



YU ISSN 0352-1788
УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ЗБОРНИК РАДОВА ПРИРОДНО МАТЕМАТИЧКОГ ФАКУЛТЕТА

30

СЕРИЈА ЗА БИОЛОГИЈУ

Главни и одговорни уредник
Проф. др Душан Стевановић

Уредник
Проф. др Живојин Гавриловић

Редакција
Проф. др Радмила Ковачевић
Проф. др Љиљана Вапа
Проф. др Славка Гајин
Проф. др Боривој Крстић
Проф. др Верица Божић-Крстић
Доц. др Зорива Свирчев

Нови Сад
2001.

MSC 7757

UNIVERSITI OF NOVI SAD
INSTITUTE OD BIOLOGY

REVIEW OF RESEARCH
FACULTY OF SCIENCES

30

BIOLOGY SERIES

Editor-in-Chief
Prof. dr Dušan Stevanović

Editor
Prof. dr Živojin Gavrilović

Redaction
Prof. dr Radmila Kovačević
Prof. dr Ljiljana Vapa
Prof. dr Slavka Gajin
Prof. dr Borivoj Krstić
Prof. dr Verica Božić-Krstić
Doc. dr Zorica Svirčev

Издаје: Природно-математички факултет, Институт за биологију
Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 2

Штампа: АД "Просвета" Нови Сад, Стевана Сремца 13

Изм. бр. 3790



SADRŽAJ

Popović Ester i Kostić Desanka: Taksonomski karakteri srebrnog karaša — <i>Carassius auratus gibelio</i> /Bloch, 1783/ iz ribnjaka Svilojevo — — — — —	5
Pajević S., Vučković M., Stankavić Ž.: Sadržaj makroelemenata u dominantnim makrofitama nekih vodenih ekosistema u okolini Novog Sada — — — — —	12
Bojana Stanić, Gordana Grubor-Lajšić: Antioksidativna zaštita kod insekata — — — — —	21
Nebojša Andrić, Silvana Andrić, Tatjana Kostić, Snežana Dragišić, Radmila Kovačević: Inhibitorski L-arginin metil estera na aktivnost antioksidativnih enzima i na stresom — inhibisanu steroidogenu aktivnost testisa pacova — — — — —	43
Nikolić N., Mikić A., Mihailović V. i Krstić B.: Uporedna mor- fološka proučavanja različitih linija jarog stočnog graška — — — — —	58
Stanković Živko, Lana Krstić, Pal Boža i Slobodanka Pajević: Mineralni sastav — <i>Solanum nigrum</i> L. u zavisnosti od staništa — — — — —	67
Merkulov Ljiljana, Krstić Lana, Boža Pal, Krstić Borivoj, Pajević Slobodanka: Anatomske i fiziološke vrste <i>Lathyrus vernus</i> (L.) Bernh. 1800 (<i>Fabaceae</i>) — — — — —	76



CONTENT

Popović Ester and Kostić Desanka: Taxonomic characteristics of <i>Carassius auratus gibelio</i> /bloch. 1783/ from the Svilojevo fishpond	5
Pajević S., Vučković M. and Stankavić Ž.: Macronutrients and Na in aquatic macrophytes of the water ecosystems connected to the Danube near Novi Sad	12
Bojana Stanić and Gordana Grubor-Lajšić: Antioxidant protection in insects	21
Nebojša Andrić, Silvana Andrić, Tatjana Kostić, Snežana Dragišić and Radmila Kovačević: Inhibitory effects of L. arginin methyl ester on antioxidant enzymes and stress-impaired steroidogenesis in rat testes	43
Nikolić N., Mikić A., Mihailović V. and Krstić B.: Comparative morphological studies of different folder pea lines	58
Stanković Živko, Lana Krstić, Pal Boža and Slobodanka Pajević: Mineral composition of <i>S. nigrum</i> plants in relation to habitat	67
Merkulov Ljiljana, Krstić Lana, Boža Pal, Krstić Borivoj, Pajević Slobodanka: Anatomical and physiological traits of <i>Lathyrus vernus</i> (L.) Bernh. 1800 (Fabaceae)	76

UDK 597.554.3

Naučni prilog

TAKSONOMSKI KARAKTERI SREBRNOG KARAŠA —
Carassius auratus gibelio (Bloch, 1783) IZ RIBNJAKA SVILOJEVO

Popović Ester, Kostić Desanka

Prírodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Novi Sad

Primljeno

1. III 2001.

SAŽETAK

Tokom 1999 godine iz ribnjaka Svilojevo sakupljen je uzorak od 22 primerka (19 ženki i 3 mužjaka) srebrnog karaša — *Carassius auratus gibelio*. Analizom 6 merističkih i 23 morfometrijska karaktera, konstatovano je da su najstabilniji meristički karakteri, kod oba pola, broj negranatih i granatih žbica u ventralnom i analnom peraju i formula ždrelnih zuba. Unutar morfometrijskih karaktera najveća vrednost koeficijenta varijacije kod ženki registrovana je za visinu dorzalnog peraja (Altitud pinne D), a kod mužjaka za dijametar oko (Dijametar oculi). Na osnovu odnosa standardne dužine tela i najveće visine tela, zaključeno je da srebrni karaš spada u formu „typica”.

Ključne reči: *Carassius auratus gibelio*, meristički i morfometrijski karakteri, ribnjak Svilojevo.

UVOD

Babuška ili srebrni karaš (*Carassius auratus gibelio*) kao podvrsta žutog karaša, poreklom je sa Dalekog istoka iz reka Amur, Sir-Darja i Amu-Darja. Premešten je 1948. godine u evropski deo Sovjetskog saveza, odakle se uskoro proširio u vode istočne i severne Evrope. Širenje u slivu Dunava započinje u Rumuniji još 1920. godine (BACALBASA-DOBROVICI, 1982). Njegovo prisustvo u srednjem toku Dunava datira od 1954. godine kada je iz Bugarske uvezena izvesna količina ribe u ogledne ribnjake u Sarvašu u Mađarskoj (ANTALFI et TOLG, 1974), pa je ekspanzija u ovom delu Dunavskog rečnog sistema inicirana u reci Tisi.

Preferira bare, ritove, mrtvaje, plavne zone Dunava i njegovih pritoka. S obzirom na ginogenezu kao specifičan način razmnožavanja, do pre nekoliko godina bio je dominantan u vodenim ekosistemima Vojvodine (MALETIN et KOSTIĆ, 1988; KOSTIĆ and MALETIN, 1992).

U odnosu na ribnjake, prvi put je registrovan u Ečkoj 1962. godine (JEVTIĆ, 1981). Danas je u velikom broju prisutan u svim šaranskim ribnjacima, gde njegova

količina, kao i količina ostale korovske ribe zavise od tehnoloških mera. Mnogi tehnološki propusti kao što su: neblagovremeni izlov, uticaj niskih temperatura, nepažnja prilikom sortiranja mladi, koji dovode do mešanja plemenitih vrsta riba sa srebrnim karašem, slabo ili nikakvo zakrečavanje, dezinfikovanje depresija i celog jezera, neadekvatno postavljanje sita sa upustima, neadekvatan nasad plemenitih vrsta grabljivica, kao što su som, štuka i smuđ, dovode do povećanja gustine populacije srebrnog karaša, a time i do smanjenja produktivnosti ribnjaka. Pored toga, srebrni karaš, kao korovska podvrsta je konkurent plemenitim vrstama riba, pre svega šaranu, jer konzumira istu hranu koja mu je lako dostupna (RAMAČ, 2000).

Cilj ovog rada je analiza merističkih i morfometrijskih karaktera, kao i uzrasne i polne strukture srebrnog karaša iz ribnjaka Svilojevo.

MATERIJAL I METODE

Materijal je sakupljen iz ribnjaka Svilojevo avgusta 1999. godine. Analizirano je 19 ženki starosti 2 + i 3 + i mase tela 40 do 340 grama i 3 mužjaka starosti 2+ i mase 85 g. do 110 grama.

Analizirani su standardni taksonomski karakteri (6 merističkih i 23 morfometrijska). Starost riba je određena na osnovu naraštajnih zona na krljuštima po standardnoj metodi (ČUGUNOVA, 1959). Morfometrijski karakteri su obrađeni variaciono-statističkom metodom (PETZ, 1981).

Ribnjak Svilojevo je izgrađen 1975. godine na slatinastom terenu i prostire se između Svilojeva i Sonte na površini od 640.56 ha od čega je proizvedeno 549.06 ha. Napaja se vodom iz sistema D-T-D preko glavnog dovodnog kanala kod sela Prigreviće, a iskorišćena voda se vraća u sistem D-T-D kod sela Doroslova.

U ribnjaku vladaju povoljni ekološki uslovi, što se pre svega odnosi na temperaturni i kiseonički režim. Optimalna količina hrane i odsustvo zagađivača antropogenog porekla ukazuje na visok kvalitet života hidrobionata.

Pored šarana koji je dominantan, u ribnjaku se gaje još i amur, beli i sivi tolstolobik, smuđ i som.

REZULTATI I DISKUSIJA

Meristički karakteri

Broj žbica u perajima

Broj negranatih žbica u **pektoralnom** peraju i kod ženki i kod mužjaka uvek je 1 što je u skladu sa literaturom (KOSTIĆ, 1985, 1988; VRCELJ, 2000). Broj granatih žbica pokazuje veće variranje, naročito kod ženki (12-18) (Tab. 1) i više varira u odnosu na podatke za ribnjak Bečej (KOSTIĆ, 1985), Palić, mrtvu Tisu i Obedsku baru (KOSTIĆ, 1988) i akumulaciju Sot (VRCELJ, 2000). Rezultati za mužjake odstupaju od literaturnih podataka.

Broj negranatih žbica u **ventralnom** peraju kod oba pola uvek je II, a broj granatih žbica je 7-8 (Tab. 1). Ovi podaci se uklapaju u rezultate za ribnjak Bečej (KOSTIĆ, 1985), mrtvu Tisu (KOSTIĆ, 1988) i akumulaciju Sot (VRCELJ, 2000).

U **dorzalnom** peraju broj tvrdih žbica i kod ženki i kod mužjaka uvek je IV, dok broj mekih žbica varira. Veća variranja javljaju se kod ženki babuške i kreću se od 15-20 (Tab. 1). Za broj negranatih žbica dobijene su manje vrednosti u odnosu na podatke koje navodi VRCELJ, (2000).

U ribnjaku Svilojevo sve jedinke srebrnog karaša bez obzira na pol imale su 3 negranate i 6 granatih žbica u **analom** peraju (Tab. 1), što se poklapa sa raspoloživom literaturom. Broj žbica u analnom peraju predstavlja jedan od najstabilnijih karaktera, na šta ukazuju i VUKOVIĆ i IVANOVIĆ, (1971); KOSTIĆ, (1985, 1988).

Broj krljušti u bočnoj liniji i broj redova krljušti

Broj krljušti u bočnoj liniji kod ženki kreće se od 28 do 33, a kod mužjaka 30-32 (Tab. 1), što je u skladu sa literaturnim podacima.

Minimalan i maksimalan broj redova krljušti **iznad bočne linije** kod ženki je 7-8, a **ispod bočne linije** 6-8, dok se kod mužjaka broj redova kreće od 6-7 (Tab. 1). Za razliku od rezultata (VRCELJ, 2000) (akumulacija Sot) za mužjake su dobijene niže vrednosti.

Formula ždrelnih zuba

Predstavlja najstabilniji meristički karakter, na šta nam ukazuje činjenica da su sve jedinke babuške, bez obzira na pol, imale formulu ždrelnih zuba 4-4 što takođe navode i VUKOVIĆ i IVANOVIĆ, 1971; KOSTIĆ, 1985, 1988.

Tab. 1. Meristički karakteri podvrste *Carassius auratus gibelio* ribnjaka Svilojevo

KARAKTER	ŽENKE	MUŽJACI
Radii P	I 12-18	I 14-16
Radii V	II 7-8	II 7-8
Radii D	IV 15-20	IV 16-20
Radii A	III 6	III 6
Linea lateralis	28-33	30-32
Linea lateralis sup.	7-8	6-7
Linea latralis inf.	6-8	6-7
Dentes pharingii	4-4	4-4

Morfometrijski karakteri

S obzirom na tip staništa i polnu strukturu uzorka srebrnog karaša iz ribnjaka Svilojevo (19 ženki i 3 mužjaka), poređenje srednjih vrednosti morfometrijskih karaktera moguće je samo sa ribnjakom Bečej (KOSTIĆ, 1985) i akumulacijom Sot (VRCELJ, 2000).

U odnosu na ribnjak Bečej u kome su konstatovane samo ženke starosti 0+ do 3+ (KOSTIĆ, 1985) i u odnosu na akumulaciju Sot (VRCELJ, 2000), ženke srebrnog karaša iz ribnjaka Svilojevo imale su niže srednje vrednosti za: totalnu dužinu tela, dužinu tela do repnog useka, (Longitudo per Smit), dužinu osnove dorzalnog peraja, dužinu glave i zaočni region glave, dok su za sve ostale karaktere u ribnjaku Svilojevo dobijene više srednje vrednosti.

Na osnovu podataka iz ovoga rada, kao i navoda iz literature, zaključuje se da je srebrni karaš, kada su morfometrijski karakteri u pitanju, izuzetno plastična podvrsta. Razlike koje su dobijene u odnosu na podatke iz literature rezultuju iz povoljnih ekoloških uslova u ribnjaku Svilojevo i naslednih faktora.

Koeficijent varijacije

Prema koeficijetu varijacije, najvarijabilniji morfometrijski karakteri kod ženki su visina dorzalnog peraja (41.85 %), dužina osnove analnog peraja (40.49 %) i predočni region glave (36.85 %), a kod mužjaka dijametar oka (12.29 %), predočni region glave (11.31 %) i zaočni region glave (9.81 %) (Tab. 2, 3).

Forma tela

Na osnovu odnosa između standardne dužine tela i najveće visine tela, konstatovano je da sve jedinke srebrnog karaša iz ribnjaka Svilojevo spadaju u formu „typica” (KRIVOŠEKOV, 1953), koja je konstatovana i u svim literaturnim navodima sa područja Vojvodine. KRIVOŠEKOV, (1953) ističe da na formu tela pored ishrane utiču salinitet, pH vode i nasledni faktori. Forma „typica” ukazuje na to da srebrni karaš u ribnjaku Svilojevo ima povoljan režim ishrane.

ZAKLJUČAK

Analizom 22 jedinke srebrnog karaša — *Carassius auratus gibelio* iz ribnjaka Svilojevo, može se zaključiti sledeće:

Prisustvo 19 ženki i samo 3 mužjaka u uzorku ukazuju na neravnomernu polnu strukturu populacije.

Ženke su bile starosti 2 + i 3 +, dok su 3 mužjaka pripadali uzrasnoj kategoriji od 2+.

Najstabilniji meristički karakteri kod oba pola su: broj negranatih i granatih žbica u ventralom i analnom peraju i formula ždrelnih zuba, dok je najvarijabilniji broj granatih žbica u pektoralnom peraju.

Prema koeficijentu varijacije, najvarijabilniji morfometrijski karakter kod ženki je visina dorzalnog peraja, dok kod mužjaka najviše varira dijametar oka.

Po formi tela srebrni karaš iz ribnjaka Svilojevo spada u formu „typica”.

Tab. 2. Morfometrijski karakteri ženki *Carassius auratus gibelio* iz ribnjaka Svilojevo

KARAKTER	MIN-MAX	X+/-SX	δ	KV(%)
u % u odnosu na Longitudo tot. corporis				
Longitudo corporis	80.46 – 87.50	83.23+/-1.60	7.00	8.41
u % u odnosu na Longitudo corporis				
Longitudo tot. corporis	114.28–124.28	120.21+/-2.28	9.95	8.28
Longitudo per Smit	100.00–115.38	110.78+/-4.63	20.18	18.22
Distantia praedorsalis	42.49–50.40	46.00+/-1.88	8.20	17.96
Longitudo pinne dorsalis	35.67–47.91	38.41+/-2.22	9.68	25.20
Distantia postdorsalis	16.41–24.28	21.03+/-1.31	5.73	27.25
Distantia praepectoralis	19.27–28.00	24.70+/-1.87	8.18	33.12
Distantia praeventralis	40.19–47.62	43.48+/-1.48	6.45	14.83
Distantia praenalis	72.09–78.57	75.18+/-1.46	6.38	8.48
Longitudo pinne analis	7.32–15.38	12.18+/-1.13	4.92	40.49
Longitudo ped. caudalis	14.88–20.51	17.51+/-1.03	4.48	25.58
Altitudo pinne D	13.02–25.48	18.52+/-1.78	7.75	41.85
Altitudo pinne P	17.15–19.73	18.42+/-0.69	3.02	16.39
Altitudo pinne V	18.46–22.30	20.57+/-0.87	3.81	18.52
Altitudo pinne A	13.85–19.49	16.93+/-1.42	6.19	36.56
Altitudo corporis max.	40.31–48.72	44.68+/-1.52	6.63	14.84
Altitudo corporis min.	16.26–18.90	17.06+/-0.62	2.72	15.94
Longitudo capitis	21.87–28.05	25.65+/-1.00	4.36	16.99
u % u odnosu na Longitudo capitis				
Distantia praeorbitalis	22.22–30.95	26.90+/-2.20	9.60	36.85
Diametar oculi	18.75–24.24	21.35+/-1.47	6.42	30.07
Distantia postorbitalis	45.24–57.50	52.59+/-2.60	11.31	21.50
Altitudo capitis	80.43–103.03	94.80+/-6.90	30.07	32.06

Tab. 3 Morfometrijski karakteri mužjaka *Carassius auratus gibelio* iz ribnjaka Svilojevo

KARAKTER	MIN-MAX	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	δ	KV(%)
u % u odnosu na Longitudo tot. corporis				
Longitudo corporis	80.77–82.44	81.39 $\pm$ 0.68	1.19	1.46
u % u odnosu na Longitudo corporis				
Longitudo tot. corporis	121.29–123.81	122.86 $\pm$ 1.05	1.82	1.48
Longitudo per Smit	102.72–115.43	109.70 $\pm$ 4.66	8.07	7.35
Distantia praedorsalis	42.28–44.21	43.02 $\pm$ 0.79	1.37	3.18
Longitudo pinne dorsalis	40.81–44.29	42.13 $\pm$ 1.69	2.93	6.95
Distantia postdorsalis	17.45–20.00	19.06 $\pm$ 1.07	1.86	9.76
Distantia praepectoralis	21.47–25.17	23.28 $\pm$ 1.25	2.17	9.32
Distantia praeventralis	40.94–43.22	42.33 $\pm$ 0.93	1.61	3.80
Distantia preanalis	73.82–74.84	74.27 $\pm$ 0.38	0.66	0.89
Longitudo pinne analis	12.26–12.92	12.64 $\pm$ 0.25	0.44	3.48
Longitudo ped. caudalis	17.68–18.71	18.17 $\pm$ 0.36	0.62	3.41
Altitudo pinne D	17.69–19.35	18.38 $\pm$ 0.64	1.11	6.04
Altitudo pinne P	18.06–20.13	19.08 $\pm$ 0.70	1.21	6.34
Altitudo pinne V	20.00–21.77	21.08 $\pm$ 0.72	1.25	5.93
Altitudo pinne A	17.01–17.45	17.29 $\pm$ 0.19	0.33	1.93
Altitudo corporis max.	42.58–46.94	44.38 $\pm$ 1.70	2.95	6.65
Altitudo corporis min.	17.78–18.06	17.28 $\pm$ 0.52	0.90	5.21
Longitudo capitis	24.51–27.21	25.96 $\pm$ 0.97	1.68	6.47
u % u odnosu na Longitudo capitis				
Distantia praeorbitalis	22.50–26.31	23.96 $\pm$ 1.56	2.71	11.31
Diametar oculi	20.00–23.68	21.39 $\pm$ 1.52	2.63	12.29
Distantia postorbitalis	50.00–57.50	54.63 $\pm$ 3.10	5.36	9.81
Altitudo capitis	92.10–92.50	92.30 $\pm$ 0.13	0.23	0.25

LITERATURA

- ANTALFI, A., TOLG, I. (1974): ABC Ribnjačarstva. Glas Slavonije. Osjek.
- BACALBASA-DOBROVICI, N. (1982): Neue und zuerueckgehende Fischarten in der Sozialistischen Republik Rumänien. 23 Arbeitstagung der IAD. Wissenschaftliche Kurzreferate; pp. 200-202.
- ČUGUNOVA, N.N. (1959): Rukovodstvo po izučeniju vozrasta i rosta ryb. Izd. Akad. nauk. SSSR, Moskva.
- JEVTIĆ, J. (1981): Morfološke karakteristike srebrnog karaša — *Carassius auratus gibelio* Bloch. Ichthyologia, Vol, 13, No 1; pp. 39-50. Beograd.
- KOSTIĆ, D. (1985): Variranje taksonomskih karaktera srebrnog karaša — *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1783) u nekim lokalitetima ribnjaka Bečej. Zbornik Marice srpske za prirodne nauke br. 68. str. 111-123.
- KOSTIĆ, D. (1988): Variranje taksonomskih karaktera srebrnog karaša (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) u nekim lokalitetima Vojvodine. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, br. 74, str. 49-70.
- KOSTIĆ, D., MALETIN, S. (1992): Contribution to the knowledge of ichthyofauna of some stagnant waters in Vojvodina. Ichthyologia Vol. 24, No 1; pp. 25-31. Beograd.
- KRIVIŠEKOV, G.M. (1953): Karasi zapadnoj Sibiri. Trudy Barbinskogo instituta ozernogo i rečnogo rybnogo hozjajstva. Tom 6, Vyp. 2; pp. 71-124. Moskva.
- MALETIN, S., KOSTIĆ, D. (1988): Der Fischbestand des Donaströms und Überschwemmungsgebietes in der Vojvodina (Jugoslavien), 27. Arbeitstagung der IAD, Mamaia; 167-172.
- PETZ, B. (1981): Osnovne statističke metode za nematematičare. SNL. Zagreb.
- RAMAČ, Z. (2000): Uticaj prisustva srebrnog karaša u ribnjacima na nivo proizvodnje šarana. Diplomski rad. Poljoprivredni fakultet. Novi Sad.
- VUKOVIĆ, T., IVANOVIĆ, B. (1971): Slatkovodne ribe Jugoslavije. Zemaljski muzej BiH. Sarajevo.
- VRCELJ, V. (2000): Variranje taksonomskih karaktera srebrnog karaša — *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1783) u akumulaciji Sot. Diplomski rad. PMF. Novi Sad.

TAXONOMIC CHARACTERISTICS OF *Carassius auratus gibelio* (Bloch. 1783) FROM THE SVILOJEVO FISHPOND

Popović Ester, Kostić Desanka

Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Novi Sad

SUMMARY

During 1999, a sample of 22 specimens (19 females and 3 males) of *Carassius auratus gibelio* was caught. The analysis of 6 meristic and 23 morphometric characters shows that the most stable were the meristic characters (in both sexes), number of nonramose and ramose radii in ventral and anal fins, and pharyngeal teeth formula. Within the morphometric characters, the highest variation coefficient was obtained with the height of dorsal fin (Altitude pinne D) of females and eye diameter (Diameter oculi) of males. The ratio of standard body length to the greatest body height shows that *C. auratus gibelio* belong to a „typica” form.

UDK 581.192:504.4

Naučni prilog

SADRŽAJ MAKROELEMENATA I Na U DOMINANTNIM MAKROFITAMA
NEKIH VODENIH EKOSISTEMA U OKOLINI NOVOG SADA

Pajević, S., Vučković, M., Stanković, Ž.
Institut za biologiju i ekologiju, PMF,
Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad

Primljeno:
1. III 2001.

SAŽETAK

U radu je određivana koncentracija makroelemenata (N, P, K) i Na u tkivu dominantnih akvatičnih makrofita sa lokaliteta Kanal Dunav—Tisa—Dunav kod Novog Sada (u blizini rafinerije i azotare) i lokaliteta Dunav — Subić u okolini Novog Sada (neposredno nakon izlivanja Kanala), sa ciljem da se ukaže na stanje ekoloških prilika u pogledu postojanja hemijske kontaminacije vode i priobalnog područja. Radi upoređivanja i boljeg tumačenja dobijenih rezultata u istraživanje je uključen još jedan lokalitet (Bečejska jama) za koji se pretpostavlja da je pod manjim antropogenim uticajem šireg gradskog okruženja. Hemijske analize biljnog materijala su pokazale da je akumulacija **azota** u tkivu ispitivanih makrofita prosečno iznosila 2-2.5%, a najmanja je bila u makrofitama Begečke jame. Apsorpcija **fosfor**a od strane biljaka, slično kao i u slučaju N, zavisila je od biljne vrste i od lokaliteta, a zabeležene prosečne koncentracije iznosile su od 0.2 do 0.3%, što su niže vrednosti u odnosu na ranije dobijene podatke za iste lokalitete. Naročito su niže vrednosti dobijene za lokalitet Begečka jama. Najveći akumulatori **kalijuma** bile su submerzne vrste, a sadržaj se kretao od 3 do 4%. Izuzetak je *M. spicatum* sa lokaliteta Begečka jama, gde je konstatovano 1.3% K. Najveći akumulatori **natrijuma** bili su listovi flotantnih biljaka.

Ključne reči: Makrofite, hemijski sastav, makroelementi, N, P, K, Na, zagađenje

UVOD

Podloga, odnosno sediment predstavlja važan izvor mineralnih elemenata za ishranu vodenih biljaka. Koncentracija rastvorenih soli u vodi je nekoliko puta manja nego u podlozi, a na koncentraciju pojedinih elemenata i njihovu dostupnost biljkama, odnosno na akumulaciju elemenata u tkivu biljaka utiče veliki broj abiotičkih činioca, temperatura, pH, kvalitativni i kvantitativni odnos pojedinih elemenata i njihov jonski oblik i dr. (Lewis, 1995). Akvatične biljke, naročito submerzne, imaju osobine izuzet-

nih akumulatora hemijskih elemenata iz vodenog okruženja, tako da koncentracija pojedinih elemenata može biti 10, 100 ili nekoliko hiljada puta veća u tkivu biljaka u odnosu na koncentraciju istih u spoljnoj sredini (Kovács et al., 1984; Pajević et al., 2002). Zbog sposobnosti da akumuliraju veće količine hemijskih elemenata vodene biljke doprinose smanjenju eutrofizacije, kruženju nutrienata, stabilizaciji sedimenta i kontroli kvaliteta vode (Chambers and Prepas, 1994; St-Cyr et al., 1994). Hidrofite su odlični biofiltratori jer iz vode izvlače različite toksične materije kao što su pesticidi, derivati fenola i teški metali. Absorbujući i akumulirajući veće količine hemijskih elemenata makrofite ostvaruju svoje važne uloge biofiltratora, odnosno bioakumulatora u vodenim ekosistemima (Gupta, 1998).

Akvatine makrofite mogu da budu indikatori kvaliteta vodene sredine u kojoj žive na više načina, a njihova distribucija u vremenu i prostoru ukazuje na važne karakteristike vode koje nije uvek lako odrediti hemijskim analizama. Stoga se promene u sastavu vodene vegetacije smatraju pouzdanim indikatorom kvaliteta vode, dna i priobalja u vodenim ekosistemima (Pall et al., 1996).

Zbog sposobnosti da akumuliraju hemijske elemente kao i zbog toga što produkuju najviše organske materije u vodenim ekosistemima makrofite se koriste u ekološkim istraživanjima kao 'in situ' bioindikatori kvaliteta vode (Chambers, 1987). Ovakvoj ulozi makrofita doprinosi značajna interspecifijska varijabilnost u pogledu koncentracije nutrienata (Boyd, 1970; Stanković et al., 2000).

Indikatorska funkcija makrofita je sve više potencirana u ekološkim istraživanjima, jer je sadržaj nekog elementa u biljnom tkivu pokazatelj prisustva tog elementa u vodenoj sredini. Da bi se na ovaj način tačnije definisao stepen zagađenja vodene sredine, potrebno je precizno odrediti efekte zagađenja na biljnom materijalu, a ovo je moguće samo uz korektnu procenu neophodne količine nutrienata za metabolizam biljaka. Tada bi se povećana akumulacija pojedinih nutrienata i teških metala u biljnom tkivu mogla pripisati njihovoj povećanoj koncentraciji u vodenoj sredini, odnosno zagađenju (Gerloff i Krombholz, 1966; Stanković et al., 1998).

Obuhvatajući u istraživanjima različite vrste vodenih biljaka sa tri lokaliteta u okolini Novog Sada, cilj rada je bio da se utvrdi koje su vrste najveći akumulatori makro elemenata (makronutrienata), te se zbog toga mogu smatrati bioindikatorima njihovog prisustva u vodenoj sredini. Hemijski sastav odabranih makrofitskih vrsta treba da ukaže na stanje ekoloških prilika u pogledu postojanja hemijske kontaminacije vode i priobalnog područja odabranih lokaliteta koji su pod većim ili manji antropogenim uticajem užeg i šireg gradskog okruženja.

Ispitivani lokaliteti:

Odabrani lokaliteti predstavljaju vodene ekosisteme u području grada Novog Sada koji su u neposrednoj ili posrednoj vezi sa rekom Dunav. Stoga na fizičko-hemijska svojstva vode ovih lokaliteta bitno utiče vodni režim i kvalitet vode Dunava. To su:

Begečka jama

Begečka jama se nalazi uzvodno od Novog Sada i predstavlja jedno od plavnih područja Dunava, smešteno uz njegovu levu obalu. To je rukavac Dunava, čiji vodni režim primarno zavisi od Dunava sa kojim je povezan preko kanala (Laušević, 1999). U Begečkoj jami su prisutni elementi jezerskog, barskog i močvarnog ekosistema. Zeljastu vegetaciju Begečke jame karakteriše prisustvo vodenih makrofita. U najdubljim slojevima vode nalaze se submerzne biljke, dok u priobalnom pojasu dominiraju flotanantne i emerzne biljke. Kao vrste za ocenjivanje hemijskih karakteristika vode, sa lokaliteta Begečka jama uzete su dominantne makrofite: *Myriophyllum spicatum* L., *Tra-pa longicarpa* Jank., *Nymphoides flava* HILL., *Nymphaea alba* L.

Dunav — Subić

Lokalitet na glavnom toku Dunava u blizini grada Novog Sada, 5 km nakon ulivanja Kanala Novi Sad—Savino Selo. Na ovom lokalitetu uliva se u Dunav i manji kanal Subić, koji donosi otpadne i drenažne vode okolnog područja. Za analize su uzimane makrofitske vrste koje su se nalazile u priobalnim područjima i manjim rukavcima, a to su: *Ceratophyllum demersum* L., *Trapa longicarpa* Jank., *Nymphoides flava* HILL., *Phragmites communis* Trin. (nadzemni deo i rizom).

Kanal DTD: Novi Sad—Savino Selo

Hydrosistem Dunav—Tisa—Dunav obuhvata kompletnu kanalsku mrežu Vojvodine u ukupnoj dužini od 960 km koja povezuje dve reke, Dunav i Tisu i ostale vodotoke u Vojvodini. Za istraživanje je odabran deo kanala Novi Sad—Savino selo u neposrednoj blizini Novog Sada gde se uočava veliki antropogeni uticaj, zbog značajnih količina otpadnih voda iz azotare i rafinerije, koje se izlivaju na ovoj deonici. Odabrane makrofitske vrste za hemijske analize sa ovog lokaliteta bile su: *Vallisneria spiralis* L., *Salvinia natans* (L) ALL., *Hydrocharis morsus ranae* L.

MATERIJAL I METODE

Uzorci biljaka uzimani su po slučajnom blok sistemu u septembru 2001. godine, na mestima sa najvećom gustom i pokrovnošću.

U laboratoriji je biljni materijal klasifikovan, ispiran u destilovanoj vodi nekoliko puta, osušen u sušnici na 105°C i pripremljen za hemijske analize po standardnoj proceduri koja se primenjuje za vodu i vodene biljke (APHA 1995). Koncentracija ukupnog azota određena je standardnom mikrokjeldahl metodom koja podrazumeva razaranja suvog biljnog materijala u koncentrovanoj sumpornoj kiselini i potom destilaciju azota (Nelson and Sommers, 1973). Koncentracije ukupnog K, i Na određene su plamen-fotometrijskom metodom (Arsenijević-Maksimović i Pajević, 2002) iz matičnog rastvora tj. merenjem intenziteta svetlosti koju oslobađaju ekscitirani atomi ispitivanog elementa u plamenu. Koncentracija ukupnog fosfora određena je takođe iz matičnog rastvora amonijum-vanadat-molibdat metodom (Gericke i Kurmies, 1952).

Sve analize radene su u tri nezavisna ponavljanja, a dobijeni podaci su obrađeni metodom analize varijanse (ANOVA) faktorijalnog oglada. Upoređivanje tretmana (biljna vrsta, lokalitet) vršeno je pomoću Dankanovog testa (višestruki test intervala), za nivo značajnosti $p < 0.05$. Rezultati su predstavljeni tabelarno.

REZULTATI I DISKUSIJA

Koncentracija ispitivanih teških metala varirala je zavisno od biljne vrste i lokaliteta.

Begečka jama

A z o t (N). Upoređujući koncentracije ispitivanih makroelemenata u tkivu makrofitskih vrsta, može se konstatovati da su one najviše akumulirale azot. Akumulacija N je zavisila od biljne vrste i kretala se od 2681 mg·100 g⁻¹ suve materije (2,681%) kod vrste *N. flava* do 1,319% kod *T. longicarpa* (Tab. 1). Izuzev vrste *N. flava*, sve ostale ispitivane vrste su imale manju akumulaciju azota u odnosu na akumulacije koje

su dobijene za iste vrste i isti lokalitet u istraživanjima 1999. godine (Pajević et al., 2002). Smanjenje u akumulaciji N može da sugerise na smanjeni sadržaj ovog nutrien-ta u vodi a samim tim i na smanjenje eutrofizacije, pri čemu se mora obratiti pažnja na antagonistički efekat koji joni ispoljavaju prilikom usvajanja od strane biljaka. Na usvajanje N značajno utiču koncentracije Cl^- , K^+ , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , i dr. (Kastori, 1998). Međutim, relativno niski sadržaj P i K u vrstama sa ovog lokaliteta takode ukazuje na opštu sliku manje organske produkcije u Begečkoj jami, tj., manji stepen eutrofizacije.

Tabela 1. Koncentracija makroelemenata i Na u tkivu dominantnih makrofita lokaliteta Begečka jama.

Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za nivo značajnosti $p=0.05$

Vrste	N	P	K	Na	Ukupni pepeo
	mg 100 g ⁻¹ suve materije				%
<i>Myriophyllum spicatum</i>	1536 c	188 b	1347 a	1092 b	36.61 a
<i>Trapa longicarpa</i>	1319 c	126 c	486 c	629 c	15.43 b
<i>Nymphoides flava</i>	2681 a	352 a	903 b	640 c	15.05 b
<i>Nymphaea alba</i>	1956 b	141 c	1167 a	4567 a	9.33 c
Prosek	1873	202	976	1732	19.10

Sličan sadržaj azota (preko 2.6%) registrovan kod vrste *N. flava* na lokalitetu Begečka jama, utvrđen je za istu vrstu i na lokalitetu Dunav—Subić.

F o s f o r (P). Zahtevi biljaka prema fosforu su manji u odnosu na azot, tako da su i koncentracije ovog elementa u tkivu ispitivanih vodenih biljaka bile manje i kretale su se od 352 mg·100 g⁻¹ suve materije (0,352%) u vrsti *N. flava* do 0.141% u listovima *N. alba*. Registrovane koncentracije P bile su manje u odnosu na koncentracije zabeležene za iste vrste u ranijim istraživanjima. Za rast biljaka, odnosno za njihovu organsku produkciju veoma je značajan P, kao i odnos N/P, koji čak može biti značajniji od apsolutno izmereih koncentracija (Babalonas i Papastergiadou, 1989). Po Gerloff i Krombholz-u (1966) kritični sadržaj P u tkivu makrofita kreće se oko 0.13%, pri čemu količina P više limitira rast i organsku produkciju u odnosu na N. Ispitivane vrste u ovim istraživanjima imale su malu akumulaciju i azota i fosfora, tako da je odnos ova dva elementa ostao konstantan. Slične, relativno niske koncentracije P za vrste *M. spicatum* i *N. flava* registrovane su i za lokalitet jezera Provala koji bi se mogao okarakterisati kao sličan Begečkoj jami (Pajević et al., 2002a).

K a l i j u m (K). Izuzev vrste *T. longicarpa* koja je sadržavala 486 mg·100 g⁻¹ suve materije K, odnosno oko 1%. Vrste *M. spicatum* i *N. alba* imale su najveće koncentracije K, koje se nisu značajno međusobno razlikovale. Ispitivane vrste su u sezoni



2001. godine imale značajno nižu koncentraciju K u odnosu na sezonu 1999. (Pajević, 2002). Poredeći registrovane koncentracije K u makrofitama svih lokaliteta, može se konstatovati da su najniže izmerene koncentracije K bile upravo na lokalitetu Begečka jama.

N a t r i j u m (Na). Akumulacija Na je generalno posmatrano, bila najviša u makrofitama Begečke jame, izuzetak je jedino vrsta *N. flava* koja je u Begečkoj jami imala prosečno manju akumulaciju ovog elementa u odnosu na lokalitet Subić. Na-ročito visoki sadržaj Na registrovan je u flotantnim listovima *N. alba*, 4567 mg·100 g⁻¹ suve materije, odnosno, preko 4.5%. Ovako visok sadržaj Na kod *N. alba* bio je karakterističan i u 1999. godini (Pajević et al., 2002).

Dunav—Subić

A z o t (N). Sadržaj N u tkivu ispitivanih makrofita kretao se oko 2%, pri čemu su značajno veću akumulaciju pokazale vrste *C. demersum* i *N. flava* (2.6%) (Tab. 2). Koncentracija N u nadzemnom delu emernze vrste *P. communis* bila je nešto manja od 2%. Dobijene vrednosti, kao i pomenuta varijabilnost N u odnosu na stanište mogu se smatrati tipičnim za kopnene i emernze biljke (Dinka, 1986; Kochev i Yurukova, 1996). U rizomu je bilo ispod 1% azota, što ukazuje na veću mobilnost N i njegovu translokaciju u nadzemni deo.

Tabela 2. Koncentracija makroelemenata i Na u tkivu dominantnih makrofita lokaliteta Subić
Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za nivo značajnosti p=0.05

Vrsta	N	P	K	Na	Ukupni pepeo
	mg 100 g ⁻¹ suve materije				%
<i>Ceratophyllum demersum</i>	2681 a	387 a	3416 a	741 b	40.44 a
<i>Trapa longicarpa</i>	2290 b	278 b	1791 c	534 c	15.37 b
<i>Nymphoides flava</i>	2623 a	387 a	2653 b	1233 a	11.77 c
<i>Phragmites communis</i> (n. d.)	1903 c	149 c	1153 d	61 d	6.87 d
<i>Phragmites communis</i> (rizom)	908 d	94 d	486 e	75 d	7.39 d
Prosek	2081	259	1900	529	16.37

F o s f o r (P). Sadržaj P je bio veći u makrofitama ovog lokaliteta u odnosu na Begečku jamu, a najveći akumulatori su, kao i u slučaju azota, bile vrste *C. demersum* i *N. flava* (Tab. 2). Najmanje fosfora, svega 94 mg·100 g⁻¹ (0.09%) bilo je u rizomu *P. communis*. Koncentracija P u *C. demersum* je ovde bila visoka (387 mg·100 g⁻¹). Kako

se fosfor često javlja u otpadnim vodama u organskoj ili jonskoj formi, biljke akumulatori ga u zagađenim vodama mogu akumulirati u značajnoj količini. Stoga se povećana koncentracija ovog makronutrijenta u biljkama ovog lokaliteta može povezati sa njegovom povećanom koncentracijom u vodi, a što može biti rezultat priliva otpadnih voda na ovom lokalitetu.

Kalijum (K). Submerzna vrsta *C. demersum* akumulirala je najviše kalijuma, preko 3% (3416 mg·100 g⁻¹). Ova vrsta se ističe i u literaturi kao izuzetni akumulator K, pri čemu koncentracije mogu da iznose i 4, odnosno 5% (Boyd, 1970; Pajević et al., 2002). Relativno visoka koncentracija K u ostalim vodenim makrofitama ukazuje na veće prisustvo K u vodi na ovom lokalitetu.

Natrijum (Na). Najveća akumulacija Na zabeležena je u vrsti *N. flava* (1233 mg·100 g⁻¹), dok je u svim ostalim vrstama koncentracija bila ispod 1%. Veoma niske koncentracije, slične onima koje su specifične i za kopnene biljke, zabeležene su u emerznoj vrsti *P. communis*.

Kanal DTD: Novi Sad—Savino Selo

Azot (N). Sadržaj azota nije signifikantno varirao u odnosu na ispitivanu makrofitsku vrstu, tako da su sve tri ispitivane vrste imale približno iste vrednosti, tj. nešto više od 2% (Tab 3). Dobijene koncentracije N bile su nešto niže u odnosu na koncentracije koje su zabeležene za iste vrste i isti lokalitet u istraživanjima 1999. godine (Pajević et al., 2002). Naročito je ovo smanjenje bilo uočljivo za vrstu *S. natans* koja je prema ranijim podacima imala preko 3% N.

Tabela 3. Koncentracija makroelemenata i Na u tkivu dominantnih makrofita lokaliteta Kanal DTD: Novi Sad—Savino selo.

Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za nivo značajnosti p=0.05

Vrsta	N	P	K	Na	Ukupni pepeo
	mg 100 g ⁻¹ suve materije				%
<i>Vallisneria spiralis</i>	2144 a	324 a	3805 a	607 c	30.45 b
<i>Salvinia natans</i>	2261 a	318 a	2097 c	785 b	20.62 c
<i>Hydrocharis morsus ranae</i>	2319 a	254 b	2709 b	1233 a	32.63 a
Prosek	2241	299	2870	875	27.90

Iako su na ovom lokalitetu analize vršene na specifičnim makrofitskim vrstama kojih nije bilo na ostalim lokalitetima, pa je samim tim poređenje sadržaja nutrienata u biljkama različitih lokaliteta ograničeno, ipak se može konstatovati manja akumulacija ispitivanih elemenata na ovom lokalitetu u odnosu na ostale (izuzetak je Begečka jama). Smanjena akumulacija nutrienata na lokalitetu kanal DTD je verovatno posledica

povećane akumulacije teških metala, naročito Fe, koji u većim koncentracijama deluju antagonistički na usvajanje jona makronutrienata. Visok sadržaj ukupnog pepela kod *V. spiralis* (30.45%) i *H. morsus ranae* (32.63%) ukazuje i da je sadržaj Ca verovatno bio izuzetno visok u makrofitama ovog lokaliteta.

Fosfor (P). U saržaju fosfora između vrsta *V. spiralis* i *S. natans* nije bilo signifikantne razlike (324, odnosno 318 mg·100 g⁻¹) dok je u tkivu vrste *H. morsus ranae* bilo akumulirano značajno manje ovog elementa (254 mg·100 g⁻¹). Akumulacija fosfora se, kao i u slučaju azota, može smatrati nešto manjom i ona ukazuje na smanjenu organsku produkciju koja je posledica većeg hemijskog opterećenja teškim metalima i veće akumulacije teških metala u tkivu hidrofitama.

Kalijum (K). Variranje između vrsta u koncentraciji K je bilo izraženo. Signifikantno najviše K akumulirala je vrsta *V. spiralis* (3805 mg·100 g⁻¹), a najmanje *S. natans* (2097 mg·100 g⁻¹) (Tab. 3). Vrsta *V. spiralis* se i u prethodnim istraživanjima pokazala kao najbolji akumulator K, ali je u sezoni 1999 imala značajno veći sadržaj K (Pajević et al., 2002).

Natrijum (Na). Listovi flotantne makrofitske vrste *H. morsus ranae* najviše su akumulirali Na. Prosečna registrovana koncentracija (1233 mg·100 g⁻¹) bila je gotovo dvostruko veća od koncentracije u ostale dve ispitivane vrste. Intenzivnije nakupljanje Na u listovima flotantnih biljaka u odnosu na submerzne i emerzne zapažena je i u prethodnim istraživanjima, a takođe je bila prisutna i u drugim lokalitetima.

Sadržaj ukupnog pepela je pokazatelj ukupne akumulacije mineralnih materija. Najveći akumulatori, kao što je već istaknuto bile su submerzne vrste. Tako je vrsta *C. demersum* imala na lokalitetu Subić 40.44% ukupnog pepela. Visok sadržaj pepela imale su i flotantne vrste sa lokaliteta kanala DTD: *S. natans* 20.62% i *H. morsus ranae* 32.63%. U analizi kvalitativnog i kvantitativnog sastava pepela potrebno je istaći da veliki deo od ukupno akumuliranih mineralnih materija čini kalcijum (Ca) koji se može taložiti u većim količinama i na površini listova zbog korišćenja CO₂ (u procesu fotosinteze) iz H₂CO₃. Kod većine pomenutih vrsta sadržaj Ca se procenjuje od 10 do 20, pa i više procenata (Pajević, 2002).

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata za sadržaj makronutrienata u tkivu ispitivanih makrofita na pet lokaliteta, mogu se izvesti sledeći zaključci:

Akumulacija **azota** prosečno je iznosila 2-2.5%. Najmanja akumulacija ovog elementa bila je u makrofitama Begečke jame. Nije postojala jasno uočljiva tendencija veće akumulacije N u submerznim vrstama u odnosu na flotantne.

Apsorpcija **fosfora** od strane biljaka, slično kao i u slučaju N, zavisila je od biljne vrste i od lokaliteta. Dobijeni podaci ukazuju da postoji prosečno od 0.2 do 0.3% fosfora u tkivu makrofita, što su niže vrednosti u odnosu na ranije dobijene podatke za iste lokalitete. Naročito su niže vrednosti dobijene za lokalitet Begečka jama. Ovo se može pripisati sezonskoj dinamici u pogledu akumulacije fosfora, kao i manjem prisustvu fosfora u vodi. Najviše fosfora akumulirale su vrste *C. demersum* i *T. longicarpa* na lokalitetu Subić (0.387%).

Najveći akumulatori **kalijuma** u svim lokalitetima bile su submerzne vrste *C. demersum*, *V. spiralis* i *M. spicatum*, a sadržaj se kretao od 3 do 4%. Izuzetak je *M. spicatum* sa lokaliteta Begečka jama, gde je konstatovano 1.3% K, tako da se ovaj lokalitet može izdvojiti po najmanjoj akumulaciji K (od 0.5 do 1.3%).

Najviše **natrijuma** akumulirale su biljke Begečke jame, a najveći akumulatori bili su listovi flotantih biljaka *N. alba*, *N. flava* i *H. morsus ranae*.

LITERATURA

- Arsenijević-Maksimović, I., Pajević, S. (2002): Praktikum iz fizilogije biljaka, Poljoprivredni fakultet, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, p.p. 85-114.
- Babalonas, D., Papastergiadou, E. (1989): The water fern *Salvinia natans* (L.) All. in the Kerkini Lake (North Greece). — Arch. Hydrobiol. 116(4): 487-498.
- Boyd, C.E. (1970): Chemical analyses of some aquatic plants. Arch. Hydrobiol. 67, 78-85.
- Chambers, P.A. (1987): Light and nutrients in the control of aquatic plant community structure. II *In situ* observations. J. Ecology 75, 621-628.
- Chambers, P.A., Prepas, E.E. (1994): Nutrient dynamics in riverbeds: The impact of sewage effluent and aquatic macrophytes. - Water Res. Vol. 28, (2), 453-464.
- Dinka, M. (1986): Accumulation and distribution of elements in cattail species (*Tipha latifolia*, L., *T. angustifolia* L.) and reed (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel) living in lake Balaton. - Proceedings EWRS/AAB 7th Symposium on Aquatic Weeds: 81-85.
- Gericke, S., Kurmies, B. (1952): Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-Vanadat-Molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde, Band 59 (3), 32-35.
- Gerloff, G.C., Krombholz, P.H. (1966): Tissue analysis as a measure of nutrient availability for the growth of aquatic plants, Limnol. Oceanogr. 11, 529-537.
- Gupta, A.K.: Role of aquatic weeds in harvesting pollutants and conserving nutrients in a river ecosystem. - 10th EWRS Symposium on Aquatic Weeds, Lisbon: 419-422, 1998.
- Kastori, R. (1998): Mineralna ishrana. U: Fiziologija biljaka, Feljton, Novi Sad, p.p. 137-235.
- Kochev, H., Yurukova, L. (1996): Macroelemental content of the macrophytes from the Srebarna Lake along the Danube (Bulgaria). - 31. Konferenz der IAD Baja - Ungarn, Wissenschaftliche Referate. Limnologische Berichte Donau, Band I: 177-182.
- Kovács, M., Nyóry, I., Tóth, L. (1984): The microelement content of some submerged and floating aquatic plants. Acta Botanica Hungarica 30 (1-2), 173-185.
- Laušević, R. (Ed.) (1990): Četiri obale. Živi svet i prirodna baština sliva Dunava u Jugoslaviji. Društvo ekologa Srbije, Zavod za zaštitu prirode, p. 106.
- Lewis, M.A. (1995): Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. - Environ. Pollution 87, 319-336.
- Nelson, D. W., Sommers, L. E. (1973.): Determination of total nitrogen in plant material. Agronomy Journal, 65:109-112.
- Pajević, S., Vučković, M., Stanković, Ž., Krstić, B., Kevrešan, Ž., Radulović, S. (2002): The content of some macronutrients and heavy metals in aquatic macrophytes

of three ecosystems connected to the Danube in Yugoslavia. Large Rivers Vol. 13, No. 1-2; Archiv für Hydrobiologie Suppl. 141/1-2, 73-83.

Pajević, S., Stanković, Ž., Vučković, M. (2002a): Concentrations of macronutrients in dominant aquatics of the Lake Provala (Vojvodina, Yugoslavia). Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, u štampi.

Pall, K., Ráth, B., Janauer, G.A. (1996): Die Makrophyten in dynamischen und abgedämmten Gewässersystemen der Kleinen Schüttinsel (Donau-Fluß-km 1848 bis 1806) in Ungarn (The macrophyte vegetation of the Szigetköz flood plain waters, Hungary (river-km 1848-1806). Limnologica 26(1), 105-115.

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater - In: M.H. Franson (Ed.), 19th Edition. American Public Health Association, Washington (APHA), DC 20005, 1995.

Stanković, Ž., Pajević, S., Vučković, M., Stojanović, S. (2000): Concentrations of trace metals in dominant aquatic plants of Lake Provala (Vojvodina, Yugoslavia). Biologia Plant. 43, 583-585.

Stanković, Ž., Stojanović, S., Pajević, S., Žderić, M., Kilibarda, P. (1998): Trace metals in some aquatic macrophytes of the Danube-Theiss-Danube Hydrosystem. Proceedings of the 3rd International Symposium Interdisciplinary Regional Research (Hungary, Romania, Yugoslavia), S. Avramov (ed.), University of Novi Sad, 487-490.

St-Cyr, L., Campbell, P.G.C., Guertin, K. (1994): Evaluation of the role of submerged plant beds in the metal budget of a fluvial lake. Hydrobiolog. 291, 141-156.

MACRONUTRIENTS AND Na IN AQUATIC MACROPHYTES OF THE WATER ECOSYSTEMS CONNECTED TO THE DANUBE NEAR NOVI SAD

Pajević, S., Vučković, M., Stanković, Ž.

Institute of Biology and Ecology,

Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad

SUMMARY

Macronutrient (N, P, K) and Na concentrations in tissues of dominant aquatic macrophytes of the canal network Danube-Tisza -Danube (DTD) near Novi Sad (presence of wastewaters of fertilizer factory and oil refinery) and the Danube site immediately after the Canal emptying (vicinity of Novi Sad) was analysed to show the ecological status, i.e. possible chemical contamination of water and littoral zone. In addition, the Begečka jama pond representing a site with less evident human impact was also included to aid a better comparison and discussion of the obtained results. Recorded concentrations relied upon both plant species and locality. Concentrations of N varied between 2 and 2.5%, and P between 0.2 and 0.3%. The lowest bioaccumulation of all macronutrients was detected in macrophytes from Begečka jama. Submerged species showed extremely high bioaccumulation of K. The highest Na accumulation was recorded in floating leaves of macrophytes from Begečka jama.

Key words: Macrophytes, macronutrients, N, P, K, Na, bioaccumulation, pollution.

UDK 595.7 665.7.038.5 678.048

Naučni prilog

ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA KOD INSEKATA

Bojana Stanić, Gordana Grubor-Lajšić
Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu

Primljeno:
1. III 2001.

SAŽETAK

Prednosti i nedostaci života u aerobnim uslovima kod insekata mogu biti posebno naglašeni. Dobro usklađen odgovor na prisustvo različitih endogenih oksidanata i prooksidanata iz hrane kod insekata se ogleda u setu antioksidativnih enzima i antioksidanata male molekulske mase. Insekti poseduju antioksidativne enzime, superoksid dismutazu, katalazu, glutation S-transferazu i glutation reduktazu, a pojedine vrste i glutation peroksidazu. Nedavno je ukazano i na postojanje aktivnog enzimskog sistema za recikliranje askorbata, koji uključuje askorbat peroksidazu, dehidroaskorbat reduktazu i askorbil radikal reduktazu. Efikasnu antioksidativnu ulogu kod insekata imaju i hidrosolubilni i liposolubilni antioksidanti male molekulske mase, kao što su askorbat, glutation, urat, tokoferoli i karotenoidi. Trehaloza, glicerol i neki drugi molekuli takođe predstavljaju specifičan značajan deo antioksidativne odbrane kod insekata. Peritrofička membrana zauzima posebno mesto u antioksidativnoj zaštiti insekata. Nivo i mehanizmi regulacije antioksidativnog sistema različitih insekatskih vrsta su izučavani tokom reprodukcije, razvika i starenja, ali i u eksperimentalnim uslovima indukcije oksidativnog stresa. Dosadašnji rezultati pokazuju da je antioksidativni sistem insekata veoma fleksibilan i dinamički organizovan. Pored toga, pokazano je da ovaj sistem ne deluje samo u pravcu eliminacije reaktivnih čestica kiseonika, već preusmerava koncentracije pojedinih reaktivnih čestica ka onim koncentracijama koje proizvode direktne fiziološke efekte.

Ključne reči: insekti, reaktivne čestice kiseonika, oksidativni stres, antioksidativni sistem

UVOD

Tokom normalne metaboličke redukcije kiseonika do vode, 1-2% molekuskog kiseonika „pobegne” u formi slobodno-radikalskih intermedijera. Reakcije oksidacije su veoma važne za normalan život ćelije, ali su istovremeno izvor slododnih kiseoničnih radikala i drugih čestica koje su jaka oksidaciona sredstva. Reaktivni metaboliti

kiseonika (RMK), kako se danas nazivaju sve čestice čija je sposobnost da oksiduju mnogo veća od molekuskog kiseonika, su sastavni deo aerobnog metabolizma ćelije. RMK obuhvataju slobodne kiseonične radikale: superoksid anjon radikal (O_2^-), hidroksil radikal ($HO^\bullet$), lipidne i druge peroksil radikale ($LOO^\bullet$ i $ROO^\bullet$), azot oksid ($NO^\bullet$), ali i molekule velike reaktivnosti kao što su: vodonik peroksid (H_2O_2), lipidni peroksidi ($LOOH$), singlet kiseonik (1O_2), hipohlorna kiselina ($HOCl$), i druga hloramin jedinjenja, koja po svojoj strukturi nisu slobodni radikali (Pardini, 1995).

Kiseonik i njegovi aktivirani intermedijeri mogu reagovati sa ćelijskim komponentama rezultirajući degradacijom ili inaktivacijom esencijalnih molekula (Sies, 1986; Chow, 1991). Oksidativna oštećenja lipida dovode do lančane radikalske reakcije, pre svega kod polinezasićenih masnih kiselina u sastavu membranskih fosfolipida (Horton i Fairhurst, 1987). Membranska lipidna peroksidacija je tako jedna od najbitnijih formi ćelijskog oštećenja indukovana u uslovima oksidativnog stresa (Comporti, 1985). Do danas je pokazano da se negativni efekti lipidne peroksidacije mogu povezati sa patogeneozom mnogih obolenja: aterosklerozom, hemolitičkom anemijom, povredom usled ishemije/reperfuzije, kancerom, starenjem (Cerutti, 1985; Halliwell i Gutteridge, 1989; Freeman, 1991; McCord i Omar, 1991). Brojni su dokazi o oksidativnom oštećenju proteina *in vivo* (Levine i sar., 1981; Davies, 1986, 1987; Dean, 1991; Dean i sar., 1997). Oksidovani proteini postaju katalitički inaktivni i podložni degradaciji neutralnim proteinazama (Grune i sar., 1997). Oksidativna oštećenja nukleinskih kiselina mogu narušiti DNK replikaciju, transkripciju i translaciju, prouzrokujući mutacije, starenje i smrt ćelije (Kasai i sar., 1986; Richter i sar., 1986; Adelman i sar., 1988; Simić i sar. 1989; Ames i sar., 1991; Helbock i sar., 1999).

Poslednjih godina se sve više formira slika o ulozi slobodnih kiseoničnih radikala u ćelijskoj diferencijaciji, signalnoj transdukciji i međućelijskoj komunikaciji. Postaje jasno da su efekti slobodnih radikala mnogo kompleksniji od samih oštećenja tkiva. Sa otkrićem $NO^\bullet$ kao neurotransmitera, vazodilatatora i molekula sa specifičnim ulogama u imunom sistemu, ovakve hipoteze se sve više potvrđuju (Moncada i sar., 1991; Mizutani i Layon, 1996; Adams, 1996). RMK modulišu aktivnost znatnog broja transkripcionih faktora, mogu da utiču na Ca^{++} signaling, antioksidativne enzime, jonske transportere, kao i na različite kinaze (Abate i sar., 1990; Sen i Packer, 1996; Suzuki i sar., 1997; Sen, 1998; Adler i sar., 1999; Shackelford i sar., 2000).

KARAKTERISTIKE ANTIOKSIDATIVNOG SISTEMA INSEKATA

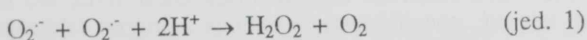
Produkcija reaktivnih kiseoničnih čestica u aerobnoj ćeliji je stalna, i tokom evolucije su se razvili različiti mehanizmi koji imaju za cilj eliminaciju ili ublažavanje njihovog negativnog dejstva. Ovi mehanizmi obuhvataju set enzima i molekula male molekulske mase, koji, delujući sinergistički, predstavljaju sistem antioksidativne odbrane. Osnovna fiziološka uloga ovog sistema je sprečavanje nastanka oksidativnih oštećenja (Cotgreave i sar., 1988; Matsuo, 1993).

Iako je najveći deo biohemijskih ispitivanja aktiviranog kiseonika i reaktivnih kiseoničnih čestica urađen na kičmenjacima, pre svega sisarima, jasno je da i beskičmenjaci, kao što su insekti, reaguju na oksidativni stres na sličan način kao i svi drugi aerobni organizmi. Insekti su posebno podložni negativnom delovanju kiseonika usled toga što trahealni sistem direktno dovodi O_2 do tkiva putem gasno-fazne difuzije (gas phase diffusion), zbog velike potrošnje kiseonika u toku leta (Krogh i Weis-Fogh, 1951), kao i visokog sadržaja lipida sa posebnim fiziološkim funkcijama kod ove klase

beskičmenjaka (Downer, 1985; Stanley-Samuelson, 1988). Pored toga, herbivorni insekti su dodatno izloženi prooksidantnim jedinjenjima koje unose biljnom hranom (Pritsos i sar. 1990; Lee i Berenbaum, 1989, 1990; Ahmad, 1992; Bi i Felton, 1995). Hematofagi insekti su izloženi intenzivnom oksidativnom stresu usled razlaganja hemoglobina u njihovom digestivnom traktu, pri čemu nastaju reaktivne kiseonične čestice (Petretsky i sar., 1995). Zbog svega navedenog, insekti su razvili raznovrstan sistem antioksidativne odbrane, koji pokazuje neke specifičnosti i razlike u odnosu na antioksidativnu zaštitu kod kičmenjaka (Felton, 1995; Felton i Summers, 1995).

Enzimi antioksidativne zaštite: karakteristike i subćelijska distribucija

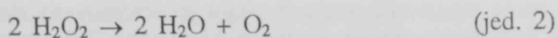
Superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim, koji katališe reakciju dismutacije O_2^- do H_2O_2 i O_2 :



Reakcija se odvija velikom brzinom, koja je 10^4 puta veća od spontane dismutacije (Fridovich, 1983). Do danas je utvrđeno postojanje četiri oblika ovog enzima, koji katališu istu reakciju, sa različitim efikasnošću. Cu,Zn-SOD je citosolni dimerni enzim prisutan u svim eukariotskim ćelijama (McCord i Fridovich, 1969). Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama eukariotskih ćelija i u ćelijama prokariota (Keele, McCord, Fridovich, 1970). Fe-SOD je dimerni protein koji se nalazi samo u prokariotskim ćelijama i u hloroplastima nekih biljaka (Yost, Fridovich, 1973). Četvrta, potpuno nova forma enzima, je predstavljena sa Ni-SOD. Enzim je prvi put detektovan kod *Streptomyces coelicolor* (Kim i sar., 1996). Ne poseduje značajnu homologiju sa poznatim Mn-SOD i Fe-SOD.

Insekti poseduju Cu,Zn-SOD koja je lokalizovana u citosolu, i Mn-SOD u mitohondrijama. Aktivnost Mn-SOD može da predstavlja jednu do dve trećine od ukupne SOD aktivnosti, što je pokazano kod larvi *Spodoptera eridania* (Ahmad i sar., 1988a) i *Trichoplusia ni* (Ahmad i sar., 1988b). Ovi rezultati su potvrđeni na dve ćelijske linije: *Spodoptera frugiperda* Sf-9 i *Trichoplusia ni* Tn-5B1-4 (Wang i sar., 2001). Potvrđena je uloga SOD u odbrani herbivornih insekata od prooksidantnih hemikalija poreklom iz biljaka. Pritsos i sar. (1991) su ukazali na značajnu ulogu SOD u zaštiti od prooksidantnog delovanja kvercetina kod tri vrste iz reda Lepidoptera: *Papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania* i *Trichoplusia ni*. Mutantne jedinke *Drosophila melanogaster*, koje ne poseduju Cu,Zn-SOD, ispoljavaju povećanu osetljivost prema parakvatu, što utiče na pojavu steriliteta kod mužjaka i na skraćenje životnog veka (Phillips i sar., 1989).

Katalaza (CAT) je enzim koji katališe reakciju oksidacije H_2O_2 do H_2O i O_2 :

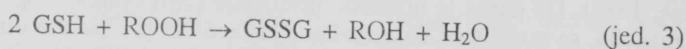


Enzim veoma efikasno uklanja H_2O_2 , jer poseduje veliku V_{max} , ali ima i visoku K_m , pa je afinitet CAT prema H_2O_2 mnogo manji u poredenju sa glutation peroksidazom (GSH-Px). Zato se smatra (Halliwell, 1981), da pri manjim koncentracijama H_2O_2

veći fiziološki značaj ima GSH-Px, dok CAT efikasno razgrađuje visoke koncentracije H_2O_2 .

U sisarskim ćelijama je aktivnost CAT vezana za peroksizome (*Chance i sar.*, 1979), mada je uočena i mala aktivnost u mitohondrijama, endoplazmatskom retikulu i hloroplastima biljaka. Subćelijska distribucija CAT kod insekata je slabo proučena. *Ahmad i sar.*, (1988) su detektovali neobičnu distribuciju ovog enzima kod *Spodoptera eridania*. Autori su registrovali najveću katalaznu aktivnost u citosolnoj frakciji, dok su mikrozomalna i mitohondrijalna frakcija pokazivale približno istu aktivnost. Izuzetno veliku aktivnost CAT u citosolu *S. eridania* (163 ± 30 U/mg proteina) autori su objasnili kao mogući kompenzatorni efekat usled odsustva Se-zavisne GSH-Px kod ove vrste. Istraživanja kod vrste *Ostrinia mibilalis* su pokazala prisustvo katalazne aktivnosti u citosolu (*Jovanović-Galović i sar.*, 1997), ali je aktivnost mnogo manja u odnosu na podatke *Ahmad i sar.* (1988). Ovako velike razlike (i do 30 puta) u aktivnosti CAT još jednom potvrđuju izuzetno veliku varijabilnost u pogledu biohemijskih parametara, čak i kod relativno srodnih insekatskih vrsta, što se može objasniti različitim načinom ishrane, specifičnostima razvića i drugim faktorima.

Glutation peroksidaza (GSH-Px) katališe redukciju velikog broja organskih hidroperoksida, kao i H_2O_2 , pri čemu koristi glutation (GSH) kao redukujući agens:



Postoje dva tipa ovog enzima: Se-zavisna GSH-Px i Se-nezavisna GSH-Px. Se-zavisna GSH-Px kao supstrat koristi H_2O_2 i različite organske peroksidge (*Flohe*, 1989), dok se Se-nezavisna GSH-Px, zapravo, pripisuje jednoj od izoenzimskih formi glutation S-transferaze (GST), koja katališe razlaganje organskih hidroperoksida, ali ne i H_2O_2 . Se-zavisna GSH-Px je prisutna u gotovo svim ćelijama kičmenjaka, a rasprostranjenost kod beskičmenjaka nije do danas potpuno razjašnjena (*Ahmad i sar.*, 1989). Enzim je odsutan kod viših biljaka i bakterija (*Halliwell i Gutteridge*, 1989).

Pitanje prisustva Se-zavisne GSH-Px kod insekata otvara brojne kontroverze i neslaganja među autorima. Pojedini autori su utvrdili potpuni nedostatak ovog enzima kod različitih vrsta insekata (*Smith i Schrifft*, 1979; *Pritsos i sar.*, 1988; *Ahmad i sar.*, 1989; *Sohal i sar.* 1990; *Bolter i Chefurka*, 1990; *Ahmad*, 1992; *Grubor-Lajšić i sar.* 1996; *Jovanović-Galović i sar.* 1997; *Jovanović-Galović*, 1998). Ovi autori su utvrdili peroksidaznu aktivnost prema organskim peroksidima (kumen hidroperoksid, terc-butil hidroperoksid), ali nije detektovana aktivnost sa H_2O_2 kao supstratom. Stoga su ovi autori zaključili da je kod ispitivanih vrsta insekata aktivna Se-nezavisna forma GSH-Px (po nekim autorima GST-Px). Subćelijska distribucija Se-nezavisne GSH-Px kod insekata se poklapa sa distribucijom glutation reduktaze (GR). Prema *Jovanović-Galović* (1998), najmanja aktivnost enzima je detektovana u citosolu, dok je između mitohondrijalne i mikrozomalne frakcije aktivnost uglavnom ravnomerno raspoređena. Kod sisara se Se-zavisna GSH-Px i GR uglavnom nalaze u citosolu i mitohondrijalnom matriksu.

Kod manjeg broja ispitivanih vrsta insekata je detektovana aktivnost Se-zavisne GSH-Px, što unosi dodatne nejasnoće u ovu problematiku. Tako je utvrđeno prisustvo ovog enzima u hemolimfi hematofagne vrste *Rhodnius prolixus* (*Paes i Oliveira*, 1999). Autori su pokazali da enzim ima molekulsku masu oko 100 kDa, inhibiše se sa merkaptosukcinatom, neosetljiv je na cijanid, a deluje i na organske hidroperoksidge, kao i na H_2O_2 . Po svojim osobinama, enzim je sličan sisarskoj Se-zavisnoj GSH-Px,

ali je najveća aktivnost kod *R. prolixus* detektovana ekstracelularno (u hemolimfi), dok je kod sisara enzim lokalizovan pretežno intracelularno. Simmons i sar. (1987) su, koristeći H_2O_2 kao supstrat, utvrdili prisustvo Se-zavisne GSH-Px u citosolu kod *Musca domestica*. Autori su pokazali da je aktivnost enzima modulirana sadržajem selena u ishrani i da nedostatak ovog elementa dovodi do značajnog pada aktivnosti GSH-Px, uz istovremeni porast stepena oksidativnih oštećenja. Do sličnih zapažanja su došli Ahmad i sar. (1989), koristeći kao model istu vrstu insekta.

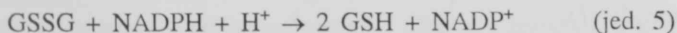
Glutation S-transferaza (GST) katališe reakciju konjugacije između GSH i elektrofилnih supstrata, pri čemu se konjugati prvo eliminišu iz ćelije (Ishikawa, 1992), a zatim transformišu u merkapturну kiselinu, koja se lako ekskretuje van organizma. GST pripada multifunkcionalnoj grupi enzima koji deluju i na organske hidroperokside i lipidne hidroperokside, ali ne na H_2O_2 :



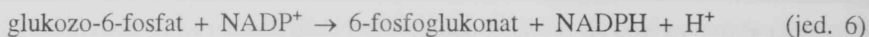
Do danas je kod sisara utvrđeno prisustvo osam citosolnih klasa GST enzima i jedna mikrozomalna klasa (Mannervik, 1985; DeJong i sar., 1988; Mezer i sar., 1991; Pemble i sar., 1996; Board i sar., 1998, 2000), dok su kod insekata opisane dve klase GST enzima (Fournier i sar., 1992). Nedavno je identifikovana nova, treća klasa ovog enzima kod malaričnog vektora *Anopheles gambiae* (Ranson i sar., 2001). Smatra se da je ovaj enzim izuzetno značajan za insekte, pošto kod mnogih predstavnika ove klase beskičmenjaka nije detektovano prisustvo Se-zavisne GSH-Px (Ahmad i Pardini, 1988; Simmons i sar., 1989; Weinhold i sar., 1990). Pored toga, GST ima značajnu ulogu u metabolizmu insekticida i drugih ksenobiotika, kao i u otpornosti insekata na njihovo delovanje (Clark i sar., 1986; Grant i Matsumura, 1989; Reidy i sar., 1990; Fournier i sar., 1992; Ranson i sar., 2001; Kostaropoulos i sar., 2001).

Poznato je da je GST grupa enzima koji su pre svega locirani u citosolu, odakle su izolovani kod nekih insekatskih vrsta (Egaas i sar., 1995; Yu, 1996). Prisustvo GST aktivnosti u mikrozomalnoj frakciji se može povezati sa potvrđenom ulogom ove grupe enzima u detoksifikaciji koja se jednim delom odigrava u mikrozomalnoj frakciji ćelije (Yu, 1996). Približno ista aktivnost i u mitohondrijalnoj frakciji kod vrste *Ostrinia nubilalis* sugerise da GST enzimi imaju određenu ulogu i u detoksifikaciji organskih peroksida i drugih elektrofилnih jedinjenja u mitohondrijama insekatske ćelije, posebno ako se ima u vidu stalna raspoloživost GSH u ovom delu ćelije, koju obezbeđuje izraženo prisustvo GR (Jovanović-Galović, 1998).

Glutation reduktaza (GR) je flavoprotein koji vrši redukciju oksidovanog glutatiона (GSSG), uz učešće NADPH kao redukujućeg agensa (Racker, 1955; Zeigler, 1985):



GR katalizuje i reakciju „mešanih“ disulfida koji nastaju reakcijom između GSH i drugih jedinjenja koja sadrže -SH grupe, formiranjem disulfidnog mosta. NADPH koji je potreban za delovanje GR se u tkivima životinja obezbeđuje oksidativnim pentozofosfatnim putem. GR tako ubrzava pentozofosfatni put, jer redukovani oblik koenzima nastaje u prvoj reakciji ovog metaboličkog puta, delovanjem glukozo-6-fosfat dehidrogenaze:

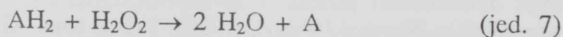


GR je izuzetno značajan enzim u sistemu antioksidativne odbrane ćelije, zato što učestvuje u održavanju visokog odnosa GSH/GSSG i redoks ravnoteže u ćeliji (Ross, 1988; Schafer i Buettner, 2001). Pored toga, svojim delovanjem obezbeđuje potrebnu količinu GSH kao kosupstrata za GSH-Px i GST.

U poređenju sa rezultatima koji su dobijeni na sisarskim vrstama, insekti imaju potpuno drugačiju subćelijsku distribuciju GR. Kod sisara je dve trećine GR aktivnosti lokalizovano u citosolu, a jedna trećina u mitohondrijalnom matriksu (Chance i sar., 1979). Ahmad i sar. (1988) su kod larvi *Spodoptera eridania* detektovali najveću aktivnost GR u mitohondrijalnoj frakciji, nešto manju aktivnost u mikrozomima, dok u citosolu nisu detektovali aktivnost ovog enzima. Slični rezultati dobijeni su kod larvi *Ostrinia nubilalis*, ali je i u citosolu kod ove vrste detektovana mala aktivnost GR (Jovanović-Galović, 1998).

Kanzok i sar. (2001) su utvrdili nedostatak GR kod *Drosophila melanogaster* i dokazali da je enzim tioredoksin reduktaza (TrxR) odgovoran za redukciju GSSG. Enzim vrši transfer redukcionih ekvivalenata sa NADPH na tioredoksin (Trx) i GSSG, pri čemu nastaju Trx(SH)₂ i GSH. Autori su izneli pretpostavku da sličan mehanizam postoji i kod drugih, srodnih insekatskih vrsta.

Askorbat peroksidaza (APOX) karališe redukciju H₂O₂ do H₂O, uz istovremenu oksidaciju askorbata (Asada, 1992):



APOX je enzim specifičan za više biljke (Dalton i sar., 1986; Nakano i Asada, 1987; Mittler i Zilinskas, 1991; Miyake i sar., 1993; Asada, 1992), ali je izolovan i iz nekih cijanobakterija (Shigeoka i sar., 1980; Tel-Or i sar., 1986; Miyake i sar., 1991), kao i protozoe *Trypanosoma cruzi* (Boveris i sar., 1980). APOX je detektovana i u nekim sisarskim tkivima (Kaul i sar., 1988; Nakamura i Ohtaki, 1993; Wada i sar., 1998).

S obzirom da kod mnogih insekatskih vrsta nije utvrđeno prisustvo Se-zavisne GSH-Px i da CAT ima mali afinitet prema H₂O₂ (veliko K_m), Felton i Summers (1995) su postulirali drugi enzimski mehanizam za uklanjanje H₂O₂ kod insekata. Takav mehanizam, po mišljenju autora, uključuje recikliranje askorbata. Potvrdu ovakvim razmišljanjima dali su Mathews i sar. (1997), kada su izolovali APOX iz *Helicoverpa zea*. Autori su utvrdili da enzim, pored H₂O₂, deluje i na lipidne peroksidge, te na taj način predstavlja funkcionalnu zamenu za Se-zavisnu GSH-Px. Ovakav način delovanja APOX je utvrđen još samo kod *Euglene* i nekih cijanobakterija (Ishikawa i sar., 1993), ali nije uočen kod biljaka. Značajno je napomenuti da je kod *H. zea* APOX detektovana u onim tkivima u kojima nedostaje CAT, kao što su Malpigijeve tubule (Mathews i sar. 1997).

Dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) je enzim koji katališe dvoelektronsku redukciju dehidroaskorbata, uz učešće GSH kao donora elektrona:

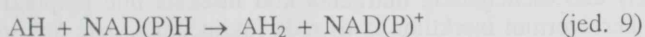


Na ovaj način, enzim je uključen u recikliranje askorbata (Summers i Felton, 1993). Za insekte, to može biti od izuzetnog značaja, jer insekti nisu sposobni za sintezu sopstvenog vitamina C (Dutta Gupta i sar., 1972; Chatterjee, 1973), mada su Fle-

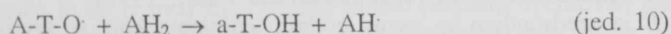
ming i sar. (1988) utvrdili da se vitamin C sintetiše kod dva soja iz roda *Drosophila*. Pitanje sinteze ovog vitamina kod insekata je do danas ostalo otvoreno.

Kod svih ispitivanih vrsta insekata, *Summers i Felton* (1993) su potvrdili prisustvo DHAR. Aktivnost enzima se kreće u granicama od 1.56 U/mg proteina kod *Gal-leria melonella*, do 6.97 U/mg proteina kod *Malacosoma americanum*. Ispitivanja tkivne distribucije DHAR kod *Helicoverpa zea* su pokazala da je enzim prisutan u crevu, masnom telu i Malpigijevim tubulama. Najveća aktivnost enzima je zapažena u Malpigijevim tubulama, što je u korelaciji sa podatkom da je aktivnost APOX najveća upravo u ovom tkivu. Prisustvo APOX i DHAR kod insekata ukazuje na to da je askorbat-zavisno uklanjanje H_2O_2 veoma značajno kod ovih organizama, naročito u tkivima koja ne poseduju katalaznu aktivnost. *Wang i sar.* (2001) su pokazali da ćelijska linija *Spodoptera frugiperda* Sf-9 ne pokazuje katalaznu aktivnost, ali je detektovana aktivnost APOX i DHAR. Autori su zaključili da gonade, od kojih potiče Sf-9 ćelijska linija, ne poseduju CAT, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na larvama *Trichoplusia ni* (*Ahmad i sar.*, 1991).

Askorbil radikal reduktaza (ARR) katališe jednoelektronsku redukciju monodehidroaskorbil radikala ($AH^\cdot$), uz učešće $NAD(P)H$:



Enzim je detektovan u sisarskim tkivima (*Diliberto i sar.*, 1982; *Sun i sar.*, 1984, *Coassin i sar.*, 1991), a utvrđeno je prisustvo ARR i kod insekata (*Felton i Duffey*, 1992; *Felton*, 1995). $AH^\cdot$ nastaje prilikom regeneracije α -tokoferola (α -T-OH), iz tokoferil radikala (α -T-O $^\cdot$) i askorbata (*Niki*, 1991; *Wijesundara i Berger*, 1994):



Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite: antioksidanti male molekulske mase

Određene supstance imaju sposobnost da neenzimskim putem reaguju sa slobodnim radikalima, pri čemu ih prevode u stabilne molekule male reaktivnosti. Neprotein-ski antioksidantni molekuli su od izuzetnog značaja, kako u sprečavanju nastajanja slobodnih radikala, tako i u prekidanju lančanih slobodno-radikal-skih reakcija. Pored dobro poznatih neenzimskih antioksidanata, kako hidrofilnih (glutation, askorbat), tako i lipofilnih (tokoferoli, tokotrienoli, karotenoidi), kod insekata su prisutni i neki specifični antioksidanti male molekulske mase (lutein, urat, poliol, ugljeni hidrati, ostali specifični molekuli).

Glutation je prisutan u ćelijama bakterija, biljaka i životinja u koncentraciji od 0.1 do 10 mM, a ekstracelularno u mikromolarnoj koncentraciji. U ćeliji je glutation prisutan u redukovanoj formi (GSH), a samo je mali deo glutaciona (obično manje od 5%) prisutan u oksidovanoj formi (GSSG) ili u obliku mešanih disulfida (*Kosower i Kosower*, 1978). GSH ima veliki značaj u zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja, jer je dobar sakupljač $OH^\cdot$ i 1O_2 , učestvuje u održavanju homeostaze tiola neophodne za odvijanje njihovih osnovnih funkcija, kao i u putevima detoksifikacije ksenobiotika (*Sies i sar.*, 1980). Mnogi enzimi antioksidativne zaštite su GSH-zavisni (GSH-Px, GST, DHAR), a aktivnost drugih je regulisana tiol-disulfidnom razmenom. Intracelularno,

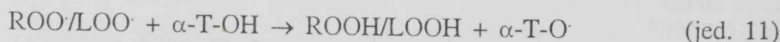
GSH se održava u redukovanom obliku zahvaljujući delovanju GR (Mannervik i sar., 1989), a kod nekih insekata je operativan i sistem Trx-TrxR (Kanzok i sar., 2001).

Čelije reaguju na oksidativni stres povećanjem koncentracije GSH, što se smatra univerzalnim mehanizmom kod mnogih organizama. Veći broj autora je zabeležio povećanje nivoa GSH kao odgovor na primenjeni oksidativni stres kod nekoliko vrsta insekata. Prilikom izlaganja insekata parakvatu (Allen i sar., 1984a) i diamiidu (Allen i sar., 1984b) dolazi do značajnog povećanja koncentracije GSH, a do sličnih rezultata su došli Sohal i sar. (1984), prilikom izlaganja adultnih *Musca domestica* dietilditiokarbamatu i H_2O_2 (Sohal, 1988).

Askorbinska kiselina (vitamin C) funkcioniše kao glavni antioksidant male molekulske mase u citosolu, pored glutationa. Direktno reaguje sa mnogim RMK ($O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$, 1O_2 , tiil radikalom), kao i sa $HOCl$, što je od posebnog značaja kod hronične inflamacije. Učestvuje u redukciji H_2O_2 do H_2O , kao kosupstrat za APOX (jed. 7), a pored toga, igra važnu ulogu u obnavljanju α -T-OH od α -T-O $^{\cdot}$ (jed. 10). Askorbinska kiselina pri većim koncentracijama može delovati i kao prooksidant uz jone prelaznih metala (Cu, Fe), produkujući $HO^{\cdot}$, H_2O_2 ili redukujući Fe^{3+} u Fe^{2+} , te na taj način favorizujući Fentonovu reakciju.

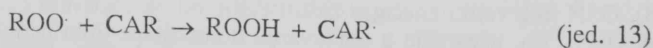
Uloga AH_2 kao esencijalnog nutrijenta kod insekata nije potpuno jasna. Ranija istraživanja na herbivornim insektima iz tri reda (uključujući vrste *Schistocerca gregaria*, *Bombyx mori* i *Anthonomus grandis*) ukazuju da je AH_2 univerzalno neophodna u ishrani fitofagih vrsta (Dadd, 1963). Ekstracelularno, koncentracija AH_2 varira tokom ontogenetskog razvoja, što ukazuje na moguću ulogu u razviću insekata Dadd, 1963). Smatra se da AH_2 kod insekata učestvuje u mnogim vitalnim fiziološkim procesima, uključujući imuni odgovor i promociju sinteze kolagena, što se poklapa sa specifičnom ulogom ovog molekula kod sisara (Yasothornsrikul i sar., 1997).

Vitamin E je predstavljen sa osam srodnih jedinjenja koja se javljaju u prirodi (tokoferol serija), ali je fiziološki najaktivniji α -tokoferol (α -T-OH). Dobar je „hvatač“ (scavenger) peroksil radikala i ova osobina je od posebnog značaja za prevenciju iniciranja, kao i prekidanje lančane reakcije lipidne peroksidacije (Chow, 1991):



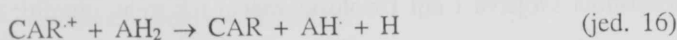
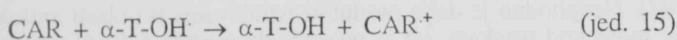
α -T-O je manje reaktivan molekul i nije sposoban da oduzme vodonik od membranskih lipida, pa se na taj način zaustavlja proces lipidne peroksidacije. Ireverzibilnom oksidacijom α -T-O $^{\cdot}$ može nastati tokoferil hinon (α -TQ), međutim, *in vivo* je favorizovana reakcija regeneracije α -T-O $^{\cdot}$ sa AH_2 (jed. 10). Zbog toga se α -TQ može detektovati u organizmu samo u tragovima.

Karotenoidi (CAR) mogu da reaguju sa slobodnim radikalima na tri načina: preko transfera elektrona (jed. 12), oduzimanjem vodonika (jed. 13) i adicijom radikalske čestice (jed. 14) (Britton, 1995):



Karotenoidi su odlični „ugasivači” (quenchers) $^1\text{O}_2$ i drugih prooksidanata u eks-citiranom stanju, kao što je 8-metoksipsoralen (Ahmad i Pardini, 1990; Ahmad, 1992). Iako je β -karoten najrasprostranjeniji, plazma likopen je čak efikasniji quencher oksidanata u ekscitiranom stanju (Di Mascio i sar., 1989). Kod čoveka je likopen veoma efikasan u odbrani od štetnih efekata $^1\text{O}_2$ i NO_2 (Bohm i sar., 2001). Istraživanja na insektima su pokazala da β -karoten znatno umanjuje toksične efekte nekih jedinjenja. Robinson i Beatson (1985) su pokazali da eritrozín B (fotosenzitirajuća boja) ispoljava znatno manji toksični efekat kod *Musca domestica*, ukoliko je β -karoten prisutan u ishrani. Kod vrste *Manduca sexta* je umanjen efekat fototoksične supstance u prisustvu β -karotena i vitamina E, uz istovremeno smanjenje stope smrtnosti (Aucoin i sar., 1990). Ahmad (1992) je uočio da larve *Spodoptera eridania* i *Papilio polyxenes* selektivno resorbuju lutein (hidroksi- β -karoten) u odnosu na ostale karotenoidne. Ovo jedinjenje može imati antioksidantnu ulogu kod insekata, uprkos relativno niskoj „quenching” konstanti (Pardini, 1995).

Truscott (1996) je predložio mogući mehanizam interakcije vitamina C i E sa β -karotenom. Prema ovom modelu, molekul karotenoida učestvuje u obnavljanju $\alpha\text{-T-O}^\cdot$ (jed. 15), a zatim se nastali karotenoid katjon radikal (CAR^+) regeneriše sa askorbatom (jed. 16):



Interakcija CAR^+ sa AH_2 (jed. 16) je nedavno potvrđena od strane Burke i sar. (2001). Moguće je da je ovaj sinergistički model potpuno operativan kod insekata, što ukazuje na značaj i kompleksnost neenzimskih mehanizama zaštite od oksidativnih oštećenja.

Urat ($\text{U}^\cdot$) je hidrosolubilni antioksidant (Hochstein i sar., 1984), lokalizovan pretežno ekstracelularno (Ames i sar., 1981). Posедуje značajne antioksidativne potencijale: vezuje $\text{HO}^\cdot$, $^1\text{O}_2$, LOOH, ozon, kao i HOCl, koja nastaje delovanjem mijeloperoksidaze u fagocitima (Meadows i Smith, 1986; Halliwell i Gutteridge, 1989). Urat formira stabilne komplekse sa jonima prelaznih metala (helira slobodno gvožđe), te na taj način stabilizuje AH_2 (Davies i sar., 1986). Kod sisara, krajnji produkt katabolizma azotnih jedinjenja je urea, a koncentracija $\text{U}^\cdot$ u telesnim tečnostima je relativno mala. Kod čoveka, normalne koncentracije $\text{U}^\cdot$ u plazmi se kreću u granicama od 0.25 do 0.45 mM (Murray, 1988). Nasuprot sisarima, $\text{U}^\cdot$ je dominantna forma ekskrecije azotnih jedinjenja kod većine insekata (Bursell, 1965). Koncentracija u hemolimf hematofagne vrste *Rhodnius prolixus* se kreće od 1 do 5 mM, što ukazuje na značaj ovog molekula u zaštiti od oksidativnih oštećenja (Souza i sar., 1997). Hilliker i sar. (1992) su pokazali da su mutantni oblici *Drosophila melaogaster*, koji nisu sposobni da sintetišu $\text{U}^\cdot$, podložniji oksidativnom stresu. Simić i Jovanović (1989), kao i Maples i Mason (1988), zastupaju stanovište da radikal urske kiseline, koji nastaje vezivanjem $\text{U}^\cdot$ za reaktivne čestice, može da se redukuje pomoću AH_2 , pošto je redoks potencijal urske kiseline pri fiziološkom pH znatno viši u odnosu na askorbinsku kiselinu. Time se još jednom potvrđuje da neenzimski antioksidantni molekuli ne deluju nezavisno, nego u međusobnoj sprezi, sa ciljem da obezbede optimalnu zaštitu od oksidativnog stresa.

Izvestan broj mono- i disaharida može da reaguje sa RMK, pri čemu pokazuju različit kapacitet za vezivanje ovih čestica (Halliwell i Gutteridge, 1981). Malo je po-

dataka koji ukazuju na antioksidantnu ulogu nekih ugljenih hidrata kod insekata. *Felton i Summers* (1995) ukazuju da trehaloza, osnovni ugljeni hidrat u hemolimfi insekata, može da deluje kao scavegner HO $\cdot$, i to sa znatno većom efikasnošću od glukoze. Mnogi insekti u toku zime i izlaganja niskim temperaturama akumuliraju glicerol u veoma visokim koncentracijama. Glicerol, koji funkcioniše kao anhidroprotektor i antifriz agens, može da ispoljava i antioksidantna svojstva *Block*, 1990; *Duman i sar.*, 1991; *Block i sar.*, 1993). Međutim, do danas ostaje nejasno da li je antioksidantno dejstvo ovih jedinjenja njihova primarna uloga ili samo posledica njihovih hemijskih osobina i relativno visokih koncentracija u tkivima insekata pri određenim fiziološkim uslovima ili u određenom stadijumu razvika (*Grubor-Lajšić i sar.*, 1992; *Worland i sar.*, 1998, 2000).

3-hidroksikinurenin, prekursor očnog pigmenta kod insekata, je specifičan molekul sa antioksidantim svojstvima. *Wadano i sar.* (1993) su pokazali da 3-hidroksikinurenin štiti ćelije masnog tela od lipidne peroksidacije kod *Aldrichina grahami* i umanjuje efekat izlaganja t-BOOH. Nedavno je ukazano i na antioksidativni efekat melatonina kod *Drosophila melanogaster* (*Coto-Montes i Hardeland*, 1999). Direktnе interakcije melatonina sa slobodno-radikaliskim česticama se kod insekata mogu jasno razlikovati od indirektnih interakcija, koje se sreću kod ptica i sisara, kod kojih je utvrđeno da melatonin stimuliše GSH-Px (*Barlow-Walden i sar.*, 1995; *Pablos i sar.*, 1995; *Reiter i sar.*, 1997). Neophodno je dalje produbiti istraživanja u oblasti antioksidanata male molekulske mase kod insekata, jer je moguće da postoje i drugi molekuli koji ispoljavaju antioksidantna svojstva i čiji fiziološki značaj tek treba utvrditi.

Antioksidativna zaštita u digestivnom traktu insekata

Insekti poseduju poseban mehanizam pomoću kojeg smanjuju priliv oksidanasa iz spoljašnje sredine do metabolički aktivnih tkiva. Peritrofička membrana, PM (peritrofički matriks, peritrofička ovojnica) je poseban zaštitni sloj koji se formira oko ingestiranog materijala u crevu većine insekata. PM štiti epitelijalne ćelije srednjeg creva od abrazije česticama hrane, a može da deluje i kao lubrikant, olakšavajući time prolazak hrane kroz digestivni trakt (*Wigglesworth*, 1974). Smatra se da PM ima ulogu u sprečavanju prodiranja patogena u ćelije epitela creva, kao i u vezivanju i eliminaciji toksičnih sastojaka hrane (*Peters*, 1992; *Barbehenn i Martin*, 1992, 1994). *Felton i Summers* (1996) su predložili još jednu funkciju PM: zaštita epitela srednjeg creva od oksidativnih oštećenja izazvanih prooksidantima iz hrane. Autori su pokazali da u *in vitro* uslovima preparat PM vrste *Helicoverpa zea* značajno smanjuje formiranje hidroperoksida u homogenatu tkiva izloženog delovanju OH $\cdot$. PM je veoma efikasan „hvatač” OH $\cdot$, zahvaljujući polisaharidnoj prirodi hitina u svom sastavu. Sličnost u strukturi, lokalizaciji i fiziološkoj funkciji između PM insekata i mucina želuca sisara je velika, jer je uočeno da mucin iz želuca sisara može da deluje kao moćan „hvatač” RMK (*Cross i sar.*, 1984; *Grisham i sar.*, 1987).

ZAKLJUČAK

Nemoguće je u jednoj rečenici izvesti neke opšte, univerzalne zaključke o antioksidativnom sistemu insekata. Tokom protekle dve decenije, veliki broj autora se priključio istraživanjima u ovoj oblasti, pa su se saznanja o kompleksnosti AOS kod insekata sukcesivno uvećavala. Danas znamo da je ovaj sistem visoko organizovan, da su

sve komponente sistema međusobno funkcionalno povezane i da nedostatak ili nedovoljna efikasnost jedne komponente izaziva kompenzatorni efekat kod drugih članova sistema. Na taj način se postiže veoma efikasna zaštita ćelija i tkiva, pa i čitavog organizma, od štetnog delovanja radikalskih čestica. Opstanak, rast, razviće, fekunditet/fertilitet, kao i dužina života adulta, mogu biti ugroženi prooksidantima i RMK. Zahvaljujući visokoj integraciji AOS, omogućeno je nesmetano odvijanje brojnih fizioloških procesa kod insekata. Neki autori ukazuju na direktnu regulatornu ulogu RMK u fiziološkim procesima kod insekata. Nedavno je pokazano da H_2O_2 može da izazove apoptozu u insekatskim ćelijama (Hasnain i sar., 1999). Poznato je da je signalni put NO-cGMP operativan i kod insekata (Ribeiro i sar., 1993; Dow i sar., 1994). Danas znamo da oksidanti i antioksidanti učestvuju u procesima diferencijacije i razvića insekata (Allen, 1991). Sve ovo ukazuje na činjenicu da uloga AOS kod insekata nije ograničena samo na neutralizaciju RMK i efekata koje one izazivaju. Očekujemo da će istraživanja u bliskoj budućnosti pružiti odgovore na neka od brojnih pitanja, što će značajno obogatiti naša saznanja o multifunkcionalnosti AOS kod insekata, i biti dobra osnova za razumevanje ovog složenog sistema i kod drugih vrsta, pa i čoveka.

SKRAĆENICE

A	- dehidroaskorbinska kiselina
AH $\cdot$	- monodehidroaskorbil radikal
AH ₂	- askorbinska kiselina
AOS	- antioksidativni sistem
APOX	- askorbat peroksidaza
ARR	- askorbil radikal reduktaza
CAR	- karotenoid
CAR $^{+}$	- karotenoid katjon radikal
CAT	- katalaza
cGMP	- ciklični guanozin monofosfat
DHAR	- dehidroaskorbat reduktaza
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
GR	- glutathion reduktaza
GSH	- redukovani glutathion
GSH-Px	- glutathion peroksidaza
GSSG	- oksidovani glutathion
GST	- glutathion S-transferaza
H ₂ O ₂	- vodonik peroksid
HO $\cdot$	- hidroksil radikal
HOCl	- hipohlorna kiselina
LOO $\cdot$	- lipidni peroksid radikal
LOOH	- lipidni peroksid
NAD(P) $^{+}$	- nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat), oksidovani oblik
NAD(P)H	- nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat) redukovani oblik
NO $\cdot$	- azot oksid
NO ₂	- azot dioksid
O ₂	- molekularni kiseonik
O ₂ $^{-}$	- superoksid anjon radikal

$^1\text{O}_2$	- singlet kiseonik
PM	- peritrofička membrana
RMK	- reaktivni metaboliti kiseonika
$\text{ROO}^\cdot$	- organski peroksil radikal
ROOH	- organski peroksid
SOD	- superoksid dismutaza
$\alpha\text{-T-O}^\cdot$	- α -tokoferil radikal
$\alpha\text{-T-OH}$	- α -tokoferol
t-BOOH	- terc-butil hidroperoksid
Trx	- tioredoksin, oksidovani oblik
$\text{Trx}(\text{SH}_2)$	- tioredoksin, redukovani oblik
TrxR	- tioredoksin reduktaza
U^-	- urska kiselina (urat)

LITERATURA

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., Curran, T. (1990): Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157-1161.
- Adams H. R. (1996): Physiological, pathophysiological and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209, 1297-1302.
- Adelman, R., Saul, R. L., Ames, B. N. (1988): Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2706-2708.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D., Donai, Z. (1999): Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18, 6104-6111.
- Ahmad, S. (1992): Biochemical defense of prooxidant plant allelochemicals by herbivorous insect. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 269-296.
- Ahmad, S., Beilstein, M. A., Pardini, R. S. (1989): Glutathione peroxidase activity in insects: A reassessment. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 12, 31-49.
- Ahmad, S., Duval, D. L., Weinhold, L. C., Pardini, R. S. (1991): Cabbage looper antioxidant enzymes: tissue specificity. *Insect Biochem.* 21, 563-572.
- Ahmad, S., Pardini, R. S. (1988): Evidence for the presence of glutathione peroxidase activity toward an organic hydroperoxide in larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.* 18, 861-866.
- Ahmad, S., Pardini, R. S. (1990): Mechanisms of regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 401-413.
- Ahmad, S., Pritsos, C. A., Bowen, S. M., Heisler, C. R., Blomquist, G. J., Pardini, R. S. (1988b): Antioxidant enzymes of larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*: subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. *Free Radic. Res. Commun.* 4, 403-408.
- Ahmad, S., Pritsos, C. A., Bowen, S. M., Heisler, C. R., Blomquist, G. J., Pardini, R. S. (1988a): Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 7, 173-186.

Allen, R. G. (1991): Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: The metabolic paradox of cellular differentiation. P. S. E. B. M. 196, 117-129.

Allen, R. G., Farmer, K. J., Newton, R. K., Sohal, R. S. (1984a): Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. Comp. Biochem. Physiol. 78C, 283-288.

Allen, R. G., Farmer, K. J., Sohal, R. S. (1984b): Effect of diamide administration on longevity, oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. Comp. Biochem. Physiol. 78C, 31-33.

Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. (1981): Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6858-6862.

Ames, B. N., Shigenga, M. K., Park, E. M. (1991): DNA damage by endogenous oxidants as a cause of aging and cancer. In Davies, K. J. A. (ed): Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects, New York, Pergamon Press, pp 181-187.

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

Aucoin, R. R., Fields, P. Lewis, M. A., Philogene, B. J. R., Arnason, T. J. (1990): The protective effects of antioxidants to a phototoxin-sensitive insect herbivore, *Manduca sexta*. J. Chem. Ecol. 16, 2913-2924.

Barbehenn, R. V., Martin, M. M. (1992): The protective role of the peritrophic membrane in the tannin-tolerant larvae of *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera). J. Insect Physiol. 38, 973-980.

Barbehenn, R. V., Martin, M. M. (1994): Tannin sensitivity in the larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): Roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. J. Chem. Ecol. 20, 1985-2001.

Barlow-Walden, L., Reiter, R. J., Abe, M., Pablos, M. I. Menendez-Palaez, A., Chen, L.-D., Poeggeler, B. (1995): Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. Neurochem. Int. 26, 497-502.

Benedetti, A., Comporti, M. (1987): Formation, reactions and toxicity of aldehydes produced in the course of lipid peroxidation in cellular membranes. Bioelectrochem. 18, 187-202.

Bi, J. L., Felton, G. W. (1995): Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. J. Chem. Ecol. 21, 1511-1530.

Block, W. (1990): Cold tolerance of insects and other arthropods. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 326, 613-633.

Block, W., Grubor-Lajšić, G., Worland, R. (1993): Cold tolerance of a larval tipulid from an upland habitat. Cryo-Lett. 14, 185-192.

Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., Jermin, L. S. (1998): Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. Biochem. J. 328, 929-939.

Board, S. E., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastale, S., Jermin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V. (2000): Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. J. Biol. Chem. 275, 24798-24806.

Bohm, F., Edge, R., Burke, M., Truscott, T. G. (2001): Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide - ROS components from cigarette smoke. *J. Photochem. Photobiol. B.* 64, 176-178.

Bolter, C. J., Chefurka, W. (1990): The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, catalase and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Pest. Biochem. Physiol.* 36, 52-60.

Boveris, A., Sies, H., Martino, E. E., Docampo, R., Turrens, J. F., Stoppani, A. O. M. (1980): Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 188, 643-648.

Britton, G. (1995): Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9, 1551-1558.

Burke, M., Edge, R., Land, E. J., Truscott, T. G. (2001): Characterization of carotenoid radical cations in liposomal environments: interaction with vitamin C. *J. Photochem. Photobiol. B.* 60, 1-6.

Bursell, E. (1965): Excretion of nitrogen in insects. *Adv. Insect Physiol.* 9, 33-67.

Cerutti, P. A. (1985): Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-538.

Chatterjee, I. B. (1973): Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* 182, 1271-1272.

Chow, C. K. (1991): Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 215-232.

Clark, A. G., Shamaan, N. A., Sinclair, M. D., Dauterman, W. C. (1986): Insecticide metabolism by multiple glutathione S-transferases in two strains of the house fly *Musca domestica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 25, 169-175.

Coassin, M., Tomasi, A., Vannini, V., Ursini, F. (1991): Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: One-electron vs two-electron pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 458-462.

Comporti, M. (1985): Biology of disease: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 53, 559-623.

Cotgreave, I. A., Moldeus, P., Orrenius, S. (1988): Host biochemical defence mechanisms against prooxidants. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28, 189-212.

Coto-Montes, A., Hardeland, R. (1999): Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: Antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *J. Pineal Res.* 27, 154-158.

Cross, C. E., Halliwell, B., Allen, A. (1984): Antioxidant protection: A function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1, 1328-1330.

Dadd, R. H. (1963): Feeding behavior and nutrition in grasshoppers and locusts. *Adv. Insect Physiol.* 1, 47-109.

Dalton, D. A., Rusell, S. A., Hanus, F. J., Pascoe, G. A., Evans, H. J. (1986): Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3811-3815.

Davies, K. J. A. (1986): Intracellular proteolytic systems may function as secondary defenses: A hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* 2, 155-173.

Davies, K. J. A. (1987): Protein damage and degradation by oxygen radicals in general aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901.

- Davies, K. J. A., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S. F., Hochstein, P. (1986): Uric acid-iron complexes: A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235, 747-754.
- Dean, R. T. (1991): Protein damage and repair: An overview. In Davies, K. J. A. (ed): *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*. New York, Pergamon Press, pp 341-347.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18.
- DeJong, J. L., Morgenstern, R., Jornvall, H., DePierre, J. W., Tu, C.-P.D. (1988): Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 263, 8430-8436.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989): Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532-538.
- Diliberto, E., Jr., Dean, G., Carter, C., Allen, P. L. (1982): Tissue, subcellular, and submitochondrial distributions of semidehydroascorbate reductase: Possible role of semidehydroascorbate reductase in cofactor regeneration. *J. Neurochem.* 39, 563-568.
- Dow, J. A. T., Maddrell, S. H. P., Davies, S., Skaer, N. J. V., Kaiser, K. (1994): A novel role for the nitric oxide cGMP signaling pathway: The control of epithelial function in *Drosophila*. *Am. J. Physiol.* 266, R1716-R1719.
- Downer, R. G. H. (1985): Lipid metabolism. In Kerkut, G. A., Gilbert, L. I. (eds): *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, Vol. 10, pp 77-113.
- Duman, J. G., Wu, D. W., Xu, L., Tursman, D., Olsen, T. M. (1991): Adaptations of insects to subzero temperatures. *Quart. Rev. Biol.* 66, 387-410.
- Dutta Gupta, S., Ray Chaudhuri, C., Chatterjee, I. B. (1972): Incapability of L-ascorbic acid synthesis by insects. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 889-890.
- Egaas, E., Sandvik, M., Svendsen, N. O., Skaare, J. U. (1995): The separation and identification of glutathione S-transferase subunits from *Orthosia gothica*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 783-788.
- Esterbauer, H., Cheese, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G., Slater, G. F. (1982): Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem. J.* 208, 129-140.
- Felton, G. (1995): Antioxidant defenses of invertebrates and vertebrates. In Ahmad, S. (ed): *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, New York, pp 356-434.
- Felton, G. W., Duffey, S. S. (1992): Ascorbate oxidation reduction in *Helicoverpa zea* as a scavenging system against dietary oxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 19, 27-37.
- Felton, G. W., Summers, C. B. (1995): Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 187-197.
- Fleming, J. E., Orr, P. L., Shibuya, R. B., Bensch, K. G. (1988): Hydroxyl radical scavenging in *Drosophila melanogaster*. *Age* 11, 175.
- Flohe, L. (1989): The selenoprotein glutathione peroxidase. In Dolphin, D., Poulson, R., Avramović, O. (eds): *Glutathione*. John Wiley & Sons, New York, pp 643-731.

Fournier, D., Bride, J. M., Poirie, M., Berge, J. P., Plapp, F. W. (1992): Insect glutathione S-transferases: Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* 267, 1840-1845.

Freeman, B. A. (1991): Mechanisms of ischemia/reperfusion injury: An overview. In Davies, K. J. A. (ed): *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*. New York, Pergamon Press, pp 392-395.

Fridovich, I. (1983): Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 239-257.

Fridovich, I. (1995): Superoxide radicals and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 97-112.

Grant, D. F., Matsumura, F. (1989): Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 33, 132-143.

Grisham, M. B., Von Ritter, C., Smith, B. F., Lamont, J. T., Granger, D. N. (1987): Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am. J. Physiol.* 253, G93-G96.

Grubor-Lajšić, G., Block, W., Jovanović, A., Worland, R. (1996): Antioxidant enzymes in the Antarctic fly, *Belgica antarctica*. *Cryo-Lett.* 17, 39-42.

Grubor-Lajšić, G., Block, W., Worland, R. (1992): Comparison of the cold hardness of two larval Lepidoptera (Noctuidae). *Physiol. Entomol.* 17, 148-152.

Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K. J. (1997): Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11, 526-534.

Halliwell, B. (1981): Free radicals, oxygen toxicity and aging. In Sohal, R. S. (ed): *Age Pigments*. Elsevier, North Holland Biomedical Press, pp 1-62.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1981): Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.* 128, 343-346.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.

Hasnain, S. E., Taneja, T. K., Sah, N. K., Mohan, M., Pathak, N., Sahdev, S., Athar, M., Totey, S. M., Begum, R. (1999): *In vitro* cultured *Spodoptera frugiperda* insect cells: Model for oxidative stress induced apoptosis. *J. Biosci.* 24, 13-19.

Helbock, H. J., Beckman, K. B., Ames, B. N. (1999): 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* 300, 156-166.

Hilliker, A. J., Duyf, B., Evans, D., Phillips, J. P. (1992): Urate-null rose mutants of *Drosophila melanogaster* are hypersensitive to oxygen stress. *Procl. Natl. Acad. Sci.* 89, 4343-4347.

Hochstein, P., Hatch, L., Sevanian, A. (1984): Uric acid: Functions and determinations. *Methods Enzymol.* 105, 162-166.

Horton, A. A., Fairhurst, S. (1987): Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. In Goldberg, L. (ed): *CRC Critical Reviews in Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp 27-79.

Ishikawa, T. (1992): The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trend Biochem. Sci.* 17, 463-468.

Ishikawa, T., Shigeoka, S., Hirayama, O., Mitsunaga, T. (1993): Requirement for iron and its effect on ascorbate peroxidase in *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 93, 25-29.

- Jovanović-Galović, A. (1998): Antioksidativni sistem kukuruznog plamena (*Ostrinia nubilalis*, Hbn): subćelijska distribucija i uloga antioksidanata u metamorfozi. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu.
- Jovanović-Galović, A., Grubor-Lajšić, G., Taški, K., Vujović, G. (1997): Subcellular distribution and activities of antioxidant enzymes in the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) Hbn. 11th Balkan Biochem. Biophys. Days, Abstr. 127, 393, Thessaloniki, Greece.
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H.-M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. H., Becker, K. (2001): Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. Science 291, 643-646.
- Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., Tanooka, H. (1986): Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. Carcinogenesis 7, 1845-1851.
- Kaul, K., Lam, K.-W., Fong, D., Lok, C., Berry, M., Treble, D. (1988): Ascorbate peroxidase in bovine retinal pigment epithelium and choroid. Curr. Eye Res. 7, 675-679.
- Keele, B. B., McCord, J. M., Fridovich, I. (1979): Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: A new manganese-containing enzyme. J. Biol. Chem. 245, 6176-6181.
- Kim, F. J., Kim, H. P., Hah., Y. C., Roe, J. H. (1996): Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. Eur. J. Biochem. 241, 178-185.
- Kosower, I. A., Kosower, E. M. (1978): The glutathione status of cells. Int. Rev. Cytol. 54, 109-160.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A. I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001): Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. Biochem. Molec. Biol. 31, 313-319.
- Krogh, A., Weis-Fogh, T. (1951): The respiratory exchange of the desert locust (*Schistocerca gregaria*), before, during and after light. J. Exp. Biol. 28, 342-357.
- Lee, K., Berenbaum, M. R. (1989): Action of antioxidant enzymes and cytochrome P-450 monooxygenases in the cabbage looper in response to plant phototoxins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 10, 151-162.
- Lee, K., Berenbaum, M. R. (1990): Defense of parsnip webworm against phototoxic furanocoumarins: Role of antioxidant enzymes. J. Chem. Ecol. 16, 2451-2460.
- Levine, R. L., Oliver, C. N., Fulks, R. M., Stadtman, E. R. (1981): Turnover of bacterial glutamine synthase: Oxidative inactivation proceeds proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2120-2124.
- Mannervik, B. (1985): The isoenzyme of glutathione transferase. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 57, 357-417.
- Mannervik, B., Widersten, M., Board, P. G. (1989): Glutathione-linked enzymes in detoxification reactions. In Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A. (eds): Glutathione Centennial: Molecular Perspectives and Clinical Implications. Academic Press, San Diego, pp 23-34.
- Maples, K. R., Mason, R. P. (1988): Free radical metabolite of uric acid. J. Biol. Chem. 263, 1709-1712.

- Mathews, M. C., Summers, C. B., Felton, G. W.** (1997): Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 57-68.
- Matsuo, M.** (1993): *Free Radicals and Aging* (Ed. P. Y. Byung), London, C. R. C. Press, Boca Raton.
- McCord, J. M., Fridovich, I.** (1969): Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (haemocytin). *J. Biol. Chem.* 244 (22) 6049-6055.
- McCord, J. M., Omar, B. A.** (1991): Mechanisms of ischemia/reperfusion injury. In Davies, K. J. A. (ed): *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*. New York, Pergamon Press, pp 396-401.
- Meadows, J., Smith, R. C.** (1986): Uric acid protection of nucleobases from ozone induced degradation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 838-845.
- Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., Ketterer, B.** (1991): Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274, 409-414.
- Mittler, R. Zilinskas, B. A.** (1992): Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* 97, 962-968.
- Miyake, C., Coa, W.-H., Asada, K.** (1993): Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 34, 881-889.
- Miyake, C., Michihata, F., Asada, K.** (1991): Scavenging of hydrogen peroxide in prokaryotic and eukaryotic algae: Acquisition of ascorbate peroxidase during evolution of cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32, 33-43.
- Mizutani T., Layon A. J.** (1996): Clinical applications of nitric oxide. *Chest* 110, 506-524.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A.** (1991): Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
- Murray, R. K.** (1988): Biochemistry and disease. In Murray, R. M., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, V. W. (eds): *Harper's Biochemistry*. 22nd ed. Appleton and Lange, Connecticut, pp 689-690.
- Nakamura, M., Ohtaki, S.** (1993): Formation and reduction of ascorbate radicals by hog thyroid microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 84-90.
- Nakano, Y., Asada, K.** (1987): Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: Its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28, 131-140.
- Niki, E.** (1991): Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1119-1124.
- Pablos, M. I., Agapito, M. T., Gurierrez, R., Recio, J. M., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Acuna-Castroviejo, D., Menendez-Pelaez, A.** (1995): Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res.* 19, 111-115.
- Paes, M. C., Oliveira, P. L.** (1999): Extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41, 171-177.
- Pardini, R. S.** (1995): Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active prooxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 101-118.
- Pemble, S. E., Wardle, A. F., Taylor, J. B.** (1996): Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319, 749-754.

- Peters, W. (1992): Peritrophic Membranes. Springer-Verlag, Berlin, pp 238.
- Petretsky, M. D., Ribeiro, J. M. C., Atella, G. C., Masuda, H., Oliveira, P. L. (1995): Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. J. Biol. Chem. 270, 10893-10896.
- Phillips, J. D., Campbell, S. D., Michaud, D., Charbonneau, M., Hilliker, A. J. (1989): Null mutation of copper/zinc superoxide dimutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2761-2765.
- Pritsos, C. A., Ahmad, S., Bowen, S. M., Elliot, A. J., Blomquist, G. J., Pardini, R. S. (1988): Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin. Arch. Insect biochem. Physiol. 8, 101-112.
- Pritsos, C. A., Ahmad, S., Elliot, A. J., Pardini, R. S. (1990): Antioxidant enzyme levels response to proxdant allelochemicals in larvae of southern armyworm moth *Spodoptera eridania*. Free Rad. Res. Comms. 9, 127-133.
- Pritsos, C. A., Pastore, J., Pardini, R. S. (1991): Role of superoxide dismutase in the protection and tolerance to the prooxidant allelochemical quercetin in *Papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania*, and *Trichoplusia ni*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 16, 273-282.
- Racker, E. (1955): Glutathione reductase (liver and yeast). Methods Enzymol. 2, 722-725.
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C. W., Collins, F. H., Hemingway, J. (2001): Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem. J. 359, 295-304.
- Reidey, G. F., Raose, H. A., Visetson, S., Murray, M. (1990): Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). Pestic. Biochem. Physiol. 36, 169-276.
- Reiter, R. J., Tang, L., Garcia, J. J., Munos-Hoyos, A. (1997): Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. Life Sci. 60, 2255-2271.
- Ribeiro, J., Hazzard, J., Nussenzveig, R. H., Champagne, D. E., Walker, F. A. (1993): Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a blood-sucking insect. Science 260, 539-541.
- Richter, C., Rark, J. W., Ames, B. N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Procl. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6465-6467.
- Robinson, J. R., Beatson, E. P. (1985): Enhancement of dye-sensitized phototoxicity to house fly larvae in vivo by dietary ascorbate, diazobicyclooctane, and other additives. Pest. Biochem. Physiol. 24, 375-383.
- Ross, D. (1988): Glutathione, free radicals chemotherapeutic agents, mechanisms of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. Pharamac. Ther. 37, 231-249.
- Saltman, B. (1989): Oxidative strees: a radical view. Seminars Hematol. 26, 249-256.
- Schackelford, R. E., Kaufman, W. K., Paules, R. S. (2000): Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. Free Radic. Biol. Med. 28, 1387-1404.

- Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001): Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191-1212.
- Sen, C. K. (1998): Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1747-1758.
- Sen, C. K., Packer, L. (1996): Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709-720.
- Shigeoka, S., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1980): Purification and some properties of L-ascorbic acid peroxidase in *Euglena gracilis* Z. *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 121-127.
- Sies, H. (1986): Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058-1071.
- Sies, H., Wahllander, A., Waydhas, C., Soboll, S., Heberle, D. (1980): Functions of intracellular glutathione in hepatic hydroperoxide and drug metabolism and the role of extracellular glutathione. *Adv. Enzyme Regul.* 18, 303-320.
- Simić, M. G., Bergtold, D. S., Karam, L. R. (1989): Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutat. Res.* 214, 3-12.
- Simić, M. G., Jovanović, S. V. (1989): Antioxidant mechanisms of uric acid. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5778-5782.
- Simmons, T. W., Jamall, I. S., Lockshin, R. A. (1987): The effect of selenium deficiency on peroxidative injury in the house fly, *Musca domestica*. *FEB* 218, 251-254.
- Simmons, T. W., Jamall, I. S., Lockshin, R. A. (1989): Selenium-independent glutathione peroxidase activity associated with glutathione S-transferase from the housefly, *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 232-237.
- Smith, J., Schrift, A. (1979): Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B, 39-44.
- Sohal, R. S. (1988): Effect of hydrogen peroxide administration on life span, superoxide dismutase, catalase, and glutathione in the adult house fly, *Musca domestica*; *Exp. Gerontol.* 23, 211-216.
- Sohal, R. S., Arnold, L., Orr, W. C. (1990): Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 56, 223-235.
- Sohal, R. S., Farmer, K. J., Allen, R. G., Ragland, S. S. (1984): Effects of diethyldithiocarbamate on life span, metabolic rate, superoxide dismutase, inorganic peroxides and glutathione activity in the adult male housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* 24, 175-183.
- Souza, A. V. G., Petretski, J. H., Demasi, M., Bechara, E. J. H., Oliveira, P. L. (1997): Urate protects a bloodsucking insect against hemin-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 209-214.
- Stadtman, E. R. (1990): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanisms and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 315-325.
- Stadtman, E. R. (1991): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266, 2006-2008.

- Stanley-Samuelson, D. W., Jurenka, R. A., Cripps, C., Blomquist, G. J., de Renobales, M. (1988): Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 9, 1-33.
- Summers, C. B., Felton, G. W. (1993): Antioxidant role of dehydroascorbic acid in insects. *Biochim. Biophys. Acta* 1156, 235-238.
- Sun, I., Morre, D.J., Crane, F.L., Safranski, K., Croze, E.M. (1984): Monodehydroascorbate as an electron acceptor for NADH reduction by coated vesicle and Golgi apparatus fractions of rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* 797, 266-275.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., Sevanian, A. (1997): Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 269-285.
- Tel-Or, E., Huflejt, M. E., Packer, L. (1986): Hydroperoxide metabolism in cyanobacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 396-402.
- Truscott, T. G. (1996): Beta-carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *J. Photochem. Photobiol. B.* 35, 233-235.
- Wada, N., Kinoshita, S., Matsuo, M., Amako, K., Miyake, C., Asada, K. (1998): Purification and molecular properties of ascorbate peroxidase from bovine eye. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242, 256-261.
- Wadano, A., Takenaka, Y., Matumoto, M. (1993): 3-Hydroxykynurenine as a radical scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 919-925.
- Wang, Y., Oberley, L. W., Murhammer, D. W. (2001): Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 1254-1262.
- Weinhold, L. C., Ahmad, S., Pardini, R. S. (1990): Insect glutathione S-transferase: A predictor of allelochemical and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B, 355-363.
- Wigglesworth, V. B. (1974): *The Principles of Insect Physiology*. 7th Ed. Chapman and Hall, London.
- Wijesundara, M. B. J., Berger, S. (1994): The redox pair vitamin E and C, a ¹³C-NMR study. *Liebigs Ann. Chem.*, 1239-1241.
- Witz, G. (1989): Biological interactions of α , β -unsaturated aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 333-349.
- Worland, R., Block, W., Grubor-Lajšić, G. (2000): Survival of *Heleomyza borealis* (Diptera, Heleomyzidae) larvae down to -60 C. *Physiol. Entomol.* 25, 1-5.
- Worland, R., Grubor-Lajšić, G., Montiel, P. O. (1989): Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *J. Insect Physiol.* 44, 211-219.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A., Dearoff, C. R. (1997): Identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* 198, 17-25.
- Yost, F., Fridovich, I. (1973): An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248, 4905-4908.
- Yu, S. J. (1996): Insect glutathione S-transferases. *Zoological studies* 35, 9-19.
- Zeigler, D. M. (1985): Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 305-329.

ANTIOXIDANT PROTECTION IN INSECTS

Bojana Stanić, Gordana Grubor-Lajšić
Institute of Biology and Ecology, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

ABSTRACT

In addition to the normal burden imposed by an aerobic lifestyle, insects may be particularly prone to oxidative stress. Therefore, they possess a suite of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants that form a well orchestrated response to the attack of dietary and endogenously produced oxidants. Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione transferase and glutathione reductase have been characterized in insects. Latest results indicate the presence of an active enzymatic ascorbate recycling pathway, including ascorbate peroxidase, dehydroascorbate reductase and ascorbil radical reductase. Water-soluble and lipid-soluble small molecular weight antioxidants such as ascorbate, glutathione, urate, tocopherols and carotenoids play very efficient antioxidant roles in insects. Additionally, the peritrophic envelope, trehalose, glycerol and some other compounds may also represent an important antioxidant defence in insects. The mode of the regulation of antioxidant system has been studied in diverse insect species, employing different inducers of oxidative stress, as well as during reproduction, development and ageing. The results reported so far showed that insect antioxidant system is very flexible and dynamically organized. Besides, it has been demonstrated that this system operates not only to eliminate reactive oxygen species, but also to recompose particular reactive species which express direct physiological effects.

Key words: *insects, reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidant system*

UDK: 591.1:591.463.2

Naučni prilog

INHIBITORY EFFECTS OF L-ARGININE METHYL ESTER
ON ANTIOXIDANT ENZYMES AND STRESS-IMPAIRED STEROIDOGENESIS
IN RAT TESTES

Nebojša L. Andrić, Silvana A. Andrić, Tatjana S. Kostić,
Snežana M. Dragišić and Radmila Z. Kovačević
Institute of Biology and Ecology, Faculty of Natural Sciences,
University of Novi Sad,
Dositeja Obradovića Square 2, 21000 Novi Sad, Yugoslavia

Primljeno
1. III 2001.

ABSTRACT

The stress-induced activation of nitric oxide (NO) signalling pathway in testicular tissue has been previously suggested, but these effects of NO on cellular functions have been incompletely characterized. Consistent with earlier studies, here we show that 2-h immobilization stress led to significant increase in testicular NO production. All three NO synthases (inducible, endothelial and neural) were demonstrated by Western blot analysis, indicating their constitutive expression in the postmitochondrial fractions of interstitial cells from control and stressed animals. Intratesticular (*it*) injection of L-arginine methyl ester (L-AME; 15.2 mg/testis) an NOS substrate, not only mimicked the action of acute stress on androgenesis, but further decreased *in vitro* human chorionic gonadotropin (hCG)-stimulated androgen production in stressed rats. This was accompanied with strong increase in NO production. Also, in L-AME-treated rats the activities of antioxidant enzymes in the interstitial cell compartment were decreased comparing to saline-injected rats. These results support the role of NO signalling pathway in down regulation of both androgenesis and activities of antioxidant enzymes.

Key words: nitric oxide, acute immobilization stress, L-arginine methyl ester, testicular steroidogenesis, NOS, antioxidant enzymes.

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO), a free radical, is generated from L-arginine by nitric oxide synthase (Kostic et al., 1998). NO is widely distributed intra and inter-cellular messenger involved in many physiological processes. NO plays role in the regulation of endocrine system, because it has been reported that NO modulates secretion of some hormones, such as insulin, GnRH, PRL and LH (Punta et al., 1996). Recent studies suggest that NO could be involved in the control of testicular function (Burnett et al., 1995; Kostic et al., 1998, 1999). NO can be produced by testicular tissue and acts as an autocrine/paracrine messenger in local regulation of steroidogenesis. (Moncada et al., 1991.). Moreover, it has been suggested that Leydig cells and rat testes can also secrete NO (Welch et al., 1995; Tatsumi et al., 1997) and its inhibitory effect in testicular steroidogenesis has been reported (del Punta et al., 1996; Pomerantz and Pitelka, 1998; Adams et al., 1996; Gaytan et al., 1997; Valenti et al., 1999; Kostic et al., 1998, 1999). NO is also produced by the resident macrophages and endothelial vascular cells, which could possibly modulate Leydig cells function (Valenti et al., 1999). Del Punta et al. (1996) have shown that administration of NO-donors S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), diethylamine NONOate (DEA/NO) and dipropyleneetriamine NONOate (DPTA/NO) in doses between 10^{-4} and 10^{-3} M inhibited testosterone secretion by purified Leydig cells. Furthermore, treatment with NO donor such as isosorbide dinitrate (ISDN) decreased testosterone concentration (Kostic et al., 2000). *In vivo* treatment with L-arginine methyl ester (L-AME), an exogenous substrate for NOS, reduces concentration of testosterone in the testicular interstitial fluid. Valenti et al. (1999) have shown biphasic effect (stimulation with low and inhibition with high dose of NO donors) on testosterone production by purified Leydig cells cultured *in vitro*. Results of Adams et al. (1994) support hypothesis of inhibitory effect of NO on steroidogenesis. Treatment with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), raised the testosterone concentration.

Nitric oxide synthase is a family of isozymes present in various tissues and catalyze the production of NO (Park et al., 2000). It has been reported that human and rat testes contain all three isoforms of NOS. The constitutive type of NOS is present in Leydig cells of human testes (Davidoff et al., 1995). Furthermore, the messenger RNA for inducible NOS is expressed in these cells (Tatsumi et al., 1997). Immunohistochemical studies have shown that the endothelial (type III) isoform is present in rat and human testes (Davidoff et al., 1997; Adams et al., 1992). Recent studies suggest the presence of inducible (type II) isoform in rat and human testes. O'Bryan et al. (2000) have shown constitutive expression of protein and mRNA of inducible NOS in Leydig and Sertoli cells in the specific stages of development in normal rat testes. Furthermore, Park et al. (2000) also demonstrated constitutive expression of all three isoforms in human testes. This evidence has clearly demonstrated important paracrine/autocrine role of NO in regulation of testicular steroidogenesis.

It is well documented that acute immobilization stress decrease basal and hCG stimulated androgen production primarily at the testicular level (Maric et al., 1996). Several lines of evidence have suggested that NO mediate the stress-induced downregulation of testicular steroidogenesis. For example, *in vitro* androgenesis by decapsulated testes from stressed rats exposed to human chorionic gonadotropin (hCG) was significantly reduced. This inhibition was accompanied by an elevation in the testicular nitrite, a stable oxidation product of NO pathway (Kostic et al., 1998, 1999). Also, bilateral intratesticular injection of L-NAME, non-selective inhibitor of NOS,

prevented stress-induced decrease of hCG-stimulated androgen production, and significantly reduced the nitrite levels. The impaired testicular steroidogenesis in stressed rats coincided with significant inhibition of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD) (Srivastava et al., 1993), 17α hydroxylase/lyase (P450c17) (Kostic et al., 1997; Akinbami et al., 1994) and NADPH-P450 reductase (Kostic et al., 1998).

Raising of intratesticular concentration of NO may affect the activity of some antioxidant enzymes, leading to an imbalance of the prooxidant versus antioxidant status in the interstitial tissue and to increased production of reactive oxygen species. It has been shown that, intratesticular injection of ISDN, an NO donor, decreases activity of catalase and glutathione transferase in the interstitial compartment of rat testes (Kostic et al., 2000). Furthermore, *in vitro* application of SNAP and sodium nitropruside (SNP), an NO donor directly to the enzymatic assay inhibited activity of catalase, glutathione peroxidase and glutathione transferase and parallel treatment with L-NAME partially normalized these activities (Kostic et al., 2000). This evidence strongly support the fact that stress-induced increase of testicular NO leads to inhibition of both steroidogenic and antioxidant enzymes.

The purpose of the present study was to investigate the effect of injection of L-AME on testicular steroidogenesis in freely moving and stressed rats, as well as on testicular antioxidant enzyme activities in normal rats. We also examined the presence of all three isoforms of NOS in the testes.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Antitestosterone serum No. 250 was supplied by G. D. Niswender (Colorado State University). Medium 199 (M199) was purchased from GIBCO Laboratories (Gaithersburg, Maryland, USA); bovine serum albumin (BSA, Fraction V), collagenase (Type I), testosterone, L-arginine methyl ester, sulphanilamide, naphthylethylene-diamine, sodium nitrite, trypan blue were purchased from Sigma; hCG (Pregnyl, 3000 IU/mg) was obtained from Organon Inc; [(1,2,3,7- 3 H(N)] testosterone was obtained from New England Nuclear. Monoclonal antibody against iNOS, eNOS, nNOS was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, USA). Secondary antibody-alkaline phosphatase conjugate and substrate 5-bromo-4-chloro-3-indol phosphat/tetranitrobluetetrazolium were obtained from Calbiochem (San Diego, USA). Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL) was obtained from Pierce (Rockford, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Animals and treatments

All experiments were performed in adult male Wistar rats in our laboratory and raised under controlled environmental conditions (temperature 22 ± 2161602^0 C; 14 h light/10 h dark) with food and water *ad libitum*. Rats were handled daily during period of acclimation before experiments. Experiments were performed between 06⁰⁰ h and 08⁰⁰ h. Rats were subjected to acute (2h) immobilization stress or left undisturbed (controls). Immobilization was conducted according to Kvetnansky et al. (1970).

In order to investigate possible involvement of NO in stress induced decrease of androgen production, rats were treated with either the vehicle (saline) or L-AME (15,2 mg/testes) by bilateral intratesticular injection at the beginning of stress period. Control animals were injected with saline at the same time. Treated and control animals

were sacrificed by decapitation at the end of immobilization period, trunk blood was collected, and serum samples were stored at -20°C for subsequent hormone analysis.

In vitro steroidogenesis

Testes from control and experimental rats were removed quickly, decapsulated and hemitestes were incubated individually in plastic vials containing 2 ml 0,2% bovine-serum albumine in medium 199 (M199-BSA; pH 8). Basal as well as hCG-stimulated testosterone production were estimated by incubation in presence or absence of 10 ng/ml hCG. The contents of the incubation vials were gassed with 95% O_2 -5% CO_2 and incubations were carried out at 34°C for 3 h. The medium was decanted and centrifuged at $1500\times g$ for 10 min. and supernatant stored at -20°C until assayed for testosterone content by RIA. Since the antitestosterone serum showed high cross-reactivity with dihydrotestosterone, assay values were referred to as testosterone+dihydrotestosterone (T+DHT) levels. Each experiment was run in one assay (precision 6 pg/tube: intra-assay coefficients of variation were 5-8% and 7,5% respectively). Serum T+DHT values were also estimated by RIA.

Characterization of antioxidant enzymes activities in denucleated of interstitial cells

Testes from control and experimental groups were removed quickly, decapsulated and dissociated with collagenase (1,2 mg/ml) in M199-BSA. Interstitial cells were re-suspended in a buffer containing 17 mM Tris, and 140 mM NH_4Cl (pH 7,2) and incubated for 10 min at room temperature. This procedure eliminates red blood cells and interference of hemoglobin. The cells pellets was washed twice with 0,9% NaCl solution. Denucleated fraction of interstitial cells were obtained by homogenization of cell pellets in 50 mM phosphate buffer containing 0,25 M sucrose (pH 7,4) using a glass-glass homogenizer and centrifugation for 20 min at $1500g$ (4°C). Protein content in denucleated fractions of interstitial cells was estimated by the Bradford method (Bradford, 1976), using BSA as a standard.

The activity of superoxide dismutase was measured by inhibition of superoxide radical production in a xantine/xantine oxidase reaction according to the method described by Misra and Fridovich (Misra and Fridovich, 1972). The catalase activity was determined by the rate of H_2O_2 disappearance recorded at 240 nm, according to Clauborne (Clauborne et al., 1984). The GST activity was assayed using 4-chloro-1,2-dinitrobenzene as a substrate and measuring the absorbance change at 340 nm, according to Habig (Habig et al., 1974). Oxidation of NADPH at 340 nm with tert-butylhydroperoxide as a substrate was employed in the modified method of Paglia and Valentine (Paglia and Valentine, 1967) for measuring the activity of glutathione peroxidase.

Western blot analysis of NOS in postmitochondrial fraction of the rat testes

To prepare the post-mitochondrial fraction, testes were decapsulated and homogenized in 50 mM phosphate buffer containing 0,32 M sucrose, 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 1mM DTT, 3 μM leupeptin, 1 μM aprotinin and 1,; PMSF using glass-glass homogenizer and centrifugated at 12000 rpm/60 min/ 4°C . Protein content in denucleated fractions of interstitial cells was estimated by the method of Bradford (Bradford, 1976), using BSA as a standard.

Aliquots of postmitochondrial fraction of the rat testes containing different concentration of proteins (40 μg -1,4 mg) were resolved by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (4-12% gradient gel) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF)

membrane by incubating in transfer buffer containing 25 mM Tris, 190 mM glycine and 20% methanol over night. Thereafter, the membranes were blocked by shaking in blocking buffer containing 5% nonfat dry milk in 10 mM Tris, 10 mM NaCl and 0,1% Tween 20 for 2 hours at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated at room temperature for 1 hour in blocking buffer containing monoclonal antibody (1:250) for each NOS isoform (Transduction Laboratories, Lexington USA). Thereafter, the membranes were washed 4 times by incubating in the wash solution. Next, the membranes were incubated with secondary antibody in blocking buffer (1:3000) conjugated with alkaline phosphatase for 1 hour at room temperature. Again, after elimination of the excess antibody by incubating in the washing buffer for 6 times as before, bands were detected by incubating the membrane with substrate (BCIP/TNBT) for 15 minutes at room temperature or using hemiluminescence ECL detection kit.

Nitrite assay

The generation of NO was determined by measuring the concentration of nitrite, the stable oxidation product of NO, in the incubation medium of basal and hCG stimulated testes. Sample aliquot (1 ml) were mixed with an equal volume of Griess reagent (1% sulphanilamide and 0,1% naphthylethylenediamine in 5% phosphoric acid). The mixture was incubated at room temperature for 10 min. and the absorbance was measured at 546 nm (Green *et al*, 1982). Nitrite concentrations were determined relative to a standard curve derived from increasing concentrations of sodium nitrite.

Statistics

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using Duncan's parametric test. Non-parametric Mann-Whitney test was used for statistical analysis between only one group versus control.

RESULTS

Exposure to immobilization stress (2 h) induced significant decrease ($p < 0,05$) of serum testosterone levels compared to controls (Fig. 1).

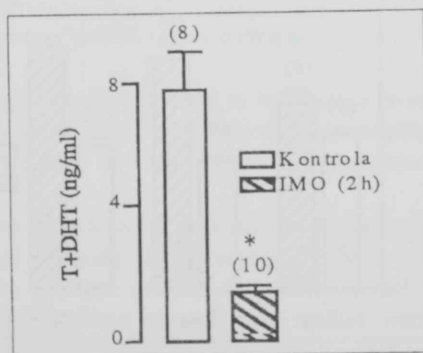


Fig 1. Effects of immobilization stress (2h) on serum androgen (T+DHT). Group of rats were subjected to acute (2h) immobilization stress or left undisturbed (controls). Columns represent means $\pm$ SEM. Number in paranthesis refers to the animals. Significance: * $p < 0,05$ versus corresponding control.

Immobilization stress by itself statistically decreased basal (0 ng) and hCG-stimulated (1,10 ng) testosterone production compared to controls (Fig. 2). The inhibition was about 50% in all three cases.

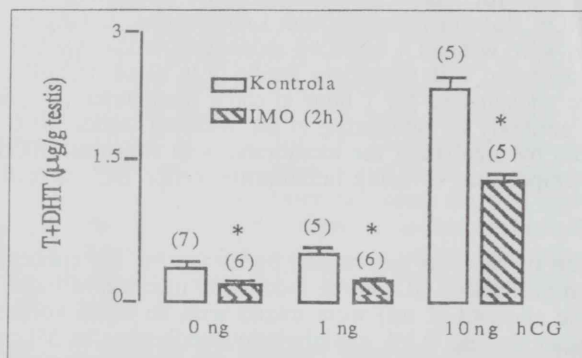


Fig 2. Effects of immobilization stress (2h) on basal and hCG-stimulated androgen (T+DHT) production. Group of rats were subjected to acute (2h) immobilization stress of left undisturbed (controls). Hemitestes from stressed and control rats were incubated in the absence (0 ng) or presence (1, 10 ng) hCG for 3h. Columns represent means $\pm$ SEM. Number in paranthesis refers to the number of hemitestes. Significance: * p <0.05 versus corresponding control

Nitrite levels (stable oxidation product of NO) in the incubation media obtained from immobilization rat testes were significantly higher (p <0,05) compared to corresponding controls (Fig. 3).

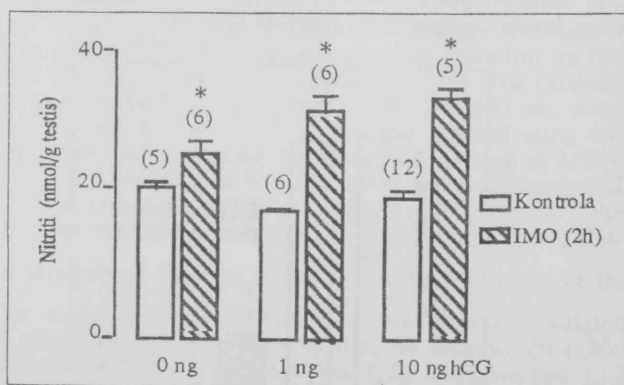


Fig 3. Effects of immobilization stress (2h) on nitrite production in testicular tissue. Group of rats were subjected to acute (2h) immobilization stress or left undisturbed (controls). Hemitestes from stressed and control rats were incubated in the absence (0 ng) or presence (1, 10 ng) hCG for 3h. Columns represent means $\pm$ SEM. Number in paranthesis refers to the number of hemitestes. Significance: * p <0.05 versus corresponding control.

To examine the *in vivo* effects of L-AME, substrate for NOS, drug was injected bilaterally in the testes (15,2 mg/0,1ml/testis) of control and immobilization animals. Half of control and stressed rats received saline (0,1 ml). Two hours after beginning of immobilization period, the rats were killed by decapitation. Testes from control and experimental rats were removed quickly and hCG stimulated androgen production by hemitestes preparations and nitrite levels were analyzed at the end of 3-h incubation.

Results showed that both stress and bilateral injection of L-AME induced significant decrease in testosterone levels compared to control animals. In addition, L-AME induced further decrease of testosterone levels in stress rats compared to stress rats treated with saline (Fig 4).

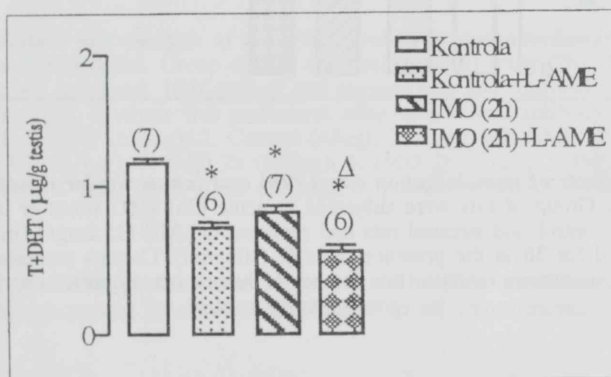


Fig 4. Effects of immobilization stress (2h) and intratesticular injection of L-AME on hCG-stimulated androgen (T+DHT) production. Group of rats were subjected to acute (2h) IMO stress or left undisturbed (controls). Half control and stressed rats had received L-AME (15,2mg/0,1ml/testis). Hemitestes were incubated for 3h in the presence of hCG (10ng/ml). Columns represent means $\pm$ SEM. Number in paranthesis refers to the number of hemitestes.

Significance: * $p < 0.05$ versus corresponding control.

Nitrite levels were significantly elevated in hemitestes from stressed rats treated with L-AME compared to control animals. Bilateral intratesticular injection of L-AME to stressed rats caused higher level in nitrite production compared to stressed rats treated with saline (Fig 5).

Inducible NOS protein was detected in testicular tissue by Western blot analysis carried out with monoclonal antibody. The presence of iNOS protein of standard size (130 kDa) was detected in positive control (pituitarity cells treated with lipopolysaccharide), in stressed animals and stressed rats treated with L-AME. Moreover, iNOS protein was demonstrated in control animals and control animals who had received L-AME (Fig. 6).

The presence of eNOS protein was detected using monoclonal antibody for eNOS in positive control (endothelial cells), stressed and control rats as well as stressed and control rats treated with L-AME (Fig. 7).

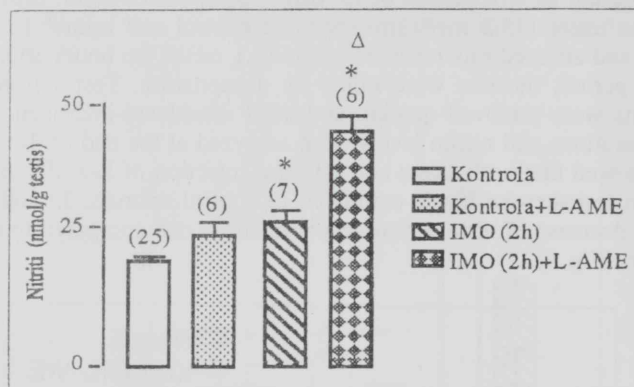


Fig 5. Effects of immobilization stress (2h) and intratesticular injection of L-AME on nitrite level. Group of rats were subjected to acute (2h) IMO stress or left undisturbed (controls). Half control and stressed rats had received L-AME (15.2mg/0.1ml/testis). Hemitestes were incubated for 3h in the presence of hCG (10ng/ml). Columns represent means $\pm$ SEM. Number in paranthesis refets to the number of hemitestes. Significance: * $p < 0.05$ versus corresponding control.

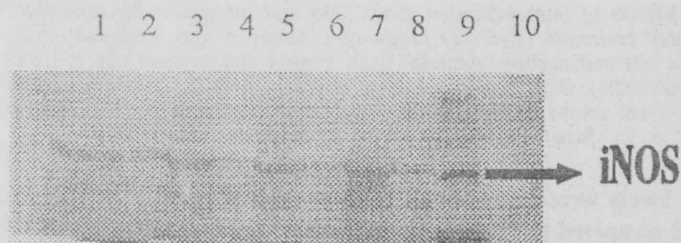


Fig 6. Western blot analysis of the iNOS protein in postmitochondrial fraction of control and stressed rats testes. Group of rats were subjected to acute (2h) IMO stress or left undisturbed (controls). Half control and stressed rats had received L-AME (15.2mg/0.1ml/testis). Analysis was performed using monoclonal antibody against iNOS (1:250). 1. Control (675 μ g), 2. Control (43 μ g), 3. Control+L-AME (705 μ g), 4. Control+L-AME (53.7 μ g), 5. IMO 2h (850 μ g), 6. IMO 2h (75 μ g), 7. IMO 2h+L-AME (782 μ g), 8. IMO 2h+L-AME (77.5 μ g), 9. positive control 10. marker

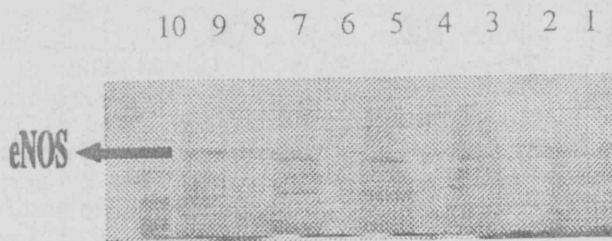


Fig 7. Western blot analysis of the eNOS protein in postmitochondrial fraction of control and stressed rats testes. Group of rats were subjected to acute (2h) IMO stress or left undisturbed (controls). Half control and stressed rats had received L-AME (15.2mg/0.1ml/testis). Analysis was performed using monoclonal antibody against eNOS (1:250). 1. Control (675µg), 2. Control (43µg), 3. Control+L-AME (705µg), 4. Control+L-AME (53.7µg), 5. IMO 2h (850µg), 6. IMO 2h (75µg), 7. IMO 2h+L-AME (782µg), 8. IMO 2h+L-AME (77.5µg), 9. positive control 10. marker

Furthermore, nNOS protein was demonstrated using monoclonal antibody for nNOS in postmitochondrial fraction of the testes in all experimental group (Fig. 8).

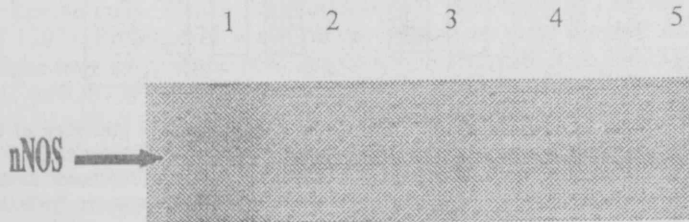


Fig 8. Western blot analysis of the nNOS protein in postmitochondrial fraction of control stressed rats testes. Group of rats were subjected to acute (2h) IMO stress or left undisturbed (controls). Half control and stressed rats had received L-AME (15.2mg/0.1ml/testis). Analysis was performed using monoclonal antibody against nNOS (1:250). 1. positive control, 2. IMO2h+L-AME (1.35mg), 3. IMO 2h (1.35mg), 4. Control+L-AME (1.36mg), 5. Control (1.4 mg)

Activities of antioxidant enzymes in the interstitial compartment of the rat testes were measured 2h after bilateral intratesticular injection of L-AME (15,2 mg/0,1ml/testis) to normal rat. Treatment with this substrate for NOS induced significant fall in the activities of catalase, glutathione peroxidase and glutathione transferase, whereas no significant differences were observed in activities of superoxide dismutase comparing to the respective controls (Fig. 9).

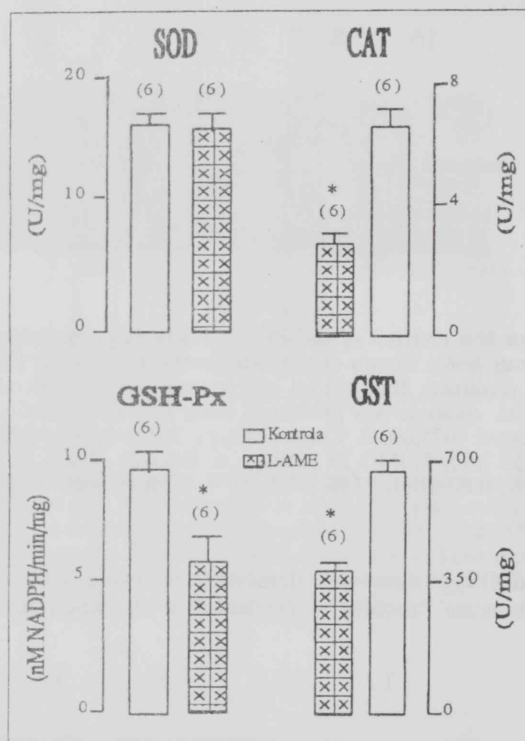


Fig 9. Effects of intratesticular injection of L-AME on the activities of antioxidant enzymes in denudeated fraction of interstitial cells. Group of rats were treated by bilateral intratesticular injection of L-AME (15.2mg/0.1ml/testis). Columns represent means $\pm$ SEM.

Number in paranthesis refers to the number of animals. Significance: * $p < 0.05$ versus corresponding control.

DISCUSSION

It is well documented that acute (2h) immobilization stress decreased androgen production in rat testes (Maric et al., 1996, Kostic et al., 2000). Moreover, it was shown that NO can be involved in regulation of testicular steroidogenesis during acute immobilization stress. The significant increase of nitrite levels was demonstrated in the incubation media obtained from immobilized rat testes (Kostic et al., 1998, 1999). The present results have also shown that acute (2h) immobilization stress induced fall in basal (0 ng) and hCG-stimulated (1,10 ng) testosterone production. These reductions in androgen production were accompanied with statistically increased nitrite (stable oxidation product of NO) levels in all three cases. Also, result have shown that it treatment with L-AME (15,2mg/0,1ml/testes) not only mimicked the action of acute stress on androgenesis, but induced further decrease afandrogen production in stressed

rats. Greater inhibition of androgen production in stressed rats treated with L-AME was accompanied with higher NO production compared to production in stressed rats treated only with saline. Previous report (Kostic et al., 1998) has shown that intratesticular application of ISDN, donor of NOS, caused increase in nitrite production which was accompanied with significant reduction in testosterone level. Furthermore, application of L-NAME, non-specific inhibitor of NOS, reversed effect of immobilization stress on testosterone and nitrite production (Kostic et al., 1998). Inhibition of testosterone production in rats was obtained after intratesticular (Gaytan et al., 1997) and intraperitoneal (Adams et al., 1994) injection of L-AME. These findings suggest that NO can be involved in local paracrine and autocrine control of testicular function, especially in mediating stressor induced changes in testicular steroidogenesis.

Mechanisms by which NO could inhibit testicular testosterone production are not completely understandable. However, it is previously shown that cytochrome P450 enzymes could be inhibited by NO binding to its haem iron (Quaroni et al., 1996) or by reacting with the sulphhydryl group present in the P450 enzymes (Snyder et al., 1996). It is documented that NO caused inhibition of P450c17 and 3 β HSD, two enzymes which are involved in steroidogenic pathway (Kostic et al., 2000; Pomerantz and Pitelka, 1998). Also, results presented by other authors showed inhibitory effect of NO-donors on *in vitro* Leydig cells steroidogenesis (Punta et al., 1996; Valenti et al., 1999) and increased basal and hCG-stimulated testosterone production by rat Leydig cells cultures incubated with NOS inhibitors (Welsh et al., 1995).

Nitric oxide synthase is a family of isozymes which catalyze the production of nitric oxide (NO). Existence of different isoforms of NOS was shown in testicular tissue. NOS type I was detected in normal human testes with most significant immunoreactivity in Leydig cells. Weaker immunoreactivity was noticed in Sertoli cells (Davidoff et al., 1997). Presence of nerve plexus as well as great number of nerve fibers inside the testes may suggest the presence of nNOS (Burnett et al., 1995). Furthermore, NOS type III (eNOS) is another constitutive form of NOS that was detected in the testes. Presence of eNOS was shown in seminiferous tubules and endothelial vessels of human testes by Western blot method (Midendorff et al., 1997). Similarly to this our results showed constitutive presence of nNOS and eNOS in postmitochondrial fraction of rat testes. Constitutive presence was detected in the testes of control and stressed rats.

Inducible form of NOS (iNOS, NOS type II) represent form which can be induced with different stimuli. Tatsumi et al. (1997) showed presence of mRNA for iNOS 3 hours after IL-1 stimulation. However, they also showed presence of mRNA for iNOS in unstimulated Leydig cells. Likewise constitutive expression of iNOS mRNA was detected in Leydig, Sertoli and spermatogenic cells of normal rats testes (Bryan et al., 2000). This is not result of inflammatory process, because there was no presence of mRNA in endothelial cells and smooth muscle cells. Similar observations were presented by Park et al. (2000). They have also shown constitutive expression of iNOS protein in normal human testes. Accordingly, our results demonstrated signal for iNOS protein in postmitochondrial fraction of control as well as testes from stressed rats. These findings suggest that NO/NOS system may be involved in control of steroidogenesis in normal condition and during acute stress.

In normal physiological condition, Leydig cells of testes are able to generate reactive oxygen species at relative high rate (Georgellis et al., 1988). The cytochrome P450 enzymes of the steroidogenic pathway use molecular oxygen and electrons tran-

sferred from NADPH to hydroxylate substrate. In this process superoxide anion or other oxygen free radicals can be produced as a result of electron leakage (Peltola et al., 1996). Therefore, the proper activity of the antioxidant enzymes system in steroidogenic tissue is very important for the maintenance of normal steroid hormone production (Kostic et al., 2000). The discovery of NO and its messenger role in steroidogenic tissue, raised the possibility that this molecule may be involved in modulation of the activity of both enzymatic system. It was previously shown that NO can modulate activity of certain steroidogenic enzymes (Pomerantz and Petelka, 1998, Kostic et al., 2000, Punta et al., 1996). Likewise it was clearly demonstrated that NO can modify the activity of antioxidant defense system. Application of SNP and SNAP decreased catalase activity (Kremser et al., 1995). Brown (1995) has also suggested that NO rapidly and reversibly decreased catalase with a K_i of 0,18 μ M. Furthermore, it has been shown that, NO donor, ISDN inhibited activity of catalase and glutathione S-transferase 2h after treatment (Kostic et al., 2000). This is in ties with our results where intratesticular application of L-AME, a substrate for NOS, decreased activity of catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase 2h after treatment. Mechanism of inhibition of catalase could be explained by interaction of NO with ferris ion in the active center of enzyme molecule. Furthermore, NO can react with GSH and form GSNO, and in the presence of excess GSH, GSNO is converted to GSSG and other products (Luperchio et al., 1996). Also, it is well documented that NO react rapidly with superoxide anion yielding peroxynitrite (Muijsers et al., 1997). In the presence of peroxynitrite GSH is oxidized not only to GSSG but also to more oxidized species. Therefore, NO could increase oxidative stress and destruction of GSH which is obligatory molecule in the action of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase (Luperchio et al., 1996).

In conclusion, these results further support the complexity of the role of NO/NOS system in the stress-induced down regulation of steroidogenesis and antioxidant defence in the testes. The stress induced activation of NO synthase and increase NO production could induce inhibition of both enzyme systems. Any inhibition of antioxidant enzymes could result in an imbalance of the prooxidant versus antioxidant status and the increase in production of free radicals which could inhibit steroidogenesis, while down-regulated steroidogenesis could result in an increase of free radical formation. Therefore, stress-induced increase in the activity of NO/NOS system in the testes could be one mechanism for antigonadal action of immobilization stress.

REFERENCES

- Adams M.L., Nock B., Trough R., Cicero T.J. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of N-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life Sciences* 50, 35-40, 1992.
- Adams M.L., Meyer E.R., Sewing B.N., Cicero T.J. Effects of nitric oxide-related agents on rat testicular function. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269, 230-237, 1994.
- Adams H.R. Physiological, pathophysiological, and therapetic implications for endogenous nitric oxide. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209, 1297-1302, 1996.

Akinbami M.A., Taylor M.F., Collins D.C., Mann D.R. Effect of a peripheral and a central acting opioid antagonist on the testicular response to stress in rats. *Neuroendocrinology* 59, 343-348, 1994.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254, 1976.

Brown G.C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 232, 188-191, 1995.

Burnett A.L., Ricker D.D., Chamnes S.L., Maguire M.P., Crone J.K., Bredt D.S., Snyder S.H., Chang T.S.K. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biology of Reproduction* 52, 1-7, 1995.

Clauborne A. Catalase activity. In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, edited by Greenwald R.A., CRC Press INC, Boca Raton Florida, 283-284, 1984.

Davidoff M.S., Middendorf R., Mayer B., de Vente J., Koeslig D., Holstein A.F. Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell Tissue Res.* 287, 161-170, 1997.

Gaytan F., Bellido C., Aguilar R., Morales C., van Rooijen N., Aguilar E. Role of testis in the response of the pituitary-testicular axis to nitric oxide-related agents. *European Journal of Endocrinology* 137, 301-308, 1997.

Georgellis A., Tsirigotis M., Rydstrom J. Generation of super-oxide anion and lipid peroxidation in different cell types and subcellular fractions from rat testis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 94, 362-373, 1988.

Green L.C., Wagner A.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and (^{15}N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138, 1982.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139, 1974.

Kostic T., Andric S., Kovacevic R., Maric D. The effect of opioid antagonists in local regulation of testicular response to acute stress in adult rat. *Steroids* 62, 703-708, 1997.

Kostic T., Andric S., Kovacevic R., Maric D. The involvement of nitric oxide in stress-impaired testicular steroidogenesis. *European Journal of Pharmacology* 346, 267-273, 1998.

Kostic T., Andric S.A., Maric D., Stojiljkovic S.S., Kovacevic R. Involvement of inducible nitric oxide synthase in stress impaired testicular steroidogenesis. *Journal of Endocrinology* 163, 409-416, 1999.

Kostic T.S., Andric S.A., Maric D., Kovacevic R.Z. Inhibitory effects of stress-activated nitric oxide on antioxidant enzymes and testicular steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 75, 299-306, 2000.

Kremser K., Stangl H., Pahan K., Singh I. Nitric oxide regulates peroxisomal enzymes activities. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.* 33, 763-774, 1995.

Kvetnansky R., Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87, 738-743, 1970.

Luperchio S., Tamir S., Tannenbaum S.R. NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radical Biology & Medicine* 21, 513-519, 1996.

Maric D., Kostic T., Kovacevic R. Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 58, 351-355, 1996.

Middendorf R., Muller D., Paust H.J., Holestein A.F., Davidoff M.S. New aspects of Leydig cell function. *The Fate of the Male Germ Cell*, Plenum Press New York, 1997.

Misra H.P., Fridovich I. The generation of superoxid radicals during autooxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247, 6960-6962, 1972.

Moncada S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109, 1991.

Muijsers R.B.R., Folkerts G., Henricks P.A.J., Sadeghi-Hashjin G., Nijkamp P. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sciences* 60, 1833-1845, 1997.

O'Bryan M.K., Schlatt S., Gerdprasert O., Phillips D.J., de Kretser D., Hedger M.P. Inducible nitric oxide synthase in rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biology of reproduction* 63, 1258-1293, 2000.

Paglia D.E., Valentine N.W. Studies on qualitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidases. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 74-77, 1967.

Park C.S., Krishna G., Ahn M.S., Kang J.H., Chung W.G., Kim D.J., Hwang H.K., Lee J.N., Paik S.G., Cha Y.N. Differential and constitutive expression of neuronal inducible and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 4, 459-471, 2000.

Peltola V., Huhtaniemi I., Metsa-Ketela T., Ahotupa M. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in rat testis. *Endocrinology* 137, 105-112, 1996.

Pomerantz D.K., Pitelka V. Nitric oxide is a mediator of the inhibitory effect of activated macrophages on production of androgen by the Leydig cell of the mouse. *Endocrinology* 139, 922-931, 1998.

Punta K.D., Charreau E.H., Pignataro O.P. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137, 5537, 1996.

Quaroni L., Reglinski J., Wolf R., Smith W.E. Interaction of nitrogen monoxide with cytochrome P-450 monitored by surface enhanced resonance Raman scattering. *Biochem. Biophys. Acta* 1296, 5-8, 1996.

Snyder G.D., Holmes R.W., Bates J.N., Van Voorhis B.J. Nitric oxide inhibits aromatase activity: mechanisms of action. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 58, 63, 1996.

Srivastava R.K., Taylor M.F., Mann D.R. Effect of immobilization stress on plasma luteinizing hormone, testosterone, and corticosterone concentrations and on β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testis of adult rats. *P.S.E.B.M.* 204, 231-235, 1993.

Tatsumi N., Fujisawa M., Kanzaki M., Okuda Y., Okada H., Arakawa S., Kamidono S. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology* 138, 994-998, 1997.

Valenti S., Cuttica C.M., Fazzuoli L., Giordano G., Giusti M. Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cell cultured in vivo. *International Journal of Andrology* 22, 336-341, 1999.

Welch C., Watson M.E., Poth M., Hong T., Francis G.L. Evidence to suggest nitric oxide is an interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis. *Metabolism* 44 234-238, 1995.

Zini A., O'Brayan M.K., Magid M.S., Schlegel P.N. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas eferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation and programmed cell death. *Biology of Reproduction* 55, 935-941, 1996.

EFEKTI L-ARGININ METIL ESTRA NA AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I NA STRESOM-INHIBISANU STERODOGENU AKTIVNOST TESTISA PACOVA

Nebojša Lj. Andrić, Silvana A. Andrić, Tatjana S. Kostić, Snežana M. Dragišić, and Radmila Ž. Kovačević
Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Novom Sad
Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Jugoslavija

SAŽETAK

Pokazano je da tokom akutnog imobilizacionog stresa dolazi do aktivacije azot-oksida (NO) signalnog puta u tkivu testisa ali efekti NO na funkciju ćelije nisu u potpunosti razjašnjeni. U skladu sa ranijim istraživanjima u ovom radu je potvrđeno da 2-h imobilizacioni stres dovodi do signifikantnog porasta u produkciji NO u testisima. U postmitohondrijalnoj frakciji intersticijalnih ćelija kako kontrolnih tako i stresiranih životinja, Western blot analizom pokazano je konstitutivno prisustvo sve tri izoforme azot-oksida sintaza (inducibilne, endotelijalne i neuralne). Intratestikularni (it) tretman sa L-arginin metil estrom (L-AME; 15,2 mg/testisu), substratom za NOS, pored toga što je oponašao efekte akutnog stresa na androgenezu, doveo je i do *in vitro* statičkog smanjenja humanim horionskim gonadotropinom stimulirane produkcije androgena kod stresiranih životinja. Paralelno je došlo i do značajnog povećanja u produkciji NO kod ovih životinja. Takođe it primena L-AME dovela je do smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima u intersticijalnim ćelijama tretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati ukazuju na ulogu NO signalnog puta u regulaciji kako steroidogenih tako i antioksidativnih enzima u testisima pacova.

UDK 581.84:633.35

Naučni prilog

UPOREDNA MORFOLOŠKA PROUČAVANJA RAZLIČITIH LINIJA JAROG STOČNOG GRAŠKA

Nikolić, N.¹, Mikić, A.², Mihailović, V.², Krstić, B.¹

¹PMF, Institut za biologiju i ekologiju, 21000 Novi Sad

²Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, 21000 Novi Sad

Primljeno
1. III 2001.

SAŽETAK

U radu su proučavane morfološke karakteristike kod 60 linija jarog stočnog graška. Ispitivane linije su se statistički značajno najviše razlikovale po broju mahuna i masi biljke, a najmanje je varirao broj internodija. Sa najmanjom visinom biljaka (32.6 cm) i najmanjim brojem internodija (9) izdvojila se Cult. FRILENE. Sumarno posmatrano, visina biljke se kretala od 32.6 do 100.3 cm, masa biljke od 5.98 do 25.69 g, broj internodija od 9 do 18, visina prve mahune od 15.3 do 63.3 cm, broj mahuna po biljci od 4 do 15, a broj zrna po mahuni od 1 do 6. Poznavanje ovih parametara omogućava efikasniji rad selekcionera i oplemenjivača graška i doprinosi bržem širenju graškova u proizvodnju.

Ključne reči: morfologija, *Pisum sativum* L., visina biljke, visina prve mahune, masa biljke, broj mahuna po biljci, broj zrna po mahuni.

UVOD

Grašak (*Pisum sativum* L.) se ubraja u najstarije gajene biljne vrste (Maxted and Ambrose, 2000). Zahvaljujući svojim biološkim svojstvima — visok sadržaj proteina (Monti, 1983), odnosno relativno skromnim zahtevima prema uslovima uspevanja i velikom bogatstvu genotipova, rasprostranjen je na svim kontinentima (Mihailović, 1994). Prema načinu korišćenja graškovi se dele na baštenske industrijske i krmne sortetj. na krunce, šećerce i njijske graškove za bio masu i zrno (Đinović et al., 1984). Krmni grašak se koristi kao kabasta hrana u vidu zelene mase (Mihailović, 1994). Prema načinu korišćenja graškovi se dele na baštenske industrijske i krmne sorte tj. na krunce, (Mihailović et al., 1997) glavne komponente prinosa kod graška za zrno. Značajno kvantitativno svojstvo kod graška je visina biljke, jer od nje zavisi otpornost biljaka na poleganje. Kod useva koji ne polegne do faze cvetanja bolja je oplodnja i nalivanje zrna, a i sazrevanje je ujednačenije.

Imajući u vidu da neke morfološke osobine predstavljaju značajne komponente prinosa stočnog graška ili na njega utiču (Hrostova, 1973), u radu su proučavani visina i masa biljke, broj internodija, visina prve mahune, broj mahuna i broj zrna po mahuni kod 60 linija stočnog graška. Poznavanje ovih parametara omogućava efikasniji rad selekcionara i oplemenjivača graška za zrno, što će doprineti bržem širenju graškova u proizvodnju, a takođe i smanjenju deficita proteina biljnog porekla u stočnoj ishrani.

MATERIJAL I METODE

U cilju proučavanja morfoloških osobina stočnog graška odabrano je 60 linija: 1. Y-10, 2. TP, 3. SAMPLE, 2, 4. VJ, 5. T-3, 6. L-90, 7. TIRKIZ, 8. OP, 9. Br. 8, 10. TR, 11. DT, 12. SM, 13. Br. 9, 14. KINADO, 15. SAMPLE 3, 16. T-4, 17. T-2, 18. V-84, 19. TI, 20. CO, 21. No 1, 22. AK, 23. AMINO, 24. MORAVAC, 25. Br. 4, 26. BH, 27. CD, 28. ZZ, 29. AC, 30. OG, 31. L-7, 32. GG, 33. Cult. FRILENE, 34. P, 35. TM, 36. NN, 37. 95-2, 38. 95/4, 39. 95/6, 40. 95/1, 41. 95/3, 42. 95/8, 43. 95/7, 44. 95/5, 45. 95/9, 46. 95/11, 47. Cult. 86202178, 48. 95/10, 49. No 11, 50. Cult. 23-E, 51. Cult. VIARA, 52. Cult. FRIJAUNE, 53. Cult. N-11, 54. Cult. DRUJBA, 55. L-90, 56. Cult. 86202215, 57. FC-1, 58. FC-2, 59. FC-3 I 60. CAN-1. Ogled je postavljen u poljskim uslovima Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, na Rimskim Šančevima, u tri ponavljanja. Veličina ogledne parcelice bila je 5 m², a međuredni razmak 20 cm.

Zemljište je posedovalo sledeće karakteristike: N=0.215 mg%; P₂O₅=25.63 mg%; K₂O=24.50 mg%; humus = 3.26%; CaCO₃=3.26%; pH(n (KCl)=0.215; pH (H₂O)=7.96.

Morfološkim istraživanjima obuhvaćena su sledeća svojstva: visina biljke (cm), masa biljke (g), broj internodija, visina prve mahune, broj mahuna po biljci i broj zrna po mahuni.

Dobijeni podaci statistički su obrađeni metodom analize varijanse, a rangiranje srednjih vrednosti ispitivanih parametara vršeno je Duncan-ovim testom za nivo značajnosti $\alpha=0.05$.

REZULTATI I DISKUSIJA

Visina biljke

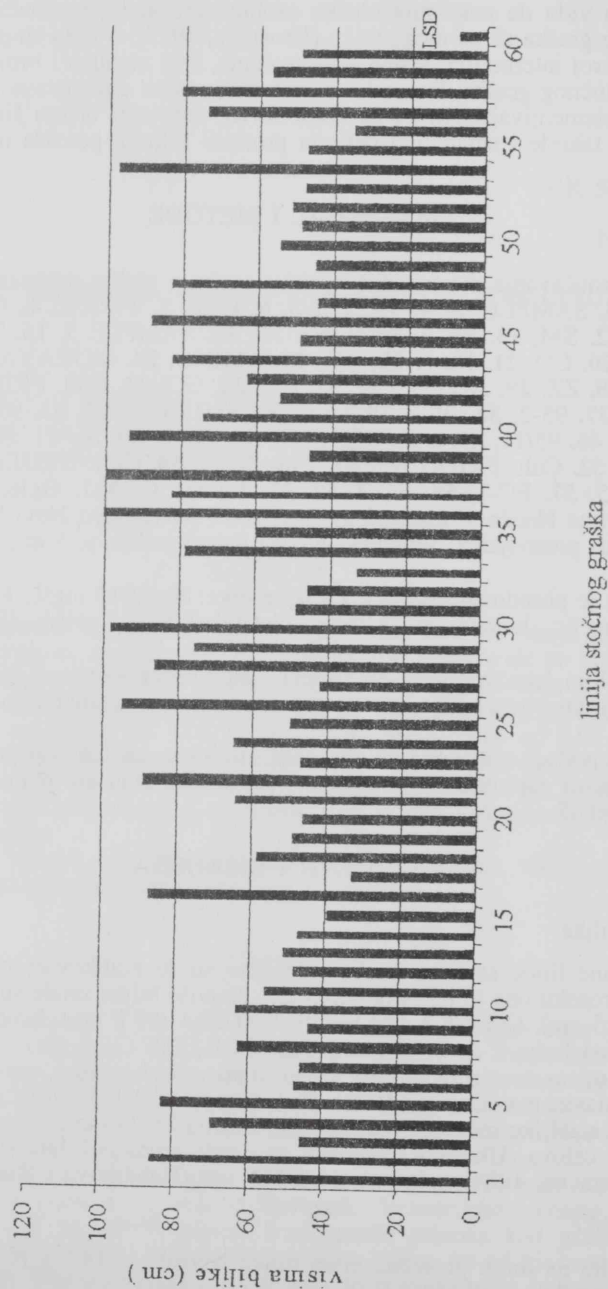
Proučavane linije stočnog graška značajno su se razlikovale po visini stabljike (Graf. 1). U proseku ona je iznosila 62.45 cm. Najviše biljke imale su linije NN (100,3 cm), 95/4 (99.5 cm), OG (98.3 cm) i Cult. DRUJBA (97.7 cm). Najniže vrednosti zabeležene su kod linija T-2 (33.0 cm) i Cult. FRILENE (32.6 cm).

Najveći uticaj na visinu biljaka mogu imati uslovi gajenja, naročito u godinama sa obilnim padavinama (Čupina, 1993). Podaci koje su dali Vetrova et al. (1982) ukazuju da visina stabljike može da varira u rasponu od 25-250 cm u zavisnosti od sorte i agroekoloških uslova. Ukoliko se grašak gaji radi zrna, poželjne su sorte visine od 60-90 cm (Slamena, 1984), odnosno od 80-90 cm (Rubnikova i Rudikova, 1985).

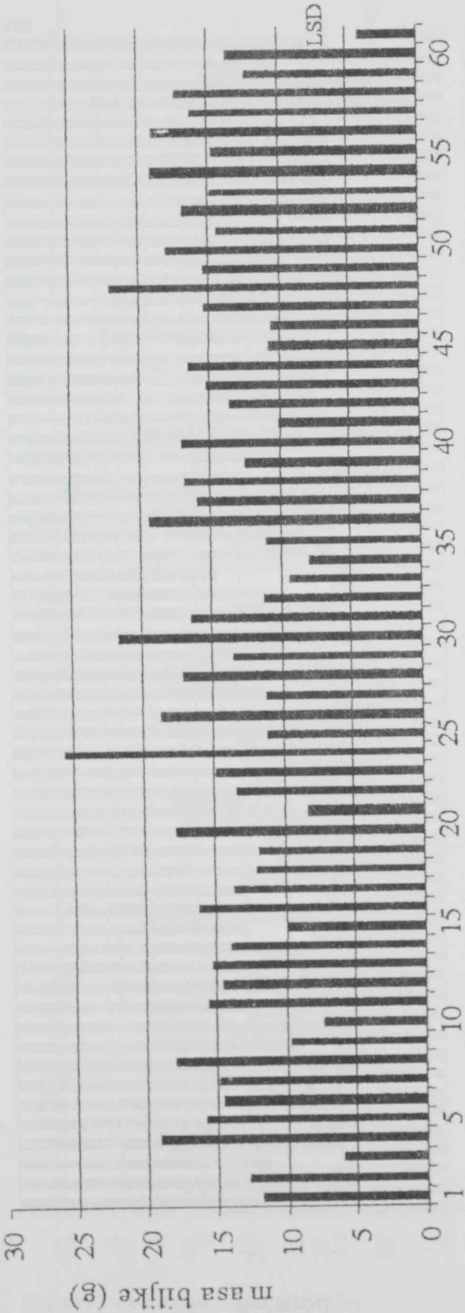
Masa biljke

Bez obzira na liniju prosečna masa biljke iznosila je 14.5 g (Graf. 2). Vrednosti su se kretale od 5.99 g (SAMPLE 2) DO 25.69 g (MORAVAC). Ukoliko se Grašak gaji radi zelene biomase masa biljke je bitno kvantitativno svojstvo.

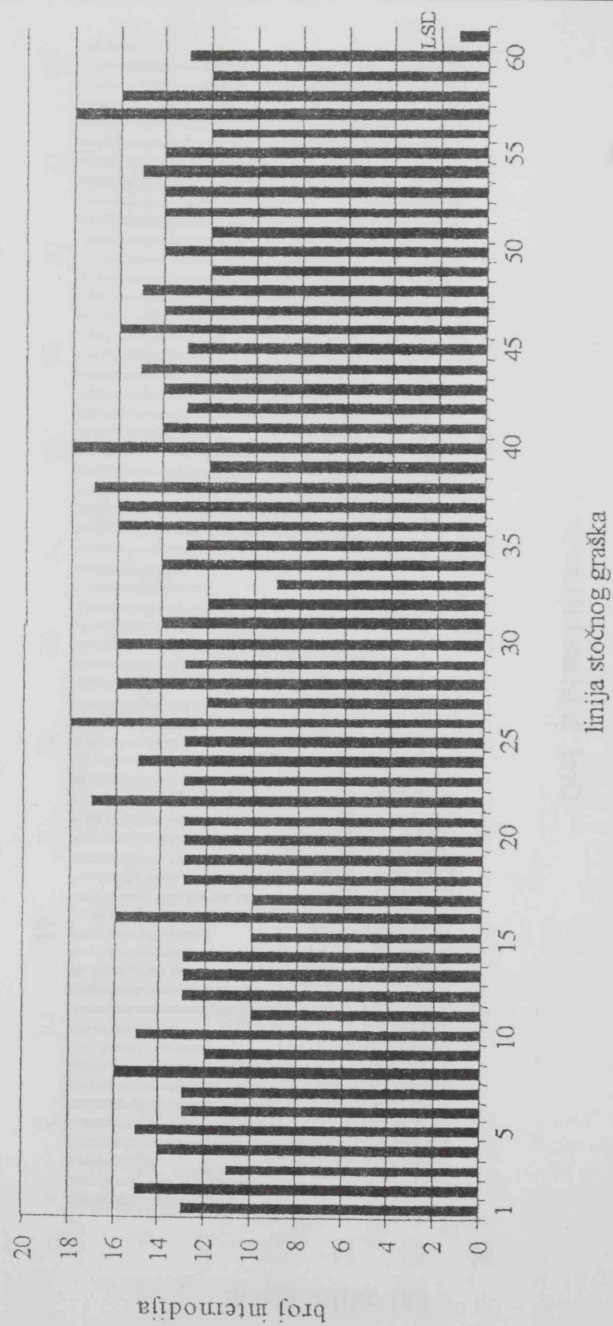
Graf. 1. Visina biljke



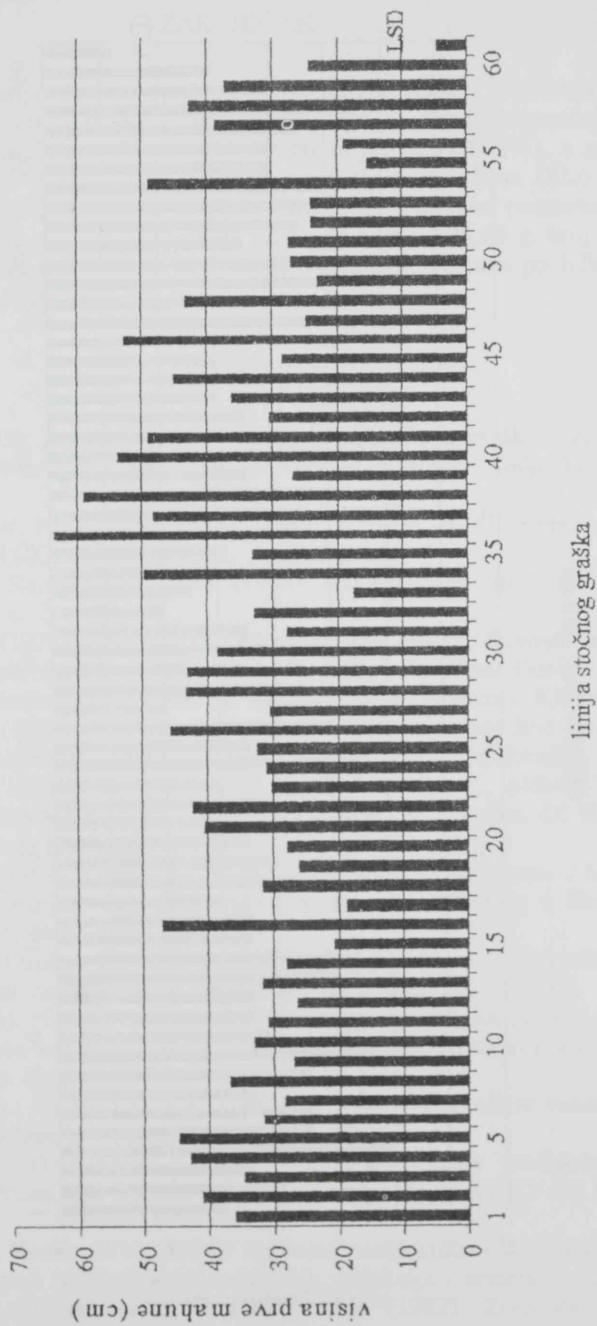
Graf. 2. Masa biljke



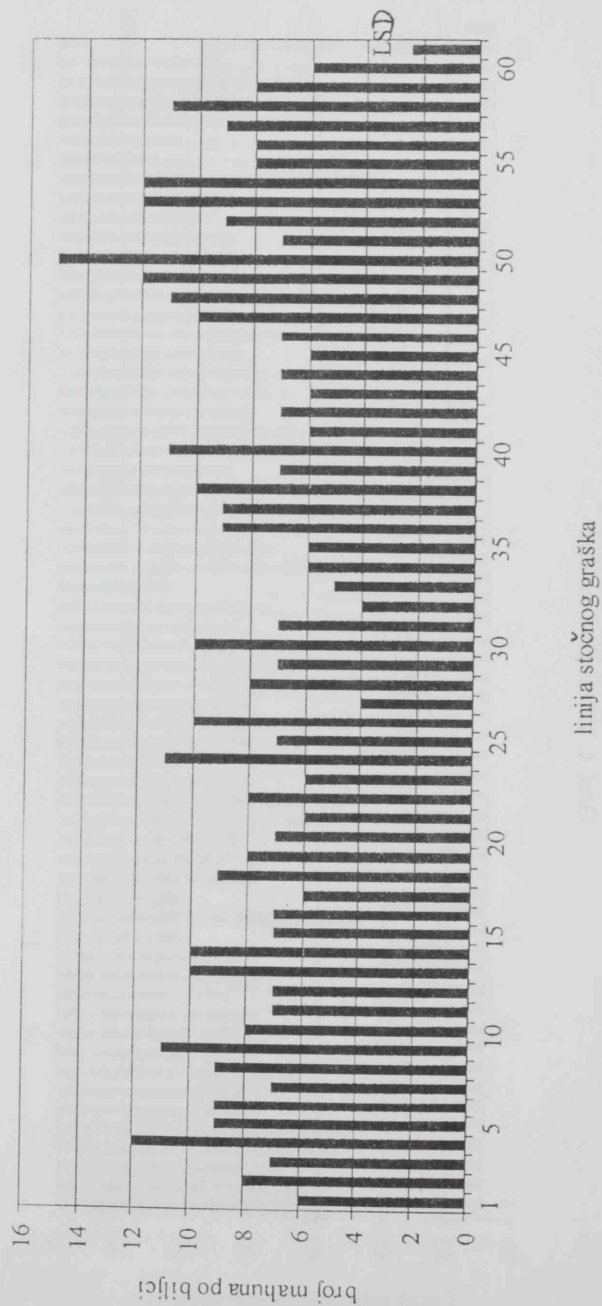
Graf. 3. Broj internodija



Graf. 4. Visina prve mahune



Graf. 5. Broj mahuna



ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja ukazuju značajne kvantitativne razlike morfoloških osobina kod 60 linija jarog stočnog graška. Ispitivane linije su se statistički značajno najviše razlikovale po broju mahuna ($CV=40.8\%$) i masi biljke ($CV=39.9\%$), a najmanje je varirao broj internodija ($CV=12.3\%$). Sa najmanjom visinom biljaka (32.6 cm) i najmanjim brojem internodija izdvojila se Cult. FRILENE. Sumarno posmatrano, visina biljke se kretala od 32.6 do 100.3 cm, masa biljke od 5.98 do 25.69 g, broj internodija od 9 do 18, visina prve mahune od 15.3 do 63.3 cm, broj mahuna po biljci od 4 do 15, a broj zrna po mahuni od 1 do 6.

LITERATURA

- Ćupina, B. (1993): Produktivnost i kvalitet jarog stočnog graška u zavisnosti od genotipa i gustine useva. Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Đinović, I., Lešić, R., Krsmanović, Ž., Perić, B., Ipša, F., Gligorević, B., Kojić, Z., Čermak, N. (1984): Grašak. Napredak, Arandelovac.
- Hmeljev, B.M., Razvodovski, A.M. (1984): Nasledovanje diljini stebnja goroha. Citologija i genetika, s. 2.
- Hrostopova, U.V. (1973): Genetika i selekcija goroha. Nauka, Novosibirsk, s. 277.
- Maxted, N., Ambrose, M. (2000): Peas (*Pisum* L.). In: Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean (eds. N. Maxted and S. Bennett). Kluwer.
- Mihailović, V. (1990): Nasledivanje kvantitativnih svojstava kod jarog stočnog graška. Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Mihailović, V., Katić, S., Nikitović, N., Trifunović, T., (1991): Korelacija između prinosa zrna i nekih komponenti prinosa kod stočnog graška. IX Naučni Simpozijum iz semenarstva, Kopaonik, 64-65.
- Mihailović, V. (1994): Genetička analiza komponenti prinosa zrna i žetvenog indeksa graška (*Pisum sativum* L.). Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Mihailović, V., Ćupina, B., Erić, P. (1997): Proizvodnja stočnog graška. Zbornik radova, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, 29, 355-362.
- Monti, L. (1983): Natural and induced variability in peas for protein production. In: Perspectives for pea and lupins as protein crops (eds. R. Thompson and R. Casey), Marinus, Nijhoff, The Hague, 23-29.
- Rubnikova, V.A., Rudikova, A.A. (1985): Viavlenie istočnikov visokai produktivnosti i kačestva. Selekcija i semenovodstvo, 4. 24-26.
- Slamena, Z. (1984): Vyskum a využitie dedičnosti znakov produktivity strukovin-hrachu siateho (*Pisum sativum* L.). Sprava za časovu etapu, VURV-ŠS Horna Streda, 67.
- Verbicki, N.M., Zenko, V.V. (1984): Najbole perspektivnoe napravlenie selekcii v zone nedostatočnogo i neustojčivago uvlaženija. Selekcija i semenovodstvo, 10.
- Vetrova, E.H., Golban, N.M., Korobko, V.A. (1982): Zernoabovie kultury, Kišinjov.

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL STUDIES OF DIFFERENT
FODDER PEA LINES

Nikolić, N.¹, Mikić, A.², Mihailović, V.², Krstić, B.¹

¹Institute of Biology and Ecology, Faculty of sciences, 21000 Novi Sad

²Institute of Field and Vegetable Crops, 21000 Novi Sad

Morphological characteristics of some 60 spring fodder pea lines were studied in this paper. Among the studied lines there was the greatest statistical difference in the number of pods, and the variation among the number of internodes was the least.

The line Cult Frilene had the lowest plant height (32.6 cm), and the lowest number of internodes (9). Observation of all studied genotypes revealed that plant height varied from 32.6 to 100.3 cm, dry leaf mass from 5.98 to 25.69 g, number of internodes from 9 to 18, height of the first pod from 15.3 to 63.3 cm, number of pods per plant from 4 to 15, and number of seeds per pod from 1 to 6. Being acquainted with these parameters helps in making the work of pea breeders more effective, and contributes to rapid pea expansion in production.

UDK 581.1 582.951.4

Naučni prilog

MINERALNI SASTAV *Solanum nigrum* L U ZAVISNOSTI OD STANIŠTA

Živko Stanković, Lana Krstić, Pal Boža, Slobodanka Pajević
Institut za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta,
Trg Dositeja Obradovića 21000 Novi Sad

Primljeno
1. III 2001.

SAŽETAK

Solanum nigrum L. je široko rasprostranjena biljna vrsta. Spada u korove, a zbog sadržaja alkaloida i drugih fitohemijski aktivnih jedinjenja, ubraja se u farmakološki značajne vrste. U ovom radu su prikazani rezultati sadržaja pepela i makroelemenata (N, P, K i Ca) u listu, stablu, cvetu i plodovima biljaka *S. nigrum* sa različitih staništa, u cilju utvrđivanja mogućeg fiziološkog uticaja ispitivanih elemenata na sadržaj farmakološki značajnih jedinjenja. Dobijeni rezultati ukazuju da dominantan uticaj na sadržaj i odnos ukupnih alkaloida i flavonoida ima azot.

Ključne reči: *S. nigrum*, stanište, N, P, K, Ca.

UVOD

BOTANIČKA PRIPADNOST

Vrsta *Solanum nigrum* L. (pomoćnica, pupator, griževac, kokošinje grožde) spada u: razdeo *Magnoliophyta*, klasu *Magnoliopsida*, podklasu *Lamiidae*, nadred *Solananae*, red *Solanales*, familiju *Solanaceae*, podfamiliju *Solanoideae*, rod *Solanum* (Takhtajan, 1997).

MORFOLOŠKE, ANATOMSKE I DRUGE ODLIKE VRSTE *S. nigrum*

S. nigrum je jednogodišnja, zeljasta biljka. Visina stabla se kreće od 10 do 70 cm. Stablo je uspravno, razgranato, tamnozeleno boje, golo ili pokriveno razbacanim, kratkim, poleglim ili uspravnim dlakama (Stjepanović-Veseličić, 1974).

Listovi su jajasti do rombični, na drškama, po obodu pliće ili dublje nejednako nazubljeni ili celog oboda. Njihova veličina varira. Listovi su goli ili dlakavi. Kod dlakavih, dlake su skoncentrisane uglavnom duž nerava. Vrh lista je zašiljen, a baza klinasta i postepeno prelazi u lisnu dršku.

Cvetovi *S. nigrum* su hermafroditni i aktinomorfni, sakupljeni u cimosne cvasti. Cvetne drške su povijene, gole ili dlakave. Cvetni omotač je dvojan i petočlan sa sraslim listićima. Čašica ima pet izrazitih jajastih režnjeva, obrasla je proređenim dlakama, a kasnije se zadržava na plodu. Krunica je do dva puta duža od čašice, sa pet režnjeva jajastog ili lancetastog oblika, dlakava sa spoljašnje strane. Najčešće je bele boje, a ponekad su na vrhu režnjeva prisutne plave mrlje od kojih se sredinom režnjeva pružaju plave pruge. Stubić je dlakav u donjem delu.

Plod je bobica, loptastog oblika, crna, sjajna, rede zelena ili žućkasta. Seme bubrežasto, spljošteno, neravne površine, sa sitnim jamicama. Cveta i plodonosi od juna do oktobra.

S. nigrum se razmnožava semenom. Rasprostire se zoohorno i antopohorno. Jedna biljka obrazuje do 40.000 semena. Apsolutna masa semena iznosi 0,5-0,8 g. To je kasnoprolećna vrsta, klija i niče tokom proleća pri temperaturi od 3-5°C. Optimalna temperatura za klijanje iznosi 24-26°C.

Raste na njivama, kako u strnim žitima, tako i u okopavaninama, ali se javlja i na zapuštenim mestima — na ruderalnim staništima, uz puteve, ograde, na šutu, na napuštenim travnjacima. Takođe se sreće i kao korov u različitim kulturama, a raste i na proređenim mestima nizijskih šuma.

Na osnovu potrebe za vodom, ova vrsta spada u submezofite, koje žive na mezofilnim staništima, mada se mogu sresti i u kserofilnim zajednicama. Naseljava dobro osvetljena staništa i u prelaznoj je grupi između poluksiofita i heliofita. U odnosu na temperaturu spada u mezotermne biljke.

Ekološki indeks za vlažnost (V) iznosi 3, kiselost zemljišta (K) 3, količinu azota u zemljištu (N) 4, svetlost (S) 4 i temperaturu (T) 3. Halofobna je vrsta i ne javlja se na slatinama (Kojić et. al. 1997).

S. nigrum je termofilna i nitrofilna vrsta humusnih zemljišta, koje je slabo kisele do alkalne reakcije. Prema tipu životne forme pripada terofitama, za koje je karakteristično da žive samo jedan vegetacioni period. Klimatski nepovoljnu sezonu preživljava u vidu semena (Janjić i Kojić, 2000; Krstić 2000).

RASPROSTRANJENOST VRSTE

S. nigrum je široko rasprostranjena vrsta (rasprostranjena je do 63° severne geografske širine). Sreće se od nizijskog do planinskog pojasa. Raste na većim nadmorskim visinama od 1250—1400 m. Raste u Evropi, na Kavkazu, u Armeniji, Maloj Aziji, zapadnom Sibiru. Preneta je u Aziju, Severnu i Južnu Ameriku, Južnu Afriku, Australiju, na Novi Zeland i Antarktik. U Srbiji i Vojvodini je česta i rasprostranjena (Marzell, 1964). Pripada južno-evroazijskom (mediteranskom) flornom elementu, a danas je kosmopolitska vrsta (Soó, 1968).

ZNAČAJ VRSTE

S. nigrum se smatra otrovnom biljkom slabijeg dejstva, pošto alkaloida sadrži u malim količinama. Najtoksičniji su nezreli, zeleni biljni organi. Najveću količinu alkaloida sadrže zelene bobice, zatim listovi, stablo, pa zrele bobice (Gašić et al., 1997; Krstić, 2000).

S. nigrum se spominje i kao narodni lek za lečenje kožnih bolesti, poremećaja organa za varenje, za stišavanje bolova, reumatizam, upale, širenje zenica (Tucakov, 1996).

Flavonoidi koji su nađeni kod ove biljke imaju farmakološka svojstva. Najznačajnija su dejstva na vaskularni sistem, hepatoprotektivno dejstvo, antinflamatorna aktivnost, delovanje na enzimski sistem, citotoksična i antioksidantna aktivnost, antibakterijska i antifungalna aktivnost (Krstić, 2000).

Doza hidroklorida solanina koje ova biljka može da sadrži i preko 2,8 mg/kg, unesena oralno je toksična za čoveka. Simptomi trovanja kod ljudi su povraćanje, dijareja i halucinacije. *S. nigrum* takode sadrži saponozide, tanine, vitamin C, rutin, asparagin, linoleinsku i palmitinsku kiselinu (Gašić et al., 1997).

Kako istraživanja vrste *S. nigrum* sve više dobijaju na značaju zbog mogućnosti dobijanja i proizvodnje određenih farmakološki značajnih supstanci, na čiji kvantitativni udeo i sastav utiču uslovi životne sredine, u ovom radu ispitan je uticaj kvaliteta zemljišta na sadržaj pepela i makroelemenata N, P, K i Ca u listu, stablu, cvetu i plodovima.

MATERIJAL I METODE

LOKALITETI sa kojih su uzeti ispitivani uzroci bili su: 1. Novo naselje, ruderalno stanište, zemljište relativno siromašno hranjivim materijama, biljke direktno izložene sunčevoj svetlosti; 2. Sirig, obradivo zemljište (njiva) bogato hranjivim materijama, stepen osunčanosti visok; 3. Kamenjar, peskovito stanište na obali Dunava, biljke povremeno izložene sunčevoj svetlosti.

BILJNI MATERIJAL. Biljni materijal sakupljen u toku 1998. i 1999. godine. Posle odvajanja pojedinih organa, materijal je osušen i samleven.

HEMIJSKE ANALIZE. Određivanje pepela vršeno je tako što je odmerena količina biljnog materijala od 3g spaljivana na rešou do prestanka izdvajanja gasova, a zatim žarena na 500°C do potpunog sagorevanja. Dobijeni pepeo tretiran je sa 30% H₂O₂ (5 ml po uzorku), zatim uparen blagim zagrevanjem na rešou i ponovo žaren na 450°C u trajanju od 30 minuta. Ostatak nakon žarenja je ohlađen u eksikatoru i meren radi određivanja sadržaja ukupnog pepela, a zatim rastvoren u 25% HCl. Po rastvaranju pepela vršeno je filtriranje u odmerni sud od 50 ml i na taj način dobijen je matični rastvor.

Koncentracija ukupnog azota određena je iz 0,2 g uzorka Kjeldahl metodom, korišćenjem postupka prema Nelson i Sommers (1973).

Određivanje ukupnog fosfora izvršeno je spektrofotometrijski iz matičnog rastvora primenom amonijum-molibdat-vanadat metode (Gericke i Kurmies, 1952).

Određivanje kalijuma i kalcijuma vršeno je plamenofotometrijski (Sarić et al., 1990).

Sve analize su urađene u tri nezavisna ponavljanja, a dobijeni rezultati su statistički obrađeni korišćenjem programa Excel i MSTATC.

Analize zemljišta izvršene su u Laboratoriji za agroekologiju. Zavod za zemljište, agroekologiju i đubriva, Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Urađene su sledeće analize: pH i sadržaj humusa, azota, fosfora, kalijuma i CaCO_3 .

Upoređivanje tretmana (biljni organ, lokalitet) vršeno je pomoću Dankanovog testa, a testiranje je vršeno za nivo značajnosti $P=0,05$.

REZULTATI I DISKUSIJA

REZULTATI ANALIZE UZORAKA ZEMLJIŠTA

Zemljišta sa staništa sa kojih je sakupljena vrsta *S. nigrum* imali su slabo alkalnu ili alkalnu reakciju (tabela 1). Najveći sadržaj humusa i azota registrovan je u zemljištu sa lokaliteta Sirig, dok je najveći procenat CaCO_3 nađen u uzorku sa peskovitog staništa (Kamenjar). Sadržaj P i K bio je najveći na ruderalnom (Novo naselje), a najmanji na peskovitom zemljištu (Kamenjar).

Tabela 1. Osnovna hemijska svojstva zemljišta sa lokaliteta Novo naselje, Sirig i Kamenjar

LOKALITET	pH u KCl	pH u H_2O	Humus (%)	Ukupni N (%)	AL- P_2O_5 (mg/100g)	AL- K_2O (mg/100g)	CaCO_3 (%)
N. NASELJE	8.06	8.35	1.22	0.081	40.73	23.50	12.69
SIRIG	7.46	8.05	3.46	0.228	16.73	20.50	2.78
KAMENJAR	7.98	8.21	0.93	0.061	12.40	7.50	15.17

SADRŽAJ PEPELA

Rezultati su pokazali da je sadržaj ukupnog pepela bio različit i zavisno kako od ispitivnog organa tako i od zemljišta sa koga su uzorci uzimali (tabela 2). U proseku, najveći sadržaj ukupnog pepela bio je u listu, zatim stablu u cvetu, a najmanji u bobi. U odnosu na mesto uzimanja uzoraka najveći sadržaj ukupnog pepela je bio u biljaka s Kamenjara, zatim Siriga, dok je najmanji sadržaj bio u biljaka sakupljenih na lokalitetu Novo naselje.

Tabela 2. Sadržaj ukupnog pepela u različitim organima *S. nigrum* (%).
Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za $P=0.05$

BILJNI ORGAN	LOKALITET			
	N. NASELJE	SIRIG	KAMENJAR	PROSEK
LIST	15,18 b	16,57 a	16,95 a	16,23
STABLO	12,22 c	15,12 b	16,52 a	14,62
CVET	12,56 c	11,86 c	12,15 c	12,19
PLOD	8,81 d e	8,16 e	8,88 d	8,61
PROSEK	12,19	12,92	13,62	
LSD (axb)	0,67			

SADRŽAJ AZOTA

Rezultati prikazani u tabeli 3 - pokazuju da je najveći sadržaj azota bio u cvetu (3,93%), zatim u listu (3,70%), bobici (2,94%), a najmanje u stablu (1,43%). U odnosu na lokalitet, najveći sadržaj azota u proseku bio je na lokalitetu Sirig, dok su za lokalitet Novo naselje i Kamenjar dobijene približno iste vrednosti.

Na osnovu analize zemljišta i sadržaja azota u biljkama uočava se određena pravilnost tj., gde je bilo više humusa, bio je povećan sadržaj azota u zemljištu, a što je rezultiralo povećanim sadržajem azota u biljci. Ovo se slaže sa brojnim literaturnim podacima i za druge biljne vrste (videti Mengel i Kirkby, 1987). Takode, na osnovu literaturnih podataka o sadržaju ukupnih alkaloida i flavonoida za vrstu *S. nigrum* sa istih lokaliteta (Krstić et al., 1999; Krstić, 2000) može se konstatovati da je postojao određen odnos (korelacija) između sadržaja azota u zemljištu i ovih materija. Tako je sadržaj ukupnih alkaloida u bobicama i listovima bio znatno veći pri višim koncentracijama azota u zemljištu (Sirig), dok je obrnut slučaj bio sa sadržajem ukupnih flavonoida. Takode se mogu naći određeni odnosi između ostalih ispitivanih elemenata i sadržaja fitohemijskih aktivnih supstanci, a koji mogu biti od praktične koristi.

Tabela 3. Sadržaj azota u različitim organima *S. nigrum* (%).
Vrednosti označene isti slovom ne razlikuju se značajno za $P=0.05$

BILJNI ORGAN	LOKALITET			
	N. NASELJE	SIRIG	KAMENJAR	PROSEK
LIST	3,69 c	3,52 d	3,89 b	3,70
STABLO	1,36 g	1,81 f	1,13 h	1,43
CVET	3,82 bc	4,16 a	3,83 bc	3,93
PLOD	2,58 e	3,73 bc	2,51 e	2,94
PROSEK	2,86	3,30	2,84	
LSD (axb)	0,17			

SADRŽAJ FOSFORA

Iz rezultata prikazanih u tabeli 4 - može se videti da su variranja u sadržaju fosfora po pojedinim organima i između staništa bila najmanja. Najveći sadržaj bio je u cvetu i plodu (0,39%), nešto manji u listu (0,33%), a najmanji u stablu (0,24%). U odnosu na lokalitet, sadržaj fosfora bio je značajno veći na lokalitetu Kamenjar, dok između lokaliteta Novo naselje i Sirig nisu utvrđene razlike.

Tabela 4. Sadržaj fosfora u različitim organima *S. nigrum* (%)
Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za $P=0,05$

BILJNI ORGAN	LOKALITET			
	N. NASELJE	SIRIG	KAMENJAR	PROSEK
LIST	0,30 b	0,30 b	0,39 a	0,33
STABLO	0,18 d	0,24 c	0,30 b	0,24
CVET	0,39 a	0,39 a	0,39 a	0,39
PLOD	0,38 a	0,38 a	0,37 a	0,38
PROSEK	0,31	0,33	0,36	
LSD (axb)	0,02			

U poređenju sa sadržajem u zemljištu sadržaj fosfora u biljci pokazuje suprotne tendencije, što se može protumačiti različito dostupnošću ovog jona, pošto se u plodnijem kao i u glinovitom zemljištu fosfor više nalazi u vezanom (nepokretnom) obliku, a manje u rastvornom (pokretnom), a time i dostupnijem za biljke (Mengel i Kirkby, 1987).

SADRŽAJ KALIJUMA

Sadržaj kalijuma (tabela 5) bio je najveći u bobici i kretao se od 2,98% na lokalitetu Sirig do 3,65% na lokalitetu Kamenjar, a najmanji u stablu i kretao se od 1,87% na lokalitetu Novo naselje do 2,96% na lokalitetu Kamenjar. Treba istaći da je sadržaj kalijuma u listu i cvetu na lokalitetima Novo naselje i Sirig bio približno isti, dok je na lokalitetu Kamenjar značajno veći sadržaj bio u listu i bliži sadržaju kalijuma u bobici. Između lokaliteta takođe su postojale određene razlike u sadržaju kalijuma. U proseku, najviše ga je bilo na lokalitetu Kamenjar, a najmanje na lokalitetu Sirig.

Tabela 5. Sadržaj kalijuma u različitim organima *S. nigrum* (%)
Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za $P=0.05$

BILJNI ORGAN	LOKALITET			
	N. NASELJE	SIRIG	KAMENJAR	PROSEK
LIST	2,65 d	2,68 d	3,57 a	2,97
STABLO	1,87 f	2,12 e	2,96 c	2,32
CVET	2,82 cd	2,68 d	3,22 b	2,91
PLOD	3,48 a	2,98 c	3,65 a	3,37
PROSEK	2,71	2,62	3,35	
LSD (AXB)	0,21			

U poređenju sa sadržajem kalijuma u zemljištu slika je bila obrnuta tj. najmanji sadržaj je bio u zemljištu na lokalitetu Kamenjar, a najveći na lokalitetu Novo naselje. Verovatan razlog je različita dostupnost ovog elementa tj. njegova manja vezanost za čestice i koloide kod siromašnijih zemljišta (Mengel i Kirkby, 1987).

SADRŽAJ KALCIJUMA

Najveći sadržaj kalcijuma (tabela 6) utvrđen je u biljkama sa lokaliteta Sirig (1,80%), zatim Kamenjar (1,51%), dok je najmanji sadržaj bio na lokalitetu Novo naselje (1,42%), ali razlike između ova dva lokaliteta nisu bile značajne. Značajne razlike u sadržaju kalcijuma utvrđene su između ispitivanih organa na svim lokalitetima. Najveći sadržaj kalcijuma u proseku je bio u listu (2,41%), zatim stablu (1,74%), cvetu (1,42%), a najmanji u bobici (0,74%).

Tabela 6. Sadržaj kalcijuma u različitim organima *S. nigrum* (%)
Vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno za $P=0.05$

BILJNI ORGAN	LOKALITET			
	N. NASELJE	SIRIG	KAMENJAR	PROSEK
LIST	2,24 b	2,99 a	1,99 c	2,41
STABLO	1,44 d	1,93 c	1,86 c	1,74
CVET	1,25 e	1,49 d	1,53 d	1,42
PLOD	0,77 f	0,79 f	0,67 f	0,74
PROSEK	1,42	1,80	1,51	
LSD (axb)	0,16			

Za razliku od kalijuma, kalcijum pokazuje tendenciju većeg sadržaja u biljci sa zemljišta gde je njegov sadržaj bio veći (lokalitet Kamenjar), što se takode može pripisati njegovoj dostupnosti, ali i antagonizmu između ova dva jona kao i različitoj pH vrednosti.

ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati su potvrdili da je mineralni sastav biljaka *S. nigrum* zavisio od tipa zemljišta. Koristeći prethodne rezultate za ovu biljnu vrstu, sa istih lokaliteta (Krstić et. al. 1999), može se zaključiti da su postojali određeni odnosi između sadržaja ispitivanih elemenata i sadržaja ukupnih alkaloida i flavonoida, posebno azota, a što može biti od praktične koristi.

LITERATURA

- Gašić, O., Popović, M., Pal, B., Malenčić, Đ. (1997): Biologically Active Compounds of Plants in the Fruška Gora Mountain Vol. 1 — Alkaloids. Matica srpska, Novi Sad, p.p. 138-140.
- Gericke, S., Kurmies, B. (1952): Die kolorimetrische Phosphorsaurebestimmung mit Ammonium-Vanadat-Molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde, Band 59, Heft 3, 32-35.
- Janjić, V., Kojić, M. (2000): Atlas korova. Institut za istraživanja u poljoprivredi „Srbija“, Beograd, p.p. 151-152.
- Kojić, M., Popović, R., Karadžić, B. (1997): Vaskularne biljke Srbije kao indikatori staništa. Institut za istraživanja u poljoprivredi „Srbija“, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd.
- Krstić, L., Popović, M., Boža, P. (1999): Fitohemijske analize vrsta *Solanum nigrum* L 1753 i *Solanum dulcamara* L. 1753 sa različitih staništa u Vojvodini. Lekovite sirovine, Vol. XIX. (19), 5-9.
- Krstić, L. (2002): Taksonomska i biohemijska analiza vrsta *Solanum nigrum* L. i *Solanum dulcamara* L. (*Solanales*, *Solanaceae*), Magistarska teza, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Marzell, H. (1964): Fam. *Solanaceae* L. In: Hegi, G. (ed.) Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band V, 4. Teil. Crl Hansen Verlag, München.
- Máthé, I. Jr, Máthé, I., Botz, L., Koch, L. (1986): Possibilities of *Solanum* alkaloid production in European temperate zone. Acta Horticulture, Medicinals and Aromatics, V. 188, 193-201.
- Mengel, K., Kirkby, E. A. (1987): Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern, Switzerland.
- Nelson, D. W., Sommers, L.E. (1973): Determination of total nitrogen in plant material. Agronomy Journal, 65, 109-112.
- Sarić, M., Kastori, R., Petrović, M., Stanković, Ž., Krstić, B., Petrović, N. (1990): Praktikum iz fiziologije biljaka. Naučna knjiga, Beograd, p.p. 137-182.

Soó, R. (1968): A Magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve III. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Stjepanović-Veseličić, Lj. (1974): Rod *Solanum* L. In: Josifović, M., (ed.), Flora SR Srbije VI; SANU, Beograd.

Takhtajan, A. (1997): Diversity and Classification of flowering Plants. Columbia University Press, New York.

Tucakov, J. (1996): Lečenje biljem, fitoterapija. Rad, Beograd.

SUMMARY

MINERAL COMPOSITION OF *S. nigrum* PLANTS IN RELATION TO HABITAT

Živko Stanković, Lana Krstić, Pal Boža and Slobodanka Pajević
Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, Trg Dositej Obradović 2,
21000 Novi Sad

S. nigrum is widely spread weed plant species. It contains alkaloids and other phytochemically active compounds and because of that it is of significant pharmaceutical importance. The results of total ash and macronutrient contents (N, P, K, and Ca) in stem, leaves, flowers and fruits are presented, with respect to the possible physiological effect of analyzed elements on the content of pharmacologically important compounds. The results suggest that the nitrogen has a dominant effect on the content and ratio of total alkaloids and flavonoids.

UDK 572:739

Naučni prilog

ANATOMSKE I FIZIOLOŠKE ODLIKE VRSTE
LATHYRUS VERNUS (L.) BERNH. 1800 (FABACEAE)

Merkulov Ljiljana, Krstić Lana, Boža Pal, Krstić Borivoj, Pajević Slobodanka
Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Novi Sad

Primljeno
1. III 2001.

SAŽETAK

Ispitivanjem divljih srodnika gajenih biljaka mogu se utvrditi njihove pozitivne i poželjne karakteristike koje je procesom oplemenjivanja moguće uneti u gajene genotipove. Vrste roda *Lathyrus* su divlji srodnici gajenog graška. U radu su prikazani rezultati anatomskih i fizioloških analiza vrste *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. 1800. Ustanovljeno je da su listići biljaka ove vrste hipostomatični, sa stomama anomocitnog tipa, prisutnim u relativno malom broju po jedinici površine. Na oba epidermisa prisutne su nežlezdane dlake, dok se retke žlezdane javljaju samo na adaksijalnom epidermisu. Mezofil je skoro homogen, sa slabo diferenciranim palisadnim tkivom. Prema analiziranim anatomskim karakteristikama listići imaju mezomorfno-skiomorfnu građu. Stablo je na poprečnom preseku okruglo do ovalno, slabo izraženih rebara, sa dva kratka krilasta izraštaja i prisutnim kortikalnim snopićima. Analiza sadržaja mineralnih elemenata po biljnim organima pokazala je da su koncentracije N, P i Ca najviše u listovima, a K i Na u stablu. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata je najviši u listu, a znatno manji u stablu. Odnos intenziteta fotosinteze i disanja je povoljan.

Ključne reči: *Lathyrus vernus* L., anatomija, list, stablo, N, P, K, Ca, Na, pigmenti, fotosinteza.

UVOD

Rod *Lathyrus* L. obuhvata 150-200 vrsta rasprostranjenih u severnoj hemisferi (Tatić i Blečić, 1988). Na području Evrope, na različitim tipovima staništa, rastu 54 vrste (Ball, 1972). U flori Srbije ovaj rod zastupljen je sa 26 vrsta (Kojić, 1972). Vrste roda *Lathyrus* predstavljaju divlje srodnike gajenog graška. Kompleksan pristup ispitivanju autohtonih srodnika gajenih biljaka postaje vrlo aktuelan i značajan (Aarsen i sar., 1986; Krstić i Sarić, 1987; Boža i sar., 1993; Krstić i sar., 1995; Lazić i sar., 1995; Merkulov i sar., 1995; Zlokolica i sar., 1996). Ispitivanja morfoloških, anatom-

skih, fizioloških, biohemijskih i genetičkih karakteristika divljih srodnika gajenih biljaka omogućava ne samo potpunije poznavanje njihove biologije, već i determinisanje „poželjnih“ osobina koje bi kroz proces oplemenjivanja bile iskorišćene kod gajenih biljaka.

Lathyrus vernus (L.) BERNH. 1800 je višegodišnja biljka sa kratkim, debelim i razgranatim rizomom (Kojić, 1972). Izdanak je go ili vrlo retko slabo obrastao dlakama. Stablo je većinom pojedinačno, uspravno, visoko 20-60 cm, u gornjem delu sa ljuspastim listićima. Listovi su perasto složeni i imaju 2-4 para jajastih, do dugačko ušiljenih listića. Zalisci su široko polukopljasti, sa malim lancetastim ušicama. Grozdaste cvasti su pojedinačne, sastavljene od 2-10 cvetova. Cvetovi su na drškama dugim 1-3 mm, odstojeći ili viseći. Čašica je zvonasta, mrka ili ljubičasto prevučena. Krunica je crveno-ljubičasta, a posle cvetanja plava do zeleno-plava. Zastavica je nabrana, znatno duža od krila i čunića. Stubić je dlakav, nije uvrnut. Mahuna je prava, odstojeća, linearna, sa slabo izraženim mrežastim nervima. Sadrži 8-14 sjajnih semena žuto-mrke boje, okruglog do sočivastog oblika.

Ova vrsta raste pretežno na kamenitim mestima i na plićim zemljištima, najčešće na krečnjačkoj podlozi, uglavnom u brdskom regionu. Zastupljena je najviše u bukovoj šumi, kao i u hrastovo-grabovoj šumi i u mešovitim šumama (*Acereto-Fraxineto-Carpineto-Fagetum mixtum*). Rasprostranjena je u većem delu Evrope. Prema Gajiću (1980) to je subsrednjoevropska vrsta, a prema Soó-u (1966) evroazijska (eurosibirska) vrsta, više-manje kontinentalnog karaktera. U Srbiji je dosta česta i rasprostranjenja (Kojić, 1972). Prema ekološkim indeksima Landolt-a (1977) indikator je staništa srednje vlažnosti i sadržaja organskih materija, srednje termofilna vrsta, koja raste uglavnom na zasenčenim mestima.

Od infraspecijskih oblika u flori Srbije zabeleženi su var. *vernus* ASCHERS ET GRAEBN. 1910 — listići lancetasti ili ljuspasto lancetasti, dugi 3-4 cm, sa formama *vernus* — listići jajasto lancetasti i *angustifolius* (ENDL.) BORZA 1947. — donji listići lancetasti, gornji uzdužno lancetasti i var. *flaccidus* (RADIUS) ARCANG 1894. — listići linearno lancetasti ili linearni, oko 10 mm široki, dugi 10-14. cm.

U cilju potpunijeg poznavanja vrste *Lathyrus vernus* u radu su analizirane njene anatomske i fiziološke karakteristike.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal sakupljen je početkom juna u fazi plodonošenja na lokalitetu Vrdnik (Fruška Gora), u listopadnoj šumi mešovitog tipa. Za anatomska ispitivanja izdvojeno je deset biljaka. Analizirani su lateralni srednji listići perasto složenog lista i internodije srednjeg dela stabla. Pokorično tkivo listića ispitivano je na otiscima adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa dobijenim po metodi Wolf-a (1954). Brojanje stoma i merenje njihove veličine vršeno je pomoću svetlosnog mikroskopa. Za ispitivanje anatomske građe pravljene su poprečni preseći srednjeg dela listića i internodija stabla pomoću mikrotoma na zamrzavanje. Standardnim mikrosopskim merenjima obuhvaćeni su: debljina listića, mezofila, palisadnog i sunderastog tkiva, kutikule, veličina ćelija adaksijalnog i abaksijalnog epidermisa, palisadnog i sunderastog tkiva, visina i širina glavnog nerva, provodnog snopića glavnog nerva i dijametar traheja. Na poprečnim preseccima stabla određen je broj provodnih snopića, a mereni su prečnik sta-

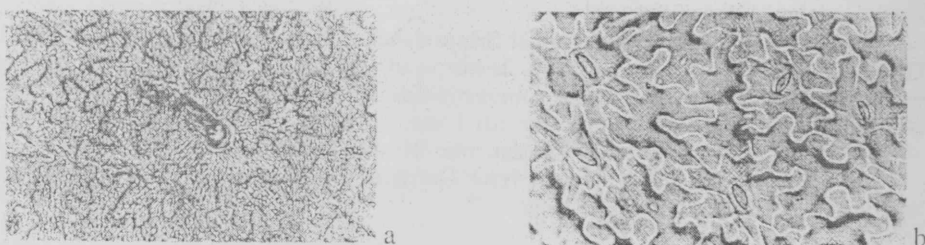
bla, debljina kutikule, veličina ćelija epidermisa, provodnih snopića, sklerenhimskih grupa, ćelija paranhima cilindra i traheja.

U okviru fizioloških ispitivanja određena je koncentracija mineralnih elemenata u listu, stablu i mahuni. Koncentracija azota određena je standardnom mikro-Kjeldahl metodom (Sarić i sar., 1990). Sadržaj fosfora određen je spektrofotometrijski, amonijum-vanadat—molibdat metodom (Gericke, Kurmies, 1952), a kalijuma, kalcijuma i natrijuma plamenofotometrijskom metodom (Sarić i sar., 1990). Analize su rađene u tri ponavljanja. Koncentracija fotosintetičkih pigmenata određena je po metodi Wetsteina, ekstrakcijom iz listova acetonom (Sarić i sar., 1990). Intenzitet fotosinteze i disanja mereni su polarografski, korišćenjem Clark-ovog tipa elektroda (Walker, 1987).

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati anatomskih ispitivanja

Rezultati analize pokoričnog tkiva listića pokazuju da epidermis čine relativno krupne ćelije čiji su antiklinalni zidovi izuvijani, više na abaksijalnoj strani (Sl. 1.). Na adaksijalnom epidermisu uočljiva su bradavičasta zadebljanja kutikule koja obrazuju kutikularni mozaik. Listovi su hipostomatični, sa stomama u nivou epidermisa. Stome su anomocitnog tipa (Metcalf i Chalk, 1957). Po mm² lisne površine nalazi se u proseku 68 stoma, dužine 29,6 µm i širine 22,5 µm. Dužina stoma više varira u odnosu na širinu (Tab. 1.)



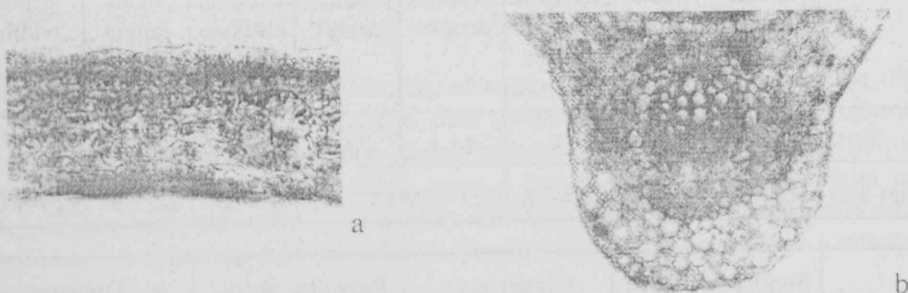
Slika 1. Otisci epidermisa listića: (a) adaksijalni epidermis, (b) abaksijalni epidermis
Figure 1. Prints of leaf epidermis: (a) adaxial epidermis, (b) abaxial epidermis

Tabela 1. Broj i veličina stoma abaksijalnog epidermisa
Table 1. Number and size of abaxial epidermis stomata

	Broj stoma po mm ² Number of stomata/mm ²	Dužina stoma (µm) Stomata length (µm)	Širina stoma (µm) Stomata width (µm)
Srednja vrednost Mean value	68	29,6	22,5
min-max	39-94	23,9-36,5	17,6-26,4

Na adaksijalnom epidermisu prisutne su nežlezdane i retke žlezdane dlake, a na abaksijalnom samo nežlezdane dlake, uglavnom koncentrisane duž glavnog nerva. Nežlezdane dlake su uniserijatne, građene iz krupnije bazalne ćelije, manje ćelije iznad nje koja je ispunjena tamnim sadržajem i duge, na vrhu zašiljene terminalne ćelije. Kod žlezdanih dlaka, razlikuju se bazalna ćelija, kratka jednoćelijska drška i višećelijska glavica ovalnog oblika.

U anatomskom pogledu listić je dorziventralne građe (Sl. 2a.) Epidermis čini jedan sloj ćelija tabličastog oblika. Pokriven je kutikulom koja nije glatka, već formira bradavičasta ispupčenja. Ćelije adaksijalnog epidermisa su sitnije i sa debljom kutikulom u odnosu na ćelije abaksijalnog epidermisa (Tab. 2.). Mezofil je relativno male debljine, skoro homogen, sa slabo diferenciranim palisadnim tkivom. Toma i Rugina (1972) takođe ukazuju na ovu osobinu u građi listića *L. vernus*. Palisadno tkivo je izgrađeno iz jednog sloja relativno krupnih ćelija koje su skoro četvorougaoznog oblika, jer je mala razlika između njihove širine i dužine (Tab. 2). Sunderasto tkivo se sastoji od četiri sloja ćelija nepravilnog oblika i brojnih, krupnih intercelulara. Subepidermalni sloj mezofila — palisadno tkivo je postavljen upravno na adaksijalni epidermis, dok su ćelije sunderastog tkiva postavljene horizontalno. U mezofilu se uočavaju sitni kolateralni provodni snopići obavijeni ćelijama parenhimske sare.



Slika 2. Poprečni presek listića: (a) 1/4 širine, (b) glavni nerv
Figure 2. Leaflet transections: (a) 1/4 leaf width, (b) main vein

Glavni nerv je ispupčen na abaksijalnoj strani, zaobljenog oblika (Sl. 2b.). U njemu se nalazi samo jedan kolateralni provodni snopić. Uz floemski deo snopića nalazi se dobro razvijeno sklerenhimsko tkivo, dok se manja grupa mehaničkih elemenata nalazi uz ksilemski deo.

Tabela 2. Anatomske karakteristike listića (μm)

Table 2. Leaflet anatomical characteristics (μm)

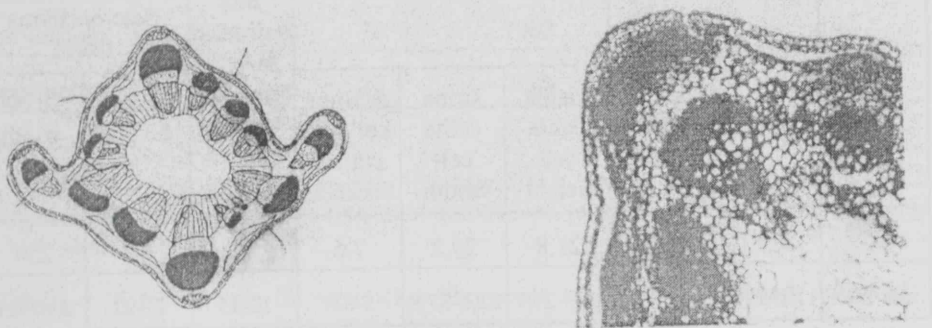
	Debljina / Thickness			
	listića leaflets	mezofil mesophyll	palisadnog tkiva palisade tissue	sunderastog tkiva spongy tissue
X	138	95	26	68
min-max	127-148	89-99	24-30	60-74

	Ćelije adaksijalnog epidermisa Adaxial epidermis cells			Ćelije abaksijalnog epidermisa Adaxial epidermis cells			Ćelije palisadnog tkiva Palisade tissue cells	
	visina height	širina width	debljina kutikule cuticle thickness	visina height	širina width	debljina kutikule cuticle thickness	visina height	širina width
X	13,8	23,2	3	14,4	27,2	2,6	26,3	30,8
min-max	10-18,9	13,9-34	2,5-3,8	10,1-18,9	13,9-41,6	1,9-3,8	20,2-34	22,7-40,3

	Sunderasto tkivo Spongy tissue		Glavni nerv Main vein		Provodni snopić glavnog nerva Main vein vascular bundle		Traheje Vessels	
	visina height	širina width	visina height	širina width	visina height	širina width	visina height	širina width
X	20	42,3	377	413	128	115	20,1	19,6
min-max	15,1-26,5	30,2-52,9	362-393	393-423	122-133	102-138	16,4-25,2	17,6-21,4

Mala debljina listića, kutikule, relativno mali broj stoma po jedinici površine i njihovo prisustvo samo na abaksijalnoj strani listića, slabije razvijen indumentum, kao i slaba diferenciranost palisadnog tkiva su osobine koje ukazuju na mezomorfno-skio-morfnu gradnju listića.

Stablo je na poprečnom preseku okruglo do ovalno, sa dva bočna, kratka i široka krilasta izraštaja (Sl. 3.). Dva naspramna rebra su jače izražena, a intermedijalna veoma slabo. Na poprečnom preseku stabla uočavaju se epidermis, primarna kora i centralni cilindar. Epidermis čini jedan sloj ćelija skoro sferičnog oblika. Prekriven je hrpavom kutikulom. I na epidermisu stabla nalaze se nežlezdane i žlezdane dlake, ali u znatno manjem broju u odnosu na listić.



Slika 3. Poprečni presek stabla
Figure 3. Stem transection

Primarna kora je relativno tanka, izgrađena iz svega nekoliko slojeva ćelija (Sl. 5.). Dva do tri subepidermalna sloja čine sitne tankozidne ćelije ispunjene hloroplastima — asimilacioni parenhim. Dublje slojeve primarne kore grade krupnije ćelije parenhima, bez hlorofila. Subepidermalno, samo u krupnijim rebrima i u krilastim izraštajima razvijen je kolenhim. U perifernom delu kore, paralelno sa površinom stabla, rasporedene su spljoštene šupljine, lakune. Granični sloj ćelija između kore i cilindra nije jasno izražen.

Centralni cilindar ispunjavaju parenhimske ćelije čija se veličina povećava ka središnjem delu stabla. Najkrupnije centralne ćelije se raskidaju i formira se manja centralna šupljina. Kolateralni provodni snopići različite veličine raspoređeni su u jednom krugu u perifernom delu centralnog cilindra. Snopići naspram rebara su znatno krupniji. Broj provodnih snopića kreće se od 12 do 15 (Tab. 3). Po jedan manji snopić nalazi se u svakom krilastom izraštaju — kortikalni snopići. Iznad floemskog dela snopića su grupe sklerenhimskih vlakana (periciklične sklerenhimske grupe) koje su veće iznad krupnijih snopića. Ćelije sržnih zraka između ksilemskih delova snopića imaju jače zadebljale zidove i zajedno sa ksilemom grade kontinuirani prsten. Parenhimske ćelije perifernog dela cilindra (perimedularna zona) su sitnije i jače zadebljale zidova.

Tabela 3. Anatomske karakteristike stabla (μm)

Table 3. Stem anatomical characteristics (μm)

	Prečnik stabla Stem diameter		Epidermis Epidermis			Broj provodnih snopića Number of vascular bundles	Sklerenhimsko tkivo Sclerenchyma tissue	
	veći larger	manji smaller	visina ćelija cell height	širina ćelija cell width	debljina kutikule cuticle thickness		visina height	širina width
X	2150	1875	21,8	29,2	7,6	13	82	254
min-max	1703-2795	1651-2535	16,3-27,7	22,6-37,8	5-8,8	12-15	71-92	204-321

	Floem Phloem		Ksilem Xylem		Traheje Vessels		Ćelije parenhima cilindra Cylinder parenchyma cells	
	visina height	širina width	visina height	širina width	visina height	širina width	visina height	širina width
X	36	273	159	257	39,5	28,8	38,5	32
min-max	25-46	219-337	107-199	214-326	25,2-56,7	17,6-42,8	22,6-51,6	16,8-46,6

Rezultati fizioloških ispitivanja

Analiza sadržaja mineralnih elemenata po organima pokazuje da je sadržaj azota najveći u listovima zatim u stablu, a najmanji u mahuni (Tab. 4.). Prosečan sadržaj fosfora kod graška prema Alzueta i Gonzales (1981) iznosi 0,13%, dok Cervato i Marudeli (1986) ukazuju da sadržaj ovog elementa zavisi od ontogeneze biljke graška, kao i to da ga u semenu ima oko 0,5%. Prema našim ispitivanjima fosfora ima najviše u listu, dok su koncentracije u stablu i mahuni podjednake i niže. Kalijuma i natrijuma ima najviše u stablu, zatim u listu, a najmanje u mahuni, dok je kalcijum najzastupljeniji u listu, zatim u stablu i najmanje mahuni.

Tabela 4. Koncentracije mineralnih elemenata po biljnim organima (mg%)
Table 4. Mineral element concentrations in plant organs (mg%)

	N	P	K	Ca	Na
list/leaf	3478	105	1773	2457	68
stablo/stem	2174	70	1992	1301	90
mahuna/pod	1372	71	633	907	32

Od ispitivanih pigmenata najviše ima hlorofila a, dok su koncentracije hlorofila b i karotenoida manje (Tab. 5.). Intenzitet fotosinteze je 444,17 $\mu\text{mol O}_2/\text{gh}$, a disanja 143,04 $\mu\text{mol i O}_2/\text{gh}$.

Tabela 5. Koncentracija fotosintetičkih pigmenata (mg/g suve materije), intenzitet fotosinteze disanja ($\mu\text{mol O}_2/\text{gh}$)

Table 5. Concentration of photosynthetic pigments (mg/g dry weight) and rate of net photosynthesis and dark respiration ($\mu\text{mol O}_2/\text{gh}$)

	Hlorofil a Chlorophyl a	Hlorofil b chlorophyl b	Hlorofil a+b Chlorophyll a+b	Karotenoidi Carotenoids	Intenzitet fotosinteze Rate of net photo- synthesis	Intenzitet disanja Rate of dark respiration
list	5,71	2,02	7,73	1,91	444,17	143,04
stablo	1,26	0,52	1,78	0,82		

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja anatomskih i fizioloških karakteristika vrste *Lathyrus vernus* može se zaključiti da su listići hipostomatični, sa stomama anocitnog tipa, čiji je broj po jedinici površine relativno mali. Čelije epidermisa imaju izuvijane antiklinalne zidove, posebno na abaksijalnoj strani. Za adaksijalni epidermis karakteristična su bradavičasta ispupčenja kutikule — kutikularni mozaik. Nežlezdane dlake se javljaju na oba epidermisa, dok su retke žlezdane prisutne samo na adaksijalnom epidermisu. Listić je dorziventralne građe, male debljine, sa slabo diferenciranim palisadnim tkivom. U građi listića izražene su mezomorfno — skimorfne osobine. Stablo je okruglo do ovalno, sa dva kratka, bočna krilasta izraštaja i slabo izraženim rebrima i kolenhimom. U stablu su prisutni kortikalni snopići. Analizom mineralnog sastava lista, stabla i mahune ustanovljeno je da postoji razlika u sadržaju jona zavisno

od biljnog organa. Najveće koncentracije N, P i Ca zabeležene su u listovima, a K i Na u stablu. Sadržaj pigmenata najveći je u listu a znatno manji u stablu. Odnos intenziteta fotosinteze i disanja je povoljan.

Ovaj rad je deo istraživanja na projektu broj 1760 „Divlji srodnici gajenih biljaka: *Lathyrus* spp. *Trifolium* spp i *Allium* spp.”, finansiranog od strane Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

1. Aarsen, L. W., Ivan, V. Hall, Jensen, I. N. (1986): The biology of Canadian weeds. *Vicia angustifolia* L., *V. cracca* L., *V. sativa* L., *V. tetrasperma* (L.) Schreb. and *V. villosa* Roth. Canadian Journal of Plant Science, 66, 711-737.
2. Alzueta, C., Gonzales, G. (1981): Valoración nutritiva del residuo fibrosa resultante del fraccionamiento de la planta des Granada de *Pisum sativum* L. Pastos 11(2), 371-381.
3. Ball, P. W. (1972): *Lathyrus* L. In: Tutin, T. G. et al. (ed.) Flora Europaea, 2, University Press, Cambridge.
4. Boža, P., Krstić, B., Merkulov, Lj., Sarić, M., Pajević, S., Savić, D. (1993): Morphological variability of certain relatives of cultivated vetch *Vicia sativa* L. (*Fabales*, *Fabaceae*). Journal of Sci. Agric. Research 54, 193-196.
5. Cervato, A., Marudelli, M. (1986): Assorbimento ed Assortazioni minerali di culture di pisello da industria. Ann. Fac. Agr. U.C.S.C.2, 137-164.
6. Gajić, M. (1980): Pregled vrsta flore SR Srbije sa biljno-geografskim odlikama. Glasnik šumarskog fakulteta, serija A „Šumarstvo” 54, 111-141.
7. Gericke, S., Kurmies, B. (1952): Die kolorimetrische phosphorsaurebestimmung mit Amonium-Vanadate-Molibdat und ihre Anwendung in der pflanzenanalyse. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde 59, 32-35.
8. Krstić, B., Sarić, M. (1987): Genetic diversity in ion acquisition of wild species and imbred lines of sunflower. Contemporary Agric. 35, 229-235.
9. Krstić, B., Sarić, M., Pajević, S., Boža, P., Merkulov, Lj. (1995): Diversity of ion acquisition in wild *Vicia* species. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 88, 19-26.
10. Kojić, M. (1972): Rod *Lathyrus* L. U: Josifović, M. (ed.), Flora SR Srbije 4, SANU, Beograd, 358-385.
11. Landolt, E. (1977): Ökologische Zeigerwerte zur Schweizer Flora, Veröffentlichungen des geobotanischen Institutes der eidg. Techn. Hochschule, Stiftung Rubel, Heft 64, Zurich.
12. Lazić, B., Igić, R., Butorac, B., Petrović, N., Zlatković, B. (1995): Biološka svojstva *Allium rotundum* L. subsp. *waldsteinii* (Don) Soo, *A. sphaerocephalon* L. i *A. flavum* L. Savremena poljoprivreda, Vol. 43., No. 5., 43-50.
13. Merkulov, Lj., Boža, P., Krstić, B., Ivezić, J., Pajević, S. (1995): A comparative anatomical investigations of the genus *Vicia* L. (*Fabales*, *Fabaceae*). Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 90, 59-69.
14. Metcalfe, C. R., Chalk, L. (1957): Anatomy of the Dicotyledons I, Clarendon Press, Oxford, 504-516.
15. Sarić, M., Kastori, R., Stanković, Ž., Krstić, B., Petrović, N. (1990): Praktikum iz fiziologije biljaka, Naučna knjiga, Beograd.

16. Soó, R. (1966): A magyar flóra és vegetáció rendszertaninóvényfoldrajzi kézikönyve II., Akadémiai kiadó, Budapest.

17. Tatić, B., Blečić, V. (1988): Sistematika i filogenija viših biljaka, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

18. Toma, C., Rugina, R. (1972): Cercetari de histo-anatomic comparata la specii ale genului *Lathyrus* L. (II). An. St. Univ., Iasi, sect. II a. t. XVII, fasc. 2: 411-421.

19. Zlokolica, M., Boža, P., Krstić, B., Milošević M. (1996): The significance of enzyme polymorphism in studying *Vicia sativa* L. and its wild relatives. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 89, 45-52.

20. Walker, D. A. (1987): Leaf disc. The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxigraphics Ltd., University of Eheffield print Unit, Sheffield, 164-196.

21. Wolf, L. (1954): Mikroskopicka tehnika, Státni zdravotnické, nakladatelství, Praha, p. 656.

ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL TRAITS OF *LATHYRUS VERNUS* (L.) BERNH. 1800 (FABACEAE)

Mekulov Ljiljana, Krstić Lana, Boža Pal, Krstić Borivoj, Pajević Slobodanka
Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology and Ecology, Novi Sad

SUMMARY

Investigation of wild relatives of cultivated plants reveals their positive and desirable characteristics, which can be introduced into cultivated genotypes during improvement process. Species of *Lathyrus* genus are wild relatives of cultivated pea. The results of anatomical and physiological analyses of *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. 1800 are presented in this paper. It was concluded that leaves of this species are hypostomatic, with anomocytic stoma type. The number of stomata per leaf surface is relatively low. Non-glandular hairs are present on both epidermises, while glandular ones only on adaxial epidermis. Mezophyll is almost homogenous, with poorly differentiated palisade tissue. According to analyzed anatomical characteristics it was concluded that leaves have mesomorphic-sciomorphic structure. Cross section of stem is rounded to oval, with two winged outgrowths. Analysis of content of mineral elements according to plant organs revealed that concentrations of N, P and Ca were the highest in the leaves, and of K and Na in the stem. The highest content of photosynthetic pigments was found in the leaves, and it was much less so in the stem. The relation of intensity of photosynthesis and respiration was favorable.

Key words: *Lathyrus vernus* L., anatomy, leaf, stem, N, P, K, Ca, Na, pigments, photosynthesis.

