако се оне по правилу јављају међу последњима у низу ултраструктурних промена (Kolodziejek et al. 2003). О ултраструктурним променама митохондрија током сенесценције листова нема много публикованих података. Код животиња, митохондрије остају целовите током већег дела апоптотског процеса и имају кључну улогу у контроли *PCD*-а тако што отпуштају цитохром *c* у цитосол, чиме активирају каспазе. Ослобађање цитохрома *c* и других фактора из митохондрија може имати важну улогу у смрти биљних ћелија (Jones 2000, Orzáez et al. 2001)

Везикулација мембранског система цитоплазме је специфична одлика која се често јавља у апоптотичним биљним ћелијама функционално различитих и специјализованих органа и ткива (Vanyushin et al. 2004). У мезофилним ћелијама листова *in vitro* гајених биљака дувана, специфична фрагментација цитоплазме, односно формирање у вакуоли једномембранских везикула испуњених цитоплазматским матриksom који може садржавати ћелијске органеле, запажена је релативно рано, већ у старијим зрелим листовима без видљивих симптома сенесценције.

Значајна промена у ултраструктури мезофилних ћелија је кондензација хроматина у њиховим једрима. Ово је релативно касна промена, која је запажена у једрима појединих ћелија видљиво сенесцентних листова дувана. Насупрот томе, кондензација једарног хроматина у мезофилним ћелијама сенесцентних листова кукуруза и јечма претходи деградацији тилакоида и порасту броја пластоглобула и представља једну од најранијих деградативних промена (Kolodziejek et al. 2003). Многи аутори су описали кондензацију хроматина у вези са програмираном ћелијском смрти код биљака (Greenberg 1996, Beers 1997, Nooden et al. 1997, Pennel & Lamb 1997, Yen & Yang 1998, Simeonova et al. 2000). Премда је поједини аутори сматрају једним од обележја *PCD*-а, ипак постоје докази да кондензација

хроматина није повезана са *PCD*-специфичном фрагментацијом ДНК и да су ова два процеса различито регулисана (Yao *et al.* 2001). Према овим ауторима, кондензација хроматина представља ранији индикатор иницијалне фазе ћелијске смрти него детекција *DNA laddering*-а.

У нашем раду показали смо следећи редослед промена повезаних са сенесценцијом у мезофилним ћелијама листова *in vitro* гајених биљака дувана: најпре се запажа фрагментација једарне ДНК, бубрење тилакоидних мембрана, благи пораст броја пластоглобула и пад садржаја пигмената; затим долази до даље фрагментације ДНК, деградације тилакоидних мембрана праћене значајним порастом броја и величине пластоглобула и даљим смањењем концентрације пигмената, кондензације хроматина заједно са разарањем различитих ћелијских мембрана. У сенесцентним листовима *in vitro* гајених биљака дувана, јасно су детектовани типични симптоми *PCD*-а (фрагментација ДНК, кондензација хроматина, контролисани колапс вакуоле). Наши резултати јасно указују да интернуклеозомална фрагментација ДНК претходи ултраструктурним променама као што су кондензација хроматина и деградација хлоропласта, што је показано и током сенесценције листова пиринча (Inada *et al.* 1998, 1999; Simeonova *et al.* 2000), кукуруза и јечма (Kolodziejek *et al.* 2003). Различите студије недвосмислено показују да је за сенесценцију листа карактеристичан континуум промена у кондензацији хроматина и фрагментацији једарне ДНК, која представља важан извор фосфора у зрелом листу, и која мора остати очувана што је могуће дуже како би се омогућило настављање генске експресије све до касних фаза сенесценције (Yao *et al.* 2001, Buchanan-Wollaston *et al.* 2003).

Током читавог процеса сенесценције, васкуларно ткиво задржава уобичајен (нормалан) изглед, са свега неколико ћелија које садрже везикуле и електрон непробојне структуре унутар вакуоле. Niewiadomska и сарадници (2009) су показали да ткиво у близини проводних снопића само делимично подлеже програму сенесценције, при чему одржавање његове фотосинтетичке компетентности коинцидира са релативно високим нивоима транскрипата гена који кодирају протеине повезане са

фотосинтезом, чија је количина у „међувенском“ мезофилу сенесцентних листова у то време већ ниска. Упркос задржавању фотосинтетичке компетенције током сенесценције листа, у венском ткиву се ипак индукују други делови програма сенесценције, што је илустровано високом експресијом *CP1* гена, као и *CAT-3* гена који кодира *CAT* изоформу повезану са сенесценцијом (Niewiadowska et al. 2009)

5.3 *PCD*-специфична фрагментација једарне ДНК

Фрагментација једарне ДНК је детектована у сенесцентним листовима различитих биљних врста, што потврђује да програмирана ћелијска смрт учествује у процесу сенесценције листа (Yen & Yang 1998, Simeonova et al. 2000). Електрофореза једарне ДНК на агарозном гелу (*DNA laddering*) и *TUNEL* есеј су најчешће коришћене методе за детекцију *PCD*-специфичне фрагментације ДНК. Користећи *TUNEL* метод, показали смо да се деградација ДНК специфична за *PCD* јавља током природне сенесценције листова дувана.

Фрагментација једарне ДНК је уочена већ у раним морфогенетским стадијумима, што значи да се програмирана смрт ћелија јавља не само у видљиво сенесцентним, већ и у врло младим листовима дувана, при чему је ниво деградације ДНК највећи у ћелијама сенесцентних листова. Наиме, пошто флуоресцеин-*dUTP* обележава слободне 3'-ОН крајеве једноланчаних прекида у једарној ДНК, јачина флуоресцентног сигнала може послужити као индекс деградираности ДНК у ћелијама које подлежу *PCD*-у (Yen & Yang 1998). Стога је ниво деградације ДНК много виши у ћелијама сенесцентних листова, јер су њихови нуклеуси јаче обојени *TUNEL* реакцијом.

Показали смо да се програмирана смрт ћелија дешава не само у сенесцентним листовима, већ и у ранијим развојним стадијумима укључујући и младе, непотпуно диференциране листове (стадијум C2). Физиолошки значај *PCD*-а у младим листовима није сасвим разјашњен, али се претпоставља да *PCD* појединих епидермалних и мезофилних ћелија рано

у развићу листа доприноси већој фотосинтетичкој ефикасности (Horii & Marubashi 2005).

5.4 Садржај хлорофила и протеина у листовима

Најочљивији доказ сенесценције код биљака представља губитак зелене боје листова услед опадања садржаја хлорофила што, заједно са разлагањем протеина, индукује постепено смањење фотосинтетичке способности (Thompson *et al.* 1987). У узорцима листова дувана испитиваних морфогенетских стадијума опажене су промене у садржају хлорофила и растворљивих ћелијских протеина током старења. Садржај хлорофила достиже максималну вредност у млађим зрелим листовима, односно пре пуне експанзије листа, након чега почиње да опада све до касних стадијума сенесценције. Однос хлорофила *a* према хлорофилу *b* не мења се значајно током сенесценције листова дувана, а слично је запажено и током сенесценције јечма и кукуруза (Kolodziejek *et al.* 2003). Такође смо показали да и садржај растворљивих ћелијских протеина континуирано опада са старошћу листа, па стога заједно са садржајем хлорофила, представља добар биомаркер за процену старости листа. Свежа маса, која расте са физиолошком старошћу листова, достиже максималну вредност на почетку процеса сенесценције, након чега драстично опада.

Деградација хлорофила и протеина је највећим делом узрокована повећањем концентрације реактивних кисеоничних врста у биљним ткивима током сенесценције (Leshem 1988), зависно од активности антиоксидативних система. Scelba и сарадници (2001) су показали да код *Prunus armeniaca* постоји позитивна корелација између промена *POD* и *SOD* активности и опадања садржаја хлорофила током сенесценције.

Губитак хлоропласта и деградација хлорофила су код *in vivo* биљака обично повезани са сенесценцијом листа. Међутим, различити аутори су показали да услови конвенционалне *in vitro* културе могу да убрзају процес сенесценције (Lucchesini *et al.* 2006, Radochová & Tichá 2009). Листови биљака

дувана гајених фотоаутоотрофно у условима високе осветљености испољавају веома рано, још током експанзије, симптоме који обично прате сенесценцију листа (*Radochová & Tichá 2008*). Међутим, рана деградација хлорофила, и то пре свега *Chl a*, није праћена опадањем стопе фотосинтезе која прати типичан онтогенетски ток. *Radochová & Tichá (2009)* су даље показали да је и формирање хлоропласта и фотосинтетичког апарата *in vitro* гајених биљака дувана умањено.

Hensel и сарадници (1993) су постулирали модел према коме је сенесценција листова иницирана опадањем фотосинтетичких процеса, које је повезано са њиховом старошћу. Они су показали да код *Arabidopsis thaliana* репродуктивно развиће не управља животним веком соматских ткива, односно да листови розете имају интринзични максимални животни век који је независан од репродуктивног статуса биљке. Штавише, показали су да зависност сенесценције од старости код *Arabidopsis thaliana* није ограничена само на листове розете, већ да обухвата сва фотосинтетичка ткива биљке. Испитујући улогу диференцијалне генске експресије у процесу сенесценције листа, нашли су да повишеној експресији *SAG*-гена претходи опадање експресије гена повезаних са фотосинтезом, као и самог процеса фотосинтезе. Један од диференцијално експримираних гена у сенесценцији хомолог је са цистеин протеазама, што је у складу са улогом његовог продукта у „спашавању“ азота. Они су предложили механицистички модел регулације гена повезаних са фотосинтезом и *SAG*-гена, по коме смањење фотосинтезе повезано са старошћу иницира активацију експресије *SAG*-гена, након чега њихови продукти започињу ремобилизацију хранљивих материја, што има за последицу смањење вијабилности ткива до тачке губитка хомеостазе и смрти. Према овом моделу, стопа смањења фотосинтезе након пуне експанзије листа одређује време отпочињања сенесценције листа.

5.5 Анализа ендогених биљних хормона

5.5.1 Садржај ендогених цитокинина

Сенесценција листа је обично повезана са смањењем нивоа ендогених цитокинина у њима (Noodén 1988, van Staden et al. 1988, Buchanan-Wollaston 1997). Садржај цитокинина, нарочито *trans*-зеатина, у горњим пре-сенесцентним листовима дувана надмашује онај у доњим сенесцентним листовима (Singh et al. 1992). У листовима *in vitro* гајених биљака дувана, напредовање сенесценције је у корелацији са постепеним опадањем концентрације укупних цитокинина. Према између посматраних морфогенетских стадијума нису уочене статистички значајне разлике у садржају физиолошки активних цитокинина, постоји јасна корелација између смањења нивоа цитокинина *trans*-зеатинског типа и напредовања сенесценције. Пад цитокинина *trans*-зеатинског типа у зрелим С3 листовима, у поређењу са јувенилним С2 листовима, не може се повезати са сенесценцијом. Штавише, у зрелим С3 листовима запажена је рапидна акумулација хлорофила, праћена диференцијацијом хлоропласта. Како је садржај цитокинина изражен по јединици свеже масе, уочени пад се може објаснити значајним порастом свеже масе услед усвајања воде током експанзије листа у раној фази развића.

За разлику од биоактивног *trans*-изомера, *cis*-зеатин има ниску биолошку активност, па је упркос распрострањености *cis*-зеатинских деривата у читавом биљном царству и високом садржају у различитом биљном материјалу, њихова биолошка улога још увек непозната (Mok & Mok 2001, Gajdošová et al. 2011). Висок удео цитокинина *cis*-зеатинског типа (59-78% укупних цитокинина) детектован је и у листовима различитих морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана. Њихов садржај, као и садржај *trans*-зеатина, мења се током онтогенезе листова дувана. Gajdošová и сарадници (2011) су показали да се ниво *trans*- и *cis*-зеатина драматично мења током животног циклуса *Arabidopsis thaliana*. За разлику од

семена, у којима *cis*-зеатини представљају доминантне метаболите, у листовима биљака *Arabidopsis thaliana* преовлађују *trans*-зеатини. Током сенесценције, ниво *trans*-зеатина опада, а равнотежа се помера у правцу *cis*-зеатина (30% укупних цитокинина). На основу промена пропорције *cis*-зеатина у садржају укупних цитокинина током онтогенезе *Arabidopsis thaliana*, Gajdošová и сарадници (2011) претпостављају да је ниво *cis*-зеатина повећан у органима у којима је растење завршено. У том смислу је интересантно да је у листовима *in vitro* гајених биљака дувана, најнижи ниво *cis*-зеатина детектован тек у касном стадијуму сенесценције.

Као могућ извор биоактивних цитокинина током природне сенесценције котиледона *Cucurbita pepo* сматрају се цитокинински нуклеотиди (Ananieva et al. 2004). Током сенесценције листова дувана цитокинински нуклеотиди показују исти тренд промена као и биоактивне базе и рибозиди, а мало је вероватно да би извор биоактивних цитокинина у сенесцентним листовима дувана могли би да буду *cis*-зеатини, обзиром да у ћелијама дувана није примећена *cis*↔*trans* изомеризација зеатина (Gajdošová et al. 2011).

Ефикасност сваког цитокинина одређена је збирним факторима, као што су ћелијска или ткивна локализација, стабилност и метаболизам. Како се расположивим методама могу квантификовати само слободни метаболити који не укључују цитокининне везане за протеине или структурне компоненте, квантитет цитокинина екстрахованих из различитих ткива не мора одражавати њихов биолошки значај *in vivo* (Mok & Mok 2001). Преовлађујуће форме цитокинина у листовима *in vitro* гајених биљака дувана свих посматраних стадијума развића јесу *N*-глукозиди, који се сматрају неактивним или слабо активним цитокининским дериватима. Интересантно је да се они уопште не могу детектовати у апексима дувана, без обзира да ли су ови прикупљени током вегетативне, прелазне или репродуктивне фазе (Dewitte et al. 1999). За разлику од вегетативних апекса и цветних пупољака, у апексима током транзиције ка цветању нису уопште детектоване слободне цитокининске базе (*Z*, *DHZ*, *iP*), док је садржај њихових рибозида био значајно снижен. Аутори су закључили да се

формирање органа (листова и цветова) карактерише повећаним садржајем цитокинина, на супрот веома ниском нивоу ендогених цитокинина у префлоралним апексима који не показују органогенезу.

5.5.2 Садржај ендогене IAA и АВА

Наши резултати су показали да садржај ендогене IAA опада током развића листова дувана, као и да се овај тренд промена наставља и током сенесценције. Слично смањење нивоа ендогених ауксина током сенесценције забележено је код различитих биљних врста (Noodén 1988), док повећање нивоа ендогене IAA у сенесцентним котиледонима *Cucurbita pepo* или листовима *Arabidopsis thaliana* сведочи у прилог њиховој улози ретарданата сенесценције (Ananieva et al. 2004, Quirino et al. 1999). Због контрадикторних података о променама нивоа ендогених ауксина током сенесценције код различитих биљних врста, тешко је генерализовати њихову улогу у регулацији сенесценције листа (Smart 1994). Обзиром да и ауксини и цитокинини учествују у регулацији нутритивног статуса биљке преко *NKX1* (Moore et al. 2003), улога ауксина у регулацији сенесценције је вероватно повезана са другим регулаторима растења и са метаболичким флуksom.

Абсцисинска киселина, регулатор растења који се у биљци ствара у одговору на различите стресне услове, повезана је такође са индукцијом сенесценције (Yang et al. 2002). У листовима *in vitro* гајених биљака дувана, динамика промена у садржају АВА током њихове онтогенезе показује сличност са променама у садржају укупних цитокинина. Максимална концентрација АВА забележена је у млађим зрелим листовима, а са физиолошким старењем листа њен садржај континуирано опада. Zeevaart & Creelman (1988) су показали да млади листови садрже највећу количину АВА, која је углавном пореклом из старијих листова. Када биљка није изложена стресу, садржај АВА је генерално веома низак током вегетативног периода. У одрезаним листовима салате пораст нивоа овог хормона запажен је напореда са падом количине слободних цитокинина и гиберелне киселине, пред сам почетак разградње хлорофила; одмах након тога

забележен је други, драстичнији пораст нивоа ендогене АВА (*Aharoni & Richmond* 1978). Аутори су претпоставили да снижење нивоа цитокинина и гиберелина означава почетак сенесценције листа, што резултира повећањем нивоа АВА након иницијације овог процеса. Експресија гена за ензиме који контролишу синтезу АВА се повећава током сенесценције (*Buchanan-Wollaston et al.* 2005, *Schippers et al.* 2007). У том смислу, неочекивано смањење садржаја АВА са напредовањем сенесценције дувана је можда могуће објаснити драстичним порастом свеже масе листова, обзиром да је концентрација АВА изражена по јединици свеже масе.

5.6 Ефекат цитокинина на програмирану ћелијску смрт током сенесценције

Основни ефекат цитокинина је да одлажу сенесценцију. Њихова улога у том процесу првобитно је проучавана егзогеном применом хормона, чиме је постигнуто одлагање сенесценције у одрезаним листовима (*Richmond & Lang* 1957).

Carimi и сарадници (2003) су показали да егзогено примењени цитокинин БА у високим дозама може блокирати пролиферацију ћелија и индуковати програмирану ћелијску смрт код *Arabidopsis thaliana* и *Daucus carota*. Пратећи експресију специфичног маркера сенесценције, *SAG12* код *Arabidopsis thaliana*, показано је да високе дозе БА (13 и 27 μM) заправо убрзавају сенесценцију, и на тај начин индукују *PCD* (*Carimi et al.* 2004). Насупрот томе, *Kobori* и сарадници (2007) су показали да висок ниво (0.8, 4.0 или 20 μM) истог цитокинина супресује *PCD* у хибридном ћелијама дувана. У нашем експерименту, позитивно *TUNEL* бојење (индикатор *PCD*-специфичне фрагментације ДНК) опажено је у листовима свих БА-третираних изданака. Применом нижих концентрација БА (1 и 10 μM) реакција је била слична оној код контролних листова, за које је претходно показано да појединачне ћелије подлежу програмираној ћелијској смрти иако у њима процес сенесценције још није започео. Дејство БА при високим

концентрацијама (30 и 100 μM) састоји се у убрзавању сенесценције, што се јасно огледа у превременом жућењу листова, и у случају изданака третираних 100 μM бензиладенином индукцијом *PCD*-а у већини мезофилних ћелија, при чему је ниво фрагментације ДНК виши него при нижим концентрацијама БА. *PCD*-индукујући ефекат није ограничен само на БА, јер су слични ефекти постигнути применом и *ZiP* и неких једињења са цитокининском активношћу (Mlejnek & Prochazka 2002). Интересантно је да се у систему *Arabidopsis thaliana* и *Daucus carota*, зеатин или други типови цитокина нису показали ефикасним, вероватно услед ефикаснијег катаболизма, у поређењу са БА.

5.7 Активност антиоксидативног система током сенесценције листова дувана

5.7.1 Супероксид дисмутазе

Супероксид дисмутазе (*SOD*) представљају прву линију одбране ћелија од дејства *ROS* (Alscher et al. 2002). Ови металоензими катализују разградњу изузетно реактивног супероксид радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$) који може настати на било ком месту у ћелији где је присутан електрон транспортни ланац, укључујући митохондрије, хлоропласте, микрозоме, глиоксисоме, пероксисоме, апопласт и цитосол. Стога не чуди да су *SOD* присутне у различитим ћелијским одељцима, у којима њихова активност значајно варира у зависности од услова спољашње средине, врсте ткива, стадијума развића биљке (Dat et al. 2000, Alscher et al. 2002). Три основне групе *SOD* које се могу наћи у биљкама разликују се међусобно по металном кофактору у активном месту ензима. *CuZnSOD* су преобладајуће лоциране у цитосолу и хлоропластима биљних ћелија и веома су осетљиве на дејство цијанида и H_2O_2 ; *MnSOD* су лоциране у митохондријалном матриксу и пероксисомима, и неосетљиве су на дејство цијанида и H_2O_2 ; *FeSOD* се обично налазе у хлоропластима и нису осетљиве на цијанид али их инхибира H_2O_2 (Sheng et al. 2004). Иако су у екстрактима листова дувана нађене све

три групе *SOD*, уопштено се може рећи да је цитосолна *CuZnSOD* најобилнија *SOD* активност у екстрактима листова дувана (*Sheng et al.* 2004).

Специфичним ензимским тестом на гелу, у листовима одабраних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана, детектована је активност две *CuZnSOD* изоформе, једне *FeSOD* и једне *MnSOD* изоформе. Показано је да се *SOD* статус листова мења са њиховом физиолошком старошћу. Током диференцијације јувенилног листа долази до значајног пораста укупне *SOD* активности. Она достиже свој максимум у раној фази сенесценције (стадијум С5) да би у току даљег процеса драстично опала готово до вредности забележених у младом, непотпуно диференцираном листу. Током сенесценције најдрастичнији пад релативне активности показан је код *CuZnSOD*, нарочито код изоформе 2. Са напредовањем сенесценције, повећава се једино активност *MnSOD* изоформе.

Брже мигрирајућа *CuZnSOD* изоформа детектована у листовима *in vitro* гајених биљака дувана највероватније представља хлоропластну *CuZnSOD*. *Kurepa et al.* (1997) су испитивали специфичне функције *CuZnSOD* и *FeSOD* лоцираних у хлоропластима листова дувана, претпостављајући да присуство двеју изоформи у истој органели мора имати физиолошки значај и да се њихова коегзистенција може објаснити различитом локализацијом у органели, као и различитим развојним процесима са којима су повезане. Ниво активности хлоропластне *CuZnSOD* је био највећи у младим листовима и постепено опадао са старошћу листа, истовремено одражавајући градијент одговарајуће *sodCp mRNA*. Насупрот томе, показано је да *FeSOD* активност расте са старошћу листа, а у зрелим и сенесцентним листовима детектована је додатна *FeSOD* изоформа, чија је активност расла са старењем. У најстаријем анализираном листу, две *FeSOD* изоформе су биле преовлађујуће *SOD* изоформе. У старијим сенесцентним листовима *in vitro* гајених биљака дувана такође смо уочили да *FeSOD* представља предоминантну изоформу.

Mýtinová и сарадници (2011) су у листовима дувана различите старости детектовали три *SOD* изоензима (*MnSOD*, *FeSOD* и три *CuZnSOD*

траке). Они су показали да *FeSOD*, лоцирана у хлоропластима, највећим делом доприноси укупној *SOD* активности. *SOD* активност, изражена по јединици масе протеина, незнатно се мења током сазревања и старења листова. Међутим, изражена по јединици свеже масе, активност свих *SOD* изоензима опада са старошћу листа (*Mýtinová et al. 2011*). Слично томе, *Dertinger* и сарадници (2003) су показали да активност *SOD* достиже свој максимум на почетку развића листа, и да је значајно редукована у сенесцентним листовима дувана. Резултати испитивања нивоа различитих антиоксиданаса и антиоксидативних ензима током развића листова дувана код биљака дивљег типа и трансгених биљака са ауторегулисаном продукцијом цитокинина која се индукује током сенесценције, показали су да пад капацитета антиоксидативног система са старошћу није узрок, већ последица сенесценције и старења биљака (*Dertinger et al. 2003*)

5.7.2 Каталазе

Истраживања сенесценције у одрезаним и интактним листовима различитих врста дала су опречне податке о тренду промена активности каталазе током сенесценције, који је очигледно специфичан за посматрану биљну врсту (*Kar & Mishra 1976, Dertinger et al. 2003, Mýtinová et al. 2011*). У нашим експериментима опажено је да активност *CAT* опада током сенесценције листова *in vitro* гајеног дувана. *Mýtinová* и сарадници (2011) су детектовали пад активности *CAT* са старењем листова дувана и код биљака дивљег типа и код *AtCKX2* трансгена са значајно сниженим нивоом ендогених цитокинина. Интересантно је да је у младим листовима ниво активности *CAT* код биљака дивљег типа готово двоструко већи него код трансгених, док је разлика у *CAT* активности између ове две групе биљака измереној у зрелим и сенесцентним листовима готово незнатна. Спектрофотометријском анализом антиоксидативних ензима у листовима *Prunus armeniaca* различите старости нису нађене значајне разлике у активности *CAT*, али су примећене промене у обрасцу изоформи *CAT* са напредовањем сенесценције (*Scebba et al. 2001*).

Различите изоформе каталазе се диференцијално експримирају у биљкама зависно од биљног ткива, стадијума развића и услова средине (Willekens et al. 1994). Нативном електрофорезом на полиакриламидном гелу ми нисмо успели да раздвојимо различите изоформе CAT. Каталазе су детектоване само у виду краћих или дужих „мрља“ (енг. *smears*), које указују на постојање више изоформи. Niewiadomska и сарадници (2009) су помоћу нативне полиакриламидне електрофорезе у екстрактима протеина листова дувана раздвојили две траке CAT активности, при чему је брже мигрирајућа изоформа редукована на почетку процеса сенесценције. *qRT-PCR* анализом ови аутори су затим показали да током сенесценције долази до драстичног пада нивоа транскрипата два CAT гена са иначе високим нивоом експресије у зрелим листовима, те да се у сенесцентним листовима може детектовати само експресија CAT-3 гена, који кодира CAT изоформу повезану са сенесценцијом (Willekens et al. 1994).

5.7.3 Пероксидазе

Пероксидазе присутне у различитим ћелијским одељцима катализују процес редукције H_2O_2 користећи електроне које преузимају од различитих донора. Већи број студија је показао пораст активности *POD* током сенесценције лисних дискова и одрезаних листова, као и током физиолошког старења листова код различитих биљних врста (Kar & Mishra 1976, Scobbba et al. 2001, Synková et al. 2006). Код неких врста *POD* активност показује супротну тенденцију током сенесценције, па се сматра да обе тенденције вероватно имају изван функциоални значај током развића листова, при чему су флукуације у ензимској активности карактеристичне за врсту (Patra & Mishra 1979).

Код *in vitro* гајених биљака дувана детектовали смо више *POD* изоформи и показали пораст укупне *POD* активности са физиолошким старењем листа. Ово повећање је последица промена у заступљености и активности појединачних изоформи, које се значајно разликују у посматраним морфогенетским стадијумима. Последица постојања

вишеструких форми ензима, локализованих у различитим ћелијским органелама, је да се за сваку од њих може постулирати одређена улога у процесу сенесценције (Scebba et al. 2001). За сенесценцију листова *in vitro* гајених биљака дувана карактеристичан је упадљив пораст активности двеју изоформи (означених као *POD* 4 и 6), као и појава у сенесцентним листовима изоформи (*POD* 1, 8, 9, 10) које нису детектоване у зрелим зеленим листовима и чија се активност повећава са напредовањем сенесценције. Synková и сарадници (2006) су показали постепени пораст *POD* активности на каснијим ступњевима развића (на почетку цветања) код контролних биљака дувана, док је код трансгених биљака са повишеном продукцијом цитокинина и одложеном сенесценцијом *POD* активност била стимулирана током читаве онтогенезе. Осим тога, *POD* активност је код обе групе биљака била изразито висока током периода *in vitro* култивације, са драстичним падом након пресађивања и оживљавања.

5.8 Разградња протеина и ремобилизација азота

Основна функција сенесценције листова је рециклирање хранљивих материја. Више од 80% азота садржаног у листовима *Arabidopsis thaliana* се експортује током сенесценције (Himmelblau & Amasino 2001). Знање о биохемијским и молекуларним механизмима који контролишу деградацију протеина и процес ремобилизације азота је још увек фрагментаран, пошто различите студије углавном испитују појединачне ензиматске реакције у датој биљној врсти (Feller & Fischer 1994, Masclaux et al. 2000, Pageau et al. 2006).

5.8.1 Разградња протеина у сенесцентним листовима

Протеолиза у биљкама је сложен процес који укључује бројне ензиме, активне у различитим ћелијским одељцима, међу којима цистеин протеазе заузимају централно место. Њихов удео у укупној протеолизи зависи од биљне врсте и посматраног органа, и може достићи чак 30% у зрелим

несенесцентним органима (*Grudkowska & Zagdanska 2004*). Активност цистеин протеаза се драстично мења у одговору на различите унутрашње и спољашње стимулусе и у неким случајевима може порастати и на 90% укупне протеолитичке активности. Експресија гена који кодирају цистеин протеазе повећава се у условима стреса, као и током различитих развојних процеса као што су клијање семена, формирање трахеарних елемената или сенесценција органа (*Linthorst et al. 1993, Ueda et al. 2000*). Цистеин протеазе сличне папаину нађене су у многим сенесцентним органима, укључујући и листове (*Lohman et al. 1994, Ueda et al. 2000, Beyene et al. 2006*).

Код дувана је идентификовано неколико цистеин протеаза (*Linthorst et al. 1993, Ueda et al. 2000*), али су тек *Beyene* и сарадници (2006) изоловали и окарактерисали ген за цистеин протеазу која је специфична за сенесценцију. Наиме, показано је да се *NtCP1* експримира само у сенесцентним листовима дувана и да се не може индуковати у зрелим зеленим листовима након излагања абиотичком стресу, те да стога представља погодан маркер за развојну сенесценцију код дувана (*Beyene et al. 2006*). *NtCP1* је ортологна *SAG12* протеази *Arabidopsis thaliana* (*Lohman et al. 1994*), чији су транскрипти присутни у веома малој количини или испод нивоа детекције у младим и зрелим зеленим листовима, а која током сенесценције листова *Arabidopsis thaliana* испољава један од највиших нивоа индукције од свих *SAG*-гена. *SAG12* је специфично индукована развојном сенесценцијом и, за разлику од других *SAG*-гена, њена експресија се не мења у условима стреса који индукују сенесценцију (*Brodersen et al. 2002*).

SAG-гени се могу сврстати у две класе на основу временског обрасца њихове експресије током сенесценције листа (*Gan & Amasino 1997*). *NtCP1*, као и *SAG12*, припада класи *I* *SAG*-гена, који су специфични за сенесценцију јер се експримирају само у сенесцентним листовима. Насупрот томе, класа *II* *SAG*-гена има ниску базалну експресију током читавог развића листа, али се њихова експресија значајно повећава на почетку сенесценције. Типичан образац експресије класе *II* показује цистеин протеаза дувана *NtCP23* (*Ueda et al. 2000*). *NtCP23 mRNA* се експримира у свим органима, а експресија и *mRNA* и одговарајућег протеина је повећана током природне сенесценције.

Стога аутори сматрају да је *NtCP23* одговорна за ремобилизацију аминокиселина, нарочито у сенесцентним листовима.

У листовима *in vitro* гајених биљака дувана показано је да до значајног пораста експресије и *NtCP1* и *NtCP23* долази тек у касној фази сенесценције, у стадијуму С6. Транскрипти *NtCP1* налазе се готово на граници детекције све до С6 стадијума, који би на основу временског обрасца експресије *NtCP1* требало да представља рани сенесцентни стадијум. Ово, пак, није у складу са ултраструктурним запажањима и другим биомаркерима сенесценције који указују на унапредовалу фазу процеса сенесценције.

Метакаспазе представљају удаљене хомологе анималних каспаза код биљака, гљива и протозоа. Код сисара, ове цистеин-зависне аспартат-специфичне протеазе имају значајну улогу „*de novo* извршиоца“ апоптотске ћелијске смрти, секући читав низ различитих апоптотских супстрата што коначно резултира у ћелијској смрти. Геном *Arabidopsis thaliana* садржи 9 гена за метакаспазе. Зависно од присуства или одсуства *N*-терминалног продужетка који подсећа на продомен иницијаторних каспаза, разликују се два типа метакаспазе (*Vercammen et al.* 2007). Метакаспазе типа *I*, које поседују овај домен, учествују у контроли ћелијске смрти код *Arabidopsis thaliana*, било као њени позитивни или негативни регулатори (*Coll et al.* 2010). Код дувана је већ раније спекулисано да протеини слични каспазама учествују у хиперсензитивном одговору, такође типу програмиране ћелијске смрти (*del Pozo & Lam* 1998). *NtMC* је цистеин протеаза дувана из групе метакаспазе типа *II*. У старијим сенесцентним листовима *in vitro* гајених биљака дувана експресија *NtMC* је повишена у односу на претходне ступњеве, што указује на вероватно учешће у развојној сенесценцији.

Цистеин протеазна активност се индукује током програмиране смрти ћелија и код биљака (*Solomon et al.* 1999). У процесу ћелијске смрти, цистеин протеазе учествују у кондензацији хроматина и фрагментацији ДНК, заједно са нуклеазама. Огледи са инхибиторима протеаза, који спречавају кондензацију хроматина и фрагментацију ДНК, указују на централну улогу протеаза у апоптотском разлагању нуклеуса, као и на то да активација

протеаза претходи активацији нуклеаза, слично као у анималној апоптози (Yao *et al.* 2001). Иако су кондензација хроматина и фрагментација ДНК посредовани различитим сигнаlima, цистеин протеазе су главни ензими у заједничком путу који иницира апоптотску деградацију ћелија.

Протеазоми деградирају специфичне протеине одређене (циљане) за протеолизу убиквитинацијом, која је важна за елиминацију абнормалних цитоплазматских протеина и за брзи обрт (промет) кратко-живећих протеина. Код животиња и квасаца, протеазоми лоцирани у једру учествују у регулацији ћелијског циклуса и других развојних процеса кроз контролу нивоа регулаторних једарних протеина, као што су циклини и транскрипциони фактори. *NtPSA1*, изолована из стубића тучка дувана показује високу сличност са хуманим *PRCI* и са *PRCI* квасца, који кодирају некаталитичку алфа-субјединицу 26S протеазома и који, попут *NtPSA1*, поседују сигнале за нуклеарну локализацију (Bahrami & Gray 1999). Показано је да се *NtPSA1 mRNA* акумулира у различитим биљним деловима, у мери која зависи од стадијума развића. Ниво *NtPSA1 mRNA* је био нарочито висок у младим ткивима која се развијају, а његов пад је детектован током сенесценције и листова и цветова. Ови резултати су указивали да би улога протеазома у биљним нуклеусима пре могла бити регулација развојних процеса кроз контролу нивоа регулаторних протеина у пролиферишућим ткивима која се развијају, него деградација и рециклирање протеина током сенесценције (Bahrami & Gray 1999). У листовима *in vitro* гајених биљака дувана, експресија *NtPSA1* није се значајно мењала од јувенилног стадијума све до касне фазе сенесценције, у којој је забележена индукција *NtPSA1*.

С друге стране, идентификација гена који кодира протеин носач убиквитина Е2-типа, са повишеном експресијом током сенесценције листова код *Nicotiana sylvestris* (Genschik *et al.* 1994), као и повишена експресија полиубиквитинског гена *SEN3* у сенесцентним листовима *Arabidopsis thaliana* (Park *et al.* 1998), указују да се убиквитин-зависна протеолиза дешава током сенесценције листова. На основу структуре гена убиквитинског пута, вероватно је да убиквитин-посредована протеолиза учествује у селективној деградацији специфичних протеина, пре него у

масовној дегарадацији протеина током сенесценције. *ORE9* (*F-box* протеин) *Arabidopsis thaliana* учествује у убиквитинацији протеина одређених за дегарадацију у протеазомима, чиме уклања специфичне циљане протеине који су потребни за одлагање сенесценције листа (*Woo et al.* 2001)

5.8.2 Метаболизам аминокиселина у сенесцентним листовима

Прелаз (енг. *switch*) са примарне асимилације азота у листовима означеним као извор (енг. *sink*) на његову ремобилизацију у сенесцентним листовима означеним као увир (енг. *source*) подразумева индукцију новог метаболичког пута иницирану специфичним сигнаlima (*Feller & Fischer* 1994, *Buchanan-Wollaston* 1997, *Noodén et al.* 1997). *Masclaux* и сарадници (2000) су показали да се, у односу на експресију ензима укључених у примарну асимилацију или ремобилизацију азота, вегетативна биљка дувана може поделити на два одељка, између којих је уочен главни преокрет у резервоарима угљеника и азота. Млади листови се понашају као извор, с обзиром да акумулирају слободне аминокиселине, док с друге стране ефикасно користе угљене хидрате за изградњу ћелијских структура и производњу енергије. Старији, сенесцентни листови се понашају као увир, јер акумулирају неоргански азот и прогресивно губе органска једињења попут угљених хидрата и аминокиселина. Између ова два ступња, постоји одређена старост листа коју углавном карактеришу висок садржај шећера и низак садржај и органског и неорганског азота, и која у смислу метаболичке активности представља преломну тачку у развићу листа. Запажање да у листовима прикупљеним дуж главне осе стабла вегетативних биљака дувана долази до наглог преокрета у резервоарима угљеника и азота, сугерише да овај прелаз представља важан фактор који контролише индукцију сенесценције листа (*Masclaux et al.* 2000).

У листовима *in vitro* гајених биљака дувана, експресија *GS1* и *GDH* гена укључених у мобилизацију азота је индукована током сенесценције. Анализа експресије два гена који кодирају цитосолну *GS1* (*Gln1-3* и *Gln1-5*) је показала да се током физиолошког старења листа индукује само *Gln1-3*

изоформа и да је њена експресија највећа у раној фази сенесценције, док се ниво експресије *Gln1-5* не мења значајно током читавог процеса сенесценције. *Brugière* и сарадници (2000) нису детектовали транскрипте *Gln1-3* гена у зрелим, већ само у сенесцентним листовима дувана. Ови аутори такође нису детектовали транскрипте флоем-специфичног *Gln1-5* гена (*Dubois et al.* 1996) ни у зрелим, ни у сенесцентним жутим листовима, на основу чега су закључили да је постепена индукција *GS1* транскрипата и полипептида током старења листа искључиво резултат повишене експресије *Gln1-3*. *GS1* је окарактерисан као „рани“ SAG-ген, док је према обрасцу експресије *GDH* сличнији „каским“ SAG-генима (*Masclaux-Daubresse et al.* 2005). *Masclaux* и сарадници (2000) су јасно показали да у листовима вегетативних биљака дувана на различитим ступњевима развића постоји снажна корелација између повећане протеолитичке активности и експресије *GS1* и *GDH*. Овиме је први пут показано да је процес разградње протеина блиско повезан са синтезом и активношћу ова два ензима, који стога представљају корисне биохемијске и молекуларне маркере старења листа и ремобилизације азота. Штавише, показано је да до индукције протеолитичке, *GS1* и *GDH* активности у листовима дувана долази у исто време када се у њима драстично мењају концентрације различитих метаболита шећера и азота, те да ниво транскрипата *GS1* и *GDH* достиже максимум у листовима који одговарају прелазу са примарне асимилације азота на његову ремобилизацију. Постоји мали број података о регулаторним механизмима који контролишу индукцију *GS1* и *GDH* током природне или индуковане сенесценције, на основу којих аутори предлажу да експресију оба ензима код биљака контролише метаболички статус листа. Пораст експресије *GS1* и *GDH* детектован је такође приликом вирусне и бактеријске инфекције које „опонашају“ симптоме природне сенесценције и доводе до активне ћелијске смрти, затим приликом оксидативног стреса, као и након примене регулатора растења повезаних са стресом (*Pageau et al.* 2006). Готово сви примењени стресови показали су ефекте сличне природној сенесценцији, укључујући и напоре смањење експресије *GS2* и *NIA* и пад укупне *GS* активности. Међутим, временски ток и величина одговора *GS1* и *GDH* били су различити код сваког појединачног стреса, указујући на вероватно независне улоге *GS1* и *GDH* у овим одговорима. У нашем

експерименту, експресија оба гена који кодирају глутамат дехидрогеназу, *GDH1* и *GDH2*, била је највиша у касној фази сенесценције. Ова касна индукција указује да *GDH* вероватно не учествује директно у процесу ремобилизације азота, већ да је њена експресија индукована накупљањем амонијума насталог услед хидролизе протеина током процеса сенесценције (Melo-Oliveira et al. 1996, Tercé-Laforgue et al. 2004).

Анализа експресије гена који кодирају хлоропластну глутамин синтетазу (*GS2*) и нитрат редуктазу (*NIA*) у листовима *in vitro* гајених биљака дувана, показала је да ниво транскрипата оба гена расте током диференцирања и сазревања листова, у складу са повећаном потребом за њиховим продукцијом у развијајућим, фотосинтетички активним ткивима. У даљем развићу, запажено је смањење нивоа транскрипта *GS2*, као и повећање нивоа *NIA* транскрипата, нарочито у касном стадијуму сенесценције. Повећање експресије *NIA* забележено у периоду сенесценције је неочекивано, обзиром да асимилација нитрата снажно опада са старењем листа. Познато је да нитрат представља примарни сигнал који регулише експресију *NIA*, у веома брзом одговору, а у регулацији експресије *NIA* учествују такође и светлост, цитокинини, CO_2 , циркадијани ритам, као и метаболити угљеника и азота, попут сахарозе и глутамина (Crawford 1995). Експресија *NIA* код различитих биљних врста је генерално индукована присуством нитрата, мада су анализе промотора дале противречне резултате (Konishi & Yanagisawa 2011). Присуство нитрата смањује активност промотора *NIA* гена код дувана (Vaucheret et al. 1992).

Masclaux и сарадници (2000) су током старења листова дувана детектовали истовремени пад нивоа транскрипата *GS2* и *NIA*. Напоредо са падом експресије одговарајућих гена, забележен је и драстичан пад активности *NIA* од најмлађег до најстаријег листа, као и смањење укупне *GS* активности, углавном представљене *GS2* активношћу. Пад *GS2* током старења листа је био праћен истовременом индукцијом *GS1*. Укупна *GS* активност у листовима *Helianthus annuus* такође опада током сенесценције, услед изразитог смањења нивоа *GS2* транскрипта као и смањења ензимске активности хлоропластне изоформе (Cabello et al. 2006). Насупрот томе,

цитосолна *GS1* активност расте са старењем листа, па аутори сматрају да однос *GS2/GS1* може да се користи као маркер сенесценције листова. Различити стресови, као нпр. излагање осетљивих биљака ниским температурама које индукују оксидативни стрес, могу довести до редукције *GS* активности, вероватно услед оксидативне деградације ензима (*Simonović & Anderson 2007*). Оксидативни стрес повезан са сенесценцијом изазива снажну инхибицију *GS2* активности, док је *GS1* изоформа много отпорнија према оксидативном оштећењу (*Cabello et al. 2006*). Супротно овим налазима, укупна *GS* активност у листовима *in vitro* гајених биљака дувана константно расте током читаве онтогенезе и у сенесцентним листовима достиже максималну вредност. Пораст укупне *GS* активности током сазревања и сенесценције детектован је и у листовима шећерне репе (*Brechlin et al. 2000*). Штавише, аутори су показали да током онтогенезе листова, поред повећања активности *GS1*, долази и до драстичног пораста активности хлоропластне изоформе, као и то да је *GS1* преобладајућа изоформа у сенесцентним листовима захваљујући високој отпорности на дејство протеолитичких ензима током сенесценције листова шећерне репе. Пораст *GS* активности током развића листа првенствено је последица пораста *GS2* активности, која је одговорна за асимилацију највећег дела амонијума у зрелим листовима, док цитоплазматска изоформа вероватно има главну улогу у незрелим ћелијама листа које се развијају (*Tobin et al. 1985*). Корелација између повећања нивоа *GS1 mRNA* и *GS1* протеина снажно указује да је синтеза протеина у највећој мери регулисана на транскрипционом нивоу (*Kamachi et al. 1991, Masclaux et al. 2000*). Одсуство овакве корелације у случају *GS2 mRNA* и одговарајућег полипептида *Kamachi* и сарадници (1992) су показали током природне сенесценције листова пиринча, где је ниво *GS2* транскрипта неколико пута већи у средњој фази сенесценције него у њеном раном стадијуму, и остаје благо повишен чак и у касној фази процеса, док ниво *GS2* полипептида постепено опада. С обзиром на пад експресије *GS2* током старења и сенесценције листова *in vitro* гајених биљака дувана, забележени пораст укупне *GS* активности у сенесцентним листовима вероватно је последица индукције *Gln1-3*, што указује да се асимилација амонијума током физиолошког старења листова постепено премешта из хлоропласта у цитосол мезофилних ћелија листа.

6. ЗАКЉУЧЦИ

- Степен сенесценције листова дувана окарактерисан је садржајем хлорофила и цитосолних протеина, који представљају поуздане биомаркере за процену релативне старости појединачних листова дуж главне осе *in vitro* гајених биљака дувана.
- Ране дегенеративне промене хлоропласта запажене су у листовима који још не показују видљиве симптоме сенесценције. Кондензација једарног хроматина је релативно касна промена, запажена у једрима појединих ћелија видљиво сенесцентних листова. Губитак структурног интегритета ћелијских мембрана, који се иницира веома рано у процесу сенесценције, резултира дезинтеграцијом плазма мембране и осталих ћелијских мембрана у касној фази сенесценције, након вакуоларног колапса.
- *PCD*-специфична фрагментација и кондензација једарне ДНК детектовани су *in situ* у сенесцентним листовима дувана, што потврђује да програмирана ћелијска смрт учествује у процесу сенесценције листа. По својим морфолошким карактеристикама она одговара аутофагној *PCD*. Интернуклеозомална фрагментација ДНК, унутар још увек интактних једара, претходи ултраструктурним променама као што су деградација хлоропласта, специфична фрагментација цитоплазме, и кондензација и маргинализација хроматина у једру.
- Суседне ћелије мезофила могу се налазити у различитим фазама ћелијске смрти, па се у групама блиских ћелија запажа континуум ултраструктурних промена.
- У листовима *in vitro* гајених биљака дувана идентификовано је и квантификовано више од 20 различитих цитокинина, међу којима преовлађују *N*-глукозиди. Напредовање сенесценције је у корелацији са постепеним опадањем концентрације укупних цитокинина, као и са смањењем нивоа цитокинина *trans*-зеатинског типа.
- Садржај ендогене *IAA* континуирано опада током онтогенезе листова дувана, док садржај ендогене *ABA*, највећи у младим зеленим листовима, опада на почетку процеса сенесценције.
- Високе дозе цитокинина БА индукују програмирану смрт ћелија тиме што убрзавају сенесценцију.

- У листовима одабраних морфогенетских стадијума *in vitro* гајених биљака дувана, детектована је активност две *CuZnSOD* изоформе, једне *FeSOD* и једне *MnSOD* изоформе. *SOD* статус листова мења се са њиховом физиолошком старошћу. Укупна *SOD* активност достиже свој максимум у раној фази сенесценције, а затим драстично опада, првенствено услед смањења активности *CuZnSOD* у касној фази сенесценције, у којој *FeSOD* представља главну изоформу овог ензима.
- Напредовање сенесценције је у јасној корелацији са смањењем активности *CAT* и повећањем укупне активности *POD*. Укупна *POD* активност расте са физиолошким старењем листа услед промена у заступљености и активности појединачних изоформи. У сенесцентним листовима појављују се *POD* изоформе које нису запажене на претходним морфогенетским ступњевима и чија активност значајно расте са напредовањем сенесценције.
- Примарну антиоксидативну заштиту током старења обезбеђују *SOD*, а у процес одбране од штетног дејства *ROS* у иницијалној фази сенесценције укључују се *POD*.
- Експресија гена који кодирају цистеин протеазе повећана је у сенесцентним листовима. Значајно повећање експресије маркер гена *NtCP1*, који припада класи *I SAG*-гена, и *NtCP23* гена (из класе *II SAG*-гена), чија је повишена експресија карактеристична за иницијалну фазу сенесценције, забележено је у стадијуму који на основу биохемијске и ултраструктурне анализе одговара фази узрапредовале сенесценције. На истом ступњу повишена је и експресија *NtMC*, а значајно се повећава и ниво транскрипта *NtPSA1* гена, укљученог у селективну елиминацију протеина.
- Експресија *Gln1-3* и *GDH2*, *SAG*-гена укључених у мобилизацију азота, индукована је током сенесценције. Експресија *GS2* опада током старења и сенесценције, па је детектовани пораст укупне *GS* активности у сенесцентним листовима вероватно последица индукције *Gln1-3* што указује да се асимилација амонијума током сенесценције постепено премешта из хлоропласта у цитосол мезофилних ћелија.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Agüera E., Cabello P., De La Haba P. (2010) Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiologia Plantarum* **138**, 256-267.
- Aharoni N. & Richmond A.E. (1978) Endogenous gibberellin and abscisic acid content as related to senescence of detached lettuce leaves. *Plant Physiology* **62**, 224-228.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341.
- Ananieva K., Malbeck J., Kamínek M., van Staden J. (2004) Changes in endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) during natural and dark-induced senescence. *Physiologia Plantarum* **122**, 133-142.
- Bahrami A.R. & Gray J.E. (1999) Expression of a proteasome alpha-type subunit gene during tobacco development and senescence. *Plant Molecular Biology* **39**, 325-333.
- Balibrea Lara M.E.B., Garcia M.C.G., Fatima T., Ehneß R., Lee T.K., Proels R., Tanner W., Roitsch T. (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* **16**, 1276-1287.
- Bate N.J., Rothstein S.J., Thompson J.E. (1990) Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **239**, 801-811.
- Beauchamp C.O. & Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-287.

- Beers E.P. (1997) Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death and Differentiation* **4**, 649-661.
- Beyene G., Foyer C.H., Kunert K.J. (2006) Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1431-1443.
- Bhalerao R., Kesiktao J., Sterky F., Erlandsson R., Björkbacka H., Birve S.J., Karlsson J., Gardeström P., Gustafsson P., Lundeberg J., Jansson S. (2003) Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology* **131**, 430-442.
- Biswal U.C. & Biswal B. (1988) Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. *International Review of Cytology* **113**, 270-321.
- Bleecker A.B. & Patterson S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1169-1179.
- Borner C. & Monney L. (1999) Apoptosis without caspases: An inefficient molecular guillotine? *Cell Death and Differentiation* **6**, 497-507.
- Bortner C.D., Nicklas B.E., Oldenburg N.B.E., Cidlowski J.A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* **5**, 21-26.
- Bradford 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.
- Brady C.J. (1988) Nucleic acid and protein synthesis. In: Noodén L.D., Leopold A.C. (eds) *Senescence and ageing in plants*. Academic Press, San Diego, pp. 147-179.
- Brechlin P., Unterhalt A., Tischner R., Mäck G. (2000) Cytosolic and chloroplastic glutamine synthetase of sugarbeet (*Beta vulgaris*) respond

differently to organ ontogeny and nitrogen source. *Physiologia Plantarum* **108**, 263-269.

Brodersen P., Petersen M., Pike H.M., Olszak B., Skov S., Odum N., Jorgensen B.L., Brown R.E., Mundy J. (2002) Knockout of *Arabidopsis* *ACCELERATED-CELL-DEATH11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes and Development* **16**, 490-502.

Brugière N., Dubois F., Masclaux C., Sangwan R.S., Hirel B. (2000) Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**, 519-527.

Buchanan-Wollaston V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**, 181-199.

Buchanan-Wollaston V. & Ainsworth C. (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence-related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* **33**, 821-834.

Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T. & Pink D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 3-22.

Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **42**, 567-585.

Buckner B., Johal G.S., Janick-Buckner D. (2000) Cell death in maize. *Physiologia Plantarum* **108**, 231-239.

- Cabello P., Agüera E., De La Haba P. (2006) Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. *Physiologia Plantarum* **128**, 175–185.
- Cadenas S.E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 79-110.
- Cao J., Jiang F., Sodmergen, Cui K. (2003) Time-course of programmed cell death during leaf senescence in *Eucommia ulmoides*. *Journal of Plant Research* **116**, 7-12.
- Carimi F., Terzi M., De Michele R., Zottini M. & Lo Schiavo F. (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Science* **166**, 963-969.
- Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M. & Lo Schiavo F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**, 413-421.
- Chiba A., Ishida H., Nishizawa N.K., Makino A., Mae T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiology* **44**, 914-921.
- Clarke P.G.H. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology* **181**, 195–213.
- Clarke A.K., MacDonald T.M., Sjögren L.L.E. (2005) The ATP-dependent Clp protease in chloroplasts of higher plants. *Physiologia Plantarum* **123**, 406-412.
- Cohen G.M. (1997) Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* **326**, 1-16.

- Coll N.S., Vercammen D., Smidler A., Clover C., Van Breusegem F., Dangl J.L., Epple P. (2010) Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science* **330**, 1393-1397.
- Crawford N. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859-868.
- Crowell D.N., Kadlecsek A.T., John M.C., Amasino R.M. (1990) Cytokinin-induced mRNAs in cultured soybean cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8815-8819.
- Danon A., Delorme V., Mailhac N. & Gallois P. (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 647-655.
- Dat J., Vandenameele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779-795.
- del Río L.A., Pastori G.M., Palma J.M. Sandalio L.M., Sevilla F., Corpas F.J., Jiménez A., López-Huertas E., Hernández J.A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* **116**, 1195-1200.
- Delorme V.G.R., McCabe P.F., Kim D.J., Leaver C.J. (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology* **123**, 917-927.
- Del Pozo O. & Lam E. (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology* **8**, 1129-1132.
- Dertinger U., Schaz U., Schulze E.D. (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase

- activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum* **119**, 19-29.
- Dewitte W., Chiappetta A., Azmi A., Witters E., Strnad M., Rembur J., Noin M., Chriqui D., Van Onckelen H. (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* **119**, 111-121.
- Dobrev P.I., Havlíček L., Vágner M., Malbeck J., Kamínek M. (2005) Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1075**, 159-166.
- Dobrev P.I. & Kamínek M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**, 21-29.
- Dubois F., Brugière N., Sangwan R.S., Hirel B. (1996) Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Molecular Biology* **31**, 803-817.
- Feller U. (2004) Proteolysis. In: Noodén L.D. (ed) *Plant Cell Death Processes*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 107-123.
- Feller U. & Fischer A. (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 241-273.
- Feller U. & Keist M. (1986) Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: Lambers H., Neeterson J.J., Stulen I. (eds) *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 219-234.

- Finkel E. (2001) The mitochondrion: Is it central to apoptosis? *Science* **292**, 624-626.
- Finkel T. & Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
- Fischer A.M. (2007) Nutrient remobilization during leaf senescence. In: Gan S. (ed) *Annual Plant Reviews, Volume 26, Senescence processes in plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 87-107.
- Foyer C.H., Descourvières P., Kunert K.J. (1994a) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **17**, 507-523.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. (1994b) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92**, 696-717.
- Fukuda H. (1997) Programmed cell death during vascular system formation. *Cell Death and Differentiation* **4**, 684-688.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P.I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vanková R., Strnad M., Motyka V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatine-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2827-2840.
- Gan S. & Amasino R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Gan S. & Amasino R.M. (1997) Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**, 313-319.

- Gastal F. & Lemaire G. (2002) N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* **53**, 789-799.
- Genschik P., Durr A., Fleck J. (1994) Differential expression of several E2-type ubiquitin carrier protein genes at different developmental stages in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana sylvestris*. *Molecular and General Genetics* **244**, 548-556.
- Greenberg J.T. (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12094-12097.
- Grudkowska M. & Zagdanska B. (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica* **51**, 609-624.
- Gunawardena A.H., Greenwood J.S., Dengler N.G. (2004) Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *Plant Cell* **16**, 60-73.
- Guo Y., Cai Z., Gan S. (2004) Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* **27**, 521-549.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1985) *Free Radicals in Biology and medicine*. Clarendon Press Oxford, London.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edn. Oxford University Press (Clarendon), Oxford, UK.
- Hensel L.L., Grbić V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 553-564.

- Himmelblau E. & Amasino R.M. (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1317-1323.
- Hinder B., Schellenberg M., Rodoni S., Ginsburg S., Vogt E., Martinoia E., Matile P., Hörtensteiner S. (1996) How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27233-27236.
- Hirel B. & Gadal P. (1980) Glutamine synthetase in rice: a comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiology* **66**, 619-623
- Horii M. & Marubashi W. (2005) Even juvenile leaves of tobacco exhibit programmed cell death. *Plant Biotechnology* **22**, 339-344.
- Hörtensteiner S. & Feller U. (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**, 927-937.
- Inada N., Sakai A., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (1998) Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Planta* **205**, 153-164.
- Inada N., Sakai A., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (1999) Senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) leaves: analysis of the blade of the second leaf at the tissue and cellular levels. *Protoplasma* **207**, 222-232.
- Jiménez-Atiénazar M., Pedreño M.A., Caballero N., Cabanes J., Garcia-Carmona F. (2007) Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from peach mesocarp (*Prunus persica* L.Cv. Babygold). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 1682-1690.
- Jones A. (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Science* **5**, 225-230.

- Kamachi K., Yamaya T., Hayakawa T., Mae T., Ojima K. (1992) Changes in Cytosolic Glutamine Synthetase Polypeptide and its mRNA in a Leaf Blade of Rice Plants during Natural Senescence. *Plant Physiology* **98**, 1323–1329.
- Kamachi K., Yamaya T., Mae T., Ojima K. (1991) A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiology* **96**, 411-417.
- Kar M. & Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**, 315-319.
- Kato Y., Murakami S., Yamamoto Y., Chatani H., Kondo Y., Nakano T., Yokota A., Sato F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribuloso-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* **220**, 97-104.
- Kobori S., Masuda Y., Horii M., Marubashi W. (2007) High levels of the cytokinin BAP suppress programmed cell death in hybrid tobacco cells (*Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*) expressing hybrid lethality. *Plant Biotechnology* **24**, 375-381.
- Kołodziejek I., Kozioł J., Wałęza M., Mostowska A. (2003) Ultrastructure of mesophyll cells and pigment content in senescing leaves of maize and barley. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 217-227.
- Konishi M. & Yanagisawa S. (2011) The Regulatory Region Controlling the Nitrate-Responsive Expression of a Nitrate Reductase Gene, NIA1, in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **52**, 824–836.
- Krupinska K. & Humbeck K. (2004) Photosynthesis and chloroplast breakdown. In: Noodén L.D. (ed) *Plant Cell Death Processes*, Elsevier Science (USA), Academic Press, London, UK, 169-187.

- Kukavica B. & Veljović-Jovanović S. (2004) Senescence-related changes in the antioxidant status of ginko and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum* **122**, 321-327.
- Kurepa J., Hérouart D., Van Montagu M., Inzé D. (1997) Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress and hormonal treatments. *Plant Cell Physiology* **38**, 463-470.
- Lam E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews* **5**, 305-315.
- Lam E. & del Pozo O. (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Molecular Biology* **44**, 417-428.
- Lam E., Kato N., Lawton M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 569-593.
- Lee R.-H. & Chen S.-C.G. (2002) Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. *New Phytologist* **155**, 25-32.
- Lers A. (2007) Environmental regulation of leaf senescence. In: Gan S. (ed) *Annual Plant Reviews, Volume 26, Senescence processes in plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 108-144.
- Leshem Y.Y. (1988) Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine* **5**, 39-49.

- Lesniewska J., Simeonova E., Sikora A., Mostowska A., Charzynska M. (2000) Application of comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **69**, 101-107.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136.
- Lim P.O., Woo H.R., Nam H.G. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sciences* **8**, 272-278.
- Linthorst H.J.M., Vanderdoes C., Brederode F.T., Bol J.F. (1993) Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase. *Plant Molecular Biology* **21**, 685-694.
- Liu W. & Saint D.A. (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* **302**, 52-59.
- Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**, 322-328.
- Lorenzo H.K., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death and Differentiation* **6**, 516-524.
- Loulakakis K.A. & Roubelakis-Angelakis K.A. (1996) The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. *Physiologia Plantarum* **96**, 29-35.
- Lucchesini M., Monteforti G., Mensuali-Sodi A., Serra G. (2006) Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. *Biologia Plantarum* **50**, 161-168.

- Mäder M., Ungemach J., Schloss P. (1980) The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta* **147**, 467-470.
- 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.
- Masclaux-Daubresse C., Valadier M.H., Carrayol E., Reisdorf-Cren M., Hirel B. (2002) Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in C/N balance of tobacco source leaves. *Plant Cell and Environment* **25**, 1451-1462.
- Masclaux-Daubresse C., Carrayol E., Valadier M.H. (2005) The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated *GS1* and *GDH* genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* **221**, 580-588.
- Masferrer A., Arro M., Manzano D. Schaller H., Fernández-Busquets X., Moncaleán P., Fernández B., Cunillera N., Boronat A., Ferrer A. (2002) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant Journal* **30**, 123-132.
- Matile P. (1992) Chloroplast senescence. In: Baker N.R., Thomas H. (eds) *Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants*. Elsevier, Amsterdam, pp 413-440.
- Matile P. (1997) The vacuole and cell senescence. In: Callow J.A (ed) *Advances in Botanical Research: The Plant Vacuole, Vol. 25*. Academic Press, San Diego, CA, pp 87-112.

- McRae D.G. & Thompson J.E. (1983) Senescence dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplast from bean leaves. *Planta* **158**, 185-193.
- Melo-Oliveira R., Oliveira I.C., Coruzzi G.M. (1996) *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 4718-4723.
- Merzlyak M.N. & Hendry G.A.F. (1994) Free radical metabolism, pigment degradation and lipid peroxidation in leaves during senescence. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **102B**, 459-471.
- Minamikawa T., Toyooka K., Okamoto T., Hara-Nishimura I., Nishimura M. (2001) Degradation of ribulose-biphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma* **218**, 144-153.
- Mlejnek P. & Prochazka S. (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* **215**, 158-166.
- Mok D.W.S. & Mok M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J. (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science* **300**, 332-336.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002) Plant ageing increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* **214**, 608-615.

- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Mýtinová Z., Motyka V., Haisel D., Gaudinová A, Lubovská Z., Wilhelmová N. (2010) Effect of abiotic stresses on the activity of antioxidative enzymes and contents of phytohormones in wild type and AtCKX2 transgenic tobacco plants. *Biologia Plantarum* **54**, 461-470.
- Mýtinová Z., Motyka V., Haisel D., Lubovská Z., Trávníčková A., Dobrev P., Holík J, Wilhelmová N. (2011) Antioxidant enzymatic protection during tobacco leaf ageing is affected by cytokinin depletion. *Plant Growth Regulation* **65**, 23-34.
- Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E., Mackerness S.A.H., Buchanan-Wollaston V. (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2285-2292.
- Nešković M., Konjević R., Čulafić Lj. (2003) Fiziologija biljaka. NNK-International, Beograd.
- Niewiadomska E., Polzien L., Desel C., Rozpadek P., Miszalski Z., Krupinska K. (2009) Spatial patterns of senescence and development-dependent distribution of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1057-1068.
- Noodén L.D. (1988) The phenomena of senescence and aging. In: Noodén L.D., Leopold A.C. (eds) *Senescence and ageing in plants*. Academic Press, San Diego, pp. 1-50.
- Noodén L.D. (2004) Introduction. In: Noodén L.D. (ed) *Plant cell death processes*. Academic Press, San Diego, pp. 1-14.

- Noodén L.D., Guiamet J.J., John I. (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.
- Noodén L.D. & Letham D.S. (1993) Cytokinin metabolism and signaling in the soybean plant. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**, 639–653.
- Noodén L.D., Santokh S., Letham D.S. (1990) Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiology* **93**, 33-39.
- O'Brien I.E., Reutelingsperger C.P., Holdaway K.M. (1997) Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* **29**, 28-33.
- Orendi G., Zimmermann P., Baar C., Zentgraf U. (2001) Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. *Plant Science* **161**, 301-314.
- Ori N., Juarez M.T., Jackson D., Yamaguchi J., Banowitz G.M., Hake S. (1999) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* **11**, 1073-1080.
- Orzáez D., de Jong A.J., Woltering E.J. (2001) A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* **46**, 459-468.
- Otegui M.S., Noh Y.-S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin L.A. et al. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant Journal* **41**, 831-844.
- Pageau K., Reisdorf-Cren M., Morot-Gaudry J.F., Masclaux-Daubresse C. (2006) The two senescence-related markers, *GS1* (cytosolic glutamine synthetase) and *GDH* (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen

- mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 547-557.
- Park J.H., Oh S.A., Kim Y.H., Woo H.R., Nam H.G. (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **37**, 445-454.
- Pastori G.M. & del Rio L.A. (1994) An activated-oxygen-mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of *Pisum sativum* L. leaves. *Planta* **193**, 385-391.
- Patra H.K. & Mishra D. (1979) Pyrophosphatase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during leaf development and senescence. *Plant Physiology* **63**, 318-323.
- Pauls K.P. & Thompson J.E. (1984) Evidence for accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiology* **75**, 1152-1157.
- Pennel R.I. & Lamb C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**, 1157-1168.
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**, 384-394.
- Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., Plzáková Š. (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* **45**, 481-497.

- Pospíšilová J., Wilhelmová N., Synková H., Čatský J., Krebs D., Tichá I., Hanáčková B., Snopek J. (1998) Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **49**, 863-869.
- Prasad T.K. (1997) Role of Catalase in Inducing Chilling Tolerance in Pre-Emergent Maize Seedlings. *Plant Physiology* **114**, 1369-1376.
- Purnell M.P., Skopelitis D.S., Roubelakis-Angelakis K.A., Botella J.R. (2005) Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. *Planta* **222**, 167-180.
- Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**, 278-282.
- Quirino B.F., Normanly J., Amasino R.M. (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* **40**, 267-278.
- Radochová B. & Tichá I. (2008) Excess irradiance causes early symptoms of senescence during leaf expansion in photoautotrophically *in vitro* grown tobacco plants. *Photosynthetica* **46**, 471-475.
- Radochová B. & Tichá I. (2009) Leaf anatomy during leaf development of photoautotrophically *in vitro*-grown tobacco plants as affected by growth irradiance. *Biologia Plantarum* **53**, 21-27.
- Raff M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397-400.
- Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acid Research* **38**, 227-233. (<http://merops.sanger.ac.uk>)

- Richmond A.E. & Lang A. (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. *Science* **125**, 650-651.
- Roulin S. & Feller U. (1998) Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta* **205**, 297-304.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez P., de Torres Zabala M., Grant M. (2000) Atbi-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant Journal* **21**, 393-399.
- Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C. (2001) Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. *Biologia Plantarum* **44**, 41-46.
- Schippers J.H.M., Jing H.C., Hille J., Dijkwel P.P. (2007) Developmental and hormonal control of leaf senescence. In: Gan S. (ed) *Annual Plant Reviews, Volume 26, Senescence processes in plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp.145-170.
- Schmid M., Simpson D.J., Sarioglu H., Lottspeich F., Gietl C. (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **98**, 5353-5358.
- Sheng L., Zheng X., Tong H., Liu S., Du J., Liu Q. (2004) Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu,Zn-superoxide dismutase from tobacco leaves. *Plant Science* **167**, 1235-1241.

- Simeonova E. & Mostowska A. (2001) Biochemical and molecular aspects of leaf senescence. *Postępy Biologii Komórki* **28**, 17-32.
- Simeonova E., Sikora A., Charzyńska M., Mostowska A. (2000) Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* **214**, 93-101.
- Simonović A.D & Anderson M.D. (2007) Effect of chilling and acclimation on the activity of glutamine synthetase isoforms in maize seedlings. *Archives of Biological Sciences* **59**, 177-185.
- Simonović A., Gaddameedhi S., Anderson M.D. (2004) In-gel precipitation of enzymatically released phosphate. *Analytical Biochemistry* **334**, 312-317
- Singh S., Letham D.S., Palni L.M.S. (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. *Physiologia Plantarum* **86**, 388-397.
- Smalle J. & Vierstra R.D. (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 555-590.
- Smart C.M. (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**, 431-444.
- Stjepanović-Veseličić L. (1974) In: Josifović M. (ed) Flora SR Srbije VI. SANU, Beograd.

- Synková H., Semorádová Š., Schnablová R., Witters E., Hušák M., Valcke R. (2006) Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic *Pssu-ipt* tobacco during plant ontogeny. *Biologia Plantarum* **50**, 31-41.
- Taylor C.B., Bariola P.A., del Cardayre S.B., Raines R.T., Green P.J. (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNase before speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5118-5122.
- Tercé-Laforgue T., Mäck G., Hirel B. (2004) New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiologia Plantarum* **120**, 220-228.
- Thomas H. & Stoddart J.L. (1980) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 83-111.
- Thompson A.R. & Vierstra R.D. (2005) Autophagoc recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 165-173.
- Thompson J.E., Froese C.D., Madey E., Smith M.D., Hong Y. (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* **37**, 119-141.
- Thompson J.E., Ledg R.L., Barber R.F. (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist* **105**, 317-344.
- Thompson J., Taylor C., Wang T.W. (2000) Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochemical Society Transactions* **28**, 775-777.
- Tobin A.K., Ridley S.M., Stewart G.R. (1985) Changes in the activities of chloroplast and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during

- normal leaf growth and plastid development in wheat. *Planta* **163**, 544-548.
- Ueda T., Seo S., Ohashi Y., Hashimoto J. (2000) Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Molecular Biology* **44**, 649-657.
- van Doorn W.G. (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends in Plant Science* **10**, 478-483.
- van Doorn W.G. & Woltering E.J. (2004) Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *Journal of Experimental Botany* **55**, 2147-2153.
- van Doorn W.G. & Woltering, E.J. (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* **10**, 117-122.
- van Staden J., Cook E.L., Noodén L.D. (1988) Cytokinins and senescence. In: Noodén L.D., Leopold A.C. (eds) *Senescence and ageing in plants*. Academic Press, San Diego, pp. 281-328.
- Vanyushin B.F., Bakeeva L.E., Zamyatnina V.A., Aleksandrushkina N.I. (2004) Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *International Review of Cytology* **233**, 135-179.
- Vaucheret H., Marion-Poll A., Meyer C., Faure J.D., Marin E., Caboche M. (1992) Interest in and limits to the utilization of reporter genes for the analysis of transcriptional regulation of nitrate reductase. *Molecular and General Genetics* **235**, 259-268.
- Vercammen D., Declercq W., Vandeanabeele P., Van Breusegem F. (2007) Are metacaspases caspases? *Journal of Cell Biology* **179**, 375-380.

- Vicentini F. & Matile P. (1993) Gerontosomes, a multi-functional type of peroxisome in senescent leaves. *Journal of Plant Physiology* **142**, 50-56.
- Watanabe N. & Lam E. (2004) Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Molecular Plant Pathology* **5**, 65-70.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmölling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Willekens H., Langebartels C., Tire C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1994) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10450-10454.
- Wingler A., Marès M., Pourtau N. (2004) Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* **161**, 781-789.
- Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J., Quick W.P. (1998) Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. Effects on HADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Planta* **116**, 329-335.
- Woo H.R., Chung K.M., Park J.H., Oh S.A., Ahn T., Hong S.H., Jang S.K., Nam H.G. (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1779-1790.
- Woodbury W., Spencer A.K., Stahmann M.A. (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* **44**, 301-305.

- Yamaya T., Obara M., Nakajima H., Sasaki S., Hayakawa T., Sato T. (2002) Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of Experimental Botany* **53**, 917-925.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L. (2002) Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* **215**, 645-652.
- Yao N., Tada Y., Park P., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S. (2001) Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats. *Plant Journal* **28**, 13-26.
- Yen C.H. & Yang C.H. (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiology* **39**, 922-927.
- Yoshida S., Ito M., Nishida I., Watanabe A. (2001) Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **42**, 170-178.
- Yu X.-H., Perdue T.D., Heimer Y.M., Jones A.M. (2002) Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* **9**, 189-198.
- Zeevaart J.A.D. & Creelman R.A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 439-473.
- Zhou X., Guangcheng C., Rufa L., Yongru S., Wenbin L. (1994) A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. In: Javornik B., Bohanec B., Kreft I. (eds) Proceedings of impact of plant biotechnology on agriculture. Biotechnical Faculty, Ljubljana, 171-175.

Zimmermann P., Orendi G., Heinlein C., Zentgraf U. (2006) Senescence specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell and Environment* **29**, 1049-1060.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Бранка В. Узелац рођена је 16. августа 1973. године у Београду, где је завршила основну и средњу школу. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је 1993. године на студијској групи Молекуларна биологија и физиологија. Факултет је завршила 2002. године и исте године уписала последипломске студије на смеру Физиологија биљака Биолошког факултета Универзитета у Београду. Докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, у оквиру студијског програма Експериментална и примењена ботаника - Физиологија и молекуларна биологија биљака, уписала је 2006. године. Од марта 2003. године Бранка Узелац запослена је као истраживач приправник у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. У звање истраживач сарадник изабрана је 2008. године. Бранка Узелац је током истраживачког рада у периоду од 2003. до 2010. године учествовала у реализацији два национална пројекта Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије и билатераног научноистраживачког пројекта између Републике Србије и Републике Словеније. Од 2011. године па до данас ангажована је на реализацији задатака националног пројекта „Биотехнологија *in vitro* – гајене, лековите и угрожене биљне врсте“ под руководством др Бранке Винтерхалтер, финансираног од стране Министарства просвете и науке Републике Србије. Бранка Узелац је члан Друштва за физиологију биљака Србије, Српског друштва за микроскопију, Савеза европских друштава за биљну биологију (*FESPB*), као и Међународног удружења за биљну биотехнологију (*IAPB*).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Бранка Узелац _____

број уписа _____ EA060015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација процеса програмиране ћелијске смрти и сенесценције у листовима *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 21.05.2012. _____

Узелац Б.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Бранка Узелац _____
Број уписа _____ ЕА060015 _____
Студијски програм _____ Физиологија и молекуларна биологија биљака _____
Наслов рада _____ Карактеризација процеса програмиране ћелијске смрти и
сенесценције у листовима *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* _____
Ментор _____ др Снежана Будимир, др Душица Јаношевић _____

Потписани _____ Бранка Узелац _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 21.05.2012. _____

Uzelac B.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација процеса програмиране ћелијске смрти и сенесценције у листовима *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21.05.2012.

Uzelac B.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.