

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

UČINAK TOPLOTNOG STRESA NA RAZVOJ I KLIJANJE PELUDA

THE HEAT STRESS EFFECT ON POLLEN DEVELOPMENT AND  
GERMINATION

ZAVRŠNI SEMINARSKI RAD

Vedrana Šlipogor

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study of molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Željka Vidaković – Cifrek

Zagreb, 2009.

## **ZAHVALE**

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek za entuzijazam koji me zaintrigirao za biljnu fiziologiju, ukazanom povjerenju te pomoći pri pronalaženju adekvatne literature i izradi ovog završnog seminara.

Hvala doc. dr. sc. Boženi Mitić za posudbu dijela literature.

## **ABECEDNI POPIS KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU**

ER - endoplazmatski retikulum

CaM - kalmodulin

GABA -  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina

GAD - glutamat dekarboksilaza

HSE - «heat shock elements»; elementi toplotnog stresa

HSF - «heat shock factor»; faktor toplotnog stresa

HSP - «heat shock proteins»; proteini inducirani stresom

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
2. TOPLOTNI STRES.....	7
2.1. TOPLOTNI STRES I NJEGOV UČINAK NA BILJKE.....	7
2.2. PRILAGODBA BILJAKA NA PREKOMJERNO ZAGRIJAVANJE.....	10
3. STRUKTURA I MORFOLOGIJA PELUDA.....	13
4. GAMETOGENEZA.....	17
5. PELUD I OPLODNJA.....	21
5.1. KLIJANJE PELUDA.....	21
5.2. RAST PELUDNE MJEŠINICE.....	22
5.3. SIGNALNI MEHANIZMI KOJI UPUĆUJU RASTUĆU PELUDNU MJEŠINICU PREMA EMBRIONSKOJ VREĆI.....	25
6. DJELOVANJE TOPLOTNOG STRESA NA RAZVOJ I KLIJANJE PELUDA.....	29
7. ZAKLJUČCI.....	34
8. LITERATURA.....	35
9. SAŽETAK.....	39
10. SUMMARY.....	40

## 1. UVOD

Interes znanstvenika za učinak toplotnog stresa na razvojne procese u biljaka svakom je godinom sve veći zbog opasnosti od globalnog zatopljenja i potrebe za osiguravanjem dovoljne količine hrane za svjetsko pučanstvo u tim promijenjenim uvjetima. Naime, zatopljenje bi moglo značajno djelovati na reproduktivni uspjeh biljnih vrsta, a moglo bi imati i dalekosežni utjecaj na svjetske sustave proizvodnje hrane biljnog podrijetla. Osjetljivost razvoja biljnih reproduktivnih organa na toplotni stres nije još dovoljno istražena, međutim sa predviđenim porastom temperature od +1,4 °C do +5,8 °C do 2010. godine (YOUNG I SUR. 2003, prema IPCC Working Group I, 2001) dobro razumijevanje ove problematike je nužno kako bi se na vrijeme smanjio negativni učinak povišenja temperature na biljke (YOUNG I SUR. 2003) te doprinosi i razumijevanju prirodnog geografskog smještaja biljnih vrsta. Ovo je posebice važno za vrste poput divlje trešnje (*Prunus avium*) koje su u nekim regijama poput Mediterana, na samoj temperaturnoj granici kultivacijskog potencijala (HEDHLY I SUR. 2003). Klimatske promjene također mogu uzrokovati odvajanje reproduktivnih ciklusa biljaka i insekata koji ih oprašuju (HEDHLY I SUR. 2008). Toplotni stres je svakako jedan od najvažnijih okolišnih stresnih čimbenika koji djeluju na živi svijet.

Biljke se susreću s visokim vrijednostima temperature zraka i tla u uvjetima suše i nedostatka navodnjavanja polja. Takvi se uvjeti najčešće javljaju u područjima suhe vruće klime. Negativni učinak visokih temperatura na kultivirane biljke može se smanjiti rjeđim navodnjavanjem tla (BURKE I SUR. 2006).

Mnoge biljke, kao što su uljana repica (*Brassica napus*) (YOUNG I SUR, 2003, prema ANGADI I SUR. 2000), lan (*Linum usitatissimum*) (YOUNG I SUR. 2003, prema GUSTA I SUR 1997), rajčica (YOUNG I SUR. 2003, prema SATO I SUR. 2002), grah (*Phaseolus vulgaris*) (YOUNG I SUR. 2003, prema SHONNARD I GEPTS 1994), pšenica (*Triticum aestivum*) (YOUNG I SUR. 2003, prema SAINI I SUR. 1983), kukuruz (YOUNG I SUR. 2003, prema CARLSON, 1990) pokazuju osjetljivost na toplotni stres tijekom reproduktivnog razvoja što sugerira postojanje zajedničkih mehanizama koji dovode do smanjenja stvaranja sjemena u tim biljkama.

Zna se da na razvoj peluda i oplodnju utječu mnogi okolišni faktori, kao što je temperatura, starost peluda (ROSELL I SUR. 2006), vlažnost, raspoloživost hranjivih tvari, ozon

u troposferi, onečištači zraka poput H<sub>2</sub>S (YOUNG-KEUN 2002, prema SHIVANNA I JOHRI 1985). Temperatura koja djeluje tijekom razvoja peluda utječe na njegov kemijski sastav, vijabilnost, stopu i kinetiku rasta peludne mješinice te sintezu HSP. Peludno zrno mora imati optimalnu temperaturu razvoja i klijanja (HEDHLY I SUR. 2003, YOUNG-KEUN I SUR. 2002, prema LANKINEN I SUR. 2001). Na suboptimalnoj temperaturi, klijanja nema ili je slabije od onog koje se događa na optimalnoj temperaturi, a pri optimalnoj temperaturi rast peludne mješinice je brži i uspješniji (YODER I SUR 2009). Održivost neke biljke na određenom području ovisi ne samo o temperaturi nego i o duljini sezone rasta. Dnevne ili sezonske temperature iznad optimuma ili temperaturni ekstremi, ukoliko se podudaraju s ključnim stadijima u razvoju biljaka, postaju glavni ograničavajući faktor rasta (KAKANI I SUR 2005, prema HALL 1992).

Iako nije otkriveno na koju fazu cvjetanja ili razvoja gametofita najviše utječe toplotni stres (YOUNG I SUR. 2003), u biljaka toplotni stres utječe na razvoj peluda i klijanje peludne mješinice, na razvoj ženskih reproduktivnih organa, uspješnost oplodnje i stvaranja ploda. Vjerojatno su pritom najosjetljiviji procesi oprašivanje i oplodnja (BURKE I SUR. 2006). Biljke se protiv toplotnog stresa bore promjenama u metaboličkim procesima, zaustavljanjem sinteze normalnih staničnih proteina, degradacijom proteina, tj. razvile su termotoleranciju, prilagodbu na postupno povišenje temperature. Posebna i najvažnija karakteristika je sinteza proteina induciranih stresom, takozvanih «heat shock proteins» (HSP). Većina tih proteina su po svojoj strukturi i funkciji molekularni chaperoni koji omogućavaju pravilno funkcioniranje stanice u uvjetima visokih temperatura time što stabiliziraju proteine i membrane te sudjeluju u slaganju odmotanih proteina. Izlaganje visokim temperaturama tijekom razvoja cvijeta inhibira stvaranje peluda i uzrokuje sterilnost cvijeta. Pelud je vrlo osjetljiv na povišene temperature, iako ima vrlo karakterističnu strukturu koja ga na njegovom putu do sjemenog zametka štiti od brojnih štetnih utjecaja i isušivanja. Peludno zrno razvija peludnu mješinicu koja kroz tučak raste prema sjemenom zametku, noseći pritom spermalne stanice u embrionsku vreću. Dvije glavne uloge peludne mješinice su izduživanje i dobra interpretacija „signala za navođenje“ prema ženskom staničju. Ukoliko ne dođe do oplodnje, često je krivica u abnormalnosti klijanja peludne mješinice ili neuspješnosti klijanja peluda na tučku. Nužno je zato vidjeti utjecaj vanjskih faktora kao što je temperatura na fiziologiju, dinamiku i molekularne mehanizme klijanja peluda.

## 2. TOPLOTNI STRES

### 2.1. TOPLOTNI STRES I NJEGOV UČINAK NA BILJKE

Niske i visoke temperature mogu uzrokovati oštećenja biljaka (PEVALEK-KOZLINA, 2002). U okolišu s intenzivnim sunčevim zračenjem i visokim temperaturama, biljke izbjegavaju prekomjerno zagrijavanje listova. Apsorpciju sunčevog zračenja smanjuju refleksijom svjetlosti na lisnim dlakama, voskovima, zamotavanjem listova, vertikalnom orijentacijom listova, rastom malih listova kako bi se povećao gubitak topline konvekcijom i kondukcijom (TAIZ I ZEIGER, 2002).

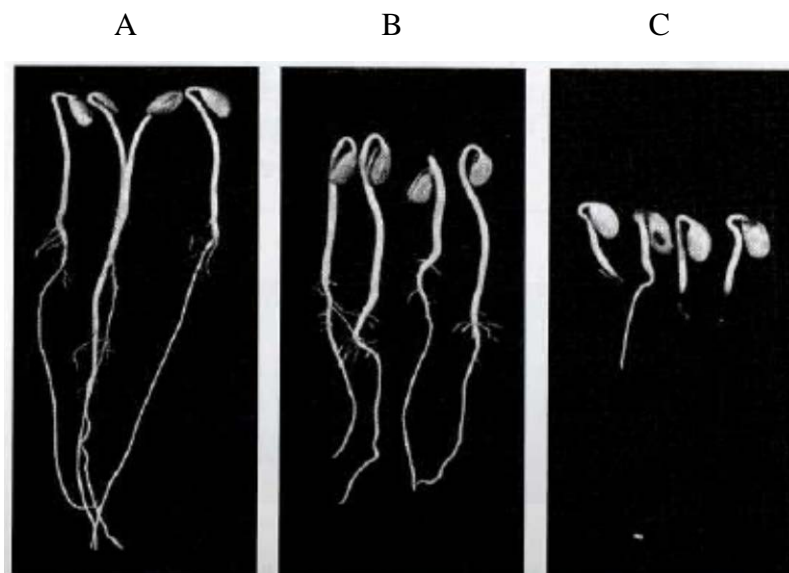
Većina tkiva viših biljaka ne može preživjeti dugotrajno izlaganje temperaturama iznad 45 °C. Pojedini organi i biljna tkiva različito su osjetljivi na visoke temperature pa tako dehidrirana tkiva (pelud, sjemenke) i ona koja ne rastu preživljavaju više vrijednosti temperature. Međutim, hidrirana tkiva, vegetativne stanice koje rastu, iste te temperature neće preživjeti i za njihov rast optimalne su mnogo niže vrijednosti temperatura (Tablica 1).

Tablica 1. Letalne temperature za pojedine biljne vrste i njihove dijelove (PEVALEK-KOZLINA, 2002)

Biljka	Letalna temperatura (°C)	Vrijeme izloženosti
<i>Nicotiana rustica</i> (divlji duhan)	49 – 51	10 min
<i>Cucurbita pepo</i> (bundeve)	49 – 51	10 min
<i>Zea mays</i> (kukuruz)	49 – 51	10 min
<i>Brassica napus</i> (korabica)	49 – 51	10 min
<i>Citrus aurantium</i> (naranča)	50,5	15 – 30 min
<i>Opuntia</i> (kaktus)	>65	-
<i>Sempervivum arachnoideum</i>	57 – 61	-
Listovi krumpira	42,5	1 sat
Sijanci bora i smreke	54 – 55	5 min
Sjemenke lucerne	120	30 min
Vinova loza (zreli plodovi)	63	-
Plodovi rajčice	45	-
Pelud bora	70	1 sat
Mahovine		
hidrirane	42 – 51	-
dehidrirane	85 – 110	-

Toplotni stres uzrokuje odmatanje ili krivo zamatanje mnogih staničnih proteina, koji inače imaju ulogu enzima ili strukturnih komponenti. Na taj način poprimaju krivu konformaciju te dovedu do gubitka enzimske aktivnosti. Ti se proteini često skupljaju u agregate i precipitiraju, uzrokujući velike probleme unutar stanice (TAIZ I ZEIGER, 2002).

Kratkotrajno povremeno izlaganje subletalom toplotnom stresu inducira toleranciju biljke na inače letalne temperature. Taj se fenomen naziva inducirana termotolerancija (Slika 1). Sadržaj vode i toplotni stres su povezani, stoga stabljike većine  $C_3$  i  $C_4$  biljaka koje imaju na raspolaganju dovoljnu količinu vode održavaju svoju temperaturu ispod  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  hlađenjem isparavanjem, no u uvjetima manjka vode isparavanje se smanjuje pa se temperatura tkiva povisi (TAIZ, ZEIGER, 2002).

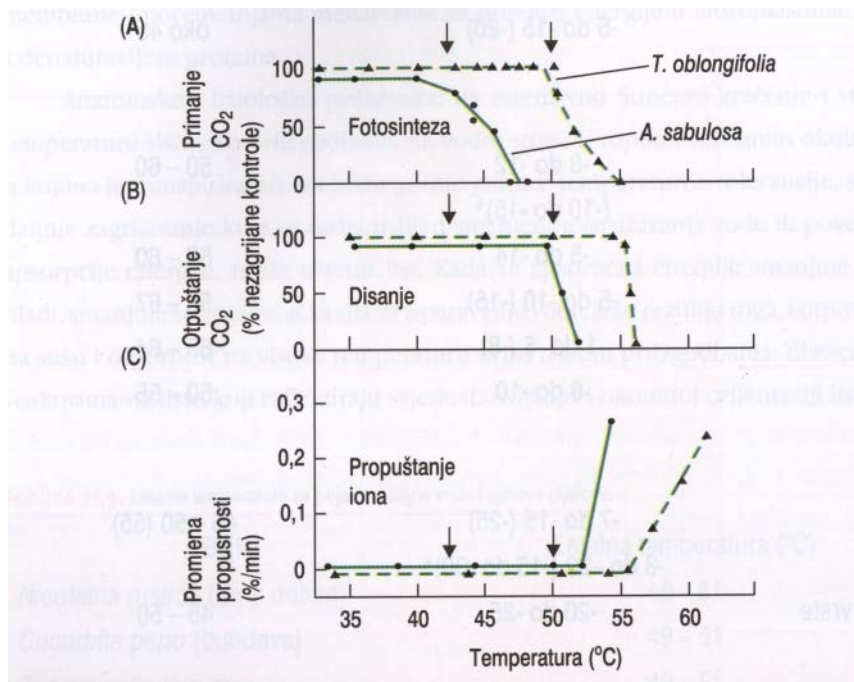


Slika 1. Termotolerancija može biti inducirana u klijanima. Slike (A, B i C) prikazuju klijanca soje uzgajane pri  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Klijanca na slici A nisu izlagani toplini, dok su klijanca na slici B pretretirani dva sata na temperaturi od  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prije nego što su izloženi dva sata temperaturi od  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Slika C prikazuje klijanca izložene temperaturi od  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez predtretmana povišenom temperaturom (BUCHANAN I SUR. 2000).

Mnoge CAM biljke, osobito sukulenti, adaptirane su na visoke temperature. U uvjetima intenzivnog sunčevog zračenja ljeti mogu podnijeti temperature tkiva od  $60$  do  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . CAM biljke drže svoje puči zatvorenima tijekom dana, pa višak topline oslobađaju ponovnom emisijom dugovalnog (infracrvenog) zračenja. Za razliku od njih, tipične  $C_3$  i  $C_4$  biljake se oslanjaju na transpiracijsko hlađenje kako bi snizile temperaturu listova. Toplotni stres je potencijalna opasnost u staklenicima, zbog toga što mali protok svježeg zraka i visoka



vlažnost smanjuju stopu hlađenja listova. Umjereni toplotni stres usporava rast čitave biljke. I fotosinteza i disanje inhibirani su kod visokih temperatura, ali kako se temperature povisuju, tako stopa fotosinteze opada prije stope disanja, kao što prikazuje Slika 2 (TAIZ I ZEIGER, 2002).



Slika 2. Odgovor vrsta *Atriplex sabulosa* (samonikla u hladnom podneblju) i *Tidestromia oblongifolia* (samonikla u vrlo toplom podneblju) na toplotni stres. Kontrolne biljke su uzgajane na temperaturi do 30 °C. Fotosinteza (A) i disanje (B) su mjereni u listovima na biljci, a propuštanje iona preko plazmaleme (C) mjereno je u komadićima listova uronjenim u vodu. Strelicama su označene temperature koje inhibiraju fotosintezu (PEVALEK-KOZLINA, 2002).

Za normalnu funkciju stanice važna je stabilnost raznih staničnih membrana. Prekomjerna fluidnost membranskih lipida uzrokuje gubitak fiziološke funkcije u uvjetima toplotnog stresa. Pri visokim vrijednostima temperatura se u tekućoj fazi membrane smanjuje jakost vodikovih veza i elektrostatske interakcije između polarnih skupina proteina. Visoke temperature koje modificiraju sastav i strukturu membrana uzrokuju «propuštanje» iona. Poremećaj membranske strukture uzrokuje inhibiciju procesa fotosinteze i disanja. Rane faze oštećenja fotosintetskih procesa uzrokovanih toplinom puno su izravnije povezane s promjenama svojstava membrana, nego s općom denaturacijom proteina (TAIZ I ZEIGER, 2002).

## 2.2. PRILAGODBA BILJAKA NA PREKOMJERNO ZAGRIJAVANJE

Kao odgovor na nagle promjene temperature (porast vrijednosti određene temperature 5-10 °C), biljke proizvode jedinstveni set proteina, takozvane proteine inducirane toplotnim stresom – „heat shock proteins“ (HSP). Većina tih proteina podiže otpornost biljke na toplotni stres ponašajući se kao molekularni chaperoni. Sprječavaju krivo smatanje proteina, pravilno smataju krivo zamotane i agregirane proteine, što omogućava poprimanje pravilne konformacije tih proteina i pravilno funkcioniranje stanice pri višim vrijednostima temperatura koje uzrokuju stres. Sinteza novih mRNA transkripata za HSP detektira se već 3-5 minuta nakon izlaganja biljke toplotnom stresu. Ipak, HSP se ne sintetiziraju samo pri naglim promjenama vrijednosti temperature, nego i postupnim, koje su mnogo primjerenije prirodnim uvjetima, u prirodnom okolišu. Neki HSP su prisutni u stanici i u normalnim, fiziološkim uvjetima (TAIZ I ZEIGER, 2002).

Tablica 2. Proteini inducirani stresom i njihove karakteristike.

PROTEINSKA SKUPINA	VELIČINA (kDa)	LOKALIZACIJA U STANICI
HSP 100	100-114	citoplazma
HSP 90	80-94	citoplazma, ER
HSP 70	69-71	ER, citoplazma, mitohondrij
HSP 60	60	kloroplast, mitohondrij
	57	kloroplast, mitohondrij
	10	kloroplast, mitohondrij
smHSP	15-30	ER, citoplazma, mitohondrij

HSP su molekularne mase od 15 do 104 kDa, i dijele se u pet skupina s obzirom na veličinu (Tablica 2). Različiti HSP lokalizirani su u jezgri, mitohondriju, kloroplastu, endoplazmatskom retikulumu i citosolu. Članovi HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100 ponašaju se kao molekularni chaperoni. Stabiliziraju novosintetizirane proteine, pri čemu troše energiju

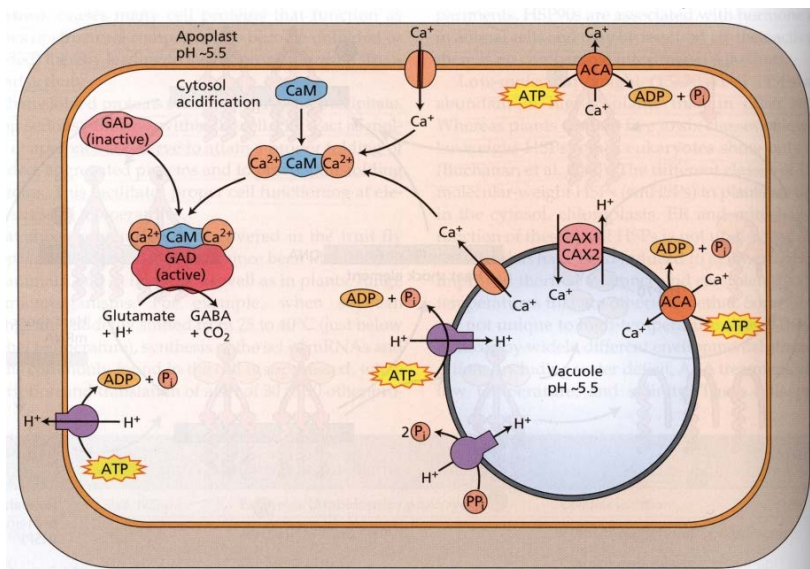
ATP-a., smataju proteine te povezuju oligomerne proteine. Neki HSP pomažu transport polipeptida preko membrane u stanične kompartimente. HSP niske molekularne mase (15-30 kDa) su prisutniji u višim biljkama nego ostalim organizmima. Dok biljke imaju pet do šest klasa HSP niske molekularne mase, drugi eukarioti pokazuju samo jednu klasu (BUCHANAN I SUR. 2000).

Toplotni stres može uzrokovati promjene u raznim metaboličkim procesima, kao što je denaturacija proteina, inhibicija sinteze normalnih staničnih proteina (HE I SUR. 2007, prema DIMASCIO I DANNEBERGER 1990). Degradacija proteina povećana je pod uvjetima toplotnog stresa što dovodi do starenja listova (HE I SUR. 2007, prema AL-KHAIB I PAULSEN 1984). Indukcija genske ekspresije sHSP i akumulacije tih proteina u stresnim uvjetima, kad se optimalna temperatura povisi 10 °C - 15 °C, daje do znanja da su vrlo bitni za toleranciju stresa. Najdominantniji su u biljkama prilikom toplotnog stresa sHSP molekularne mase do 42 kDa (SUN I SUR. 2002). Tijekom toplotnog stresa, neki sHSP zauzimaju 1% ukupnih proteina lista (SUN I SUR. 2002, BURKE I SUR. 2006 prema HSIEH I SUR. 1992). BURKE I SUR. (1985) navode da su biljke izložene temperaturama od 40 °C nakupljale polipeptide veličine do 100 kDa, ali ti se polipeptidi nisu nakupljali u kontrolnim biljkama, izloženim temperaturi od 30 °C, što je sugeriralo da je riječ o HSP.

Stvaranje HSP u literaturi nije dovoljno dokumentirano i u nekim slučajevima kontradiktorno. Primjerice, u nekim se člancima (VOLKOV I SUR. 2005, COOPER I SUR. 1984) tako navodi da se u biljkama mali proteini toplotnog stresa (sHSP) ekspimiraju u vegetativnom tkivu, ali se tijekom razvoja njihova ekspresija inducira i u peludi, iako se u drugim člancima (YOUNG I SUR 2005, XIAO I SUR 1984, BURKE I SUR 2006, prema GAGLIARDI I SUR 1995, HOPF I SUR 1992) izričito navodi kako pelud ne ekspimirira HSP. Indukcija ekspresije sHSP tijekom razvoja povezuje se sa potencijalnom embriogeneza mikrospora koje su inducirane stresom, no pokusima je odbačena ta tvrdnja. Različiti citosolni sHSP geni su ekspimirani specifično za određene faze razvoja što je sugeriralo da neki sHSP geni igraju važnu ulogu u ranom, a ne i tijekom kasnijih stadija razvoja peludi. Toplotni stres rezultira u relativno slabom i nepotpunom odgovoru peludi – razina mRNA inducirana toplinom je niža nego u lišću, a neki sHSP nisu detektirani nakon toplotnog stresa u peludi, iako se otkrivaju u listovima nakon izlaganja toplotnom stresu. Neki stresni uvjeti (toplina, hladnoća, nedostatak nutrijenata) induciraju embriogenezu mikrospora i modificiraju razine mRNA, ali jedino toplina kao stresni uvjet pojačava ekspresiju sHSP u mikrosporama (VOLKOV I SUR. 2005).

Jedan od razloga koji se navodi kao mogućnost za nesintetiziranje HSP jest u genskoj regulaciji klijanja peludne mješine. COOPER I SUR. (1984) navode kako bi proces klijanja mogao biti pod strogo kontroliranom genskom regulacijom. Jedini geni koji bi mogli biti eksprimirani bi bili oni koji su usko vezani uz sam proces klijanja. Tako okolišni uvjeti (povišene temperature) koji vladaju u vrijeme klijanja ne bi aktivirali standardni odgovor HSP na toplotni stres.

Toplotni stres može prouzročiti promjene u metabolizmu koje dovode do nakupljanja jedne vrste metabolita i smanjenja količine druge vrste. Takve promjene mogu djelovati drastično na funkciju i metaboličke puteve te dovesti do neravnoteže. Toplotni stres uzrokuje zakiseljavanje citosola, vjerojatno inhibirajući ATP-aze i pirofosfataze koje prenose protone iz plazmatske membrane ili u vakuolu. Toplotni stres također dovodi do promjene u homeostazi kalcija unutar stanice. Utječe na unos kalcija u citosol preko plazmatske membrane, vakuolarnih kanala za kalcij ili protonskih kotransportera. Povećanje koncentracije citosolnog kalcija aktivira kalmodulin (CaM). CaM se veže na glutamat dekarboksilazu (GAD) i pretvara ju iz inaktivnog u aktivni oblik. Konverzija glutamata u  $\gamma$ -aminomaslačnu kiselinu (GABA) se tada dovršava ulaskom protona i povećanjem citosolne pH vrijednosti (Slika 3) (TAIZ I ZEIGER, 2002).

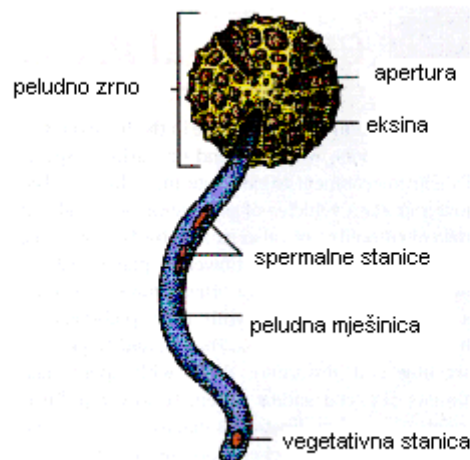


Slika 3. Toplotni stres uzrokuje zakiseljavanje citosola (smanjenje pH vrijednosti) i promjenu u homeostazi kalcija unutar stanice (BUCHANAN I SUR. 2000).

### 3. STRUKTURA I MORFOLOGIJA PELUDA

Peludno zrno je muški gametofit u golosjemenjača i kritosjemenjača, struktura koja stvara muške gamete i prenosi ih na njušku tučka. Zrnca nastaju mejozom iz majčinskih stanica peluda. U zreom obliku sastoje se od dvojezgrene ili trojezgrene stanice. Okružena su stijenkom koja ima značajnu ulogu u zaštiti mikrogametofita tijekom putovanja između muškoga i ženskoga cvijeta. Stijenka je vrlo otporna na gubitak vode i okolišne ozljede, izbjegava oštećenje i isušivanje tijekom širenja (BUCHANAN I SUR. 2000).

Stijenka peludnog zrna sastoji se od dva sloja; vanjskog - eksina i unutrašnjeg - intina (Slika 4). Intina nije prekrivena eksinom na mjestima peludnih apertura ili pora. Peludna mješinica se stvara na mjestima peludnih apertura i produžuje vršnim rastom, pa je peludna mješinica zapravo produžetak intinske stanične stijenke (BUCHANAN I SUR. 2000).

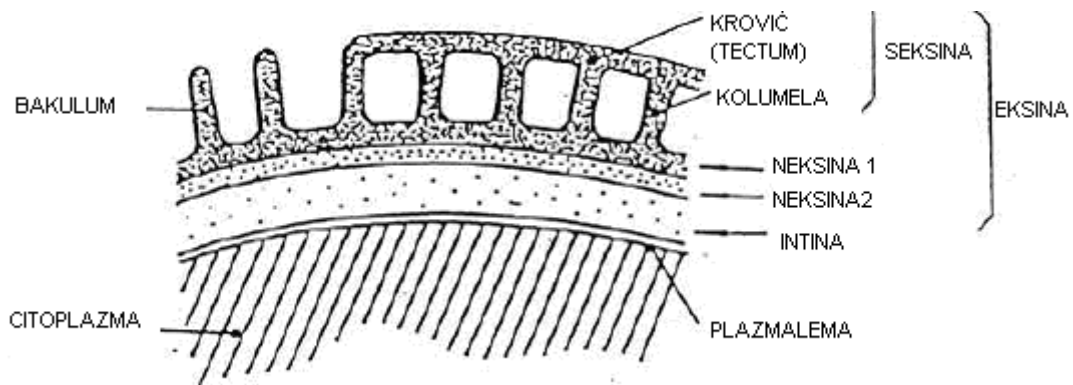


Slika 4. Zreli muški gametofit kritosjemenjača (prilagođeno prema STERN, 2003).

Unutrašnji sloj, intina, je građena od celuloze zastupljene u različitom postotku te od pektina, kaloze, proteina i enzima (HORJAN, 2008, prema FAEGRI I IVERSEN, 1989). Građom je vrlo slična uobičajenoj staničnoj stijenci biljne stanice. Vanjski sloj, eksina, građena je od sporopolenina i manje količine polisaharida. Sporopolenin nastaje oksidativnom

polimerizacijom karotenoida i karotenoidnih estera, a udio različitih monomera i stupnjevi polimerizacije variraju među svojcima (HORJAN, 2008, prema FAEGRI I IVERSEN, 1989). Sporopolenin je izuzetno otporan na razne kemikalije (npr. fluorovodičnu i sumpornu kiselinu) pa se u uvjetima slabe bakterijske aktivnosti te u vlažnim i kiselim uvjetima, jako sporo raspada. Jaki oksidansi, kao ozon ili mješavina sumporne kiseline, vodikovog peroksida i neke baze (kalijev hidroksid, 2-aminoetanol) razgrađuju sporopolenin (HORJAN, 2008, prema MOORE I SUR., 1991). Sporopolenin se raspada pri temperaturi od 500 °C zagrijavanjem čađavim plamenom (HORJAN, 2008, prema WERYSZKO-CHMIELEWSKA, 2003). Vjerojatno otpornost eksine prema raznim oblicima korozije, osim o debljini eksine, ovisi o količini i sastavu sporopolenina (HORJAN, 2008, prema MOORE I SUR., 1991). Upravo je otpornost sporopolenina odgovorna za prisutnost peluda u fosilnim ostatcima (BUCHANAN I SUR. 2000).

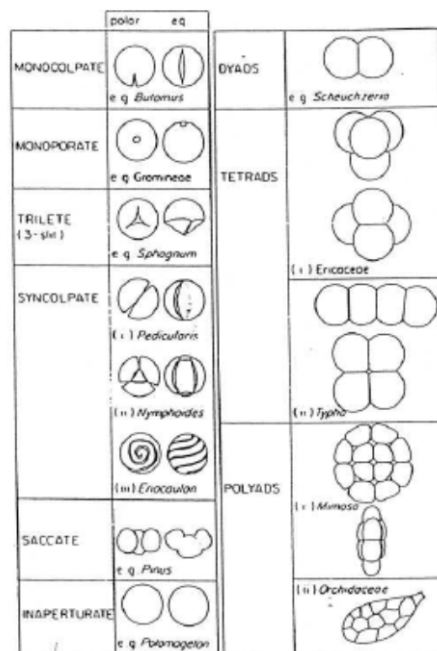
Eksina ima stijenku koja se dijeli na vanjski sloj, seksinu, i unutrašnji sloj, neksinu, koja se nalazi iznad intine (HORJAN, 2008, prema MOORE I SUR., 1991), odnosno ekteksinu i endeksinu (HORJAN, 2008, prema FAEGRI I IVERSEN, 1989).



Slika 5. Građa stijenke peludnog zrnca (prilagođeno prema HORJAN 2008, prema MOORE I SUR. 1991).

Podjela eksine na seksinu i neksinu temelji se na skulpturiranosti slojeva (Slika 5). Seksina izgleda kao da je sastavljena od zrakasto usmjerenih stupića, koji nose „krović“ (*tectum*). On može biti cjelovit, djelomičan, a može i izostajati. Stupići koji ga podupiru zovu se kolumele (*columella*) ili bakulumi (*baculum*), ako tektum izostaje. Ekteksina i endeksina se razlikuju u bojenju i topljivosti, no svjetlosnim mikroskopom su ti slojevi teško razlučivi (HORJAN, 2008, prema MOORE I SUR. 1991).

Peludna zrna se formiraju u grupama od četiri, od kojih svako rezultira iz diobe jedne majčinske peludne stanice. Ova četiri zrna postaju potpuno slobodna kad su zrela, i takva zrna nazivamo monadama. U nekim familijama, otpuštaju se u parovima i takve strukture su dijade, a u nekima ostaju zajedno formirajući tetrade. Nekada se mogu javiti i veće agregacije, i takve strukture zovu se polijade (Slika 6).



Slika 6. Raspon u broju apertura i njihovom položaju (HORJAN 2008, prema MOORE I WEBB, 1978).

Pelud je okruglastog ili jajolikog oblika u trodimenzionalnoj strukturi, ali postoje i drugi oblici (Slika 7). Veličina varira od otprilike 5  $\mu\text{m}$  u, primjerice, potočnice do 300  $\mu\text{m}$  u, primjerice, bundeve (HORJAN, 2008, prema MOORE I WEBB, 1979).

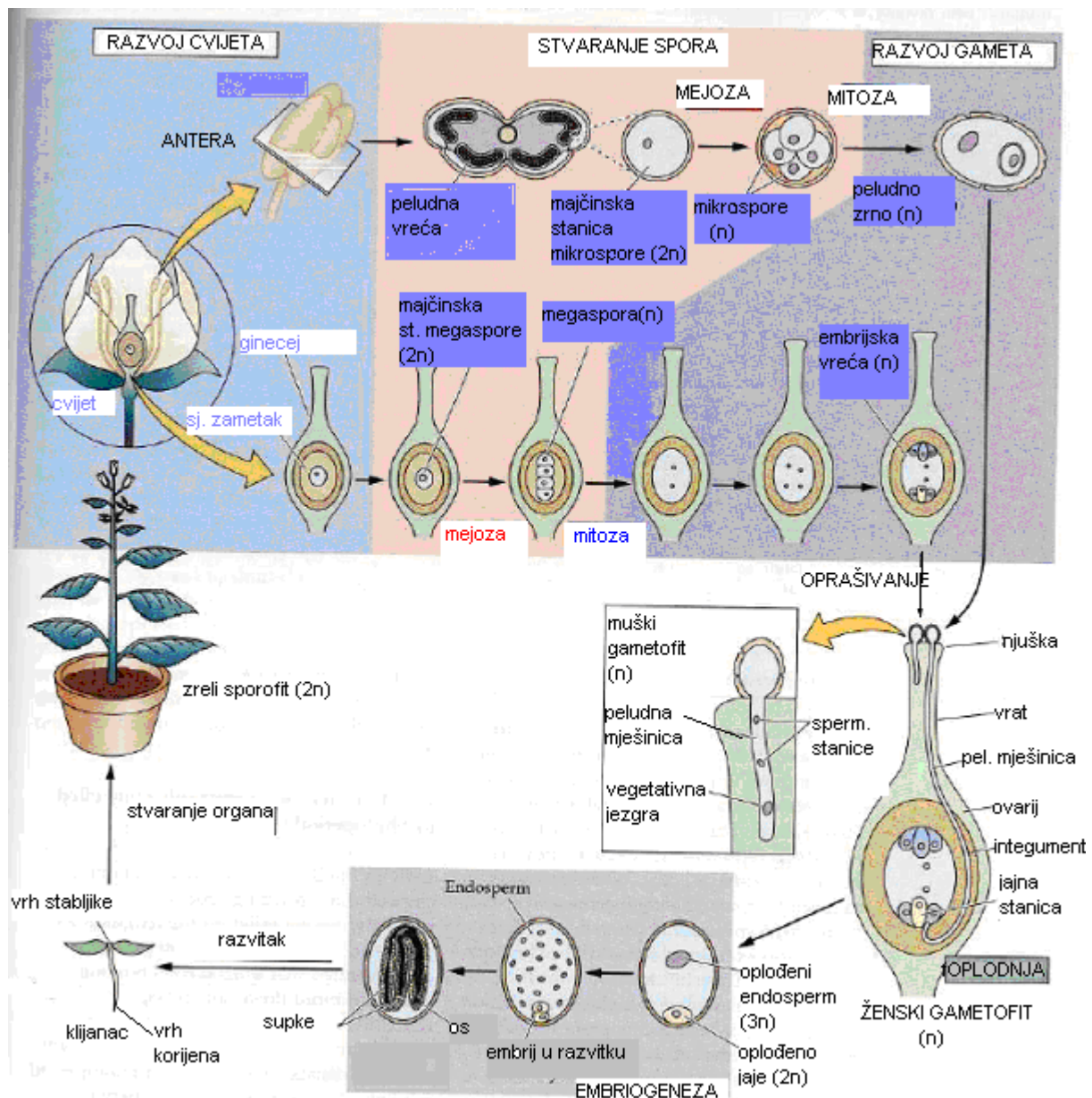


Slika 7. Pelud iz različitih skupina, pokazuje različit uzorak u stijenci eksine (BUCHANAN I SUR. 2000).



## 4. GAMETOGENEZA

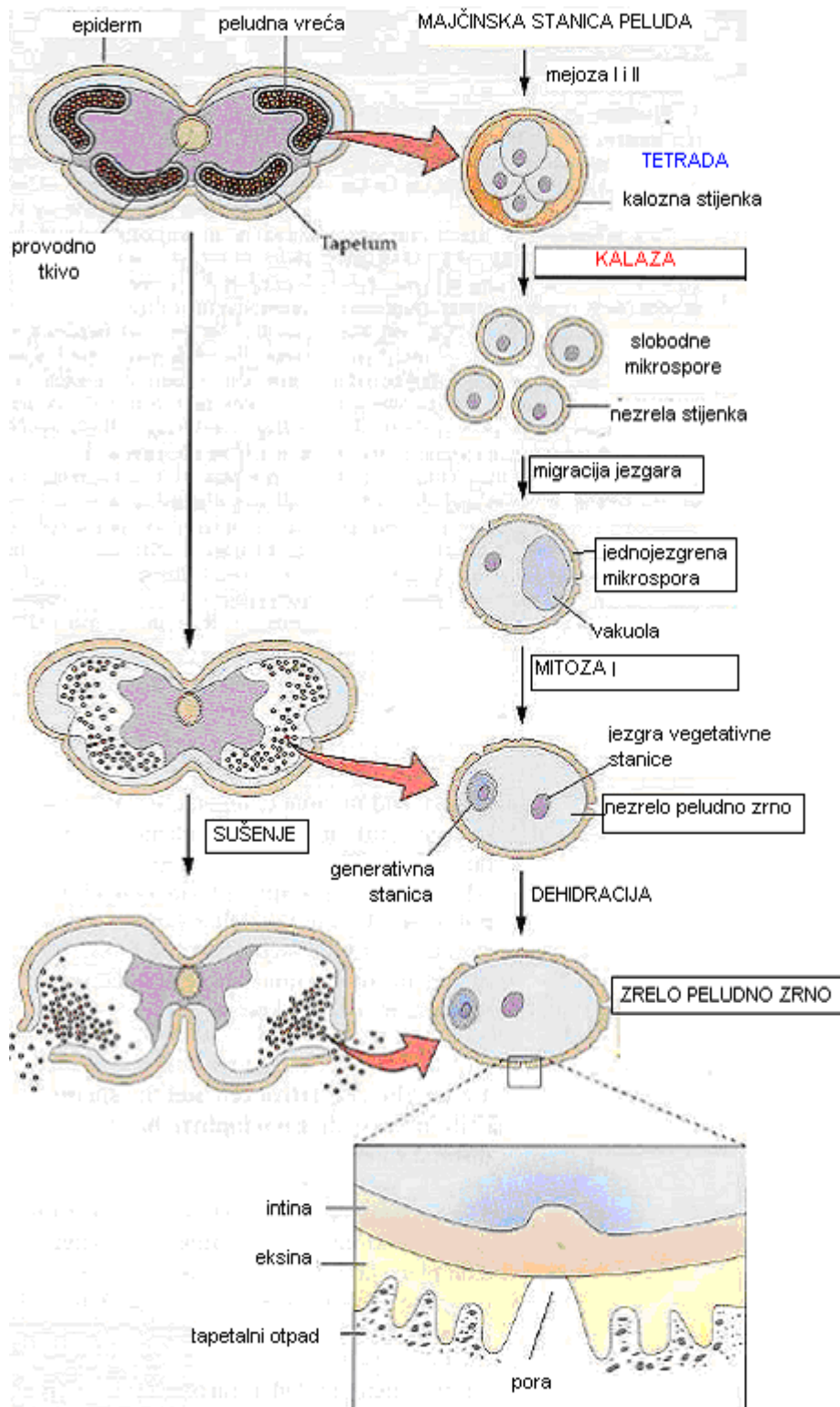
Stvaranje gameta naziva se gametogeneza. Gamete nastaju mejotskom diobom diploidne sporofitske stanice, koju prate mitotske diobe jedne ili više haploidnih stanica koje stvaraju višestanični gametofit. Mikrogametogeneza je formiranje peluda (muškog gametofita), a megagametogeneza je formiranje embrija (ženskog gametofita) (Slika 8). Pelud se stvara u velikom broju i lako ga je sakupiti i istraživati, za razliku od ženskog gametofita koji se ne stvara u velikom broju te je sakriven unutar sjemenog zametka i zato težak za izolaciju i istraživanje.



Slika 8. Životni ciklus kritosjemenjača, sa izmjenom haploidne (n) i diploidne (2n) generacije (prilagođeno prema BUCHANAN I SUR. 2000).

Stvaranje muškog gametofita (Slika 9) događa se u anterama, tako što se sporofitska stanica podijeli i daje tapetalnu inicijalnu stanicu i sporogenu inicijalnu stanicu. Svaka sporogena inicijalna stanica (peludna majčinska stanica) prolazi mejozu te nastaje tetrada haploidnih stanica koje se zajedno drže kalozom koja je po sastavu (1→3) β-glukan. Stanice iz tetrade se oslobađaju kao slobodne mikrospore djelovanjem kalaze, enzima kojeg stvaraju tapetalne stanice. Nakon otpuštanja, mikrospore prolaze dvije mitotske diobe. Prva dioba je asimetrična i daje veliku stanicu, vegetativnu stanicu i manju stanicu, generativnu stanicu. Vegetativna stanica dobije većinu citoplazme mikrospore nakon diobe. Kasnije je cijela generativna stanica okružena citoplazmom vegetativne stanice te stvara stanicu unutar stanice. Većina gena specifičnih za pelud se eksprimiraju samo u jezgri vegetativne stanice, vjerojatno zbog toga što generativna stanica sadržava manje citoplazme i ima vrlo kondenzirani kromatin. U većini biljaka generativna stanica mora proći još jednu mitozu tijekom klijanja peluda. Druga mitotska dioba generativne stanice daje dvije spermalne stanice. U nekim rodovima, primjerice *Arabidopsis*, druga mitotska dioba generativne stanice događa se prije nego što pelud izađe iz biljke, ali u većini kritosjemenjača peludno zrno se otpušta iz antera u dvostaničnom stadiju, a druga mitotska dioba se događa tijekom klijanja peludne mješinice (BUCHANAN I SUR. 2000).

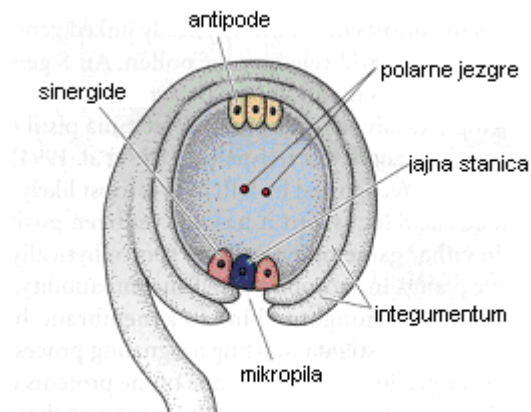
Tapetum je hranjivo staničje koje okružuje antere. Tapetalne stanice stvaraju i odlažu brojne komponente, uključujući strukturne polimere i pigmente, u vanjskom zidu peludnih zrnaca. One mogu disintegrirati, a neki se citoplazmatski sastojci, proteini i lipidi, odlažu u peludni omotač. Peludni omotač ima veliku ulogu u interakciji sa ženskim staničjem (BUCHANAN I SUR. 2000).



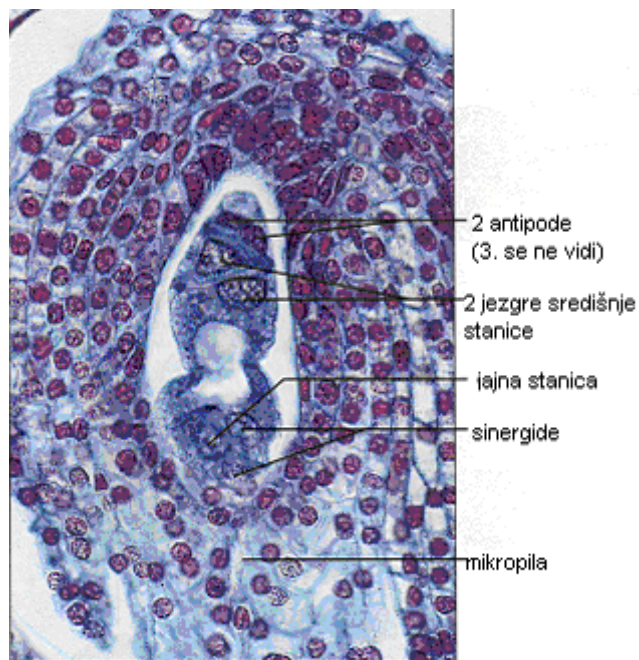
Slika 9. Put razvoja peluda, tipičan za kritosjemenjače (prilagođeno prema BUCHANAN I SUR. 2000).

Megagametogeneza također počinje mejozom u kojoj nastaju četiri stanice, od kojih tri propadaju, a četvrta formira megasporu. Megaspora prolazi dalje tri mitotske diobe i stvara

ženski gametofit ili embrionsku vreću. Tipična zrela embrionska vreća sastoji se od sedam stanica – tri antipode koje degeneriraju tijekom embionskog razvoja, dvije sinergide sa suprotne strane, središnje stanice (koja sadrži dvije haploidne jezgre) i jajne stanice. Na polu, uz sinergide nalazi se maleni otvor, mikropila, kroz koji će urasti peludna mješnica (Slika 10, Slika 11) (GILBERT, 2003).



Slika 10. Embrionska vreća je produkt tri mitotske diobe haploidne megaspore. Dvije jezgre se nalaze unutar središnje stanice, a ostalih šest stanica svaka sadrži jednu haploidnu jezgru (prilagođeno prema GILBERT 2003).



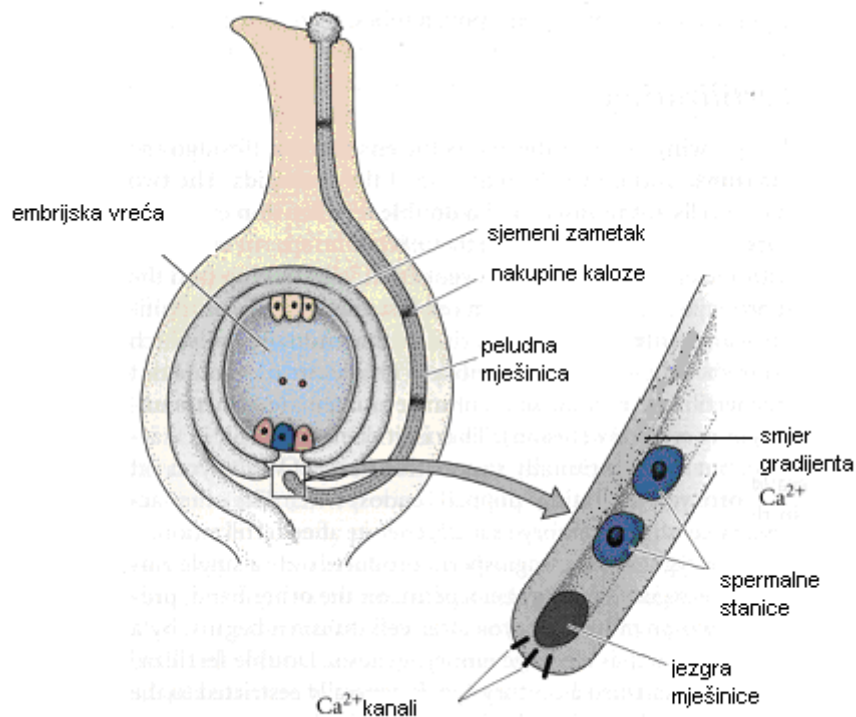
Slika 11. Zreli gametofit *Lilium sp.* (prilagođeno prema STERN 2003).

## 5. PELUD I OPLODNJA

### 5.1. KLIJANJE PELUDA

Peludna zrna otpuštaju se iz antera u osušenom stanju, a dolaskom na kompatibilnu njušku tučka moraju se hidrirati, odnosno postići određeni stupanj vlažnosti kako bi peludna mješinica uspješno izrasla prema mikropili i sjemenom zametku (BUCHANAN I SUR. 2000). Jezgra stanice peludne mješinice određuje klijanje peluda i rast peludne mješinice nakon dodira peluda s njuškom tučka. Jedna od dvije spermalne stanice spojit će se kasnije s jajnom stanicom i stvoriti sporofitsku generaciju biljke, diploidnu zigotu ( $2n$ ). Druga spermalna stanica prisustvuje u formiranju endosperma ( $3n$ ) spajajući se sa središnjom stanicom te tvori strukturu koja hrani embrio. Taj proces zove se dvostruka oplodnja (GILBERT 2003).

Rani znak za klijanje je postojanje lipidnih molekula u peludnom omotaču, posebice u vrstama koje imaju takozvane «suhe» njuške tučka (rod *Arabidopsis*). U biljkama sa takozvanim «vlažnim» njuškama tučka lipidi u omotaču nisu od tolike važnosti (duhan). Početni znak za vođenje mješinice je koncentracijski gradijent vode, koji uspostave lipidi u omotaču ili njušci. Taj koncentracijski gradijent onda određuje rast peludne mješinice prema mikropili (Slika 12). U nekim biljkama sekundarni metaboliti poput flavonola olakšavaju rast peludne mješinice. Tapetum stvara flavonolne pigmente, a oni se zatim odlažu u peludnom znu (BUCHANAN I SUR. 2000).



Slika 12. Rast peludne mješnice prema mikropili (prilagođeno prema GILBERT, 2003, prema FRANKLIN-TONG I SUR. 1996).

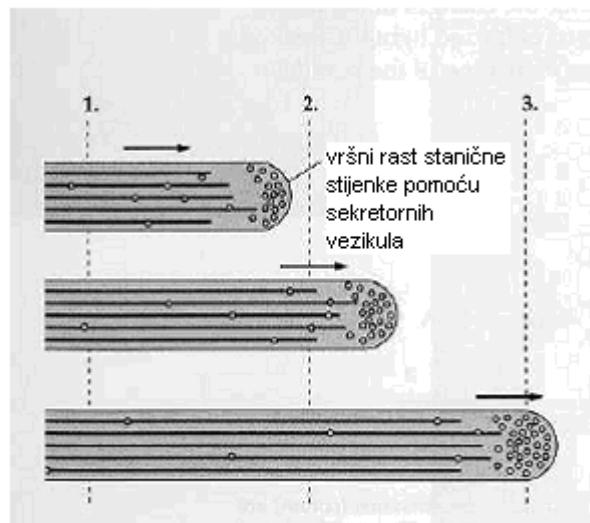
## 5.2. RAST PELUDNE MJEŠINICE

Peludno zrno, prilikom rasta na odgovarajućoj njušci tučka, razvija peludnu mješnicu koja kroz tučak raste prema sjemenom zametku, pritom noseći spermalne stanice u embrionsku vreću. Dvije glavne uloge mješnice su njezina elongacija i dobra interpretacija signala koji ju usmjeravaju prema ženskom staničju (BUCHANAN I SUR. 2000).

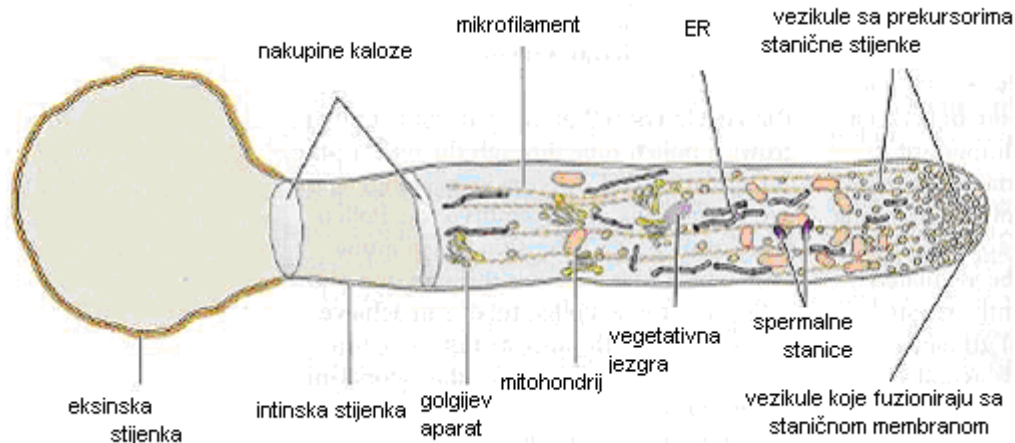
Smatra se da su se peludne mješnice razvile tijekom evolucije iz haustorija kojim se primitivni mikrogametofit hranio na domaćinskom sporofitu. Početni koraci klijanja peludnog zrna sastoje se od hidracijskog procesa koji dozvoljava nastavak metaboličkih procesa. Tijekom ove faze volumen organela se proporcionalno povećava (MALHO 2006, prema MALHO I PAIS, 1992). Ulaskom iona u biljku (HEPLER I SUR. 2006), posebice  $K^+$  (MALHO 2006, prema FEIJO I SUR.1995), dolazi do smanjenja osmotskog i vodnog potencijala, voda

ulazi te se povećava turgor. Visoka vrijednost turgora rasteže plazmatsku membranu na mjestu s kojeg će isključiti mješnica, a dodatno olakšavanje je nedostatak stijenke eksine na tom mjestu. Ionski kanali koji se aktiviraju ovim rastezanjem (SZE I SUR. 2006) mogu se otvoriti i uzrokovati lokalnu depolarizaciju plazmatske membrane, ulazak kationa, lokalno povećanje koncentracije kalcijevih iona što utječe na mehanizam pozitivne povratne sprege.

Elongacija peludne mješnice događa se posebnim vidom stanične ekstenzije, vršnim rastom. Taj je rast znakovit jer je ograničen na uski vršni dio (Slika 13). Peludna mješnica prvo izrasta kroz jednu od apertura te zatim raste vršnim ekstenzijama stijenke intine. Peludne mješnice mogu rasti vrlo brzo,  $10 \mu\text{m min}^{-1}$  i dok rastu, citoplazma je koncentrirana blizu vrha, a dio mješnice najbliži zrnu blokiran je odlaganjem kaloznih prepreka (Slika 14) (BUCHANAN I SUR. 2000). Događa se kontinuiranom apikalnom fuzijom vezikula koje sadržavaju prekursore za staničnu stijenku. Taj proces određuje brzinu rasta, promjene u osi rasta, dovođenje i recikliranje membranskih komponenti i vjerojatno je važan za ekstracelularne signale. Točka je konvergencije puteva signalizacije.



Slika 13. Brzinu rasta peludne mješnice određuje stopa dovođenja i odlaganja vezikula na vršnom dijelu. Vezikule usmjeravaju aktinski mikrofilamenti (prilagođeno prema BUCHANAN I SUR. 2000).



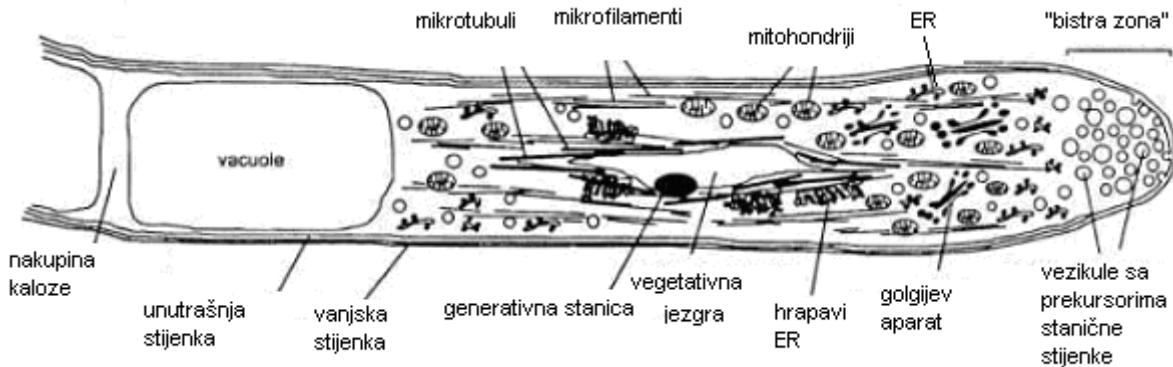
Slika 14. Vršni rast peludne mješinice. Kalozne prepreke ograničavaju volumen citoplazme do dijela blizu rastućeg vrha (BUCHANAN I SUR. 2000).

Na vrhu mješinice događa se proces brze endocitoze, koja je proces ovisan o  $\text{Ca}^{2+}$ . Povezan je s egzocitozom i zahtijeva hidrolizu GTP-a (MALHO 2006, prema ARTALEJO I SUR. 1995) i dinamin – protein odgovoran za odvajanje vezikule od membrane ([http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/BS\\_5\\_Transport\\_Golgi\\_\\_lisosomi\\_peroksisomi.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/BS_5_Transport_Golgi__lisosomi_peroksisomi.pdf)). Brza endocitoza karakterizirana je stvaranjem male i kratkoživuće pore koja ograničava veličinu čestica koje se mogu otpustiti ili inkorporirati u staničnu stijenku.

Općeniti model ultrastrukture peludne mješinice obuhvaća četiri citološke domene (MALHO 2006, prema CRESTI I SUR. 1977): vršna ili «bistra zona», u kojoj nedostaju veliki organeli i mnogo je Golgijevih vezikula koje se spajaju sa všnim dijelom peludne mješinice dovodeći prekursore za izgradnju stanične stijenke (MALHO 2006, prema MALHO 2005, GEITMANN I STEER 2006); subapikalno područje sa tipičnom citoskeletnom organizacijom (MALHO 2006, prema YOKOTA I SHIMMEN 2006, CAI I CRESTI 2006) i bogato mitohondrijima, diktiosomima i endoplazmatskim retikulumom; nuklearna ili jezgrina zona, gdje se nalaze jezgra vegetativne stanice i spermalne stanice; vakuolarna zona koja se povećava kako mješinica raste. Pojedinačne nakupine kaloze odvajaju dijelove citoplazme i omogućavaju kontinuirani rast (MALHO 2006, prema HESLOP-HARRISON 1987). Te nakupine izoliraju starije vakuolizirane dijelove mješinice i citoplazmu ograničavaju na prednje regije stanice (Slika 15). Istraživanje citoskeleta pokazuju da je pozicioniranje organela tijekom rasta mješinice ovisilo o interakcijama sa citoskeletnim komponentama, što ukazuje na signalizaciju, ali mehanizam još nije poznat (GILBERT 2003, prema CAI I CRESTI 1999).



Jedno vrijeme se mislilo da je volumen citoplazme u mješinići tijekom rasta konstantan (MALHO 2006, prema MALHO I SUR. 1992), no postoji i prijedlog da mješinića nije rastuća, nego «stanica koja se pomiče» (MALHO 2006, prema JOHNSON I LORD 2006).

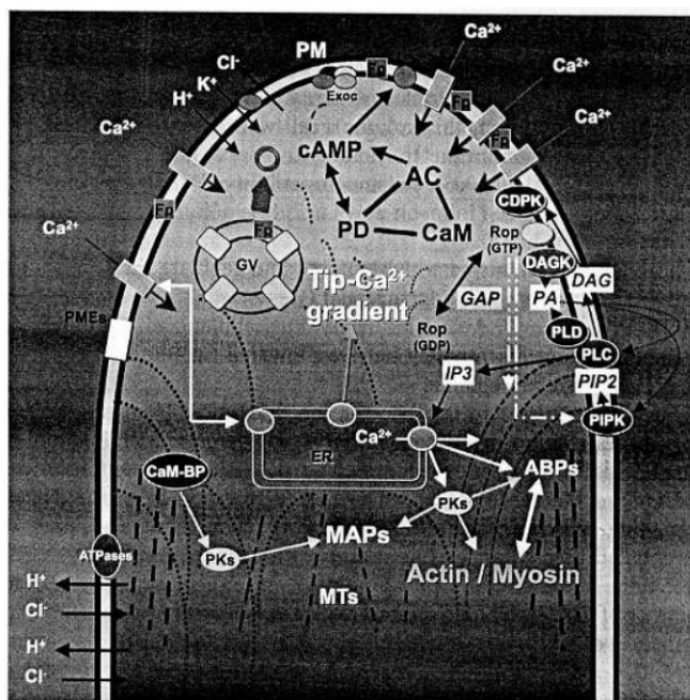


Slika 15. Intracelularna organizacija peludne mješiniće; «četiri zone»: apikalna, subapikalna, nuklearna i vakuolarna (prilagođeno prema MALHO 2006, prema FRANKLIN-TONG 1999).

U nekim slučajevima, primjerice u vrsti *Trifolium pratense* (crvena djetelina) se jasno vidi da su na vrhovima peludnih mješinića nakupine kaloze, slično kao kalozni čepovi u citoplazmi, pa se razvijaju slabo klijuće ili nekljuće peludne mješiniće. Veliko nakupljanje kaloze može, dakle, dovesti do prestanka rasta peludne mješiniće ili raznih abnormalnosti (BUYUKKARTAL, 2002).

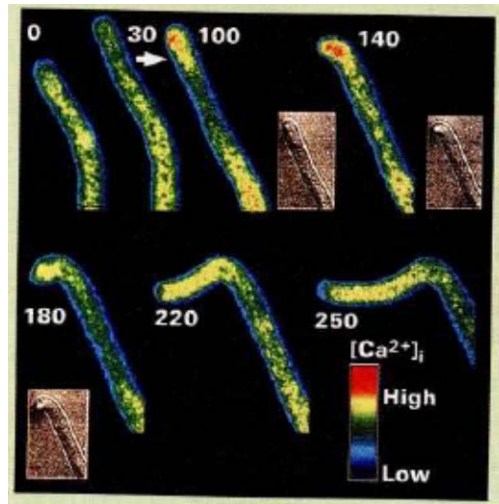
### 5.3. SIGNALNI MEHANIZMI KOJI UPUĆUJU RASTUĆU PELUDNU MJEŠINICU PREMA EMBRIONSKOJ VREĆI

Identificirani su mnogi signalni putevi (Slika 16), te im se zna uloga u klijanju i vršnom rasti mješiniće. Komponente signalnih puteva su ioni ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), kalmodulin (CaM), fosfoinozitidi, fosfolipidi, proteinske kinaze, ciklički nukleotidi, proteini 14-3-3 i GTPaze (MALHO 2006, prema MALHO I CAMACHO 2004, HEPLER I SUR. 2006, ZARSKY I SUR. 2006). Ti signalni putevi formiraju mrežu djelovanja koja se isprepliće u kontroli vezikula, fizičkom stanju aktinskog citoskeleta, formiranju stanične stijenke i ekstracelularnoj komunikaciji.



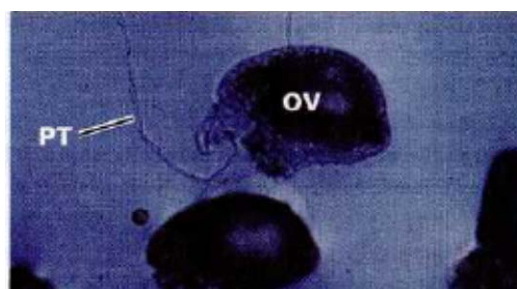
Slika 16. Vršna regija rastuće peludne mješiniće. Prikazani su glavni putevi prijenosa signala i njihove komponente (MAHLO 2006).

Citosolni slobodni kalcij ( $[Ca^{2+}]_c$ ) je ključni element u regulaciji izduživanja mješiniće i njezinom usmjerenom rastu. Kalcij je u vršnoj regiji visoke koncentracije  $1-3 \mu M Ca^{2+}$ , a u subapikalnom i bazalnom dijelu mješiniće  $0,2-0,3 \mu M Ca^{2+}$  (MALHO 2006, prema HEPLER I SUR. 2006). Ukoliko se gradijent promjeni, to može dovesti do inhibicije rasta mješiniće. Mehanizmi kojima se gradijent održava još nisu u potpunosti istraženi (MALHO 2006, prema HEPLER I SUR. 2006, HWANG I YANG 2006). Na vrhu mješiniće se koncentriraju otvoreni kanali kalcija (GILBERT 2003 prema JAFFE I SUR. 1975, TREWAVAS I MAHLO 1998). Usmjerenost rasta mješiniće može se regulirati promjenom koncentracije kalcija na vrhu mješiniće (Slika 17).



Slika 17. Promjena koncentracije kalcija na vrhu peludne mješalice (BUCHANAN I SUR. 2000).

U peludi mnogih biljaka nakon hidracije i peludna mješalina može rasti u otopinama koje sadrže bornu kiselinu, kalcij i saharozu. Iako je moguć rast u jednostavnom mediju, peludne mješalice u uvjetima *in vitro* ne rastu jednako brzo kao *in vivo*. To ukazuje da su za optimalan rast, bitni i neki drugi faktori koji vjerojatno potječu od megagametofita, a moguće je i da peludne mješalice trebaju priljubljenost za stanice njuške tučka. Dokaz za signale koji dolaze iz megagametofita pronađen je i kod vrste *Torenia fournier* (torenija), u kojoj je embrionska vreća «gola», a ne unutar uobičajeno građene stanične stijenke. U ovoj je biljci rast mješalice prema embrionskoj vreći puno precizniji i usmjeren tek nakon što su peludne mješalice ušle u njušku tučka (Slika 18).



Slika 18. Peludna mješalina (PT) koja ulazi na mikropilarnom kraju gole embrijske vreće unutar sjemenog zametka (OV) (BUCHANAN I SUR. 2000).

Najvjerojatnije od sinergida potječe signal koji navodi peludnu mješalicu na točan dolazak do embrijske vreće. Prvi razlog koji bi potkrijepio tu tvrdnju jest da peludne mješalice ulaze u embrijsku vreću na mjestu sinergida; drugi razlog je da su sinergide sekretorne stanice te sadrže visoke koncentracije kalcija, a treći razlog je da peludne mješalice

nisu privučene već oplodjenim embrionskim vrećama, kao ni embrionskim vrećama s uništenim sinergidama, a niti embrionskim vrećama koje su uništene djelovanjem visoke temperature (BUCHANAN I SUR. 2000). Novijim istraživanjima u kojima su uništene sinergide laserskim zrakama pokazano je da u slučaju uništenja obje sinergide nije bilo navođenja, ali kada je samo jedna nedostajala, peludna mješinica je normalno klijala (HIGASHIJAMA I SUR. 2001).

## 6. DJELOVANJE TOPLOTNOG STRESA NA RAZVOJ I KLIJANJE PELUDA

Još su 1927. godine Buchholz i Blakeslee promatrali učinak visoke temperature na stopu rasta peludnih mješnica u anđeoske trube (*Datura stramonium*) (HEDHLY I SUR. 2008). Godine 1975. godine objavljeno je da izlaganje visokim temperaturama tijekom razvoja cvijeta inhibira stvaranje peluda i djeluje na sterilnost cvijeta (BURKE I SUR. 2006, prema FISCHER I SUR. 1975). U radu YOUNG I SUR. (2003), istraživao je utjecaj toplotnog stresa na cvijet, plod i razvoj sjemena u uljane repice (*Brassica napus*), te su biljke izlagane temperaturama od 23-25 °C 6 sati. Zatim bi temperaturu povišali na 35 °C na 4 sata, nakon kojih bi se vratili na prethodnu temperaturu i izlagali biljku 6 sati. Primijećeno je da je toplotni stres ograničio vijabilnost peludi izložene toplotnom stresu, za razliku od kontrole, ali nije imao veliki utjecaj na mikrosporogenezu. Tijekom klijanja *in vitro* u uvjetima toplotnog stresa stvorene su abnormalne peludne mješnice, tanje i zaobljenije u usporedbi s onim koje nisu izložene stresnim uvjetima. Suprotno očekivanjima, mješnice koje nisu izložene stresnim uvjetima su rasle sasvim normalno prema sjemenim zamecima koji su bili izloženi toplotnom stresu. Ti su pokusi pokazali da toplotni stres ima učinak i na funkcionalnost peludi i tučka (YOUNG I SUR. 2003).

Prikupljeno je mnogo podataka koji ukazuju na općenitu pojavu ubrzavanja rasta peludnih mješnica u uvjetima visokih temperatura te usporavanja u uvjetima nižih temperatura, a ista je pojava zabilježena i kod razvoja megagametofita. Visoke temperature ubrzavaju razvoj njuške tučka i embrionske vreće, što smanjuje razdoblje u kojemu njuška tučka prihvaća peludna zrnca. Niske temperature isto razdoblje produžuju (HEDHLY I SUR. 2008). HEDHLY I SUR. (2003) su istraživali učinak temperature na dinamiku rasta peludne mješnice dva kultivara *Prunus avium* (divlja trešnja). Više vrijednosti temperature su kod oba kultivara smanjile postotak klijanja, ali ubrzale stopu rasta prema mikropili, iako je broj mješnica koje su došle do mikropile ostao konstantan i nije se povećavao s vremenom (HEDHLY I SUR. 2003). Na peludnim zrnima vrste *Brassica juncea* pratila se vijabilnost, klijanje i mogućnost stvaranja sjemena, te su biljke izložene temperaturama od 45 °C, 60 °C i 75 °C. Temperature do 60 °C nisu imale utjecaja na vijabilnost peluda, no vijabilnost je pri

višoj vrijednosti temperature (75 °C) već bila smanjena, a klijanje na njušci tučka se pri toj temperaturi nije događalo (RAO I SUR. 1991). KAKANI I SUR. (2005) su pratili klijanje peluda i peludne mješinice u dvanaest kultivara pamuka kao odgovor na povišene temperature (10-45 °C u intervalima od 5 °C) te njihov odnos prema termostabilnosti membrana i zaključeno je da su svi kultivari imali reducirani rast u uvjetima niskih i visokih temperatura, dok je svaki imao specifični temperaturni optimum, na kojemu je klijanje bilo najbolje.

KREMER I JEMRIĆ (2006), istraživali su klijanje peluda i rast peludne mješinice u pensilvanskog jasena (*Fraxinus pennsylvanica*) u različitom vremenu (tijekom dvije godine, 2001. i 2002.) i rasponu temperature (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C). Pokazalo se da su godina, vrijeme i temperatura te odnos vremena i temperature značajni za postotak klijanja i duljinu peludne mješinice, te da se optimalna temperatura za klijanje peluda postiže na temperaturi nešto višoj od 20 °C, dok je 25 °C pokazao manji postotak klijanja. U skladu s očekivanjima, mali postotak klijanja pri 10 °C ukazao je na upitan uspjeh uzgoja ove vrste pri niskim temperaturama (KREMER I JEMRIĆ 2006). YOUNG-KEUN I SUR. (2002) su uzgajali pelud dviju vrsta, *P. densiflora* i *P. rigida* pri različitim temperaturama. Pri 5 °C pokazalo se da je stopa klijanja 0%, a što se temperatura povisivala do optimalne (25 °C) to je stopa klijanja rasla, i pri optimalnoj postigla najvišu stopu. Nakon optimalne temperature, daljnjim povisivanjem temperature (do 40 °C) se smanjila i stopa klijanja i duljina peludne mješinice. U sljedećem radu (HERRERO I JOHNSON 1980) je istraživano kako različiti genotipovi kukuruza odgovaraju na povišene temperature i zabilježeno je da su sve peludne mješinice imale nižu ili nikakvu stopu klijanja pri 38 °C, nego pri 27 °C ili 32 °C. SHIVANNA I CRESTI (1989) su zabilježili slične rezultate u duhana (*Nicotiana tabacum*). Pri sobnoj temperaturi i visokoj vlažnosti klijanje je bilo normalno, iako je rast mješinice bio smanjen, a pri 38 °C klijanje je bilo odgođeno, a javilo se i smanjenje u rastu mješinice. PEET I SUR. (1985) su ispitali tri kultivara rajčice koji se razlikuju u toleranciji toplotnog stresa. Izlagali su ih optimalnoj temperaturi (28 °C) i umjerenom toplotnom stresu (32 °C) pri različitim uvjetima vlažnosti (30, 60 i 90 %) te su otkrili da je klijanje peluda najosjetljivije na visokoj temperaturi i visokim uvjetima vlažnosti (PEET I SUR. 1985). BURKE I SUR. (2006) su također izlagali dva kultivara pamuka toplotnom stresu, u uvjetima visoke vlažnosti, kako bi odvojili toplotni stres od odgovora biljaka na vlažnost. Pokazalo se da je pri 39 °C došlo do redukcije od 60 % u klijanju peludne mješinice kod oba kultivara, u usporedbi s klijanjem pri temperaturi od 28 °C.

Peludna zrna kad se otpuste iz antera, djeluju kao neovisne jedinice koje su izložene okolišnim uvjetima. Zato je dugotrajno izlaganje dobro skrivenog i uvučenog sjemenog zametka toplotnom stresu manje pogubno nego izlaganje peluda istom stresu (VOLKOV I SUR. 2005, prema YOUNG I SUR. 2004; KAKANI I SUR. 2005). Pelud je osjetljiviji na visoke temperature od ženskih reproduktivnih organa, što je povezano sa smanjenom stopom oplodnje u uvjetima toplotnog stresa (DUPUIS I DUMAS 1990, KAKANI I SUR. 2005, prema WEAVER I TIMM 1988). Klijanje peluda na njušci tučka puno je osjetljivije nego klijanje peludne mješinice unutar vrata tučka, zato što početno klijanje na njušci tučka ovisi samo o peludnom zrnu, a klijanje unutar vrata tučka obuhvaća i interakcije s okolnim ženskim reproduktivnim tkivom, što objašnjava neke od mehanizama rasta mješinice (HEDHLY I SUR. 2003, prema HERRERO I SUR. 1992). Povišena temperatura ubrzava sazrijevanje, ali i degeneraciju njuške tučka, što može povećati ili smanjiti stopu prihvatanja peluda za njušku tučka (HEDHLY I SUR. 2005., prema HEDHLY I SUR. 2003). Ženski reproduktivni organi pokazuju stvaranje čitavog seta HSP, te je u radu DUPUIS I DUMAS (1990) pronađena korelacija između otpornosti na toplotni stres i stvaranja HSP u kukuruzu, naime, temperature iznad 36 °C, u kojima je oplodnja drastično smanjena, su temperature u kojima je detektiran porast sinteze HSP u ženskom reproduktivnom tkivu. Također, YOUNG I SUR. (2003) kažu da je efekt toplotnog stresa na rast peludne mješinice do mikropile minimiziran majčinskim tkivom koji ju okružuje. Pelud koji je izložen toplotnom stresu u kontrolnom tučku, kao i kontrolni pelud u tučku izloženom toplotnom stresu uspješno su mogli klijeti do mikropile. Štoviše, učinak toplotnog stresa na oba gametofita je sinergistički, tako da kad su oba izložena toplotnom stresu, stvori se manje plodova i sjemenki nego kad je samo jedan bio disfunkcionalan. Interakcija gametofita neizloženog stresu s onim koji je izložen, dovodi do stvaranja sjemena i plodova (YOUNG I SUR, 2003). ABDUL-BAKI I SUR. (1995) su u svojem istraživanju dva kultivara rajčice, *Lycopersicon esculentum*, tolerantnu na toplinu i *L. pimpinellifolium*, osjetljivu na toplinu, uzgajali u uvjetima optimalne temperature od 27 °C te visoke temperature od 35 °C. Primijetili su da se u uvjetima visoke temperature ne stvaraju plodovi u *L. pimpinellifolium*. U tolerantnoj vrsti su se plodovi stvarali (ABDUL-BAKI I SUR.1995).

Pelud koji je izložen toplotnom stresu nije u mogućnosti sintetizirati transkripte HSP. Vjerojatno je suha priroda i ovojnica peluda ono što ga spašava od štete koju bi izazvale visoke temperature, čime je dodatno stvaranje transkripata HSP za zaštitu od topline postalo nepotrebno. S druge strane su transkripti HSP17.6 i HSP101 ipak eksprimirani u peludu

uljane repice *B. napus* koji se razvio u uvjetima toplotnog stresa, sugerirajući da su mikrospore u razvoju osjetljive na toplotni stres (YOUNG I SUR. 2003).

Osim HSP, u biljkama se mijenja koncentracija i drugih staničnih proteina tijekom izlaganja toplotnom stresu. U članku HE I SUR. (2007), opisano je izlaganje tri kultivara livadne vlasnjače (*Poa pratensis*) toplotnom stresu tijekom 28 dana. U kultivaru Brilliant koji je najmanje otporan na toplotni stres se koncentracija membranskih proteina malo povećala, dok se koncentracija membranskih proteina znatno smanjila, što znači da su u vrste *Poa pratensis* membranski proteini osjetljiviji na toplotni stres od citoplazmatskih proteina. Kultivar Eagleton koji je tolerantan na toplotni stres imao je u uvjetima toplotnog stresa više stabilnih membranskih proteina od kultivara Brilliant. Zajedno ovi rezultati pokazuju da je zaštita membranskih proteina važan faktor u toleranciji biljaka na toplotni stres (HE I SUR. 2007).

Pelud se u eksperimentalnim uvjetima održava vijabilnim pohranjivanjem na niske temperature, a ako se ne koristi odmah u eksperimentu, dobro je isušiti ga da bi sačuvao maksimalnu vijabilnost. Glavni je razlog smanjene vijabilnosti peluda povezan sa enzimskom aktivnošću unutar peludnog zrna. Mehanizam kojim peludno zrno održava vijabilnost tijekom pohrane povezan je sa unutarstaničnom stopom disanja, primjerice pretvorbom šećera u organske kiseline (YOUNG-KEUN I SUR. 2002, prema STANLEY I LISKENS 1974). Smanjivanje kapaciteta klijanja se povezuje s inaktivacijom enzima i metaboličkih supstrata, ili nakupljanjem sekundarnih metaboličkih produkata tijekom pohrane (YOUNG-KEUN I SUR. 2002, prema STANLEY I LISKENS 1974). Jednostavni šećeri su glavni metabolički supstrati koje koristi klijući pelud (PRESSMAN I SUR. 2002, prema STANLEY 1971). Rezerve škroba tijekom peludnog razvoja u anterama dovode do nakupljanja ugljikohidrata pri zriobi (PRESSMAN I SUR. 2002, prema SPERANZA I SUR. 1997). Zrelo peludno zrno ne sadrži škrob, iako je smanjivanje koncentracije škroba i povećanje koncentracije topljivih šećera detektirano u rastućim anterama rajčice. Manjak metabolizma ugljikohidrata u anterama rajčice dovelo je do abnormalnog razvoja peluda (PRESSMAN I SUR. 2002, prema BHADULA I SHAWNEY, 1989). PRESSMAN I SUR. (2002) su izlagali rajčicu visokim temperaturama (32 °C) te je primijećena redukcija ukupnog broja peludnih zrna, ali i smanjenje klijanja peludne mješine te smanjenje vijabilnosti. Predložili su da bi dobiveni rezultati mogli imati veze sa promjenama u koncentraciji ugljikohidrata jer pod utjecajem toplotnog stresa je koncentracija škroba i topljivih šećera u peludnim zrnima bila niža nego u kontrolnim uzorcima, uzgajanim



na 28 °C. Razlog smanjivanja koncentracije škroba u peludnim zrnima još uvijek nije poznat, ali postoje sugestije da bi nakupljanje šećera moglo biti rezultat poremećaja metabolizma ugljikohidrata (PRESSMAN I SUR. 2002, prema SAINI 1997). Neki autori navode da su visoke temperature uzrokovale smanjenje aktivnosti enzima uključenih u sintezu škroba (PRESSMAN I SUR. 2002, prema WALLWORK I SUR. 1998). Ove pretpostavke mogle bi dati odgovor na uzroke smanjivanja vijabilnosti peluda.

## 7. ZAKLJUČCI

Toplotni stres djeluje na klijanje peluda tako što smanjuje stopu klijanja, uzrokuje abnormalni razvoj peludne mješinice ili sprječava klijanje (HEDHLY I SUR. 2005, prema SHIVANNA I SUR. 1991). Ukoliko su i muška i ženska biljka bile izložene toplotnome stresu, do razvoja embrija vjerojatno neće doći. Ukoliko je samo jedna od biljaka bila izložena toplotnom stresu klijanje će se dogoditi, vjerojatno i oplodnja, ali je moguće da embrio neće biti vitalan ili će pokazivati neke abnormalnosti u razvoju. U usporedbi s ostalim biljnim tkivima, toplotni stres ne utječe na ekspresiju HSP jedino u peludi (YOUNG I SUR. 2005) zbog građe njegove vanjske ovojnice koja omogućava preživljavanje u nepovoljnim uvjetima bez gubitka vijabilnosti. Očito je ovojnica dovoljna za održavanje svih proteina unutar peludi funkcionalnima pa nisu potrebni molekularni chaperoni. Međutim, na mjestima apertura dolazi do klijanja peludne mješinice koja nije toliko otporna na vanjske uvjete što ju čini osjetljivom na toplotni stres. Rast peludne mješinice nešto otpornijim čine nakupine kaloze koje ograničavaju citoplazmu i organele, te dvije jezgre uz vršni dio, dok je ostatak relativno stacionaran i omogućava rast vršnog dijela (BUCHANAN I SUR. 2000). Međutim, u vezi pojavnosti HSP u peludi u literaturi se još uvijek navode kontradiktorni podaci, pa se tako u nekim radovima navodi da se HSP ekspimiraju u peludi, a u nekima da se ne ekspimiraju. Moja pretpostavka koja bi mogla pomiriti oba stajališta je da se HSP ne stvaraju u uvjetima u kojima još nije počeo razvoj mješinice, a u kasnijim stadijima (ili već na samom početku rasta mješinice), se zbog toplotnog stresa i nedostatka vanjske jake zaštite, počinju ekspimirati. O tom konkretnom problemu je u literaturi malo podataka, pa bi se u tom području trebalo provesti više istraživanja. U današnje vrijeme globalnog zatopljenja, svjetske nas agencije upozoravaju na prilične godišnje poraste prosječne temperature na svjetskoj razini (HEDHLY I SUR. 2008). Reproductivna faza razvoja biljaka omogućuje biljci prilagodbu na promijenjene okolišne uvjete. Razumijevanje fenotipske plastičnosti i gametofitske selekcije daju nove uvide u mogućnost brze evolucije biljaka u uvjetima globalnog zatopljenja (HEDHLY I SUR. 2008). Problem uspješnosti klijanja i oplodnje biljaka pri temperaturama koje su iznad optimalnih počinje biti od velike važnosti zbog osiguravanja dovoljno kvalitetne hrane za svjetsko pučanstvo, ali također i očuvanja bioraznolikosti svih ekosistema na Zemlji.

## 8. LITERATURA

ABDUL-BAKI, A., STOMMEL, J.R. 1995: Pollen viability and fruit set of tomato genotypes under optimum- and high-temperature regimes. *Horticultural Science* 30, 115-117

BUCHANAN B.B., GRUISSEM W., JONES R.L. 2000: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

BURKE J.J. 2006: Genetic diversity in pollen abiotic stress tolerance. Beltwide Cotton Conference. Nashville, Tennessee. January 8-11, 2008

BURKE, J.J., HATFIELD, J.L., KLEIN, R.R., MULLET, J.E. 1985: Accumulation of Heat Shock Proteins in field-grown cotton. *Plant Physiology* 78, 394-398

BUYUKKARTAL, H.N. 2002: In vitro pollen germination and pollen tube characteristics in tetraploid red clover (*Trifolium pratense*). *Turkish Journal of Botany* 27, 57-61

COOPER, P., HO, T-H.D., HAUPTMANN R.M. 1984: Tissue specificity of the heat-shock response in maize. *Plant Physiology* 75, 431-441

DUPUIS, I., DUMAS, C. 1990: Influence of temperature stress on in vitro fertilization and heat shock protein synthesis in maize (*Zea mays* L.) reproductive tissues. *Plant Physiology* 94, 665-670

GILBERT, S.F., SINGER R.S., 2003: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

HE, Y., HUANG, B. 2007: Protein changes during heat stress in three Kentucky bluegrass cultivars differing in heat tolerance. *Crop Science* 47, 2513-2520

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I., HERRERO, M. 2008: Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science* 14, 30-36

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I., HERRERO, M.: Influence of genotype – temperature interaction on pollen performance. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 1494 - 1502

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I., HERRERO, M. 2004: Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 91, 558-564

HEPLER P.K., LOVY-WHEELER, A., MCKENNA S.T., KUNKEL J.G. 2006: Ions and Pollen Tube Growth. U: MALHO, R. (urednik), *The Pollen Tube – A Cellular and Molecular Perspective*. Plant Cell Monographs, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

HERRERO, M.P., JOHNSON, R.R. 1980: High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science* 20, 796-800

HIGASHIYAMA, T., INATSUGI R., 2006: Comparative Analysis of Biological Models used in the Study of Pollen Tube Growth. Plant Cell Monographs, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

HORJAN, I. 2008: Palinološka flora Donje Stubice – osnova za građu komparativne forenzičke zbirke, magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu

KAKANI, V.G., REDDY, K.R., KOTI, S., WALLACE, T.P., PRASAD, P.V.V., REDDY, V.R., ZHAO, D. 2005: Differences in *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. *Annals of Botany* 96, 59-67

KREMER, D., JEMRIC, T. 2006: Pollen germination and pollen tube growth in *Fraxinus pennsylvanica*. *Biologia Bratislava* 61, 79-83

MALHO, R. 2006: *The Pollen Tube – A Cellular and Molecular Perspective*. Plant Cell Monographs, Springer –Verlag Berlin Heidelberg.

PEET, M., SATO, S., CLEMENT, C., PRESSMAN, E. 1985: Heat stress increases sensitivity of pollen, fruit and seed production in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to non-optimal vapor pressure deficits. *Plant Physiology* 78, 394-398

PEVALEK-KOZLINA, B. 2003.: Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.

PRESSMAN, E., PEET, M.M., PHARR D.M., 2002: The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany* 90, 631-636.

RAO,G.U., JAIN, A., SHIVANNA K.R. 1992: Effects of high temperature stress on *Brassica* pollen: viability, germination and ability to set fruits and seeds. *Annals of Botany* 69, 193-198

ROSSEL, P., GALLAN SAUCO, V., HERRERO, M., 2006: Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. *Scientia Horticulturae* 109, 97-100

SHIVANNA, K.R., CRESTI M. 1989: Effects of high humidity and temperature stress on pollen membrane integrity and pollen vigour in *Nicotiana tabacum*. *Sexual Plant Reproduction*, Springer Berlin/Heidelberg, 137-141

STERN, K.R., JANSKY S., BIDLACK, J.E. 2003: *Introductory Plant Biology*. McGraw-Hill Companies, Inc., 1221 Avenue of Americas, New York, NY 10020.

SUN, W., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN, N. 2002: Small heat shock and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577, 1-9

TAIZ, L., ZEIGER, E., 1991: *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City.

VOLKOV, R.A., PANCHUK, I.I., SCHÖFFL, F. 2005: Small Heat Shock Proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology* 57, 487-502

XIAO, C-M., MASCARENHAS, J.P.1985: High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat-shock proteins. *Plant Physiology* 78, 887-890

YODER, K., YUAN, R., COMBS, L., BYERS, R. 2009: Effects of temperature and the combination of liquid lime sulfur and fish oil on pollen germination, pollen tube growth, and fruit set in apples. Horticultural Science 44, 1277-1283

YOUNG, L.W., WILEN, R.W., BONHAM-SMITH, P. C. 2004: High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. Journal of Experimental Botany 55, 485-495

YOUNG- KEUN, L., KIM, Y-O., BOOTH, T., LEE, E. J. 2002: *In vitro* pollen performance of *Pinus densiflora* and *P. rigida*: Temperature and medium nutrient effects. Korean Journal of Ecology Science 1, 165-169

[http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/BS\\_5\\_Transport\\_Golgi\\_\\_lisosomi\\_peroksisomi.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/BS_5_Transport_Golgi__lisosomi_peroksisomi.pdf)

## 9. SAŽETAK

Povišena temperatura ima značajan učinak na sve biljne organe i sve razvojne faze u životu biljke. Osobito je važan učinak na razvoj peluda i ženskih reproduktivnih organa, klijanje peludne mješinice i uspješnost stvaranja ploda. U biljaka izloženih toplotnom stresu mijenjaju se metabolički procesi, usporava sinteza normalnih staničnih proteina, neki se proteini degradiraju, a svi ti procesi događaju se u svrhu uspostavljanja termotolerancije. Posebna karakteristika metabolizma u uvjetima toplotnog stresa je sinteza čitavog seta proteina induciranih stresom, koji omogućavaju funkcioniranje stanice u uvjetima visokih temperatura. Pelud je osjetljiv na povišene temperature, iako ima karakterističnu strukturu koja ga štiti od brojnih okolišnih utjecaja. Peludno zrno razvija peludnu mješinicu koja kroz tučak klije prema sjemenom zametku vršnim rastom i pomoću vrlo složene stanične regulacije. Razlog nemogućnosti oplodnje često je abnormalnost klijanja peludne mješinice ili neuspješnost klijanja peluda na tučku. Zato je nužno istraživati utjecaj vanjskih faktora kao što je temperatura na fiziologiju, dinamiku i molekularne mehanizme klijanja peluda. Rezultati studija pokazali su da se proces klijanja peluda mijenja u trenutku povišenja temperature iznad optimalne, nakon čega se smanjuje brzina rasta, vijabilnost ili postotak uspješne oplodnje. Zanimljivo je da toplotni stres različito djeluje na muške i ženske reproduktivne organe. Postoje podaci da od svih biljnih tkiva toplotni stres ne utječe na ekspresiju HSP jedino u peludi. Međutim, u literaturi se o toj temi nalaze kontradiktorni podaci pa se negdje navodi i postojanje ekspresije HSP u peludi. O konkretnom problemu malo je dostupnih podataka, pa bi se u tom području trebalo provesti više istraživanja koja bi integrirala molekularne mehanizme klijanja, fiziološki odgovor peludi na toplotni stres i ekspresiju određenih staničnih i proteina toplotnog stresa.

## 10. SUMMARY

Increased temperature is an important factor that has impact on the living world. In plants, temperatures can affect pollen and female reproductive organs development, pollen tube growth and fruit ripening. Plants adjust their metabolic processes, decrease the rate of normal cellular proteins' synthesis, degrade some proteins in order to be more termotolerant to heat stress. Synthesising the set of heat shock proteins is a special plants characteristic, which allows normal cell functions in high temperatures conditions. Pollen is heat-sensitive, although it has a specific structure that protects it from harmful environment conditions. Pollen grain grows into pollen tube allowing tip growth and complex cellular regulations all the way to embryo sac. The reason for unsuccessful pollination is often abnormality of the pollen tube or failure in pollen germination on stigma. The aim of this work was to determine influence of high temperature on physiology, dynamics and molecular mechanisms of pollen germination and growth. Results of recent studies showed that percentage of pollen germination, pollen tube growth rate and successful pollination rate are decreasing under influence of increased temperature. Heat stress differently affects male and female reproductive organs. The only plant organ that does not synthesise heat shock proteins under heat stress is pollen, although there are contradictory data in the literature. There is little information available about this problem, so there should be more scientific studies which would integrate data about pollen tube germination and its molecular mechanisms, physiological responses to heat stress and expression of certain cellular and heat shock proteins.