

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Jasenska Antunović

**Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke
značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri
slabom i jakom osvjetljenju**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Jasenska Antunović

**Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke
značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri
slabom i jakom osvjetljenju**

Doktorski rad predložen
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije
u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti
na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom
studiju Molekularne bioznanosti - modul biologija biljaka

Osijek, 2013.

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka
Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,
pod mentorstvom prof. dr. sc. Vere Cesar i prof. dr. sc. Hrvoja Lepeduša,
u sklopu znanstvenih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH:
"Fiziologija stresa i gospodarska svojstva različitih kultivara pšenice i ječma"
(073-0731674-0552) kojega je voditelj prof. dr. sc. Josip Kovačević i
"Utjecaj oksidativnog stresa na organizaciju i funkciju biljnih stanica i tkiva"
(073-0731674-1673) kojeg je voditelj prof. dr. sc. Hrvoja Lepeduš.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri slabom i jakom osvjetljenju

Jasenska Antunović

Rad je izrađen u:

Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentori: Prof.dr.sc. Vera Cesar
Prof.dr.sc. Hrvoje Lepeduš

Kratki sažetak doktorskog rada:

U ovom radu je istraživana utjecaj ekstremnog zasušivanja na klijance ječma (*Hordeum vulgare* L.) usporedbom fizioloških i biokemijskih parametara. Suša je izazvana prestankom zalijevanja klijanaca koji su prethodno rasli u uvjetima visokog odnosno niskog intenziteta svjetlosti. Desetodnevna dehidracija provedena je u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti. U mladim biljkama ječma suša je uzrokovala smanjenje relativnog sadržaja vode, povećanu peroksidaciju lipida i oštećenje biomembrana. Tijekom zasušivanja smanjivala se stopa transporta elektrona što je rezultiralo smanjenjem maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II i indeksa fotosintetske učinkovitosti što je povezano sa smanjenjem koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*. Antioksidacijski odgovor biljaka izloženih suši pokazuje se kroz povećanu aktivnost katalaza, askorbat-peroksidaza, gvajakol-peroksidaza te povećano nakupljanje prolina. Također, utvrđeno je da su se biljke ječma izložene suši, a prethodno uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti uspjele adaptirati na nepovoljne uzgojne uvjete, no zbog toga im se smanjila adaptabilnost na slijedeći stres (suša) u nizu. To pokazuje da će biljke teže podnositi sušu ako su prethodno bile izložene visokoj insolaciji.

Broj stranica: 177

Broj slika: 55

Broj tablica: 30

Broj literaturnih navoda: 182

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ječam, suša, svjetlost, relativni sadržaj vode u listu, antioksidacijski odgovor, fotosintetski pigmenti, fluorescencija klorofila *a*

Datum obrane: 22.03.2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof.dr.sc. Josip Kovačević**, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju Poljoprivrednog instituta u Osijeku, predsjednik;
2. **Prof.dr.sc. Vera Cesar**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor 1 i član;
3. **Prof.dr.sc. Hrvoje Lepeduš**, izvanredni profesor Filozofskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor 2 i član;
4. **Doc.dr.sc. Sandra Radić Brkanac**, docentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, član;
5. **Prof.dr.sc. Irena Jug**, izvanredna profesorica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član;
6. **Doc.dr.sc. Ivna Štolfa**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, zamjena člana.

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

The extreme drought effect on biochemical and physiological features of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings grown under the low and high light

Jasenska Antunović

Thesis performed at:

Laboratory of plant cell and molecular biology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisors: Vera Cesar, PhD, Associate Professor
Hrvoje Lepeduš, PhD, Associate Professor

Short abstract:

Physiological and biochemical parameters for screening extreme drought impact on barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings were investigated in this study. Barley seedlings were grown at low or high light. Subsequently, drought stress was induced by withholding water for ten days. During that period seedlings were grown at low light conditions. According to duration of drought stress, decrease in leaf relative water content caused higher lipid peroxidation level what was reflecting on biomembrane injury determined by enhanced electrolyte leakage. Also, electron transport rate was decreased causing reduced maximum quantum yield of photosystem II and performance index showing reduced photosynthetic efficiency what is connected with reduced chlorophyll *a* and chlorophyll *b* concentration. Increased activity of catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase as well as higher accumulation of free proline indicated antioxidative response to drought stress. Seedlings grown at high light conditions showed adaptation to excess light during development, but decreased tolerance to next stress factor (drought). These results are showing that drought tolerance will be lowered in plants previously exposed to higher insolation.

Number of pages: 177

Number of figures: 55

Number of tables: 30

Number of references: 182

Original in: Croatian

Key words: barley, drought, light conditions, leaf relative water content, antioxidative response, photosynthetic pigments, chlorophyll *a* fluorescence

Date of the thesis defense: 22.03.2013.

Reviewers:

1. **Josip Kovačević**, PhD, Scientific Advisor, Agricultural Institute Osijek
2. **Vera Cesar**, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
3. **Hrvoje Lepeduš**, PhD, Associate Professor, Faculty of Humanities and Social Sciences, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
4. **Sandra Radić Brkanac**, PhD, Assistant Professor, Faculty of Science, University of Zagreb
5. **Irena Jug**, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture in Osijek
6. **Ivana Štolfa**, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

Najiskrenije se zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Veri Cesar i prof. dr. sc. Hrvoju Lepedušu na stručnoj pomoći prilikom odabira teme i brojnim savjetima kojima su me usmjeravali tijekom mog znanstveno-istraživačkog rada. Hvala na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i iskustvima, te strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada. Posebno hvala profesorici, koja je uložila mnogo vremena i truda u ovaj rad, kao i u mene tijekom proteklih nekoliko godina zajedničkog rada. Hvala na podršci, razumijevanju i poticajima u trenucima kada bih posustala.

Hvala dr.sc. Domagoju Šimiću na nesebičnoj pomoći oko statističke obrade podataka.

Zahvaljujem se članovima povjerenstva za ocjenu i obranu ovog doktorskog rada prof. dr. sc. Josipu Kovačeviću, prof. dr. sc. Ireni Jug i doc. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na čitanju i korisnim savjetima.

Hvala kolegicama iz Labosa koje su, svaka na svoj način, doprinijele ostvarenju mog cilja. Najveću zahvalnost upućujem našoj tehničarki Kseniji Doboš koja mi je bezuvjetno bila spremna pomoći u svakom trenutku tijekom eksperimentalnog rada.

Veliko HVALA prijateljici Vesni Peršić koja je uz mene još od mojih prvih koraka u svijet znanosti, na njezinom bezuvjetnom prijateljstvu i riječima ohrabrenja.

Također hvala svim mojim dragim prijateljima na razumijevanju i podršci tijekom proteklih nekoliko godina, kada je moj cjelodnevni rad oduzimao vrijeme posvećeno njima.

HVALA mojim roditeljima i cijeloj obitelji koja mi je bila oslonac tijekom posljediplomskog studija i vjerovala u moj uspjeh.

Najveće HVALA Mariju bez čijeg razumijevanja, beskrajne tolerancije i nesebične podrške tijekom posljednje četiri godine ne bih postigla sve ovo što jesam.

Jasenska Antunović

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sistematski položaj i morfološke karakteristike ječma (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	5
1.2. Pregled literature	7
1.2.1. Biljke i stres	7
1.2.2. Biokemijski mehanizmi oksidacijskog stresa	12
1.2.3. Komponente antioksidacijskog odgovora	18
1.2.3.1. Enzimski antioksidansi	20
1.2.3.2. Neenzimski antioksidansi	24
1.2.4. Fotosinteza i fluorescencija klorofila <i>a</i>	30
1.2.5. Fiziološke posljedice stresa izazvanog manjkom vode i tolerancija na sušu	34
1.2.6. Molekularni mehanizmi tolerancije na stres izazvan suviškom svjetlosti	40
1.3. Ciljevi istraživanja i hipoteza	44
2. MATERIJAL I METODE	45
2.1. Biljni materijal i uzgoj klijanaca	46
2.2. Opis eksperimenta	47
2.3. Određivanje relativnog sadržaja vode u listu	49
2.4. Procjena oštećenosti biomembrana	49
2.5. Određivanje razine lipidne peroksidacije	50
2.6. Određivanje sadržaja slobodnog prolina	51
2.7. Određivanje i praćenje promjene boje listova	52
2.8. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	53
2.9. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i>	54
2.10. Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima (GPOX, APX, CAT, SOD)	56
2.10.1. Ekstrakcija topljivih proteina	56
2.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaza	56
2.10.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaza	57
2.10.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaza	57
2.10.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza	58
2.11. Izolacija topljivih i membranskih proteina za SDS elektroforezu i imunodetekcija proteina D1 i RubisCO LSU	59
2.11.1. Izolacija topljivih i membranskih proteina	59
2.11.2. Određivanje koncentracije topljivih i membranskih proteina	59

2.11.3. Razdvajanje topljivih i membranskih proteina denaturirajućom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS - PAGE)	60
2.11.4. Imunodetekcija proteina D1 i RubisCO LSU	60
2.11.4.1. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu	60
2.11.4.2. Bojanje proteina na nitroceluloznoj membrani	61
2.11.4.3. Detekcija proteina D1 i RubisCO LSU	61
2.12. Statistička obrada podataka	63
3. REZULTATI	64
3.1. Relativni sadržaj vode u listu (RWC)	65
3.2. Razina oštećenosti biomembrana (EL).....	67
3.3. Razina lipidne peroksidacije (TBARS).....	69
3.4. Sadržaj slobodnog prolina.....	71
3.5. Promjena boje listova.....	73
3.6. Koncentracija fotosintetskih pigmenata	79
3.6.1. Klorofil <i>a</i>	79
3.6.2. Klorofil <i>b</i>	81
3.6.3. Ukupni klorofili (<i>a+b</i>).....	83
3.7. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	85
3.7.1. Maksimalni prinos kvanta PSII ($F_v/F_m = TR_0/ABS$).....	85
3.7.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})	87
3.7.3. Omjer hvatanja ekscitona i disipacije energije (TR_0/DI_0)	89
3.7.4. Transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$).....	91
3.7.5. Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS)	93
3.7.6. Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC).....	95
3.7.7. Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC).....	97
3.7.8. Transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC)	99
3.7.9. Disipacija po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC).....	101
3.7.10. Gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0)	103
3.7.11. Vrijeme potrebno da se postigne F_m (t_{max})	105
3.7.12. Površina iznad OJIP krivulje (AREA)	107
3.7.13. OJIP porast fluorescencije klorofila <i>a</i>	109
3.8. Aktivnost antioksidacijskih enzima	112
3.8.1. Aktivnost gvajakol-peroksidaza (GPOX).....	112
3.8.2. Aktivnost askorbat-peroksidaza (APX)	114
3.8.3. Aktivnost katalaza (CAT)	116
3.8.4. Aktivnost superoksid-dismutaza (SOD)	118

3.9. Koeficijenti korelacije između dobivenih rezultata.....	120
3.10. Imunodetekcija proteina D1 i RubisCO LSU.....	122
4. RASPRAVA.....	124
4.1. Utjecaj zasušivanja na biljke uzgajane u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti	125
4.2. Utjecaj zasušivanja u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti na biljke prethodno uzgajane na visokom intenzitetu svjetlosti tijekom deset dana	133
5. ZAKLJUČAK.....	142
6. LITERATURA.....	146
7. SAŽETAK.....	160
8. SUMMARY	163
9. ŽIVOTOPIS.....	166

1. UVOD

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jedna od najvažnijih žitarica u svijetu. Prema zasijanim površinama i prinosu četvrti je na svjetskoj ljestvici, a treći u Europskoj Uniji kao i u Hrvatskoj (<http://faostat.fao.org.>, 2010). Približno $\frac{3}{4}$ globalne proizvodnje koristi se u životinjskoj ishrani, 20 % za pripremu alkoholnih i bezalkoholnih pića (sladni) i 5 % u pripremi različitih ljudskih prehrambenih proizvoda (Blake i sur. 2011). Ječam je prilično dobro prilagođen različitim okolišnim uvjetima i u odnosu na pšenicu tolerantiji je na stres (Nevo i sur. 2012). Ova karakteristika objašnjava činjenicu da je u najsiromašnijim zemljama svijeta upravo ječam jedan od glavnih izvora prehrane. U novije vrijeme društvo razvijenih zemalja prepoznalo je izuzetno visoku potencijalnu vrijednost topljivih vlakana ječmenog zrna (polisaharidi stanične stijenke) pa se ječam sve više koristi u pripremi različitih dijetetskih proizvoda s ciljem prevencije bolesti krvožilnog sustava, dijabetesa i raka debelog crijeva koje pogađaju stotine milijuna ljudi širom svijeta (Collins i sur. 2010). Osim značajne količine proteina, ugljikohidrata, lipida i vlakana zabilježene su mnoge druge nutritivne vrijednosti cjelovitog zrna žitarica kao što su bogatstvo mineralima (K, P, Mg, Fe, Mn, Zn, Se) i vitaminima (B6 - piridoksin, B5 - pantotenska kiselina, B2 - riboflavin te A, E i K u manjim količinama) (Slavin i sur. 1999).

Okolišni stresovi su ograničavajući čimbenici poljoprivredne proizvodnje širom svijeta (Gaspar i sur. 2002, Roy i sur. 2011). Suša, kao i ostali abiotički stresovi, negativno utječe na kakvoću (Wang i Frei 2011) i količinu (Dolferus i sur. 2011) svih proizvedenih žitarica, pa tako i ječma, što bi u budućnosti moglo stvarati izuzetno velike probleme budući da su žitarice osnova prehrane većini svjetske populacije.

Suša, kao i drugi stresni čimbenici uzrokuje nastanak reaktivnih kisikovih jedinki u biljkama (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) što za posljedicu ima oštećenja biomembrana i makromolekula. Najčešće reaktivne kisikove jedinice su slobodni radikali kisika: singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni (O_2^-) i hidroksilni ($\cdot\text{OH}$) radikali te vodikov peroksid (H_2O_2) kao mala, nenabijena, slobodno difundirajuća molekula (Noctor i Foyer 1998, Mittler 2002, Wang i sur. 2003). Biljke su tijekom evolucije razvile nekoliko antioksidacijskih mehanizama kojima uklanjaju spomenute toksične komponente. Različiti enzimi i neenzimske komponente imaju antioksidacijsko djelovanje. Također, određeni osmoliti i specifični proteini mogu sudjelovati u uklanjaju ROS-a. Povećanje antioksidacijske aktivnosti može povećati toleranciju na različite stresne čimbenike (Wang i sur 2003).

Proteklih nekoliko desetljeća brojni istraživači se bave proučavanjem utjecaja suše na različite biljne vrste. Laboratorijska istraživanja utjecaja suše, kao i ostalih okolišnih stresnih čimbenika, na mehanizme tolerancije, imaju prednost u odnosu na poljske pokuse, onda

kada je potrebno pratiti promjene potaknute samo jednim stresnim čimbenikom. Uzgojem biljaka i izvođenjem eksperimenata u kontroliranim uvjetima izbjegava se zbirni utjecaj različitih čimbenika koji su nužno prisutni u okolini u isto vrijeme (Fleury i sur. 2010).

Prikaz dosadašnjih spoznaja o fiziološkim, biokemijskim i molekularnim procesima koji se javljaju tijekom uvjeta niskog vodnog potencijala u listovima odnosno tijekom suše dali su Reddy i sur. (2004). Gubitak vode iz stanica (dehidracija) izaziva niz fizioloških odgovora. Nedostatak vode u tlu prvenstveno utječe na korijen, potom signal putuje dalje prema ostalim biljnim organima. Smanjenjem vodnog potencijala u listovima dolazi do gubitka turgora i pojačane osmotske regulacije. Zatvaranjem puči sprječava se ulazak CO₂ u stanice, što neposredno dovodi do smanjenja ukupne fotosinteze. Biokemijski odgovori uključuju smanjenu aktivnost enzima RubisCO koji za posljedicu ima smanjenje fotosintetske učinkovitosti, akumulaciju metabolita (glutation, monodehidroaskorbat, prolin, α-tokoferol) i povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid-dismutaza - SOD, katalaza - CAT, askorbat-peroksidaza - APX, gvajakol-peroksidaza - GPOX, glutation-reduktaza - GR, monodehidroaskorbat-reduktaza - MDHAR) zahvaljujući kojima se smanjuje nakupljanje ROS-a. U okviru molekularnog odgovora treba spomenuti ekspresiju gena koji određuju odgovor na stres, gena za biosintezu apscizinske kiseline (ABA) i sintezu specifičnih proteina važnih za stabilizaciju membrana (engl. *Late Embryogenesis Abundant* - LEA proteini, dehidrini). Navedeni procesi sudjeluju u određivanju stupnja tolerancije na stres potaknut sušom.

Svjetlost visokog intenziteta također je abiotski stresni čimbenik, koji induciranjem fotoinhibicije negativno utječe na stopu fotosinteze. U uvjetima snažnog osvjetljenja fotosintetski aparat apsorbira više svjetlosti nego što se može iskoristiti za fiksaciju CO₂, pri čemu nastaje više NADPH i ATP-a nego što je potrebno što za posljedicu ima stvaranje ROS-a u reakcijskim središtima PSI i PSII u tilakoidnim membranama osvjetljenih kloroplasta (Pevalek-Kozlina 2003, Mubarakshina i sur. 2006, Asada 2006). Zahvaljujući učinkovitim zaštitnim mehanizmima kloroplasti mogu opstati bez ozbiljnijih oštećenja i pri visokim intenzitetima svjetlosti (Foyer i Noctor 2000).

Klimatske promjene globalnih razmjera za posljedicu, između ostaloga, imaju sve veće nedostatke vode (Mishra i Singh 2010). Koncentracija atmosferskog CO₂ iznosi ≈ 355 μmol mol⁻¹, a pretpostavlja se da će se do kraja 21. stoljeća udvostručiti. Klimatske promijene će se odraziti i na povećanje temperature za 3 - 4 °C te povećanje aridnih i semiaridnih površina (Lin i Wang 2002). Stoga je potrebno kroz različita istraživanja što bolje upoznati fiziološke i biokemijske procese koji biljku čine tolerantnijom na sušu.

Budući da je ječam žitarica koja često biva izložena sušnom periodu tijekom svog rasta i razvoja izabran je za modelni organizam u ovom istraživanju. Odabrana je novija, još neistražena sorta ječma Bravo, selekcionirana na Poljoprivrednom Institutu Osijek. Aktivnost odabranih enzima antioksidacijskog odgovora i neenzimskih komponenata, kao i fluorescencija klorofila *a* izmjerena je na klijancima koji su bili izloženi suši u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti.

1.1. Sistematski položaj i morfološke karakteristike ječma (*Hordeum vulgare* L.)

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) pripada redu *Poales* i porodici trava (*Poaceae*). Jednogodišnja je zeljasta biljka, šuplje i člankovite stabljike koja se naziva vlat. Listovi su cjeloviti, linealno lancetasti, s paralelnim žilama i bez peteljke. Izmjenično su raspoređeni i imaju dobro razvijen rukavac (culmus) koji obuhvaća vlat. Kratki jezičac (ligula) razvija se na prijelazu rukavca u plojku, dok se sa strane razvijaju dvije srpaste uške (auricule). Cvjetovi su skupljeni u sastavljene klasove. Tanka os klasa nosi na sebi brojne zupce, a na svakom su po tri sjedeća klasića, ovijena dugim pljevama (glumae), s jednim cvijetom. Dvospolan cvijet ovijen je obuvencem (palea inferior) i košuljicom (palea superior). Plod je pšeno (caryopsis), s jasno izraženom uzdužnom brazdom i većinom sraslo s pljevicom (Dubravec 1991) (Slika 1). Obični ječam je diploidna vrsta ($2n=14$), čiji je haploidni genom izuzetno velik i sadrži 5,1 gigabaza (Gb) (The International Barley Genome Sequencing Consortium, Nature, 2012).

Kultivirani ječam je jedna od prvih domestificiranih žitarica u svijetu. Smatra se da je njegovo podrijetlo primarno s područja Bliskog Istoka (južnozapadna Azija) poznatog pod nazivom Fertile Crescent, gdje je proces domestifikacije započeo od divlje vrste *Hordeum spontaneum* kao izvorišta pripitomljavanja prije oko 10000 godina. Nakon mnogih provedenih istraživanja genetičke raznolikosti divljih vrsta prikupljenih na području Tibeta pokazano je da je to područje još jedan centar domestifikacije ove vrste (Xu 1975, Badr i sur. 2000, Feng i sur. 2006, Dai i sur. 2012).

Svi kultivirani oblici ječma svrstani su u jednu vrstu, *Hordeum vulgare* L. Kultivirana vrsta ječma *Hordeum vulgare* L. na temelju razvijenosti, rasporeda, i fertilnosti klasića podijeljena je u pet konvarieteta (suvarieteta):

Hordeum vulgare convar. *hexastichon* (višeredni ječmovi)

Hordeum vulgare convar. *intermedium* (prijelazni ječmovi)

Hordeum vulgare convar. *distichon* (dvoredni ječmovi)

Hordeum vulgare convar. *dificiens* (nepotpuni ječmovi)

Hordeum vulgare convar. *labile-irregulare* (labilni ječmovi)

(Martinčić i Kozumplik 1996).

Red: **POALES**

Porodica: **Poaceae (=Gramineae)**

Rod: *Hordeum* L.

Vrsta: *Hordeum vulgare* L. – obični ječam



Slika 1. Ilustracija ječma, *Hordeum vulgare* L.

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration_Hordeum_vulgare0B.jpg, 20.11.2012.).

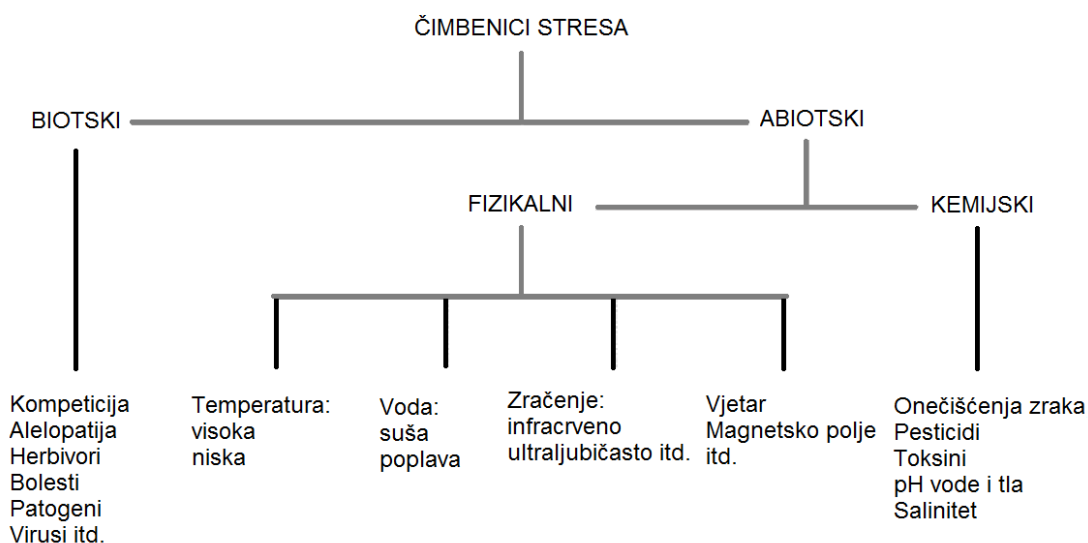
1.2. Pregled literature

1.2.1. Biljke i stres

U području biologije teško je točno definirati što je stres s obzirom na činjenicu da određene biološke prilike za neku biljku mogu biti stresne, dok su za drugu optimalne. Najpraktičnija definicija stresa u području biologije je sljedeća: stres predstavljaju nepovoljni uvjeti koji ometaju ili inhibiraju normalno funkcioniranje metaboličkih procesa (Jones i Jones 1989). Lichtenthaler je definirao stres kao nepovoljne uvjete ili tvari koje utječu na biljni metabolizam, rast i razvoj, dok je prema Strasser-u stres stanje potaknuto čimbenicima koji nastoje izmjeniti ravnotežu (Gaspar i sur. 2002). Strasser-ova definicija slaže se s Larcher-ovom, prema kojoj se stres može opisati kao stanje u kojem povećani zahtjevi usmjereni na biljku vode ka početnoj destabilizaciji funkcija, zatim normalizaciji te poboljšanoj toleranciji. Ukoliko su nadmašene granice tolerancije i kapacitet prilagodbe stres može uzrokovati trajnu štetu ili čak smrt (Pahlich 1993). Dakle, čimbenici stresa mogu imati pozitivni (engl. eustress) ili negativni (engl. distress) utjecaj, a kakav će on biti određiti će ravnoteža između tolerancije i osjetljivosti. Nadalje, odgovor biljke na određeni stresni čimbenik razlikovati će se ovisno o trajanju i jačini stresnog utjecaja (Mandre 2002, Kranner i sur. 2010).

Biljke su, kao i svi ostali živi organizmi, svakodnevno izložene različitim stresnim čimbenicima. Čimbenici stresa dijele se na biotske i abiotske (Slika 2). Biotski čimbenici stresa predstavljaju utjecaj živih organizama na biljke (gljive, insekti itd.). Abiotski čimbenici se mogu podijeliti na fizičke i kemijske. U fizičke čimbenike ubrajaju se temperaturni ekstremi, nedostatak ili suvišak vode, radijacija, utjecaj vjetra, magnetskog polja i slično. Onečišćivači zraka, pesticidi i toksini pripadaju kemijskim čimbenicima stresa (Gaspar i sur. 2002, Mahajan i Tuteja 2005).

Zajedničko obilježje svih stresnih čimbenika je njihov utjecaj na povećano stvaranje ROS-a u biljnim tkivima (Arora i sur. 2002). Reaktivne kisikove jedinice kontinuirano nastaju kao nusprodukti tijekom normalnih metaboličkih procesa, lokaliziranih u različitim staničnim odjeljcima, kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi. Tako nastale reaktivne kisikove jedinice nemaju štetnog utjecaja na biljne stanice zahvaljujući prisutnosti različitih obrambenih antioksidacijskih mehanizama koji uklanjaju ROS. Ravnotežu između stvaranja i uklanjanja ROS-a mogu poremetiti različiti stresni čimbenici koji potiču naglo povećanje unutarstanične razine ROS-a. Posljedica toga je peroksidacija lipida, oksidacija proteina i aminokiselina, a u konačnici oštećenje DNA i stanična smrt (Mittler 2002, Wang i sur. 2003, Gill i Tuteja 2010).



Slika 2. Izvori stresa u biljkama (Mandre 2002).

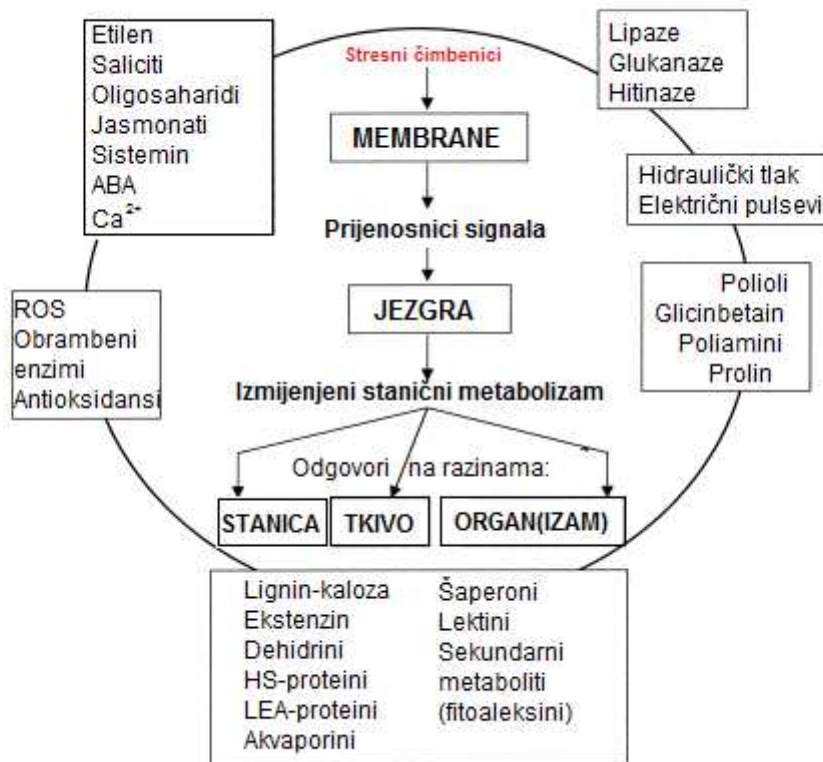
Odgovor biljke na stres je vrlo složen, uključuje mnoge gene i različite biokemijske i molekularne mehanizme. Geni koji sudjeluju u mehanizmima tolerancije na stres se mogu podijeliti u tri glavne skupine. Prvu skupinu čine geni uključeni u signalne kaskade i kontrolu transkripcije (MAP kinaze, fosfolipaze i dr.). Drugu skupinu čine geni direktno uključeni u zaštitu biomembrana i proteina (Hsps, šaperoni, LEA proteini, osmoprotektanti i komponente antioksidacijskog odgovora), dok trećoj skupini pripadaju geni koji reguliraju primanje i prijenos vode i iona (akvaporini, transporteri iona). Svi ovi geni sudjeluju u mehanizmima koji osiguravaju održavanje homeostaze, zaštite i popravka oštećenih proteina i biomembrana. Neodgovarajući korak, ili više njih, u signalizaciji ili aktivaciji gena može nepovratno oštetiti proteine i membrane te dovesti do stanične smrti (Gaspar i sur. 2002, Wang i sur. 2003).

Okolišne promjene odnosno prisutnost određenog stresa prvi primjećuju receptori plazmatskih membrana (Gaspar i sur. 2002). Signal potom putuje nizvodno što rezultira stvaranjem sekundarnih prijenosnika: inozitol fosfata, Ca^{2+} i ROS-a. Inozitol fosfati dalje podešavaju unutarstaničnu razinu kalcija. Promjene razine Ca^{2+} u citosolu opažaju kalcij vezujući proteini koji se još nazivaju i kalcijevim sensorima. Ti senzori uočavaju nedostatak enzimske aktivnosti i mijenjaju njihovu konformaciju u kalcij ovisnom putu. Proteinski senzori potom vežu određene komponente, pri čemu često potiču fosforilacijske kaskade koje povećavaju početni signal i ciljaju gene važne u odgovoru na stres ili transkripcijske faktore koji kontroliraju te gene. Produkti gena u konačnici vode ka prilagodbi biljaka te pomažu biljci

preživjeti u nepovoljnim uvjetima. Prema tome, biljke odgovaraju na stres kao pojedinačne stanice i sinergistički na razini cijelog organizma. Promjene u genskoj ekspresiji potaknute stresnim čimbenicima sudjeluju u stvaranju biljnih hormona, primjerice apscizinske kiseline (ABA), salicilne kiseline i etilena. Te molekule pojačavaju početni signal i iniciraju daljnju signalizaciju koja ide istim ili potpuno drugačijim signalnim putem (Mahajan i Tuteja 2005). Promjene koncentracije kalcija u citosolu, pogotovo u stanicama zapornicama, može regulirati apscizinska kiselina (ABA), što dalje utječe na mehanizam otvaranja/zatvaranja puči (Shao i sur. 2008).

Različiti geni aktivirani pod utjecajem stresa mogu se podijeliti u dvije skupine. Rano inducirani geni aktiviraju se unutar nekoliko minuta nakon primanja signala i njihova ekspresija je često prolazna. Mnogi drugi geni koji se aktiviraju tek nakon nekoliko sati pripadaju skupini kasno induciranih gena, a njihova je ekspresija često kontinuirana. Ovoj skupini pripadaju geni uključeni u odgovor na stres kao što su geni osjetljivi na dehidraciju (engl. responsive to dehydration, RD), inducirani hladnoćom (engl. cold induced, KIN), osjetljivi na hladnoću (engl. cold responsive, COR). Navedeni geni nose genetičku šifru za sintezu i sudjeluju u regulaciji primjerice LEA proteina (engl. *Late Embryogenesis Abundant*), antioksidansa, osmolita i drugih proteina važnih u procesu stabilizacije biomembrana (Wang i sur. 2003, Mahajan i Tuteja 2005).

Fitohormoni i sekundarni prijenosnici su odgovorni za prijenos informacija od biomembrana do ostalih metaboličkih procesa (Gaspar i sur. 2002). U cijelom signalnom putu neki su geni jače izraženi dok su drugi potisnuti. Proteinski produkti stresom induciranih gena često se nakupljaju kao odgovor na nepovoljne uvjete što se može iščitati sa sheme na Slici 3. Nakon prepoznavanja stresa signal se prenosi između stanica i kroz cijelu biljku. Važno je naglasiti činjenicu da se procesi odgovora na različite stresne čimbenike mogu odvijati zajedničkim putevima. Također različiti stresni čimbenici, kao što su suša, visoka i niska temperatura, kao i visoki salinitet rezultiraju istim procesom - nedostatkom vode. S druge strane, ovisno o biljnom rodu, porodici ili čak unutar kultivara iste vrste, odgovor na isti tip stresa može biti različit (Reddy i sur. 2004). Signalni put uglavnom je sličan ostalim signalnim kaskadama u eukariotskim organizmima, a uključuje reverzibilne fosforilacijske korake, prijenos kalcija i stvaranje ROS-a (León i sur. 2001, Gaspar i sur. 2002).



Slika 3. Stanična signalizacija i adaptacije na stresne čimbenike (prilagođeno prema Gaspar i sur. 2002).

Reakcija biljke na stres ovisi o karakteristikama stresnih čimbenika (trajanju, jačini i učestalosti izlaganja stresu) i njihovoj međusobnoj kombinaciji koja je normalno prisutna u prirodi. Isto tako, reakcija se razlikuje ovisno o biljnim karakteristikama (vrsta i svojstvo tkiva i organa, razvojni stadij i genotip) (Gaspar i sur. 2002, Reddy i sur 2004). Mehanizmi otpornosti osiguravaju opstanak na način da toleriraju ili izbjegavaju stres. Tolerancija je fiziološki odgovor u kojem biljke održavaju visoku metaboličku aktivnost u uvjetima umjerenog stresa i smanjenu aktivnost u uvjetima jačeg stresa. Mehanizmi izbjegavanja uključuju smanjenje metaboličke aktivnosti što rezultira dormancijom u uvjetima ekstremno jakog stresa. Ovi mehanizmi u biljaka mogu biti aktivni pojedinačno ili kombinirano. U fiziologiji stresa potrebno je razlikovati konačni i proksimalni odgovor. Adaptacija, kao konačni odgovor, odvija se različitim mehanizmima na genetskoj razini kroz nekoliko generacija. Aklimatizacija je proces podešavanja biljnih fizioloških i strukturalnih svojstava unutar genotipa, koji se odvija u vrlo kratkom vremenu ili sezonski. Drugim riječima, aklimatizacija je proces promjene ravnotežnog stanja u organizmu u svrhu praćenja pomaka u vanjskoj okolini (Gaspar i sur. 2002). U uvjetima stresa opažene su različite epigenetske promjene, somaklonalne varijacije i mutacije. Prema tome, stresni čimbenici koji za posljedicu imaju stvaranje ROS-a ne djeluju samo na intaktnu biljku već i na filijalne generacije. Izrazito osjetljivi genotipovi nemaju razvijene mehanizme otpornosti i završavaju ugibanjem.

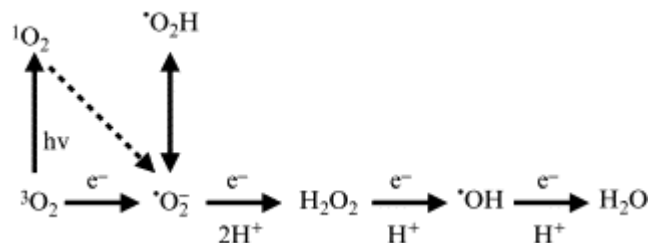
Različite vizualizacijske tehnike koriste se za detektiranje ranog stresnog signala praćenjem promjena vodnog statusa, fotosintetske učinkovitosti, akumulacije sekundarnih metabolita ili strukturalnih modifikacija (Gaspar i sur. 2002). Pasivna ili aktivna termografija, detekcija refleksije i vizualizacija fluorescencijom (potaknuta vidljivom ili UV svjetlošću) su najrazvijenije metode u posljednjih 10-ak godina (Chaerle and Van Der Straeten 2000, Chaerle i sur. 2004, Lenk i sur. 2007).

1.2.2. Biokemijski mehanizmi oksidacijskog stresa

Svi su živi organizmi izuzetno složeni redoks sustavi. Redukcijski procesi biosinteze i oksidacijski procesi razgradnje u organizmima djeluju sinergistički (Foyer i Noctor 2003). Mnogi metabolički procesi u različitim staničnim odjeljcima su potencijalni izvori ROS-a u biljkama (Mittler 2002). Kao što je već ranije spomenuto, njihova uloga u stanicama je dvostruka, s jedne strane ROS izaziva štetu oksidacijom lipida, proteina i nukleinskih kiselina, dok s druge strane ima signalnu ulogu u metaboličkim procesima (Foyer i Noctor 2003, Bailly i sur. 2008).

Razvojem (evolucijom) fotosintetskih organizama prije oko 2,7 biliona godina molekularni kisik uveden je u naš okoliš. Time je omogućen respiratorni metabolizam kao i vrlo učinkoviti metabolički procesi stvaranja energije u kojima kisik sudjeluje kao konačni akceptor elektrona. Aerobni način života praćen je i nastankom reaktivnih kisikovih jedinaka.

Reaktivne kisikove jedinake su djelomično reducirani i elektronski ekscitirani oblici atmosferskog kisika. Molekula kisika je u svom osnovnom, tripletnom stanju ($^3\text{O}_2$) inertna molekula (Pevalek-Kozlina 2003). Kisik je slobodni radikal ukoliko ima dva nesparena elektrona istog spina. Ukoliko se ekscitacijska energija s tripletnog stanja klorofila izravno prenese na kisik nastaje singletni kisik ($^1\text{O}_2$). Prijenosom elektrona na molekularni kisik stvaraju se superoksidni radikali ($\cdot\text{O}_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2), ili hidroksilni radikali ($\cdot\text{OH}$) (Mittler 2002, Gill i Tuteja 2010) (Slika 4).

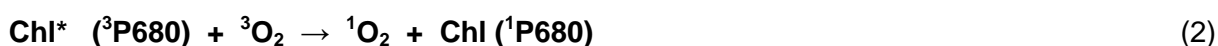


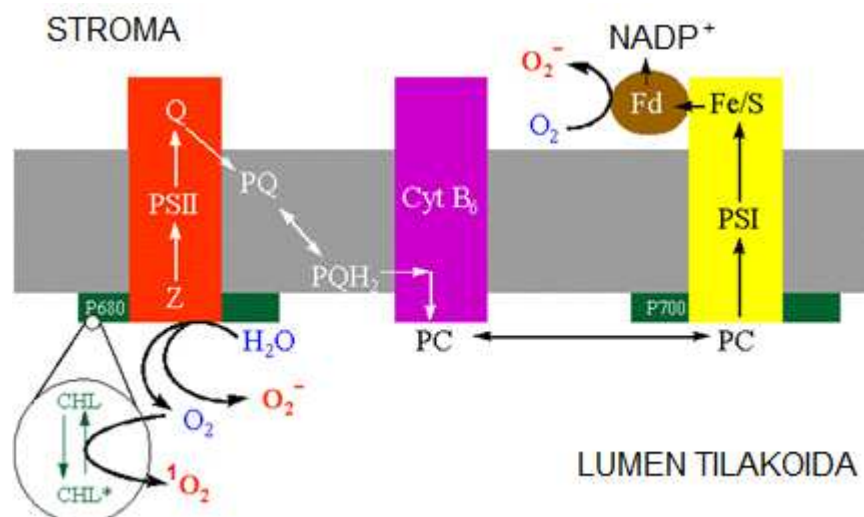
Slika 4. Stvaranje reaktivnih kisikovih jedinaka prijenosom energije/elektrona na molekularni kisik.

Proizvodnja metaboličke energije glavna je aktivnost svih stanica u biljnom organizmu. Kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi su organeli u kojima se odvijaju različiti metabolički procesi oksidacije ili je prisutan izuzetno veliki protok elektrona (Mittler i sur. 2004, Gill i Tuteja 2010). Kloroplasti koriste energiju sunčevog svjetla za proizvodnju ATP-a i redukativnog potencijala koji je potreban za sintezu ugljikohidrata iz CO₂ i H₂O. U mitohondrijima se razgradnjom lipida i ugljikohidrata proizvodi energija. Peroksisomi su organeli koji sadržavaju enzime uključene u različite metaboličke puteve, primjerice za razgradnju masnih kiselina i metabolizam nusprodukata fotosinteze (Cooper i Hausman 2010). Primarna mjesta nastanka ROS-a u uvjetima svjetla u biljnim stanicama su kloroplasti i peroksisomi, dok su u uvjetima tame to mitohondriji.

Glavni izvor ROS-a u biljnim tkivima su reakcijski centri PSI i PSII na tilakoidima kloroplasta, točnije prijenos elektrona ili energije na molekulu kisika (redukcija kisika) tijekom procesa fotosinteze (Arora i sur. 2002).

Singletni kisik (¹O₂) je neuobičajeni ROS jer ne nastaje izravnim prijenosom elektrona na molekularni kisik. Ekscitacija klorofila fotonima svjetlosti te prijenos energije na tripletno stanje kisika dovodi do stvaranja singletnog kisika (Foyer i Noctor 2003, Gill i Tuteja 2010). Ekscitirano singletno stanje klorofila koristi se za prijenos energije i elektrona. Povratak u prvobitno stanje se odvija kroz dva procesa, fluorescencijom i konverzijom u tripletno stanje koje potom u reakciji s ³O₂ daje vrlo reaktivan singletni kisik (1, 2). Izvorno mjesto nastanka singletnog kisika su reakcijski centri klorofila u PSII (Slika 5), a također ¹O₂ nastaje i kao nusprodukt lipoksigenazne aktivnosti. Pokazano je da stvaranje ¹O₂ tijekom fotosinteze izrazito štetno djeluje na PSI i PSII, kao i na cijeli fotosintetski aparat (Arora i sur. 2002).





Slika 5. Stvaranje superoksidnih radikala i singletnog kisika u PSI i PSII kloroplasta (prilagođeno prema Arora 2002).

Superoxidni radikali ($\cdot\text{O}_2^-$) nastaju prijenosom elektrona na kisik (3). Umjereno su reaktivni, no stvaranje ovih radikala potiče daljnje reakcije u kojima nastaju izuzetno reaktivni i štetni radikali poput singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) i hidroksilnog radikala ($\cdot\text{OH}$). Primarni akceptori PSI vezani na tilakoidnim membranama glavno su mjesto stvaranja ovih radikala (reducirani feredoksini reduciraju molekule kisika).

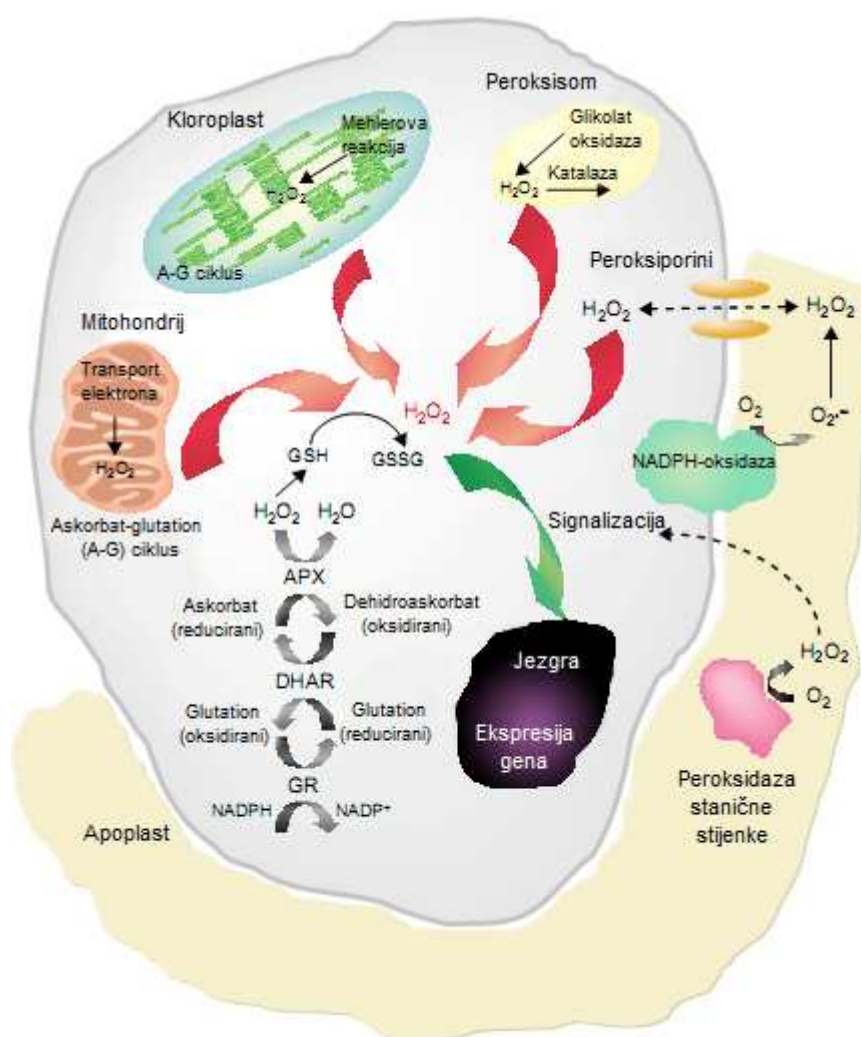


Spontanom dismutacijom superoksidnog radikala nastaje vodikov peroksid (H_2O_2). Reakcija je značajno ubrzana u prisutnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD) kao katalizatora (4). H_2O_2 je umjereno reaktivna molekula s relativno dugim vremenom poluraspada (1 ms), za razliku od ostalih radikala $\cdot\text{O}_2^-$, $^1\text{O}_2$ i $\cdot\text{OH}$ (2 - 4 μs). Suvišak H_2O_2 u biljnim stanicama utječe na pojavu oksidacijskog stresa. Također pri vrlo niskim koncentracijama može inaktivirati enzime oksidirajući njihove sulfhidrilne skupine (Gill i Tuteja 2010).



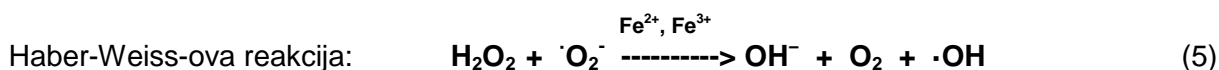
Vodikov peroksid je dugo vremena promatran uglavnom kao toksični stanični metabolit. Ne tako davna istraživanja potvrdila su da je H_2O_2 signalna molekula važna u biljnom odgovoru na različite stresne čimbenike. Tijekom normalnog metabolizma H_2O_2 nastaje Mehler-ovom

reakcijom u kloroplastima, prijenosom elektrona u mitohondrijima i fotorespiracijom u peroksisomima, a stresni čimbenici potiču stvaranje veće količine H_2O_2 . Vodikov peroksid nastaje i enzimatskim reakcijama, primjerice aktivnošću NADPH-oksidadze lokalizirane u plazmatskoj biomembrani, peroksidaznom aktivnošću u staničnoj stijenci (Slika 6), kao i aktivnošću drugih oksidaza primjerice ksantin-oksidadze i amin-oksidadze. H_2O_2 slobodno difundira u stanicama, a prijenos iz apoplasta može biti olakšan prolaskom kroz membranske kanale peroksiporine (Neill i sur. 2002). Pretpostavlja se da i akvaporini mogu služiti za prijenos H_2O_2 (Henzler i Steudle 2000, Borisova i sur. 2012).



Slika 6. Stvaranje i uklanjanje H_2O_2 u biljnoj stanici tijekom normalnog metabolizma (prilagođeno prema Neill i sur. 2002).

Hidroksilni radikali ($\cdot\text{OH}$) su najreaktivnije kemijske vrste odnosno najsnažniji oksidansi. Nastaju reakcijom vodikovog peroksida i superoksidnog radikala u prisutnosti malih količina iona željeza (Fe^{2+} , Fe^{3+}) pri neutralnom pH (Haber-Weiss-ova reakcija) (5). Ione željeza u određenim uvjetima mogu zamijeniti metalni ioni bakra Cu^+ i Cu^{2+} . Hidroksilni radikali iniciraju lipidnu peroksidaciju te oštećuju DNA, proteine i mnoge male molekule (Arora i sur. 2002, Gill i Tuteja 2010). Do sada još nije otkriven specifični antioksidans koji bi uklanjao hidroksilne radikale. Neki od metabolita (npr. urea ili glukoza) u animalnim tkivima imaju ulogu u uklanjanju upravo tih toksičnih radikala, dok u biljaka istu ulogu imaju neki osmoprotektanti kao što je prolin (Matysik i sur. 2002).



Peroksidacija lipida staničnih biomembrana kao i membrana organela poznata je kao najštetniji proces prisutan u živim organizmima koji se odvija kroz tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Prekursori za stvaranje produkata lipidne peroksidacije su polinezasićene masne kiseline (engl. *PolyUnsaturated Fatty Acids*, PUFA), glavne komponente membranskih lipida. Inicijaciju mogu potaknuti H_2O_2 i $\cdot\text{O}_2^-$ no ona ipak započinje uglavnom odvajanjem atoma vodika od molekule prekursora (PUFA) u prisutnosti $\cdot\text{OH}$ pri čemu nastaje organski radikal ($\text{R}\cdot$) i voda (6). U ovoj reakciji prisutni su kompleksi Fe i Cu. U aerobnim uvjetima kisik će vezati lipidne radikale stvarajući tako peroksilne radikale ($\text{ROO}\cdot$) (7). $\text{ROO}\cdot$ će potaknuti lančanu reakciju peroksidacije odvajanjem atoma vodika od susjednih organskih molekula (PUFA) formirajući druge organske radikale (propagacija). Ova lančana reakcija je najštetnija od svih reakcija u kojima sudjeluju reaktivne kisikove jedinice. Lipidni hidroperoksidi (ROOH) (8), nastali kao rezultat ove reakcije, mogu se u prisutnosti iona Fe^{2+} jednostavno pocijepati na različite reaktivne vrste poput lipidnih alkoksilnih radikala ($\text{RO}\cdot$): epoksida, aldehida (primjerice MDA) i alkohola (9). Međusobnom reakcijom nastalih radikala stvaraju se stabilni produkti koji dalje ne mogu nastaviti proces propagacije lančanih reakcija peroksidacije (terminacija) (10-12). Posljedice lipidne peroksidacije su smanjenje fluidnosti biomembrana, povećano propuštanje molekula čiji prijenos u normalnim uvjetima ide specifičnim kanalima, oštećenje membranskih proteina, inaktivacija receptora, enzima i ionskih kanala (Gill i Tuteja 2010).

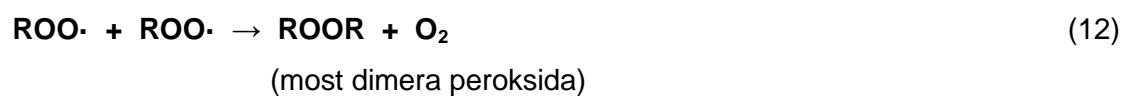
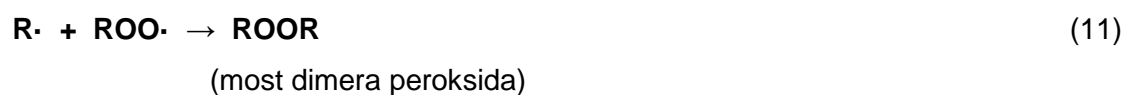
1. INICIJACIJA



2. PROPAGACIJA

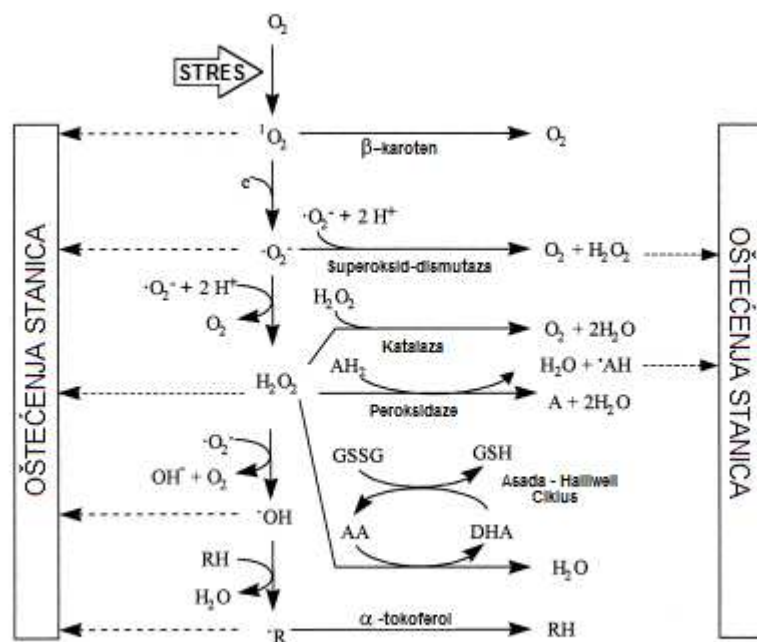


3. TERMINACIJA



1.2.3. Komponente antioksidacijskog odgovora

Izlaganje biljaka nepovoljnim okolišnim uvjetima (temperaturni ekstremi, suša, visoki intenzitet svjetlosti, teški metali, onečišćivači zraka i dr.) za posljedicu ima povećano stvaranje ROS-a ($^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$). Kako bi se zaštitile od toksičnog, oksidacijskog utjecaja tih kisikovih intermedijara biljke su tijekom evolucije razvile učinkovite obrambene mehanizme. Antioksidacijski mehanizmi nisu ograničeni samo na stanične organele, već su prisutni u manjoj mjeri i u citoplazmi i apoplastu. Komponente antioksidacijskog obrambenog sustava dijele se na enzimske i neenzimske antioksidanse. Enzimski antioksidansi uključuju SOD, CAT, GPOX, GPX, APX, MDHAR, DHAR i GR, dok se u neenzimske antioksidanse ubrajaju u vodi topljivi GSH i AA, te karotenoidi i tokoferoli topljivi u lipidima (Slika 7) (Arora i sur. 2002, Gill i Tuteja 2010). Različiti osmoliti, primjerice prolin, također sudjeluju u antioksidacijskom odgovoru (Matysik i sur. 2002). Tablica 1 prikazuje nastanak ROS-a i prisutnost antioksidansa u različitim staničnim odjeljcima.



Slika 7. Enzimске i neenzimske komponente antioksidacijskog sustava u sprječavanju štetnog utjecaja ROS-a (prilagođeno prema Gaspar i sur. 2002).

Tablica 1. Stvaranje ROS-a i prisutnost antioksidacijskih komponenata u različitim staničnim odjeljcima (modificirano prema Mittler 2002).

ROS	Mehanizam	Lokalizacija
PRODUKCIJA		
$\cdot\text{O}_2^-$	Fotosintetski ET, PSI ili PSII	Kloroplast
$\cdot\text{O}_2^-$	Respiracijski ET	Mitochondrij
H_2O_2	Glikolat oksidaza	Peroksisom
$^1\text{O}_2$	Ekscitirani klorofili	Kloroplast
$\cdot\text{O}_2^-$	NADPH oksidaza	Plazmatska membrana
H_2O_2	β -oksidacija masnih kiselina	Peroksisom
H_2O_2	Oksalat oksidaza	Apoplast
$\cdot\text{O}_2^-$	Ksantin oksidaza	Peroksisom
$\text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$	Peroksidaze, Mn^{2+} i NADH	Stanična stijenka
H_2O_2	Amin oksidaze	Apoplast
UKLANJANJE		
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoksid dismutaza	Kloroplast, Citoplazma, Mitochondrij, Peroksisom, Apoplast
H_2O_2	Askorbat peroksidaza	Kloroplast, Citoplazma, Mitochondrij, Peroksisom, Apoplast
H_2O_2	Katalaza	Peroksisom
$\text{H}_2\text{O}_2, \text{ROOH}$	Glutation peroksidaza	Citoplazma
H_2O_2	Peroksidaze	Stanična stijenka, Citoplazma, Vakuola
H_2O_2	Tioredoxin peroksidaze	Kloroplast, Citoplazma, Mitochondrij
$\text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$	Askorbinska kiselina	Kloroplast, Citoplazma, Mitochondrij, Peroksisom, Apoplast
H_2O_2	Glutation	Kloroplast, Citoplazma, Mitochondrij, Peroksisom, Apoplast
$\text{ROOH}, ^1\text{O}_2$	α -tokoferol	Membrane
$^1\text{O}_2$	Karotenoidi	Kloroplast

1.2.3.1. Enzimski antioksidansi

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je najučinkovitiji unutarstanični antioksidacijski enzim prisutan u svim aerobnim organizmima. SOD je metaloenzim koji uklanja superoksidne radikale ($\cdot\text{O}_2^-$) katalizirajući njihovu dismutaciju. Jedan $\cdot\text{O}_2^-$ se reducira stvarajući tako manje reaktivan vodikov peroksid, a drugi oksidacijom formira molekularni kisik (13). Uklanjanje $\cdot\text{O}_2^-$ smanjuje mogućnost stvaranja izuzetno reaktivnih hidroksilnih radikala ($\cdot\text{OH}$) Haber-Weiss-ovom reakcijom. Spontana dismutacija se odvija 10 000 puta sporije. Kod biljaka su prisutne tri izoenzimske forme superoksid dismutaze, klasificirane prema metalu kojeg sadrže u aktivnom centru: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD i Fe-SOD. Mn-SOD prisutan je u mitohondrijima i peroksisomima, Cu/Zn-SOD u kloroplastima i citoplazmi, dok se Fe-SOD, ukoliko je prisutan, može naći samo u kloroplastima (Gill i Tuteja 2010, Pilon i sur. 2011). Svi izoenzimi superoksid dismutaze su kodirani u jezgri.



Katalaza ili $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ -oksidoreduktaza (CAT, EC 1.11.1.6) je enzim koji se sastoji od četiri podjedinice (tetramer), a svaka sadrži atom željeza u aktivnom centru. Katalaza je enzim vrlo velike aktivnosti, jedna molekula katalaze može reducirati ≈ 6 milijuna molekula H_2O_2 do vode i kisika, u jednoj minuti (Gill i Tuteja 2010) (14). U uvjetima oksidacijskog stresa ovaj enzim predstavlja neophodnu komponentu antioksidacijskog sustava. Osim katalaznog, enzim može imati i peroksidacijsko djelovanje koje prevladava pri fiziološkim koncentracijama vodikovog peroksida ($<10^{-6}$ M). R predstavlja neki od mnogih supstrata koji mogu donirati vodik (alkoholi, askorbat, fenoli) (15).

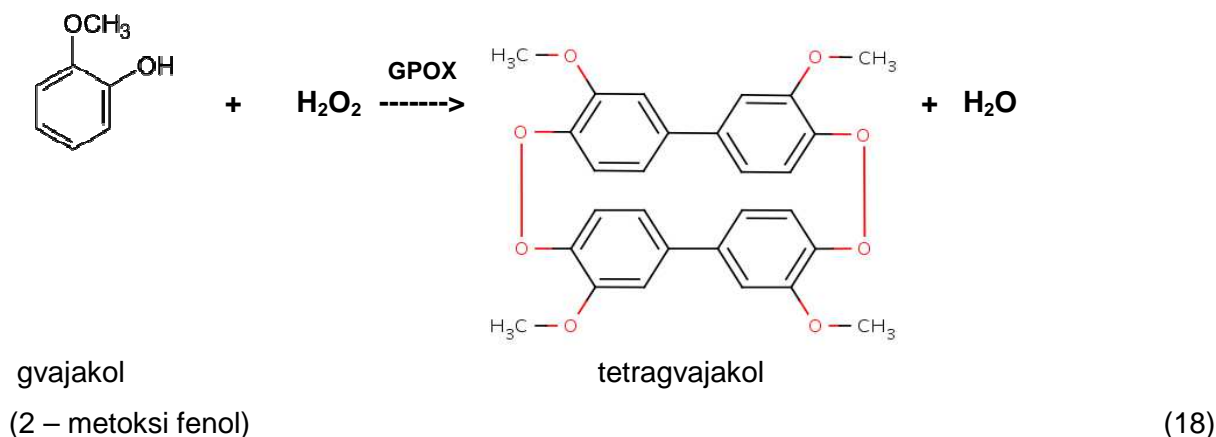


Askorbat-peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11) je također jedan od ključnih antioksidacijskih enzima u viših biljaka. Kao i katalaza, sudjeluje u uklanjanju H_2O_2 nastalog Mehlerovom reakcijom u kloroplastima. APX u askorbat-glutationu ciklusu uklanja H_2O_2 koristeći askorbat kao donor elektrona. Ovom reakcijom nastaje voda i dehidroaskorbat (DHA) (16). Poznato je najmanje pet izoenzima askorbat-peroksidaze, primjerice tilakoidne izoforme (*t*APX),

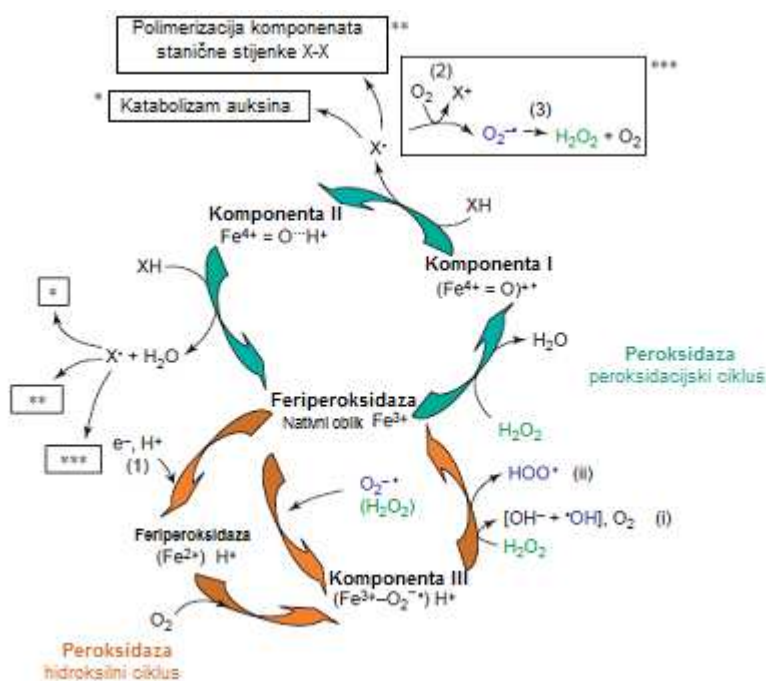
izoforme biomembrana glioksisoma (*gmAPX*), izoforme topljive u stromi kloroplasta (*sAPX*) te citosolne forme (*cAPX*) (Asada 1992, Gill i Tuteja, 2010). APX ima veću sklonost prema H_2O_2 (μM koncentracije) nego CAT ili GPOX (mM koncentracije) i njegova uloga je presudna tijekom stresa (povećana je ekspresija u različitim stresnim uvjetima).



Gvajakol-peroksidaza pripada biljnim peroksidazama skupine III (GPOX, EC 1.11.1.7) koje su uključene u regulaciju mnogih fizioloških procesa (metabolizam stanične stijenke, lignifikacija, suberinizacija, katabolizam auksina, senescencija) te u antioksidacijskom odgovoru u uvjetima stresa (Hiraga i sur. 2001, Mathe i sur. 2010). Peroksidaze su glikoproteini koji u aktivnom centru sadrže Fe, a kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije između H_2O_2 i različitih reduktanata (17). Gvajakol-peroksidaze su sklonije aromatskim donorima elektrona, a gvajakol je najčešće korišteni supstrat za mjerenje aktivnosti enzima. Gvajakol je umjetni supstrat, čijom oksidacijom u prisutnosti H_2O_2 i GPOX nastaje žuto-smeđe obojeni produkt tetragvajakol (18). Još uvijek nije poznato koje su točno specifične funkcije pojedinih peroksidaza, djelomično zbog njihove slabe specifičnosti prema supstratima u uvjetima *in vitro*, a djelomično zbog prisutnosti vrlo velikog broja izoformi u jednoj biljci. Primjerice u vrste *Arabidopsis thaliana* pronađena su 73 gena odgovorna za katalitičku aktivnost ovih enzima (Cosio i Dunand 2009). Od svih postojećih peroksidaza u eukariotskim i prokariotskim organizmima samo su ove biljne peroksidaze skupine III prisutne u toliko velikom broju izoenzimskih formi i pretpostavlja se da je to razlog njihove uključenosti u različite metaboličke procese u stanicama tijekom čitavog životnog ciklusa (od početka klijanja pa sve do senescencije) (Almagro i sur. 2009).

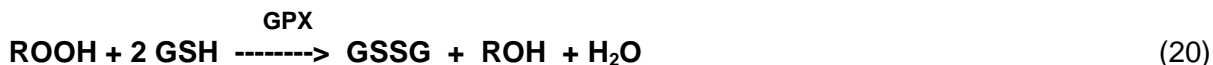
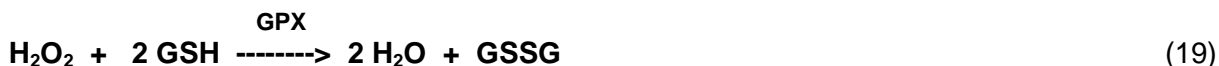


Biljne peroksidaze skupine III osim u peroksidacijskom ciklusu kojim se uklanja H_2O_2 sudjeluju i u hidroksilnom ciklusu pri kojemu se oslobađa ROS (Slika 8). Hidroksilni ciklus započinje konverzijom nativnih peroksidaza u oksifero-peroksidaze, poznate pod nazivom komponente III, što nadalje vodi ka stvaranju $\cdot OH$ (i) i $\cdot OOH$ (ii). Auksin i različite reducirajuće molekule izvor su e^- i H^+ potrebnih u reakcijama ovog ciklusa (1). U peroksidacijskom ciklusu oksidiraju se različiti supstrati ($X\cdot$) koji dalje sudjeluju u katabolizmu auksina*, polimerizaciji stanične stijenke** i oksidaciji $NAD(P)H^{***}$ reakcijama bez katalizatora (2). Oksidacijom $NAD(P)H$ nastaju $\cdot O_2^-$ koji spontano ili pomoću enzima SOD stvaraju H_2O_2 i O_2 (Passardi i sur. 2004, Almagro i sur. 2009).

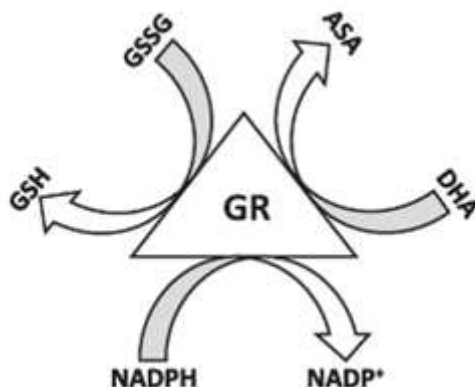
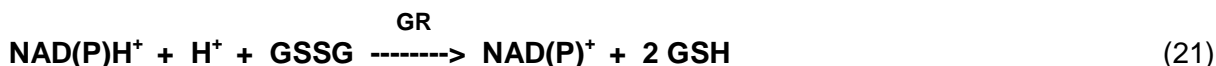


Slika 8. Hidroksilni (narančaste strelice) i peroksidacijski (zelene strelice) ciklus biljnih peroksidaza skupine III (prilagođeno prema Passardi i sur. 2004).

Glutation-peroksidaza ili GSH:H₂O₂-oksidoreduktaza (GPX, EC 1.11.1.9) je enzim koji katalizira redukciju H₂O₂ ili organskih hidroperoksida u prisutnosti reduciranog glutationa (GSH) pri čemu nastaje voda i glutation disulfid (oksidirani glutation) (19, 20) (Gill i Tuteja 2010). Svako aktivno mjesto ovog tetramernog enzima čini atom selena u obliku selenocisteina. Uloga enzima GPX je uklanjanje H₂O₂ ili nekih drugih organskih hidroksiperoksida prisutnih u fiziološkim koncentracijama.

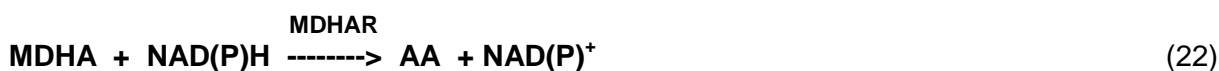


Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je flavoprotein-oksido-reduktaza prisutan pretežno u kloroplastima, a male količine enzima se mogu naći u mitohondrijima i citoplazmi. GR je ključan enzim askorbat-glutation ciklusa (Slika 9) čija važnost se ogleda u održavanju reduciranog glutationa (GSH) u stanici. GSH sprječava oksidacijski stres zavaljujući svojoj sulfhidrilnoj skupini. Oksidirani glutation (GSSG) se sastoji od dvije molekule GSH međusobno spojene disulfidnim mostom. U prisutnosti NAD(P)H enzim GR katalizira reakciju redukcije oksidiranog GSSG u reducirani GSH (21) (Gill i Tuteja 2010).



Slika 9. Glutation-reduktaza u održavanju staničnih redoks sustava (Gill i Tuteja 2010).

Monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR, EC 1.6.5.4) je flavin-adenin-dinukleotid (FAD) enzim prisutan u kloroplastima i citoplazmi. Katalizira redukciju monodehidroaskorbata (MDHA) u askorbat, u prisutnosti NAD(P)H kao donora elektrona (22). Uz APX MDHAR je smješten i u mitohondrijima i peroksisomima gdje zajedno sudjeluju u uklanjanju H_2O_2 (Gill i Tuteja 2010).

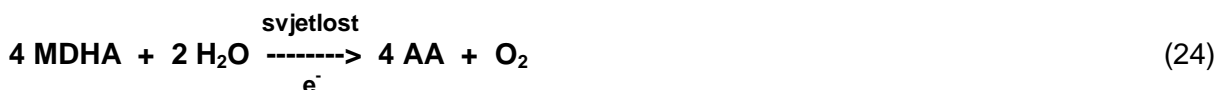


Dehidroaskorbat-reduktaza ili askorbat-glutation-dehidrogenaza (DHAR, EC 1.8.5.1) sudjeluje u regeneraciji askorbinske kiseline (AA) katalizirajući redukciju oksidiranog oblika askorbinske kiseline (dehidroaskorbata, DHA), uz glutation kao molekulu koja donira elektron (23) (Yanxia i sur. 2010). Na taj način regulira održavanje reduciranog askorbata u stanicama, ključnog u mehanizmima tolerancije u različitim stresnim uvjetima koji vode ka stvaranju reaktivnih kisikovih radikala.



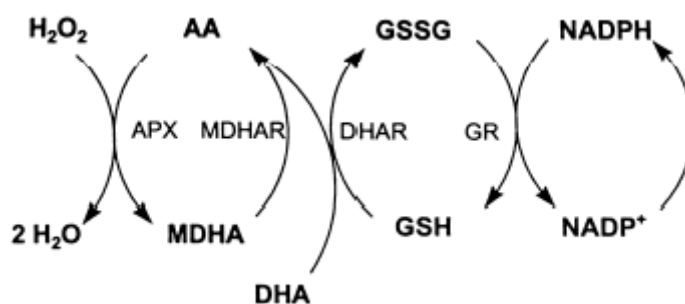
1.2.3.2. Neenzimski antioksidansi

Askorbinska kiselina (AA, Vitamin C) je izuzetno snažan i obilno zastupljen antioksidans u biljnim stanicama. Sudjeluje u sprječavanju ili smanjivanju toksičnog utjecaja reaktivnih kisikovih jedinki. Topiv je u vodi. Prisutan je u svim biljnim tkivima, a naročito u fotosintetskim stanicama, meristemima i nekim plodovima. Veća koncentracija zabilježena je u odraslim listovima s potpuno razvijenim kloroplastima i s više klorofila (Gill i Tuteja 2010). U normalnim fiziološkim uvjetima askorbinska kiselina (AA) se nalazi u reduciranom obliku u milimolarnim koncentracijama, u fotosintetskim i nefotosintetskim tkivima (Noctor i Foyer 1998). Biljni mitohondriji sintetiziraju AA pomoću L-galaktono- γ -laktonehidrogenaze i sudjeluju u regeneraciji AA iz oksidiranog oblika. Postupak regeneracije je izuzetno važan proces zbog nestabilnosti oksidiranog oblika askorbinske kiseline (DHA) i u slučaju da nema povratne redukcije potpuno bi se razgradio. Redukciju kataliziraju enzimi MDHAR i DHAR (22, 23). MDHA je vrlo učinkovit primatelj elektrona i može se reducirati direktno u askorbat koristeći elektrone iz fotosintetskog transportnog lanca elektrona (24) (Arora i sur. 2002).



AA ima važnu ulogu u askorbat-glutation ciklusu (Asada-Halliwell ciklus) (Slika 10). AA u brojnim reakcijama služi kao značajan donor elektrona. Sposobnost direktnog uklanjanja $^1\text{O}_2$ i $\cdot\text{OH}$ (Saruhan i sur. 2009) kao i regeneracije α -tokoferola iz tokoferoksilnih radikala osigurava dobru zaštitu biomembrana. U kloroplastima služi kao kofaktor enzima violaksantin-deepoksidaze podržavajući time reakciju pretvorbe viška eksitacijske energije u

toplinsku (Arora i sur. 2002, Gill i Tuteja 2010). Askorbat sudjeluje u mnogim procesima, primjerice tijekom elongacije korijena, rasta stanične stijenke, tijekom lignifikacije itd. Također sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa time što smanjena količina askorbata u meristemima zaustavlja stanice u G1 fazi (Noctor i Foyer 1998).

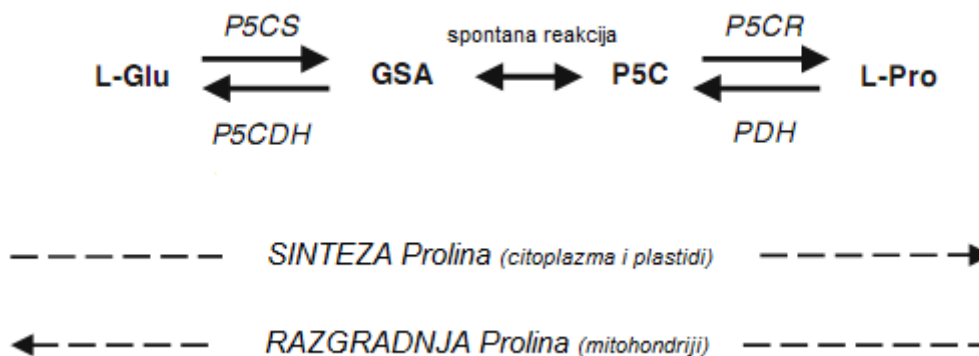


Slika 10. Askorbat-glutation ciklus (May i sur. 1998.);

(AA: Askorbat, APX: Askorbat-peroksidaza, GSH: Reducirani glutation, GSSG: Oksidirani glutation, GR: Glutation-reduktaza, DHA: Dehidroaskorbat, DHAR: Dehidroaskorbat-reduktaza, MDHA: Monodehidroaskorbat, MDHAR: Monodehidroaskorbat-reduktaza).

Reducirani oblik glutationa (GSH) je tripeptid (γ -glu-cys-gly) niske molekularne mase koji u većine biljaka predstavlja glavnu tiolnu komponentu. Transport sulfata, prijenos signala, konjugacija metabolita i detoksifikacija ksenobiotika samo su neki od fizioloških procesa u kojima GSH ima središnju ulogu. Također sudjeluje u staničnoj diferencijaciji, senescenciji i staničnoj smrti te u obrani od različitih patogena (Noctor i Foyer 1998, Gill i Tuteja 2010). Biosinteza glutationa se odvija u dva koraka ovisna o ATP-u. U prvom koraku glutamat-cistein-ligaza (GCL) katalizira formiranje γ -glutamilcisteina, dok u drugom glutation-sintetaza dodaje glicin (Gly). GSH je supstrat za stvaranje GSSG (oksidiranog glutationa) u različitim staničnim procesima. Sve biljne stanice nastoje održati visok omjer GSH/GSSG. Glutation se pretežno nalazi u reduciranom obliku (GSH) i potencijalna je komponenta važna za uklanjanje $^1\text{O}_2$, H_2O_2 i $\cdot\text{OH}$. GSH ima ključnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru zbog sposobnosti regeneracije askorbata u askorbat-glutation ciklusu, reakcijom koju katalizira DHAR (23). GSSH koji nastaje kao produkt te reakcije relativno brzo se reducira u GSH NAD(P)H-ovisnom reakcijom koju katalizira glutation reduktaza (GR) (21). Pod utjecajem stresnih čimbenika povećava se količina oksidiranog glutationa (GSSG) što dovodi do poremećaja u metabolizmu (Tausz i sur. 2004).

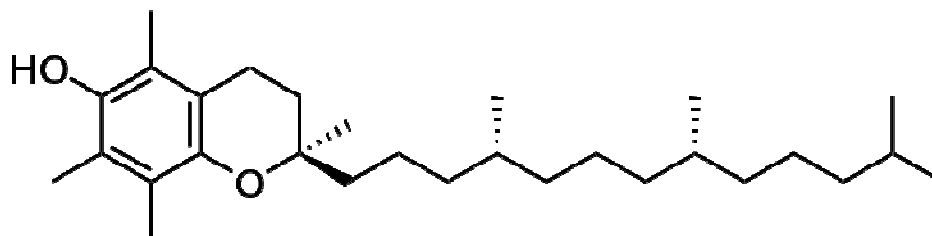
Prolin (Pro) je aminokiselina uključena u niz metaboličkih procesa, osmolit je, stabilizator proteina, kelator metala, inhibitor lipidne peroksidacije, a sudjeluje i u antioksidacijskom odgovoru kao jedan od neenzimskih antioksidansa uklanjajući $^1\text{O}_2$ i $\cdot\text{OH}$. U normalnim fiziološkim uvjetima prolin čini manje od 5 % ukupnog pula slobodnih aminokiselina u biljci, dok ta količina tijekom stresa može porasti i preko 80 %. L-prolin se u biljaka sintetizira iz L-glutaminske kiseline preko pirolin-5-karboksilata (P5C) u reakcijama koje kataliziraju enzimi pirolin-5-karboksilat sintetaza (P5CS) i pirolin-5-karboksilat reduktaza (P5CR). P5CS je bifunkcionalan enzim koji prvo katalizira aktivaciju glutamata fosforilacijom, a zatim reducira nastali međuprodukt γ -glutamil fosfat u glutamat semialdehid (GSA). Spontanom ciklizacijom dalje nastaje pirolin-5-karboksilat (P5C). Redukcijom P5C nastaje L-prolin u reakciji koju katalizira enzim P5CR. Metabolički put sinteze prolina prisutan je u citoplazmi i plastidima. U procesu razgradnje prolina do glutaminske kiseline, koji se odvija u mitohondrijima, sudjeluju enzimi prolin dehidrogenaza (PDH) i pirolin-5-karboksilat dehidrogenaza (P5CDH) (Slika 11). Prolin se može sintetizirati i alternativnim putem iz ornitina, preko ornitin- δ -aminotransferaze (δ -OAT), no taj put je manje poznat (Matysik i sur. 2002, Verbruggen i Hermans 2008).



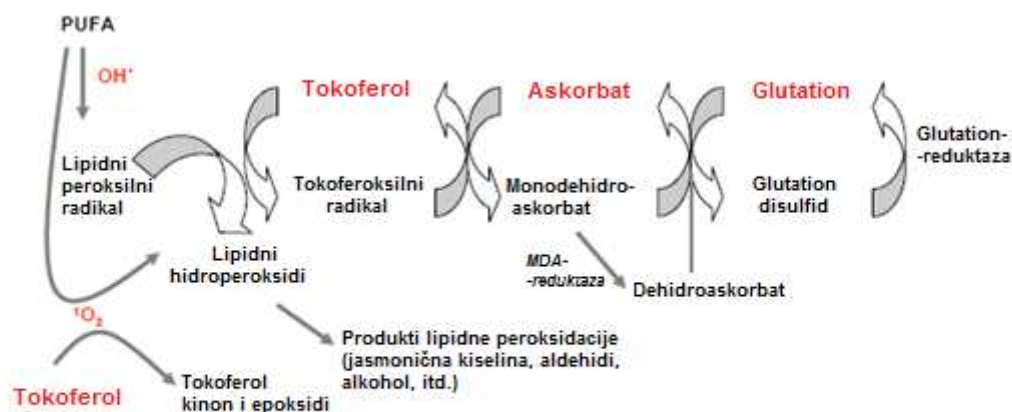
Slika 11. Metabolički putevi sinteze i razgradnje prolina u biljkama (prilagođeno prema Verbruggen i Hermans 2008).

α -tokoferoli su značajni neenzimski antioksidansi topljivi u lipidima. Od četiri prirodna izomera tokoferola (α , β , γ i δ) α -tokoferoli imaju najsnažniju antioksidacijsku aktivnost zbog prisutnosti tri metilne skupine na aromatskom prstenu (Slika 12). Uz ostale antioksidanse (Slika 13) sudjeluju u uklanjanju $^1\text{O}_2$ u fotosintetskim membranama i lipidnih radikala sprječavajući propagaciju lipidne peroksidacije u kloroplastima. Jedna molekula α -tokoferola može ukloniti i do 120 molekula $^1\text{O}_2$ (Munné-Bosch 2005). Molekule $^1\text{O}_2$ primarno nastaju u

reakcijskim centrima fotosustava II i predstavljaju okidač za degradaciju D1 proteina. Prema tome, funkcija α -tokoferola izuzetno je važna u održavanju strukture i funkcije fotosustava II (Trebst i sur. 2002, Kruk i sur. 2005).



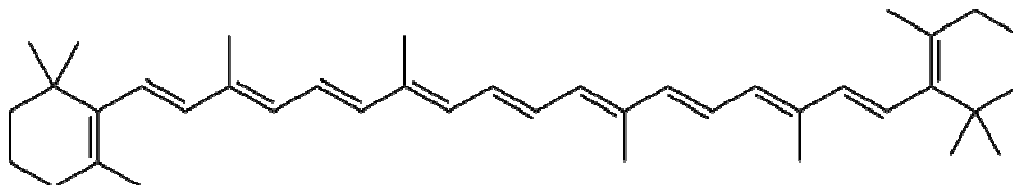
Slika 12. Struktura molekule α -tokoferola.



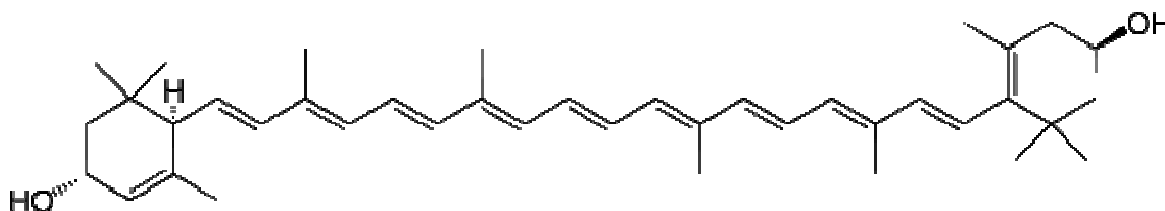
Slika 13. Shematski prikaz uloge α -tokoferola u uklanjanju ROS-a i interakcija između α -tokoferola, askorbata i glutationa u sprječavanju lipidne peroksidacije u kloroplastima (prilagođeno prema Munné-Bosch 2005).

Karotenoidi su pigmenti pronađeni u biljkama i mikroorganizmima. U prirodi ih ima preko 600. Ključni karoteni funkcionalnih kloroplasta u viših biljaka i zelenih alga su β -karoteni (Slika 14) i ksantofili: lutein (Slika 15), violaksantin i neoksantin (Lichtenthaler 1987). Po svojoj strukturi su izoprenoidi. Kao i α -tokoferoli topljivi su u lipidima. Tri su glavne funkcije karotenoida u biljnim organizmima: a) apsorpcija svjetlosti između 400 i 500 nm valne duljine i prijenos do klorofila, b) antioksidacijska funkcija - gašenje tripletnog stanja klorofila, pri čemu se energija

oslobađa u obliku topline, te uklanjanje $^1\text{O}_2$ i drugih slobodnih radikala nastalih unutar fotosintetskog aparata i c) održavanje stabilnosti LHC proteina (engl. *Light Harvesting Complex*, LHC) i tilakoidnih membrana (Niyogi i sur. 2001, Gill i Tuteja 2010).



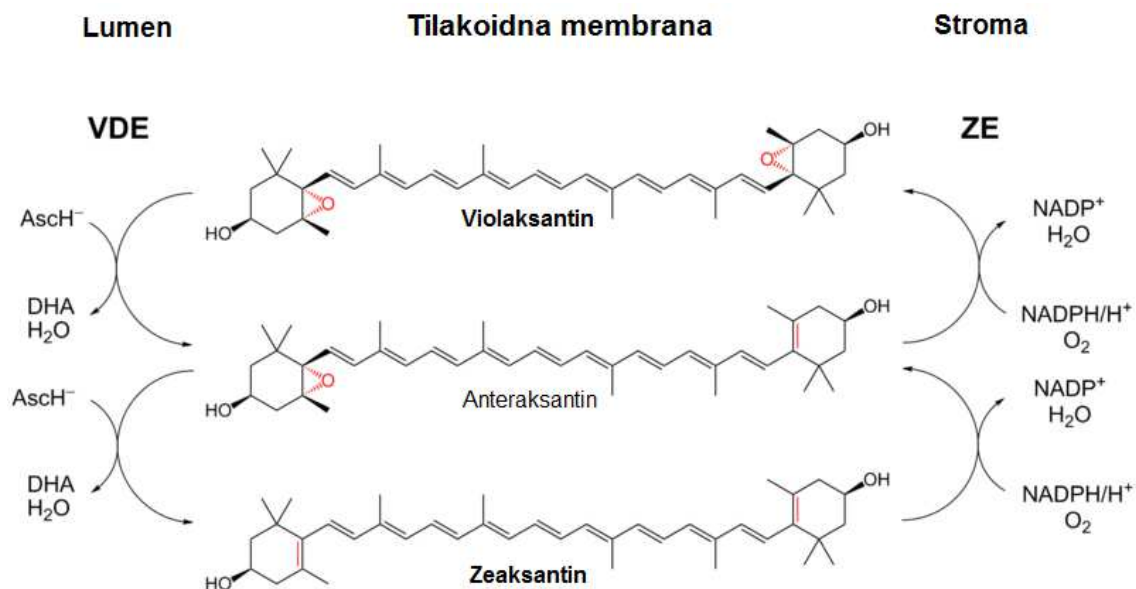
Slika 14. Struktura molekule β -karotena.



Slika 15. Struktura molekule luteina.

Karotenoiodi su glavne komponente fotokemijski aktivnih tilakoida kloroplasta. Sudjeluju u disipaciji suviška ekscitacijske energije u obliku topline, tj. nefotokemijskom gašenju fluorescencije klorofila *a* (engl. *Non-Photochemical Quenching*, NPQ) (Heldt 1999). Pretvorba eksitacijske energije u toplinu predstavlja jedan od glavnih procesa kojim se biljke štite od fotoinhibicije, a reguliran je ksantofilskim ciklusom (Slika 16). U viših biljaka tri su ključna pigmenta u ovom ciklusu, violaksantin, anteraksantin i zeaksantin. Uklanjanjem epoksidne skupine violaksantina nastaje deepoksidirani zeaksantin, preko međuprodukta anteraksantina. Reakciju, koja se odvija u lumenu tilakoida pri niskom pH, katalizira enzim violaksantin-deepoksidaza (VDE). Protonski gradijent uspostavljen u transportnom lancu elektrona snižava pH čime se aktivira enzim VDE. Violaksantin sudjeluje u sakupljanju svjetlosti i prijenosu energije na klorofil *a* i reakcijske centre. Zeaksantin primljenu energiju emitira u obliku topline sprječavajući time oštećenja fotosintetskog aparata. Reverzibilni proces regeneracije violaksantina odvija se u stromi kloroplasta pri višim pH vrijednostima, reakcijom koju katalizira enzim zeaksantin-epoksidaza (ZE) uz utrošak NADPH i kisika (Wright i DeLong 2011).

Ksantofilski ciklus se općenito povezuje s visokim intenzitetom svjetlosti, no Wright i DeLong (2011) su u svom radu pokazali da je ksantofilski ciklus aktivan i pri vrlo niskom intenzitetu svjetlosti i u uvjetima smanjene količine kisika.



Slika 16. Shematski prikaz ksantofilskog ciklusa.

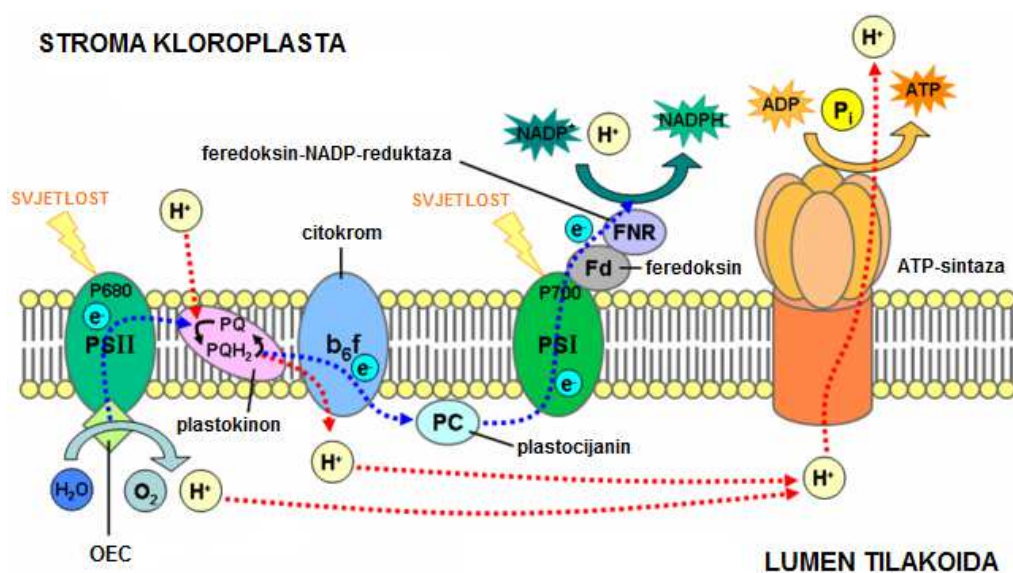
1.2.4. Fotosinteza i fluorescencija klorofila a

Fotosinteza je proces u kojem pigmenti fotosintetski aktivnih organizama apsorbiraju svjetlosnu energiju i pretvaraju ju u kemijsku energiju, koja se pohranjuje u kemijskim vezama šećera i ostalih organskih molekula nastalih iz CO₂ i H₂O. U svjetlosnim reakcijama fotosinteze oksidira se voda i otpušta kisik, te nastaje ATP i NADPH, koji će u Calvinovom ciklusu služiti kao izvor energije i visokoenergiziranih elektrona za redukciju CO₂ do organskih spojeva. Svjetlosne reakcije odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta, dok se procesi Calvinova ciklusa odvijaju u stromi kloroplasta (Cooper i Hausman 2010).

Kloroplasti sadrže vlastitu DNA, RNA i ribosome. Brojne kloroplastne proteine od ključnog značenja za fotosintezu kodira kloroplastna DNA, dok neke kodira nuklearna DNA (primjerice plastocijanin). Enzim RubisCO zaslužan je za fiksaciju CO₂. Najčešći oblik enzima ima dvije vrste podjedinica: 8 velikih i 8 malih podjedinica. Velike podjedinice (engl. *Large SubUnits*, LSU), 50 - 55 kDa, kodirane su u kloroplastnoj DNA. Male podjedinice (engl. *Small SubUnits*, SSU), 12 - 18 kDa, kodirane su u nuklearnoj DNA, sintetizirane u citoplazmi i unesene u kloroplaste. LSU ima glavnu katalitičku funkciju enzima (Andersson i Backlund 2008). Funkcija malih podjedinica nije potpuno jasna, iako se pretpostavlja da i one, na još nepoznati način, doprinose kinetičkim mogućnostima i specifičnostima RubisCO-a (Spreitzer 2003, Genkov i Spreitzer 2009). Proteini D1 i D2 (32 - 34 kDa), najvažniji među proteinima reakcijskih središta fotosustava II, kodirani su u kloroplastnoj DNA (Mattoo sur. 1999, Edelman i Mattoo 2008).

Različiti proteini nužni u fotosintezi (reakcijska središta fotosustava, kompleksi antenskih pigmentata i proteina i većina enzima za prijenos elektrona) uronjeni su u lipidni dvosloj tilakoidnih membrana ili su prislonjeni uz tilakoidne membrane (Slika 17). Fotosintetske reakcije na svjetlu uključuju nekoliko proteinskih kompleksa, fotosustav I i fotosustav II (PSI i PSII), citokrom *bf* kompleks i ATP-sintazu. Fotosustavi su kompleksi proteina i fotosintetskih pigmentata. Svaki pojedini fotosustav sastoji se od reakcijskog središta i antena kompleksa. U reakcijskim središtima fotosustava odvijaju se primarne reakcije fotosinteze, dok antena kompleksi apsorbiraju fotone svjetlosti i prenose energiju pobuđenih elektrona do klorofila u reakcijskom središtu. Vanjski dio antena kompleksa (engl. *Light-Harvesting Complex*, LHC) kodiran je jezgrinim genima i ima funkciju prikupljanja fotona svjetlosti, dok unutarnji dio čini "core-complex", čija je funkcija prijenos ekscitona u reakcijsko središte fotosustava (Heldt 1999). Fotoliza vode pri čemu se oslobađaju kisik i protoni se događa u PSII. Ekstrakcija kisika iz vode odvija se pomoću specifičnog kompleksa (engl. *Oxygen-Evolving Complex*,

OEC) smještenog u PSII. Dva fotosustava povezana su citokrom *bf* kompleksom i mobilnim nosačima elektrona (plastokinon (PQ) i plastocijanin (PC)). Prijenos visokoenergiziranih elektrona od PSII, preko nosača, do PSI povezan je s transtilakoidnim prijenosom protona u lumen tilakoida. Uspostavljeni gradijent protona sadrži pohranjenu energiju koju koristi ATP-sintaza za sintezu ATP-a. Prema tome, PSII zaslužan je za proizvodnju ATP-a, dok se važnost PSI ogleda u stvaranju NADPH (Cooper i Hausman 2010). PSI prenosi elektrone s PC smještenog u tilakoidnom lumenu do feredoksina (Fd) u stromi kloroplasta. Fd u reduciranom obliku (Fd_{red}) osigurava elektrone za feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktazu (FNR), enzim koji katalizira reakciju stvaranja NADPH necikličkim putem elektrona, za feredoksin-tioreduktazu (FTR) koji katalizira redukciju kloroplastnih tioredoksina, kao i za pokretanje cikličkog puta elektrona za kojeg je potreban samo PSI. Elektroni također mogu putovati na molekularni kisik, kao jedan od alternativnih akceptora elektrona, stvarajući pri tome O_2^- pseudocikličkim putem (Allen 2003, Jurić i sur. 2009).



Slika 17. Shematski prikaz fotosintetskih reakcija koje se odvijaju na svjetlu

(http://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent_reactions).

Nedavno je kloniran i molekularno okarakteriziran integralni protein fotosintetskih membrana sličan rodanazama (engl. *Thylakoid Rhodanese-Like*, TROL). TROL je smješten u blizini PSI i za njega se veže ranije spomenuti enzim FNR. TROL je građen od nekoliko domena koje imaju različitu ulogu u prijenosu elektrona. Rodanazna domena (RHO) sudjeluje u metabolizmu sumpora, a ITEP domena u vezivanju FNR-a. Međusobno ih povezuje PEPE domena bogata prolinom, koja najvjerojatnije ima regulatornu ulogu u dinamičkom procesu

vezivanja/otpuštanja flavoenzima FNR-a. Interakcija TROL-FNR pokazala se važnom u održavanju učinkovitog necikličkog puta elektrona kao i pri indukciji NPQ-a (Jurić i sur. 2009). Svjetlosna energija koju apsorbiraju molekule klorofila *a* potiče fotokemijske reakcije u procesu fotosinteze. Višak energije rasipa se u obliku topline ili se emitira u obliku fotona crvene svjetlosti. Energija oslobođena u obliku svjetlosti naziva se fluorescencijom klorofila *a*. Ova tri energetska procesa međusobno su kompetitivna. Ukoliko se učinkovitost jednog poveća, učinkovitost drugih se smanjuje. Prema tome, mjerenjem fluorescencije klorofila *a* mogu se dobiti informacije o promjenama učinkovitosti fotokemijskih procesa i disipaciji energije u obliku topline. U svom radu Maxwell i Johnson (2000) navode da su Kautsky i suradnici otkrili promjene u fluorescenciji prilikom prijenosa fotosintetskog materijala iz tame na svjetlo. Uočili su porast fluorescencije koji je dostigao maksimum nakon ≈ 1 s, a posljedica je progresivnog zatvaranja reakcijskih središta PSII. Kada se spominju promjene fluorescencije, u literaturi se koriste različiti izrazi: engl. "Kautsky effect", "Kautsky transient", "fluorescence induction", "fluorescence transient".

Dva su osnovna tipa fluorometara pomoću kojih se, na osnovu promjena u kinetici fluorescencije klorofila *a*, kvalitativno i kvantitativno analizira proces fotosinteze. PAM (engl. *Pulse-Amplitude-Modulation*) fluorometri mjere fluorescenciju induciranu moduliranom svjetlošću (Schreiber 2004). PEA (engl. *Plant Efficiency Analyser*) fluorometri mjere fluorescenciju induciranu kontinuiranom svjetlošću. S obzirom da se promjene fluorescencije prate tijekom 1 s često se koristi naziv "brza" fluorescencija (Strasser i sur. 2000). Unatoč različitim prednostima i ograničenjima ovih fluorometara, podaci dobiveni njihovom primjenom ne bi trebali biti kontradiktorni (Strasser i sur. 2004).

Polifazni rast intenziteta fluorescencije pod utjecajem saturacijskog pulsa (PEA fluorometar) sličan je kod različitih fotosintetskih organizama i pokazuje osnovna svojstva PSII, ili točnije nakupljanje reduciranog oblika Q_A (Schreiber 2004). Porast fluorescencije od F_0 (minimalna fluorescencija - Q_A potpuno oksidiran) do F_m (maksimalna fluorescencija) sastoji se od nekoliko stupnjeva koji se označavaju različitim slovima abecede: O (inicijalni stupanj – intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s), J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms), I (intenzitet fluorescencije nakon 30 ms) i P (maksimalna fluorescencija - F_m) (Slika 4 u poglavlju 2.9). U određenim uvjetima se mogu pojaviti i dodatni stupnjevi (K, G, H) (Strasser i sur. 2004). Brojni istraživači slažu se oko tumačenja kako porast fluorescencije od O do J stupnja odgovara fotokemijskoj redukciji primarnog akceptora elektrona u PSII (Q_A), no faze porasta od J do I, te od I do P stupnja još uvijek nisu u potpunosti jasne (Joly i Carpentier 2007). Za kvantitativnu analizu O-J-I-P porasta fluorescencije koristi se "OJIP" test (Strasser i Strasser 1995). Parametri OJIP testa opisuju protok energije i elektrona u fotosintetskom aparatu.

Apsorpcijom fotona (ABS) molekule klorofila prelaze u ekscitirano stanje (Chl^*). Jedan dio ekscitacijske energije se disipira (DI), dok se drugi dio prenosi do reakcijskog središta u kojem dolazi do odvajanja naboja i redukcije Q_A , u procesu koji se označava kao hvatanje ekscitona (TR) (od engl. "trapping"). Elektron se s Q_A^- prenosi na Q_B i ostale nosače u elektron-transportnom lancu. Transport elektrona (ET) u konačnici vodi ka fiksaciji CO_2 . ABS, TR, DI i ET moguće je izraziti po aktivnom reakcijskom središtu (engl. "Reaction Center", RC) ili po ekscitiranoj površini (engl. "Cross Section", CS) (Strasser i sur. 2000). Podaci za izračunavanje i parametri OJIP testa opisani su u Tablici 2 poglavlja 2.9.

Razlika između maksimalnog (F_m) i minimalnog (F_0) intenziteta fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom (F_v). Omjer varijabilne fluorescencije i maksimalnog intenziteta fluorescencije (F_v/F_m) predstavlja maksimalni kvantni prinos PSII, odnosno maksimalnu učinkovitost PSII. F_v/F_m koristi se kao indikator ukupne fotosintetske učinkovitosti, čija optimalna vrijednost iznosi oko 0,83 kod većine biljnih vrsta. Niže vrijednosti izmjerene su uslijed djelovanja stresa (Maxwell i Johnson 2000). Ipak, istraživanja su pokazala da F_v/F_m nije primjeren za uočavanje ranih promjena tijekom stresa, s obzirom da ovaj parametar daje informacije samo o primarnom fotokemijskom događaju. Indeks fotosintetske učinkovitosti (engl. "Performance Index", PI_{ABS}), često nazivan i indeksom vitalnosti, pokazao se kao jedan od, ako ne i najbolji parametar jer može detektirati stres prije pojave vidljivih simptoma (Christen i sur. 2007). Značajnost ovom parametru daju ključni procesi o kojima ovisi fotosintetska aktivnost: ABS, TR i ET.

Unatoč činjenici da se samo 1 do 2 % od ukupne apsorbirane svjetlosti emitira u obliku fluorescencije klorofila *a* ova metoda daje interesantne podatke i postala je jedna od značajnijih i najraširenijih metoda u istraživanju fotosinteze. Promjena fiziološkog stanja biljnog organizma odražava se i na promjenu u fluorescenciji klorofila *a* (Strasser i sur. 2000). Osim u fundamentalnim istraživanjima fotosintetskog aparata tijekom razvojnih procesa (Pospíšil i Dau 2000, Joly i Carpentier 2007, Jurić i sur. 2009, Lepeduš i sur. 2010, Lepeduš i sur. 2011, Brcko i sur. 2012, Katanić i sur. 2012), značajna je primjena mjerenja fluorescencije klorofila *a* u istraživanjima utjecaja različitih abiotičkih i biotičkih čimbenika stresa na biljke (Strasser i sur. 2000). Brojna dosadašnja istraživanja pokazala su promjene u fotosintetskoj učinkovitosti uzrokovane utjecajem suše (Kocheva i sur. 2005, Correia i sur. 2006, Oukarroum i sur. 2007, Mishra i sur. 2011), smanjenim ili povećanim intenzitetom svjetlosti (Rosenqvist 2001, Krause i sur. 2012), visokim temperaturama (Sun i sur. 2007), solnim stresom (Misra i sur. 2001, Radić i sur. 2013), djelovanjem teških metala (Vassilev i Manolov 1999, Appenroth i sur. 2001), onečišćivača zraka (Lepeduš i sur. 2005) i drugih abiotičkih čimbenika.

1.2.5. Fiziološke posljedice stresa izazvanog manjkom vode i tolerancija na sušu

Biljke su tijekom svog života u prirodi izložene različitim okolišnim čimbenicima koji utječu na rast, metabolizam i prinos. Temperaturni ekstremi, promjene vodnog statusa, visoki intenzitet svjetlosti i različiti zagađivači najvažniji su stresni čimbenici koji ograničavaju produktivnost biljaka (Lawlor 2002). Nedostatak vode tijekom duljeg vremenskog perioda naziva se sušom. Suša je jedan od najvažnijih abiotičkih čimbenika stresa u biljaka i predstavlja složeni oblik stresa koji utječe na različite metaboličke procese (fiziološke, biokemijske i molekularne) na razini cijele biljke, u gotovo svim biljnim organima i staničnim odjeljcima (Yordanov i sur. 2000, Wood 2005).

Zatvaranje puči i inhibicija rasta su procesi koji se tijekom suše najranije aktiviraju. Na taj način štite biljku od daljnjeg gubitka vode, koji bi nakon određenog vremena mogao biljku dovesti do stanične smrti. Mehanizam gibanja puči rezultat je promjena turgora stanica zapornica, u odnosu na okolne epidermalne stanice. Apscizinska kiselina (ABA) je kemijski signal koji se sintetizira u korijenu, kao odgovor na isušivanje tla, putuje ksilemom do lista i potiče zatvaranje puči (Davies i Zhang 1991). Mehanizam gibanja puči nije jednostavno objasniti u pojedinačnim stresnim uvjetima jer, primjerice, biljka zatvaranjem puči reagira na nedostatak vode, ali i na visoke temperature (Chaves i sur. 2003). Zatvaranjem puči zaustavlja se izmjena plinova, što direktno utječe na fotosintetske procese u kloroplastima. Nedovoljna količina CO_2 zaustavlja procese Calvinova ciklusa odnosno smanjuje se aktivnost RubisCO-a. U uvjetima nedostatka vode dolazi do prekomjerne redukcije NADP^+ koji je konačni akceptor elektrona u PSI, a tok elektrona se preusmjerava na alternativne akceptore od kojih je najznačajniji kisik. Pri tome nastaje O_2^- , a potom i ostali oblici ROS-a. Stvaranjem ROS-a aktiviraju se enzimi i akumuliraju neenzimske komponente antioksidacijskog odgovora, na što ukazuju brojna istraživanja (Reddy i sur. 2004).

Gubitak vode transpiracijom i primanje vode iz tla su procesi koji sudjeluju u regulaciji sadržaja vode u stanici, odnosno u cijeloj biljci. U trenutku kada proces transpiracije postane intenzivniji od procesa apsorpcije, uslijed izlaženja vode opada turgor, smanjuje se volumen stanice i povećava koncentracija otopljenih tvari u stanici (Lawlor i Cornic 2002). Relativni sadržaj vode u listu (engl. *Relative Water Content*, RWC) često je korišten kao indikator vodnog deficita odnosno mjerilo stresa. Brojna istraživanja pokazala su smanjeni RWC tijekom izlaganja suši u listovima pšenice (Zhang i sur. 2004, Keles i Öncel 2004), ječma

(Kocheva i sur. 2004, Oukarroum 2007), kukuruza (Bai i sur. 2006), uročnjaka (Sperdouli i Moustakas 2012), planike (Munné-Bosch i Peñuelas 2004) i mnogih drugih vrsta.

Brojna konduktometrijska mjerenja količine elektrolita u stanicama (engl. *Electrolyte Leakage*, EL), kao i povećana razina lipidne peroksidacije pokazuju oštećenja biomembrana u uvjetima suše (Türkan i sur. 2005, Nayyar i Gupta 2006). Filek i sur. (2012) su upravo ova dva parametra odabrali kao dobar kriterij za selekciju genotipova pšenice tolerantnih na stres potaknut sušom i salinitetom. Nayyar i Gupta (2006) su pokazali razlike u RWC-u, EL-u i lipidnoj peroksidaciji između C₃ i C₄ biljaka u uvjetima suše, na primjeru pšenice odnosno kukuruza. Povećanjem stresa u oba tipa biljaka pokazano je smanjivanje RWC-a, praćeno povećanim oštećenjem biomembrana / lipidnom peroksidacijom. Ipak, veći stupanj oštećenja pokazan je kod pšenice, što potvrđuje ranije tvrdnje da su C₄ biljke bolje prilagođene nedostatku vode (Ward i sur. 1999).

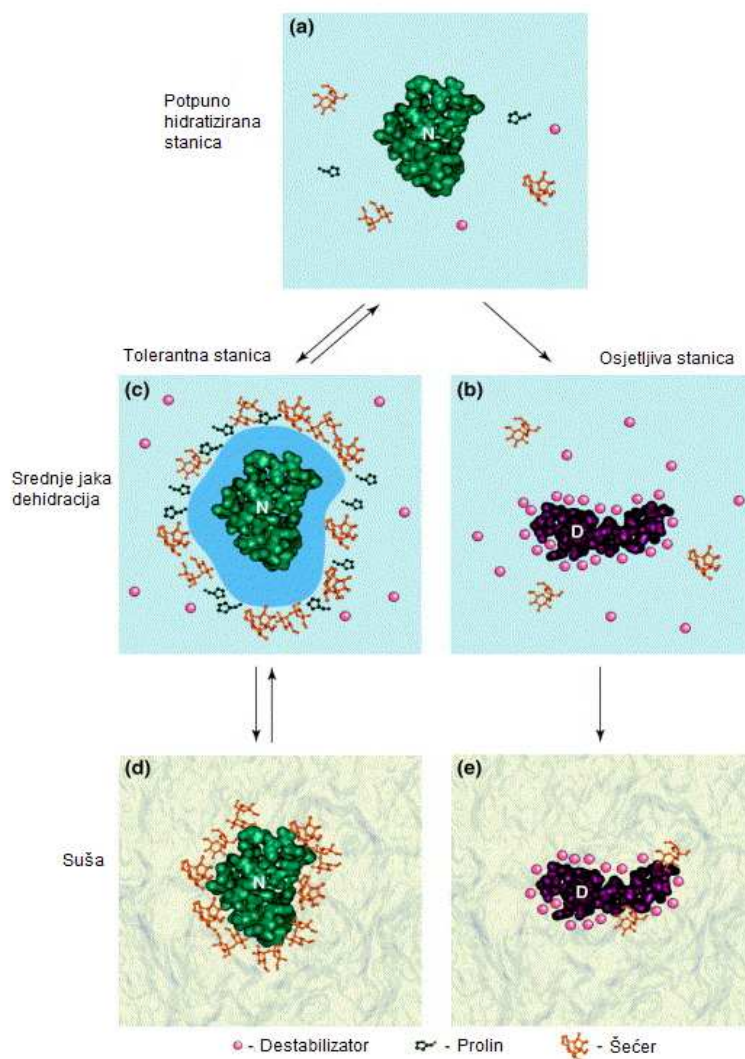
Zhang i sur. (2004) su istraživali promjene u aktivnosti enzima SOD, CAT, APX i GR te pojavnosti njihovih izoenzima kod pšenice (osjetljivog i tolerantnog genotipa) izložene suši tijekom 24, 48 i 72 sata te tijekom oporavka. Aktivnost ovih enzima tijekom suše bila je povećana, uz prisutnost različitih izoenzimskih formi ovisno o trajanju suše, što je ukazalo na potrebu daljnjeg istraživanja kako bi se dobila nova saznanja o uključivanju pojedinih izoformi u mehanizmu obrane u uvjetima nedostatka vode. Varga i sur. (2012) pratili su aktivnost enzima tijekom razvoja pšenice i ječma u polju, od prosinca do lipnja kroz dvije godine. Aktivnost enzima GR, GST, POD i CAT su porasle u vrijeme sušnog perioda u polju. Aktivnost APX-a se prve godine nije značajno mijenjala, dok je druge zabilježeno smanjenje aktivnosti, pogotovo kod ječma. U laboratorijskom dijelu eksperimenta, u kojem su bili simulirani uvjeti okoline, također je zapaženo smanjenje aktivnosti ovog enzima, ovisno o fenofazama. Ma i sur. (2011) su mjereći enzime askorbat-glutation ciklusa u uvjetima suše, na listovima jabuka, pokazali da se ovaj ciklus svakako aktivira kao odgovor na sušom potaknuti stres, no u uvjetima jakog stresa aktivnost enzima se smanjuje i ciklus se potom ne može normalno regulirati.

Osmotska regulacija u biljaka izloženih nedostatku vode odvija se akumulacijom organskih tvari male molekularne mase. Kompatibilni organski osmoliti pronađeni u višim biljkama su šećerni alkoholi (manitol, sorbitol), topljivi ugljikohidrati (glukoza, fruktoza, saharoza) i osmoliti koji sadrže dušik (prolin, betain, poliamini i dr.). Akumuliraju se u stanicama bez štetnog djelovanja i na taj način osiguravaju održavanje turgora u uvjetima suše i visokog saliniteta (Buchanan i sur. 2000). Sinteza prolina smanjuje stresom povećanu kiselost citoplazme, sudjeluje u održavanju odgovarajućeg odnosa NADP⁺/NADPH, stabilizira makromolekule i predstavlja pričuveni oblik ugljika i dušika kojeg biljka koristi u uvjetima suše

(Hare i sur. 1997). U uvjetima slabijeg vodnog deficita (dehidracije), prolin (kao i svi osmoliti) omogućava staničnim proteinima održavanje hidratiziranog stanja. No, tijekom ekstremnog isušivanja (desikacija), kada količina vode padne ispod 0,3 (g H₂O/g DW), kod tolerantnih biljaka, šećeri se mogu vodikovim vezama vezati na proteine, zamjenjujući vodu, i tako dalje štiti proteine od denaturacije (Slika 18). Time se održava stabilna struktura proteina i integritet membrana (Hoekstra i sur. 2001, Kereša i sur. 2008).

Prolin se u stresnim uvjetima akumulira u puno većoj količini u odnosu na ostale aminokiseline (Valliyodan i Nguyen 2006). Povećano nakupljanje prolina pokazano je u uvjetima suše u mnogim strnim žitaricama kao što su pšenica i ječam (Bandurska 2000, Rampino i sur. 2006, Thameur 2011), zatim u soji (Kocsy i sur. 2005), suncokretu (Manivannan i sur. 2007), špinatu (Huang i sur. 1979), lucerni (Ehsanpour i sur. 2003) i različitim pustinjanskim biljkama (Wang i sur. 2004). Iako je opće prihvaćeno da se prolin u uvjetima stresa sintetizira iz glutamata, u novije vrijeme sve više se provode istraživanja vezana za sintezu iz ornitina. You i sur. (2012) pokazali su da prekomjerna ekspresija gena *OsOAT*, koji regulira sintezu enzima δ -OAT, u transgenim linijama riže rezultira značajnim povećanjem aktivnosti δ -OAT i koncentracije prolina, odnosno povećanom tolerancijom na sušu.

U osmotskoj regulaciji sudjeluje i fitohormon apscizinska kiselina (ABA). Osim signalne uloge u regulaciji gibanja puči, ABA aktivira gene za sintezu različitih proteina (enzima) koji sudjeluju u osmoregulaciji, odnosno sudjeluje u akumulaciji osmotski aktivnih molekula/iona. Ozfidan i sur. (2013) su pratili utjecaj egzogenog dodatka ABA-e na divlje tipove i transgene linije (*aba2*) vrste *Arabidopsis thaliana* u uvjetima suše izazvane dodatkom polietilen glikola (PEG 8000). Linije *aba2* ne mogu sintetizirati ABA, ali je pokazano da kao i divlji tipovi pozitivno reagiraju na dodatak ABA-e povećavajući tolerantnost na ovaj tip stresa. Thameur i sur. (2011) su pratili promjene endogene ABA-e i koncentraciju prolina u genotipovima ječma različite tolerancije na sušu, a rezultati su ukazali na prisutnost različitih mehanizama adaptacije u uvjetima nedostatka vode.



Slika 18. Mehanizmi stabilizacije proteinskih struktura u različitim fazama nedostatka vode. U potpuno hidratiziranim stanicama (a) nativni oblik proteina (N) je termodinamički povoljan. Gubitkom vode povećava se mogućnost interakcije otopljenih tvari u citoplazmi s površinom proteina. U osjetljivim stanicama (b) nedostatak kompatibilnih osmolita (npr. prolina, šećera) uzrokuje vezanje destabilizatora i početak denaturacije proteina (D) u uvjetima srednje jakog stresa. U tolerantnim stanicama (c), u istim uvjetima, prisutni kompatibilni osmoliti ne vežu se za proteine već formiraju svojevrsni zaštitni omotač unutar kojeg se zadržava voda (plavo obojeni prsten), što proteinima osigurava održavanje nativne konformacije. Daljnjim isušivanjem molekule šećera se vodikovim vezama vežu na površinu proteina, zamjenjujući time molekule vode. Na taj način se stabiliziraju nativne proteinske strukture u tolerantnim stanicama izloženim suši (d). Ranije denaturirani proteini osjetljivih stanica u istim uvjetima (e) ostaju fiksirani u dehidriranoj citoplazmi, bez mogućnosti rehidracije (prilagođeno prema Hoekstra i sur. 2001).

Brojna dosadašnja istraživanja pokazala su da suša izaziva promjene u koncentracijama fotosintetskih pigmenata i smanjenje fotosintetske učinkovitosti u različitim biljnih vrsta. Suša također utječe i na gubitak D1 i D2 proteina PSII. Nayyar i Gupta (2006), Munné-Bosch i Peñuelas (2004), Li i sur. (2006) kao i mnogi drugi pokazali su značajno smanjenje koncentracije Chl *a*, Chl *b* i Chl *a+b* u uvjetima suše, u odnosu na koncentracije istih u optimalnim uvjetima. Na taj način se apsorbira manje svjetlosti i smanjuje vjerojatnost oštećenja fotosintetskog aparata. Za razliku od većine istraživača, Hura i sur. (2009) su pokazali da u 70 dana starim klijancima hibrida pšenice i raži (*Triticale - Triticosecale ssp.*) nakon 4 tjedna suše nije došlo do statistički značajne promjene koncentracije klorofila, niti karotenoida.

Oukarroum i sur. (2007) su mjerili fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima suše i oporavak sorata ječma, s ciljem određivanja stupnja tolerancije ili otpornosti. Omjer F_v/F_m nije bio značajno smanjen tijekom sušnog perioda i oporavak je bio uspješan, što znači da nije došlo do trajnog oštećenja fotosintetskog aparata u uvjetima sušnog perioda. S obzirom da se ovaj parametar nije značajno razlikovao niti među sortama, opisali su ga kao neučinkovit indikator istraživanih svojstava. Autori su u ovom radu uveli novi parametar, DFI (engl. *Drought Factor Index*) koji predstavlja sušom izazvano smanjenje indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Izračunava se iz izraza: $DFI = PI_{SUŠA}/PI_{KONTROLA}$. Rezultati su pokazali da je indeks suše dobar pokazatelj tolerantnosti.

Lepeduš i sur. (2012) uspoređivali su grupiranje sedam inbred linija kukuruza prema parametrima F_v/F_m i PI. Istraživanje predstavlja preliminarno ispitivanje za QTL (engl. *Quantitative Trait Locus*) analizu svojstava vezanih za parametre fluorescencije, s ciljem boljeg razumijevanja genetskih i fizioloških karakteristika linija kukuruza tolerantnih na sušu. S obzirom na dobivene rezultate, predložili su kombiniranu uporabu spomenutih parametara kada je u pitanju istraživanje uvjeta s ograničenom količinom vode.

U novije vrijeme istraživači pokušavaju utvrditi korelacije između fotosintetskih parametara i prinosa zrna. Li i sur. (2006) su mjerili fluorescenciju sorata ječma različite tolerancije na sušu. Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima prinosa zrna, zaključili su da bi F_0 i F_v/F_m mogli biti dobri kriteriji za selekciju tolerantnih sorata. Kovačević i sur. (2011) pokazali su da je kratkotrajni višekratni stres izazavan sušom prouzročio značajno smanjenje uroda zrna ozimog ječma u odnosu na kontrolni tretman. Istraživani kultivari razlikovali su se u izmjerenim parametrima fotosinteze F_v/F_m , ET_0/ABS i PI_{ABS} (izmjereni krajem busanja), dok je značajna razlika i interakcija među tretmanima utvrđena samo za parametar F_v/F_m . Parametri koji pokazuju učinkovitost fotosinteze nisu pokazali značajnu korelaciju s prinosom zrna i

stabilnosti prinosa zrna kultivara. Slično istraživanje provedeno je i na kultivarima ozime pšenice (Kovačević i sur. 2012) u kojem su dobiveni rezultati pokazali povezanost fotosintetskih parametara (F_v/F_m , ET_0/ABS i PI_{ABS}) s prinosom zrna i stabilnosti prinosa zrna, kao i s genetskom raznolikošću istraživanih kultivara.

Rast C_3 biljaka često je ograničen količinom ugljika. Posljedice nedostataka CO_2 tijekom suše Qiu i sur. (2008) su pokušali izbjeći tretiranjem embrija sjemena pšenice CO_2 laserom. Rezultati su pokazali pojačanu aktivnost enzima APX, GST, GP i POD, povećanu koncentraciju askorbata, karotenoida i zeaksantina te smanjenje akumulacije GSSG, H_2O_2 i MDA. Zaključili su da odgovarajući laserski predtretman sjemena osigurava zaštitu od stresa izazvanog sušom. Robredo i sur. (2007) su klijance ječma izlagali suši i povećanoj koncentraciji CO_2 , a rezultati su pokazali povećanje fotosinteze i smanjenu transpiraciju, odnosno odgađanje štetnog utjecaja suše. Slične rezultate dobili su Lin i Wang (2002) nakon što su istim uvjetima izložili klijance jare pšenice, na temelju kojih su zaključili da povećana koncentracija CO_2 kod osjetljivih sorata poboljšava toleranciju na sušu. Iako mnoga istraživanja pokazuju pozitivan utjecaj povećane količine CO_2 , rezultati aktivnosti enzima kao što su CAT i SOD često su izrazito kontradiktorni, u nekim vrstama su povećane dok su u drugim smanjene ili na njih CO_2 niti ne utječe.

Značajni fiziološki efekti suše su smanjenje vegetativnog rasta biljke, posebno stabljike (Schuppler i sur. 1998). Rast lista je mnogo osjetljiviji na sušu, nego rast korijena. Smanjenjem lisne površine biljka smanjuje transpiraciju. Mnoge odrasle biljke u uvjetima suše ubrzavaju senescenciju i odbacuju starije listove (Mahajan i Tuteja 2005, Shao i sur. 2008). Zanimljive rezultate dobili su Rivero i sur. (2007) nakon što su uzgojili transgene linije duhana $P_{SARK}::IPT$, čija značajka je pojačana ekspresija *IPT* (engl. *IsoPentenylTransferase*) i *SARK* (engl. *Senescence Associated Receptor protein Kinase*) gena. Enzim *IPT* katalizira biosintezu citokinina, koji inhibiraju senescenciju. *SARK* je gen čija je indukcija pokazana tijekom razvoja odnosno sazrijevanja (a prije senescencije) i suše, dok je smanjenje ekspresije uočeno tijekom senescencije. Prema tome, $P_{SARK}::IPT$ linije tijekom razvoja u uvjetima suše sintetiziraju citokinine usporavajući time pojavu senescencije. Nakon izlaganja suši transgene linije i divlji tipovi su zaliveni i praćen je oporavak. Transgene biljke su tijekom oporavka dobivale samo 30 % količine vode kojom su zalijevane kontrolne biljke, a potpunim oporavkom i dozrijevanjem (uz minimalne gubitke u prinosu) pokazale su izrazito veliku toleranciju na sušu. Biljke divljeg tipa se uopće nisu oporavile. Ovo istraživanje je izuzetno značajno za proizvodnju žitarica tolerantnih na sušu, pogotovo u područjima s ograničenom količinom vode, a manjkom hrane.

U svrhu kreiranja i oplemenjivanja biljaka tolerantnih na sušu potrebno je identificirati lokuse kvantitativnih svojstava (QTL) povezane s genima koji kontroliraju toleranciju na sušu (Zhao i sur. 2008, Roy i sur. 2011, Marcińska i sur. 2012). Genetsku osnovu otpornosti ili tolerancije na sušu teško je definirati s obzirom da su geni smješteni na različitim kromosomima (Kereša i sur. 2008). Kako bi postupak identifikacije QTL-ova bio što uspješniji potrebno je dobro istražiti biokemijske i fiziološke parametre roditeljskih biljaka (Hura i sur. 2009).

Tolerancija na sušu je vrlo složeno svojstvo. Kereša i sur. (2008) opisali su toleranciju, s oplemenjivačkog stajališta, kao sposobnost zadržavanja konstantno visokog prinosa, bez obzira na nepovoljne uvjete okoline. Odlika toleranih genotipova je prisutnost mehanizma za izbjegavanje suše (npr. rano dozrijevanje), mehanizma za smanjenje dehidracije (npr. zatvaranje puči, niska metabolička aktivnost, sporiji rast, visok vodni potencijal u stanicama za vrijeme suše) ili mehanizma za toleranciju na dehidraciju (npr. osmotska regulacija).

Unatoč svim dosadašnjim istraživanjima, mehanizmi tolerancije na sušu nisu u potpunosti razjašnjeni. Aktivnost enzima i količina akumuliranih neenzimskih komponenata razlikuje se ovisno o biljnoj vrsti, odnosno genotipovima unutar vrste, kao i o pojedinom biljnom organu. Spomenute razlike često se odražavaju i na promjene fotosintetske učinkovitosti. Razlike su uočene i u ovisnosti o samom dizajnu eksperimenta, načinu izlaganja suši, kao i trajanju sušnog perioda. Stoga je važno nastaviti fiziološka, biokemijska i molekularna istraživanja s ciljem upoznavanja navedenih mehanizama koji omogućavaju biljci preživljavanje u sušnim periodima.

1.2.6. Molekularni mehanizmi tolerancije na stres izazvan suviškom svjetlosti

Svjetlost je neophodan faktor za odvijanje fotosintetskih procesa u biljaka. Ujedno je i jedan od najčešćih uzroka oksidacijskog stresa, ukoliko je visokog intenziteta. U uvjetima snažnog osvjetljenja fotosintetski aparat apsorbira više svjetlosti nego što se može iskoristiti za fiksaciju CO₂, pri čemu nastaje više NADPH i ATP-a nego što je potrebno. Reducira se plastokinon i inhibira kompleks za cijepanje vode što se naziva fotoinhibicijom. Fotoinhibicija je posljedica svjetlosnog prezasićenja fotosintetskog aparata, uslijed kojega može doći do stvaranja ROS-a (¹O₂, O₂⁻ i ·OH) (Mubarakshina i sur. 2006) i potom smanjenja fotosintetske

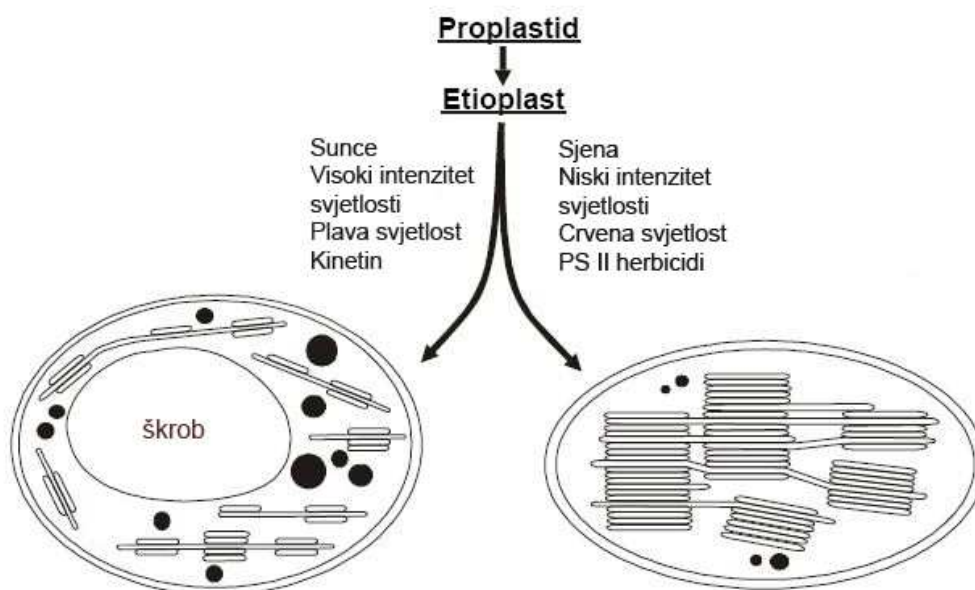
aktivnosti. Najvažniji izvori radikala kisika tijekom fotosinteze su reakcijska središta PSI i PSII tilakoidnih membrana osvijetljenih kloroplasta (Asada 2006), naročito reducirani akseptori elektrona PSI, posebno feredoksin koji prenosi pojedinačne elektrone na kisik ako se redoks lanac koji dovodi do nastanka NADP^+ reducira zbog nakupljanja elektrona. Jurić i sur. (2009) pokazali su da u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti inaktivacija TROL proteina izaziva smanjenje transporta elektrona i povećanje NPQ-a.

Formirani $^1\text{O}_2$ posebno utječe na degradaciju proteina D1, koji zajedno s D2 čini okosnicu reakcijskog središta PSII. Degradirani D1 može se nadomjestiti novosintetiziranim, što ponovno aktivira PSII. Sve dok ekspresija proteina D1 može kompenzirati njegovu degradaciju, PSII će ostati funkcionalan. Kada uslijed djelovanja svjetlosti visokog intenziteta i prekomjerne redukcije plastokinona kompenzacija nije dostatna, posljedica je oštećenje fotosustava i smanjenje fotosinteze. Oporavak D1 proteina je brži u biljkama sunca, što im osigurava učinkovitiju zaštitu od fotoinhibicije (Barber i Anderson 1992, Rintamäki i sur. 1995). Tijekom jakog osvijetljenja fosforilacija D1 proteina smanjuje oksidacijsku štetu smanjenjem produkcije superoksidnog aniona u PSII (Chen i sur. 2012).

Zahvaljujući vrlo učinkovitim zaštitnim mehanizmima (enzimske i neenzimske komponente antioksidacijskog odgovora), kloroplasti mogu opstati bez ozbiljnih oštećenja i pri visokim intenzitetima svjetlosti. Posebno su značajni karotenoidi koji imaju sposobnost primanja suviška eksitacijske energije od klorofila, na taj način štiteći biljku od svjetlosti visokog intenziteta (Foyer i Noctor 2000).

Listovi više izloženi suncu i listovi u sjeni mogu se nalaziti na istoj biljci, a razlikuju se u morfološkim karakteristikama i anatomskoj građi. Građa listova visoko je specijalizirana za apsorpciju svjetlosti. Višeslojni palisadni parenhim u listovima sunca osigurava iskorištavanje velikog dijela svjetlosti i ti su listovi najčešće deblji od listova sjene. Spužvasti mezofil čine stanice nepravilnog oblika s velikim intercelularima. Rasipanje svjetlosti u ovom dijelu mezofila uzrok je svjetlije zelenoj boji naličja listova. Gibanjem kloroplasta i promjenom položaja listova u odnosu na smjer upada Sunčeve svjetlosti biljka može povećati apsorpciju svjetlosti. Pri slabom intenzitetu svjetlosti kloroplasti su smješteni okomito na smjer upada svjetlosti, dok se pri visokom intenzitetu svjetlosti smještaju suprotno. Gibanjem kloroplasta sprječavaju se potencijalna oštećenja fotosintetskog aparata, koja bi mogla nastati prilikom prejakog osvijetljenja. Listovi u sjeni sadrže više ukupnog klorofila po reakcijskom središtu i više klorofila *b* u odnosu na klorofil *a*. Listovi na suncu imaju više koncentracije topljivih proteina i enzima RubisCo nego listovi u sjeni. Biljke u sjeni pokazuju bolju prilagodbu na intenzitet i kvalitetu osvijetljenja, a odnos reakcijskih središta PSII i PSI je 3:1, dok je u biljaka na suncu 2:1. Ta svojstva povećavaju apsorpciju svjetlosti i prijenos energije na zasjenjenim

staništima (Lichtenthaler i Burkart 1999, Pevalek-Kozlina 2003). Slika 19 prikazuje razlike između kloroplasta u listovima na suncu i listovima u sjeni.



KLOROPLASTI SUNCA

mala količina tilakoida
uski grana tilakoidi
velika količina Chl *a*-proteina CPI
viši omjer Chl *a/b* (2.9-3.4)
velika škrobna zrnca
velika količina plastoglobula
niža koncentracija klorofila
visoka stopa ukupne asimilacije CO₂
saturacija svjetlosti tek pri visokom intenzitetu

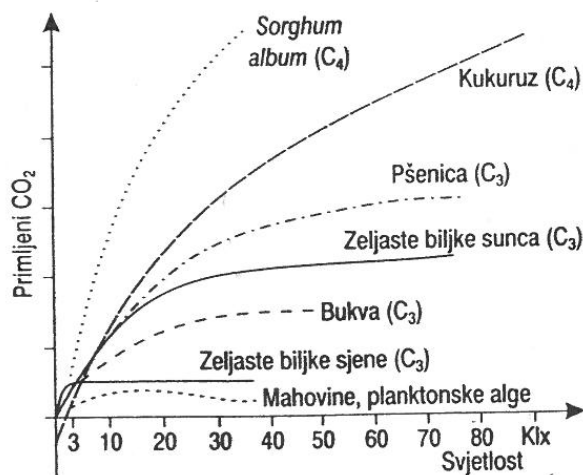
KLOROPLASTI SJENE

gusto raspoređeni tilakoidi
široki grana tilakoidi
velika količina Chl *a/b*-proteina LHClI
niži omjer Chl *a/b* (2.4-2.7)
bez škrobnih zrnaca
nekoliko malih plastoglobula
viša koncentracija klorofila
niska stopa ukupne asimilacije CO₂
rana pojava saturacije svjetlosti

Slika 19. Razvoj kloroplasta ovisno o kvaliteti i kvantiteti svjetlosti, u "kloroplaste sunca" ili "kloroplaste sjene". Sličan mehanizam adaptacije kloroplasti pokazuju i djelovanjem endogenih komponenata kao što su citokinini (kinetin) ili herbicidi poput diurona (prema Lichtenthaler i Burkart 1999).

Kvaliteta i količina svjetlosti utječe na stopu fotosinteze. Porastom intenziteta svjetlosti brzina fotosinteze linearno raste, zatim se polako smanjuje i tek kada se fotosintetski aparat zasiti svjetlošću poprima konstantnu vrijednost. Daljnje pojačavanje intenziteta svjetlosti može oštetiti fotosintetski aparat. Brzina zasićenja razlikuje se među biljnim vrstama (Slika 20).

C4-biljke imaju vrlo učinkovit sustav prerade CO₂, što im osigurava "otpornost" prema visokom intenzitetu svjetlosti. Ove biljke gotovo nikada neće postići svjetlosno zasićenje (Pevalek-Kozlina 2003).



Slika 20. Utjecaj intenziteta svjetlosti na stopu fotosinteze u različitim skupinama biljaka (Pevalek-Kozlina 2003).

Sarijeva i sur. (2007) opisali su razlike u količini pigmentata i fotosintetskoj aktivnosti u listovima na suncu i u sjeni, kod vrsta *Ginkgo biloba* L. i *Fagus sylvatica* L. U listovima na suncu izmjerena je niža koncentracija ukupnih klorofila izraženih po masi svježe ili suhe tvari, u odnosu na listove u sjeni. Omjer Chl *a/b* bio je viši u listovima na suncu, u kojima je izmjerena i veća stopa fotosinteze. Parametar fluorescencije F_v/F_m nije se razlikovao među listovima, dok je indeks adaptacije na stres (A_p) bio značajno veći u listovima na suncu. Obje vrste, od kojih jedna pripada golosjemenjačama, a druga kritosjemenjačama, pokazale su iste mehanizme adaptacije na različiti intenzitet svjetlosti.

U kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti, suša rezultira dodatno povećanom produkcijom reaktivnih kisikovih jedinki u fotosintetskom aparatu, što će u konačnici dovesti do jačeg antioksidacijskog odgovora i smanjene učinkovitosti PSII (Mittler 2006). Yang i sur. (2008) su istraživali utjecaj suše u kombinaciji s niskim (LL) i visokim intenzitetom svjetlosti (HL), na klijancima vrste *Picea asperata* Mast. U uvjetima HL suša je značajno povećala stvaranje ROS-a, što se reflektiralo na oštećenja biomembrana, povećanu koncentraciju askorbinske kiseline i porast aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, POD, CAT, APX i GR). U uvjetima LL suša je potaknula samo porast aktivnost enzima POD, aktivnosti enzima SOD i GR nisu se mijenjale, dok su aktivnosti CAT i APX značajno smanjene. Ovi rezultati pokazuju da suša ima slabiji učinak na klijance u uvjetima LL.

1.3. Ciljevi istraživanja i hipoteza

Ciljevi ovog istraživanja su pokazati razlike u biokemijskim i fiziološkim mehanizmima koji su ključni u antioksidacijskom odgovoru te fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca ječma u uvjetima ekstremnog zasušivanja. Također, očekuje se da će klijanci koji su rasli na visokom intenzitetu svjetlosti, a potom bili izloženi suši u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti pokazati smanjenu sposobnost transporta elektrona, što će dovesti do smanjene ukupne fotosintetske učinkovitosti te bržeg i/ili jačeg antioksidacijskog odgovora.

Osnovna hipoteza ovog rada je da će biljke koje su rasle u uvjetima različitog intenziteta svjetlosti imati različito razvijene mehanizme odgovora na stres izazvan nedostatkom vode. Degradacija fotosintetskih pigmenata trebala bi se događati u manjem opsegu, a smanjenje sposobnosti provođenja elektrona u fotosustavu II, te povećanje disipacije energije sporije u biljaka koje su uzgajane u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti prije no što su bile izložene suši u odnosu na biljke koje su bile uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti odnosno bile izložene svjetlosnom stresu, a potom suši. Očekuje se da će antioksidacijski odgovor uključivati povećanje aktivnosti određenih enzima i jaču akumulaciju prolina u biljaka koje su tijekom uzgoja prvo bile izložene svjetlosnom stresu, a nakon toga suši.

2. MATERIЈAL I METODE

2.1. Biljni materijal i uzgoj klijanaca

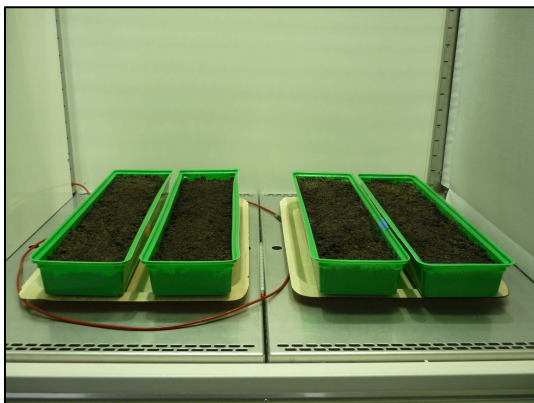
U ovom istraživanju korišteni su klijanci ječma (*Hordeum vulgare* L.) kao modelni organizam. Odabrana je sorta Bravo, ozimi dvoredni ječam, sorta više ali čvrste stabljike i stabilnog uroda zrna (Lalić i sur. 2012). Selekcionirana je na Poljoprivrednom institutu Osijek, a priznata 2009. godine od strane Ministarstva poljoprivrede i šumarstva RH. U svrhu ovog istraživanja korišteno je netretirano sjeme.

Sjeme ječma je imbibirano 24 sata prije sijanja u mraku odstajalom vodovodnom vodom nakon čega je posijano u plastične posude, u smjesu univerzalnog supstrata i pijeska, u omjeru 3 : 1, na dubinu od 2 - 3 cm. Sastav supstrata (Humokompovit H1, agroHoblaj) naveden je Tablici 2. Ječam je uzgajan u klima komori (Vötsch, Germany) u kontroliranim uvjetima u trajanju od 10 dana, koliko je bilo potrebno da se potpuno razvije prvi list (detaljni uvjeti uzgoja prikazani su u poglavlju 2.2). Tijekom desetodnevnog uzgoja ječam je svakodnevno zalijevan. Usporedno su sijane i uzgajane po dvije posude (Slika 21), jedna koja je služila za praćenje daljnjeg rasta u uvjetima isušivanja (tretman), a druga kao kontrola. Tretman isušivanja trajao je slijedećih deset dana.

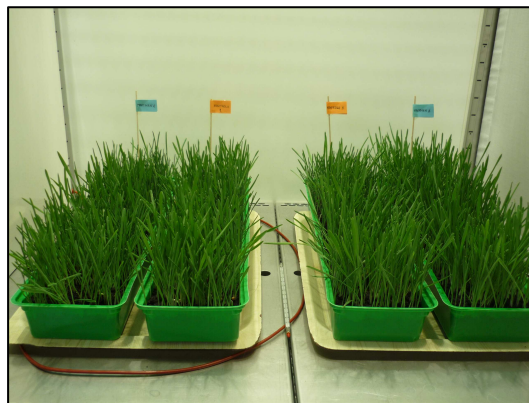
Tablica 2. Sastav supstrata (Humokompovit H1) korištenog za uzgoj klijanaca.

pH u H ₂ O	6,5 - 7,0	K ₂ O mgL ⁻¹	300 - 400
E.C. (1:2 vol.) mScm ⁻¹	0,85 - 0,95	Bakar (Cu) mgkg ⁻¹	40 - 60
Soli (1:2 vol.) %	0,110 - 0,120	Cink (Zn) mgkg ⁻¹	40 - 300
S.T. (105 C) %	25 - 35	Kadmij (Cd) mgkg ⁻¹	1,35 - 2,00
H ₂ O %	65 - 75	Olovo (Pb) mgkg ⁻¹	10,21 - 150
Organska tvar %	60 - 70	Nikal (Ni) mgkg ⁻¹	14,26 - 60
Žareni ostatak (550 C)	30 - 35	Krom (Cr) mgkg ⁻¹	7,38 - 100
Ugljik (C) %	35 - 45	Živa (Hg) mgkg ⁻¹	0,10 - 2,0
N - ukupan na ST %	1,50 - 2,50	Molibden (Mo) mgkg ⁻¹	0,089 - 15
N - mineralni mgL ⁻¹	150 - 250	Kobalt (Co) mgkg ⁻¹	4,63 - 50
P ₂ O ₅ mgL ⁻¹	200 - 300	Arsen (Ar) mgkg ⁻¹	2,02 - 30

A)



B)



Slika 21. Uzgoj klijanaca ječma u klima komori; A) 0.dan, B) 10.dan uzgoja.

2.2. Opis eksperimenta

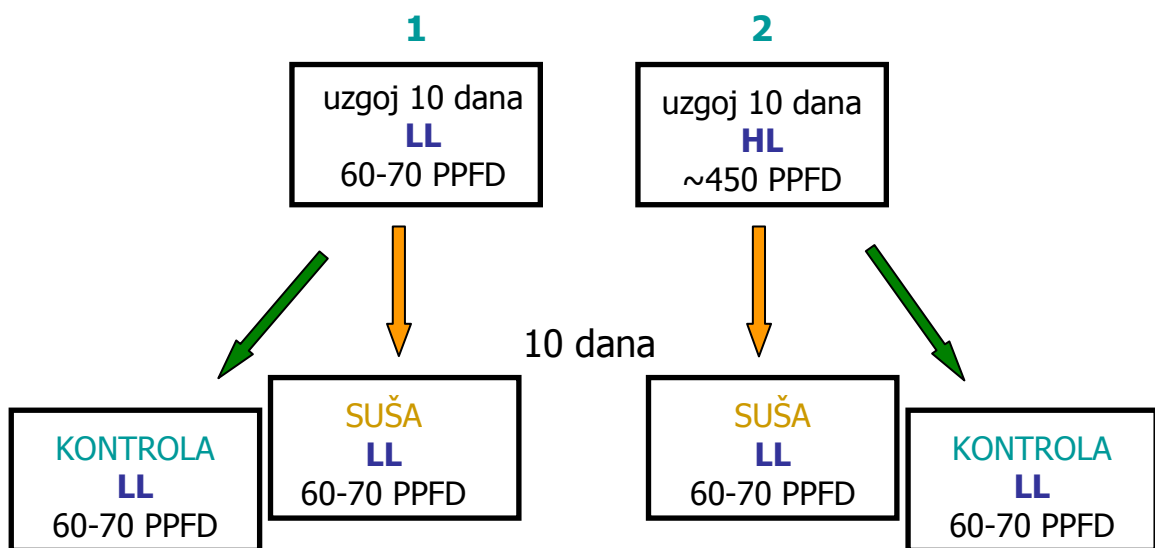
Uzgoj klijanaca trajao je 10 dana u kontroliranim uvjetima uzgojne komore: fotoperioda 16/8 sati (svjetlo/tama), temperatura $22 \pm 1/19^\circ$ (svjetlo/tama) i konstantna 80 %-tna vlažnost zraka. Suša je praćena u uvjetima slabog osvjetljenja ($60 - 70 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tijekom sljedećih 10 dana. Deset dana stari klijanci podijeljeni su u dvije skupine. U jednoj skupini biljaka prestankom zalijevanja izazvan je stres uzrokovan sušom (tretman sušom), dok je druga skupina služila kao kontrola. Kontrolne biljke su svakodnevno i dalje optimalno zalijevane. Prvi potpuno razvijeni listovi klijanaca upotrijebljeni su za provođenje svakodnevnih analiza tijekom 10 dana isušivanja.

Istraživanje obuhvaća dva eksperimenta. U prvom su klijanci rasli na niskom intenzitetu svjetlosti ($60 - 70 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). U drugom eksperimentu uzgoj prvih 10 dana je proveden u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti ($450 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), dok su za vrijeme isušivanja (sljedećih 10 dana) klijanci bili izloženi niskom intenzitetu svjetlosti ($60 - 70 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Slika 22). Predtretman visokim intenzitetom svjetlosti proveden je da bi se pokazao učinak svjetlosnog stresa tijekom klijanja na ponašanje klijanaca u uvjetima suše.

Uvjeti niskog intenziteta svjetlosti ($60 - 70 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) u daljnjem su tekstu naznačeni kraticom LL (engl. *Low Light*), dok je za uvjete visokog intenziteta svjetlosti ($450 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) korištena kratica HL (engl. *High Light*). Jedinica $\mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ odgovara gustoći

fotosintetski aktivnog fluksa fotona pa je korištena odgovarajuća kratica PPFD (engl. *Photosynthetically active Photon Flux Density*).

PLAN EKSPERIMENTA



Slika 22. Shematski prikaz eksperimenta;

klijanci ječma su rasli tijekom 10 dana u uvjetima dva različita svjetlosna režima, pri niskom (LL: 60 - 70 PPFD) i pri visokom (HL: 450 PPFD) intenzitetu svjetlosti, a potom su prestankom zalijevanja izloženi suši koja je praćena u uvjetima slabog osvjetljenja (60 - 70 PPFD) sljedećih 10 dana.

2.3. Određivanje relativnog sadržaja vode u listu

Za određivanje relativne količine vode (engl. *Relative Water Content*, RWC) listovi klijanaca su narezani na komadiće duljine oko 7 mm i odmah je izvagana masa svježe tvari (engl. *fresh weight*, FW). Masa svježe tvari svakog uzorka iznosila je približno 0,1 g. Tkivo je prebačeno u čašu s destiliranom vodom i ostavljeno stajati tri sata na sobnoj temperaturi i prigušenom svjetlu, kako bi se postigao maksimalni turgor (do potpune hidracije). Za određivanje vrijednost TW (engl. *turgid weight*) tkivo je izvađeno iz vode, nježno posušeno staničevinom i ponovo izvagano. Uzorak je potom pincetom premješten u plastičnu kivetu i stavljen u sušionik na 105°C. Nakon 24 sata određena je masa suhe tvari (engl. *dry weight*, DW). Sve odvage su izmjerene analitičkom vagom s preciznošću od 0,0001 g. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 10 ponavljanja. Analiza je izvršena na način kako je opisano u radu Keles i Öncel (2004), uz minimalne prilagodbe budući da su Yamasaki i Dillenburg (1999) utvrdili da je analizu potrebno prilagođavati svakom pojedinom biljnom materijalu kako bi se dobili što precizniji rezultati. Prilagodba se odnosi na uvjete imbibicije, koja je ključna u konačnom izračunu. Konačna vrijednost RWC-a izračunata je prema standardnom izrazu koristeći vrijednosti FW, TW i DW.

$$\text{RWC (\%)} = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$$

2.4. Procjena oštećenosti biomembrana

Za procjenu oštećenosti biomembrana listovi klijanaca su izrezani na komadiće duljine oko 7 mm te ispirani tri puta deioniziranom vodom kako bi odstranili elektrolite staničnog soka i ostatke tkiva nastale prilikom mehaničkog oštećenja rezanjem. Po 10 komadića tkiva, koji su činili jedan uzorak, pažljivo je pincetom stavljeno u staklenu epruvetu u koju je prethodno dodano 20 ml deionizirane vode. Epruvete s uzorcima zatvorene su folijom kako bi se sprječilo isparavanje vode i ostavljene na sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata prvi puta je izmjerena električna vodljivost u otopini (L_1). Uzorci su potom autoklavirani 20 minuta pri temperaturi 121°C i tlaku od jednog bara kako bi se oslobodili svi elektroliti iz stanica. Nakon hlađenja do sobne temperature po drugi puta je izmjerena vodljivost u otopini (L_2). Električna vodljivost mjerena je konduktometrom (Mettler Toledo) u jedinici μScm^{-1} . Svaki tip uzoraka izmjeren je u 10 ponavljanja. Integritet membrana procijenjen je prema

konačnom izračunu količine propuštenih elektrolita (engl. *Electrolyte Leakage*, EL) u otopini za kojeg je korišten sljedeći izraz (Nayyar i Gupta 2006):

$$EL (\%) = [(L_1 / L_2)] \times 100$$

2.5. Određivanje razine lipidne peroksidacije

Razina lipidne peroksidacije određena je spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) kao krajnjih produkata lipidne peroksidacije.

Listovi su sitno narezani u porculanski tarionik i smrvljeni u fini prah koristeći tekući dušik. Oko 0,2 g usitnjenog biljnog tkiva ekstrahirano je s 1 ml 0,1 %-tne trikloroetane kiseline (TCA) i centrifugirano 10 min na 10000 x g pri temperaturi 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R). U 0,5 ml odvojenog supernatanta dodan je 1 ml 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj TCA. Smjesa je 30 minuta zagrijavana na 95°C u termomikseru (Eppendorf thermomixer compact), ohlađena na ledu te centrifugirana na 18000 x g tijekom 15 minuta pri temperaturi 4°C. Supernatant je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje (Specord 40, Analytik Jena). Otopina 0,5 %-tne TBA u 20 %-tnoj TCA korištena je kao slijepa proba. Očitane apsorbancije na 532 i 600 nm i ekstinkcijski koeficijent 155 mM⁻¹cm⁻¹ (Verma i Dubey 2003) korišteni su u izračunu prema navedenoj formuli:

$$TBARS = [(A_{532} - A_{600} / 155) / m] \times 10^3$$

Koncentracija produkata peroksidacije lipida izražena je kao količina (nmol) reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) po gramu svježe tvari (sv.t.). Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja.

2.6. Određivanje sadržaja slobodnog prolina

Sadržaj slobodnog prolina u listovima ječma određen je spektrofotometrijski, metodom prema Bates i sur. (1973), uz određene prilagodbe.

Sitno narezano tkivo usitnjeno je do finog praha u porculanskom tarioniku korištenjem tekućeg dušika. Oko 0,2 g tako usitnjenog tkiva odvagano je u plastičnu epruvetu s čepom na navoj od 15 ml i dodano 10 ml hladne 3%-tne sulfosalicilne kiseline za taloženje proteina. Smjesa je promiješana na vibracijskoj mješalici i centrifugirana 15 minuta na 3500 x g. U 2 ml odvojenog supernatanta dodano je 2 ml ledene octene kiseline i 2 ml svježe pripremljenog kiselog ninhidrinskog reagensa (1,25 g ninhidrina otopiti u 30 ml ledene octene kiseline i 20 mL 6M ortofosfatne kiseline uz lagano zagrijavanje). Ovako pripremljeni uzorak je promiješan 10 - 15 sekundi i inkubiran 1h u sušioniku pri temperaturi 100°C prilikom čega je nastao obojeni kompleks. Reakcija je zaustavljena premještanjem uzorka u ledenu kupelj, nakon čega mu je dodano 4 ml toluena. Miješanjem na vibracijskoj miješalici 15 - 20 sekundi nastali obojeni kompleks otopljen je u toluenu. Nekoliko minuta kasnije razdvojile su se vodena i toluenska faza, a nastali crveni kromofor (kompleks ekstrahiranog prolina i ninhidrina) je prešao u gornju, organsku fazu. Nakon prilagodbe sobnoj temperaturi toluenski sloj s prolinom odvojen je u staklenu kivetu i spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm. Kao slijepa proba korišten je čisti toluen. Koncentracija prolina ekstrahiranog iz tkiva je izračunata iz standardne krivulje pripremljene s poznatim koncentracijama L - prolina (2 - 300 μM), na isti način kao uzorak. Konačni sadržaj prolina izračunat je iz niže navedenog izraza i izražen kao μmol po gramu svježe tvari (sv.t.). Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja.

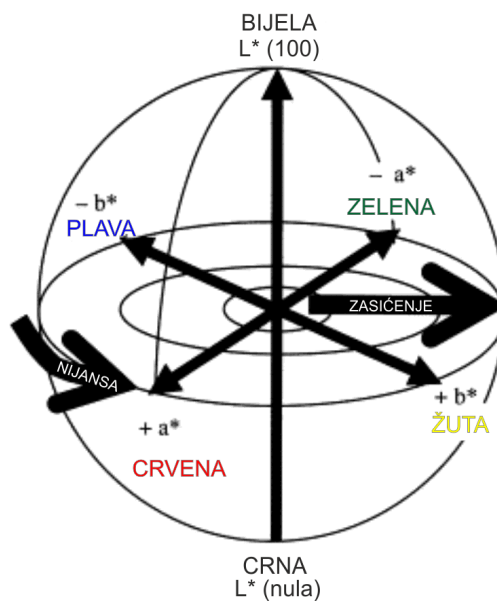
$$\mu\text{mol PROLINA g}^{-1} \text{ sv.t.} = \frac{[\mu\text{M PROLINA} \times 4 \text{ mL (TOLUENA)} \times 5 \text{ (FAKTOR RAZRJEĐENJA)} \times 0.001]}{\text{g (TKIVA)}}$$

2.7. Određivanje i praćenje promjene boje listova

Boja listova određena je kromametrom (Minolta CR-400) koji mjeri reflektiranu svjetlost s površine objekta (numerička metoda za kvantificiranje boje). Postoji nekoliko različitih sustava prema kojima se mogu interpretirati dobiveni rezultati mjerenja. Odabran je $L^*a^*b^*$ sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko (Niyomsoan i sur. 2002).

L^* vrijednost određuje relativnu svjetlinu objekta. Ukoliko je $L^* = 0$ mjereni objekt je crn, ukoliko je $L^* = 100$, objekt je bijel. a^* i b^* vrijednosti mjere se skalom od -60 do +60. Negativan a^* određuje zelenu boju objekta, a pozitivan a^* crvenu. Negativan b^* određuje plavu boju, a pozitivan b^* žutu (Slika 23).

Svaki tip uzoraka izmjeren je u 15 ponavljanja. Prije mjerenja bilo je potrebno kalibrirati instrument pomoću pripadajuće bijele pločice (bijela kalibracija).



Slika 23. Shematski prikaz očitavanja boje u $L^*a^*b^*$ sustavu prilagođeno prema Niyomsoan i sur. (2002).

2.8. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Listovi klijanaca sitno su narezani u porculanski tarionik i uz dodatak magnezijevog hidroksid karbonata (na vrh spatule) usitnjeni do finog praha koristeći tekući dušik. Oko 0,1 g usitnjenog tkiva odvagano je u plastičnoj kivetu od 2 ml i ekstrahirano s 1 ml hladnog acetona, 15 minuta na ledu. Homogenat je promiješan na vrtložnoj mješalici i centrifugiran 10 minuta na 18000 x g pri temperaturi 4°C. Supernatant je dekantiran u plastičnu epruvetu s čepom, a na talog je ponovno dodano 1 ml acetona. Postupak ekstrakcije ponovljen je tri do četiri puta, do potpunog obezbojenja tkiva u talogu. Volumen spojenih supernatanata izmjeren je menzutom, ekstrakt je potom pretočen u staklenu kivetu te mu je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija. Koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* u listovima ječma određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 645 i 662 nm. Izračunata je prema sljedećim formulama uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema Lichtenthaler (1987):

$$\text{Chl } a = (11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645}) \times V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } b = (20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662}) \times V / m \times 10^3$$

$$\text{Chl } a+b = (7,05 \times A_{662} + 18,09 \times A_{645}) \times V / m \times 10^3$$

Chl *a* = koncentracija klorofila *a* u mg g⁻¹ svježe tvari uzorka

Chl *b* = koncentracija klorofila *b* u mg g⁻¹ svježe tvari uzorka

Chl *a+b* = koncentracija ukupnog klorofila u mg g⁻¹ svježe tvari uzorka

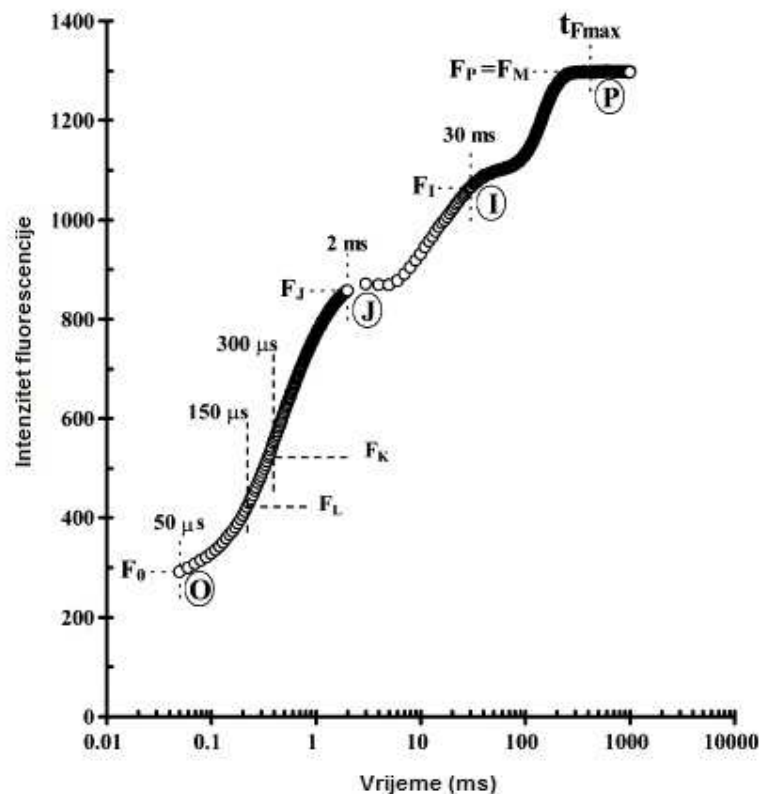
V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u ml

m = masa uzorka u gramima

Udio suhe tvari u biljnom materijalu određen je vaganjem mase svježe tvari koja je potom sušena na 105°C tijekom 24 sata u sušioniku i ponovno izvagana. Svježa masa tkiva uzeta je iz istog homogenta iz kojeg su ekstrahirani pigmenti. Suha tvar je izražena kao % svježe tvari. Konačna koncentracija klorofila izražena je po masi suhe tvari (sh.t.). Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja.

2.9. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila a

Fluorescencija klorofila *a in vivo* u klijancima ječma izmjerena je pomoću instrumenta Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech, UK). Svakodnevna mjerenja obavljena su u 25 ponavljanja po svakom tipu uzoraka (jedno mjerenje = jedan list). Prije samog mjerenja klijanci su prilagođeni uvjetima tame (najmanje 30 minuta). Otvaranje svih reakcijskih središta preduvjet je za mjerenje minimalnog intenziteta fluorescencije (F_0). Puls crvene saturacijske svjetlosti (maksimum apsorpcije 650 nm, $3000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) potiče polifazni rast fluorescencije klorofila. Instrument bilježi promjene u intenzitetu fluorescencije tijekom 1 s, počevši od $50 \mu\text{s}$ nakon osvjetljavanja. Tijekom prve 2 ms promjene se bilježe svakih $10 \mu\text{s}$, a nakon toga svake ms do pune sekunde (Slika 24). Primijenjena svjetlost omogućuje zatvaranje svih reakcijskih središta, odnosno postizanje maksimalnog intenziteta fluorescencije (F_m). Podaci dobiveni mjerenjem korišteni su u OJIP testu za izračunavanje različitih parametara funkcionalnosti fotosustava II (Tablica 3.).



Slika 24. Tipičan O-J-I-P polifazni porast fluorescencije Chl a prisutan kod viših biljaka prikazan na logaritamskoj vremenskoj skali od $50 \mu\text{s}$ do 1s (prilagođeno prema Strasser i sur. 2004, Oukarroum i sur. 2007).

Tablica 3. Podaci za izračunavanje i parametri OJIP testa.

PODACI DOBIVENI MJERENJEM POLIFAZNOG RASTA FLUORESCENCIJE KLOROFILA <i>a</i>	
F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s (O stupanj)
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μ s
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (J stupanj)
F_I	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (I stupanj)
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj)
t_{max}	vrijeme potrebno da se postigne F_m
F_V	maksimalna varijabilna fluorescencija; $F_V = F_m - F_0$
V_J	varijabilna fluorescencija na J stupnju; $V_J = (F_J - F_0)/(F_m - F_0)$
V_I	varijabilna fluorescencija na I stupnju; $V_I = (F_I - F_0)/(F_m - F_0)$
AREA	površina iznad OJIP krivulje
S_m	normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje; $S_m = AREA/(F_m - F_0)$
M_0	ukupna brzina zatvaranja RC; $M_0 = (TR_0/RC) - (ET_0/RC) = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_m - F_0)$
N	prometni broj; $N = S_m \times [(dV/dt)_0] / V_J$
PARAMETRI OJIP TESTA	
RC/CS_0	gustoća aktivnih reakcijskih središta; $RC/CS_0 = F_V/F_m \times (V_J/M_0) \times ABS/CS_0$
F_V/F_m	maksimalni prinos kvanta fotosustava II; $F_V/F_m = (F_m - F_0)/F_m = [1 - (F_0/F_m)] = TR_0/ABS$
ET_0/TR_0	efikasnost kojom "uhvaćeni" ("trapped") eksciton omogućava prijenos elektrona u elektron-transportnom lancu dalje od QA ⁻ ; $ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu; $ABS/RC = M_0 \times (1/V_J) \times [1/(F_V/F_m)]$
TR_0/RC	"trapping" po aktivnom reakcijskom središtu; $TR_0/RC = M_0 \times (1/V_J)$
ET_0/RC	transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu; $ET_0/RC = M_0 \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$
DI_0/RC	disipacija po aktivnom reakcijskom središtu; $DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti; $PI_{ABS} = (RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0 - ET_0)]$ $RC/ABS = (RC/TR_0) \times (TR_0/ABS) = [(F_J - F_0)/4(F_{300\mu s} - F_0)] \times (F_V/F_m)$ $TR_0/DI_0 = F_V/F_0$ $ET_0/(TR_0 - ET_0) = (F_m - F_J)/(F_J - F_0)$

2.10. Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima (GPOX, APX, CAT, SOD)

2.10.1. Ekstrakcija topljivih proteina

Listovi klijanaca ječma narezani su u porculanski tarionik i usitnjeni u tekućem dušiku uz dodatak polivinil pirolidona (PVP). PVP veže polifenole koji bi mogli smetati prilikom mjerenja aktivnosti enzima. Tako usitnjeno tkivo prebačeno je u prethodno izvaganu kivetu. Masa svježe tvari potrebna za ekstrakciju topljivih proteina iz kojih će se mjeriti aktivnost ukupnih peroksidaza iznosila je oko 0,5 g. Tkivo je ekstrahirano dodatkom 1 ml hladnog ekstrakcijskog pufera (0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) tijekom 15 minuta stajanja na ledu, uz povremeno miješanje. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 18000 x g pri temperaturi 4°C. Supernatant je odvojen mikropipetom u čistu kivetu, a na preostali talog je dodan još 1 ml istog pufera te je ponovljen postupak ekstrakcije. Spojeni supernatanti korišteni su kao sirovi ekstrakt za određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaza. Za svaki tip uzoraka proteinski ekstrakt je pripremljen u 3 ponavljanja.

Sirovi ekstrakti za određivanje aktivnosti ostalih enzima pripremljeni su na isti način kao i za gvajakol peroksidaze, ali je potrebna masa svježeg tkiva iznosila približno 0,2 g i puferi za ekstrakciju proteina su bili drugačijeg sastava. Ekstrakcijski pufer za askorbat-peroksidaze sadržavao je 0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 , 5 mM natrijev askorbat i 1 mM EDTA (pH 7,0). Ekstrakcijski pufer za katalaze i superoksid-dismutaze sadržavao je 0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 i 1 mM EDTA (pH 7,5). Za svaki tip uzoraka proteinski ekstrakt je pripremljen u 3 ponavljanja.

2.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaza

Ukupna aktivnost enzima gvajakol-peroksidaza (GPOX; EC 1.11.1.7) određena je prema Siegel i Galston (1967). Reakcijska smjesa (pH 5,8) sadržavala je 5 mM gvajakol (Sigma), 0,2 M KH_2PO_4 , 0,2 M $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ i 5 mM H_2O_2 koji je dodan neposredno prije mjerenja. Reakcija je započeta dodatkom proteinskog ekstrakta (5 - 20 μ l) u reakcijsku smjesu (995 - 980 μ l) i praćeno je povećanje apsorbancije (oksidacijom gvajakola nastaje žuto-smeđe obojeni tetragvajakol) svake sekunde tijekom jedne minute pri valnoj duljini od 470 nm. Svaki uzorak izmjeren je u triplikatu, a u konačnom izračunu prema priloženom

izrazu korištena je srednja vrijednost promjene apsorbancije. Ukupna aktivnost enzima je prikazana kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari (sv.t.).

$$\Delta A_{470} = X \times Y \times V_u \times V_f / m \times V_a \text{ [min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ sv.t.]}$$

X = srednja vrijednost razlika u promjeni apsorbancije u određenom vremenskom intervalu

Y = faktor potreban za izražavanje promjene apsorbancije u minuti

V_u = ukupni volumen proteinskog ekstrakta

m = masa svježe tvari u gramima

V_a = volumen mjerenog alikvota proteinskog ekstrakta

V_f = konačni volumen reakcijske smjese i alikvota uzorka u kivetu za mjerenje

2.10.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaza

Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaza (APX; EC 1.11.1.11) određena je prateći promjenu apsorbancije uslijed oksidacije askorbinske kiseline (Nakano i Asada 1981). Reakcijska smjesa (pH 7,0) sadržavala je 0,05 M K₂HPO₄, 0,05 M KH₂PO₄, 0,1 mM EDTA, 5 mM askorbinsku kiselinu i 12 mM H₂O₂. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 930 µl 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM EDTA, 20 µl askorbinske kiseline, 40 µl proteinskog ekstrakta i 10 µl H₂O₂. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Svaki uzorak izmjeren je u triplicatu. Ukupna aktivnost enzima je prikazana kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari (prema izrazu opisanom za gvajakol-peroksidaze).

2.10.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaza

Ukupna aktivnost enzima katalaza (CAT; EC 1.11.1.6) određena je prateći promjenu apsorbancije uslijed smanjivanja količine H₂O₂ metodom prema Aebi (1984), uz minimalnu prilagodbu. Naime, reakcijska smjesa sastojala se od 50 mM kalij fosfatnog pufera čija je pH vrijednost iznosila 7,5 (umjesto 7,0) i 0,01 M H₂O₂. Reakcija je započeta dodatkom 80 µl proteinskog ekstrakta u 1920 µl reakcijske smjese prethodno dodane u kvarcnu kivetu. Smanjenje apsorbancije praćeno je svakih 10 sekundi tijekom jedne minute pri valnoj duljini

od 240 nm. Promjena apsorbancije je izračunata prema izrazu opisanom za gvajakol-peroksidaze. Ukupna aktivnost enzima je prikazana kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježije tvari. Svaki uzorak izmjereno je u triplikatu.

2.10.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza

Aktivnost superoksid-dismutaza (SOD; EC 1.15.1.1) određena je najčešće korištenom spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na uporabi nitro plavog tetrazolijskog klorida (NBT) kao supstrata, prema Giannopolities i Ries (1977). NBT se reducira do plavo obojenog formazana u prisutnosti superoksidnih radikala. Redukcija je inhibirana u prisutnosti SOD-a. Reakcijska smjesa sadržavala je kalij fosfatni pufer pH 7,5 (0,05 M K_2HPO_4 i 0,05 M KH_2PO_4), 13 mM metionin, 75 μ M NBT i 0,1 mM EDTA. U plastičnu kivetu redom je dodano 910 μ l reakcijske smjese, 80 μ l ranije opisanog ekstrakcijskog pufera i 10 μ l 2 μ M riboflavina. Smjesa je promiješana i prvo je poslužila kao slijepa proba kojom je spektrofotometar namješten na nultu vrijednost. Zatim je stavljena ispod izvora svjetlosti ($\sim 120 \mu\text{mol fotona m}^{-1}\text{s}^{-2}$) koji je potaknuo reakciju redukcije NBT-a. Nakon 10 minuta reakcija je prekinuta i izmjerena je maksimalna apsorbancija (A_{max}) nastalog formazana pri 560 nm. Pripremljena su različita razrjeđenja enzimskog ekstrakta miješanjem određenog volumena proteinskog ekstrakta i ekstrakcijskog pufera. Za mjerenje apsorbancije u uzorcima u kivetu je dodano 910 μ l reakcijske smjese, 80 μ l smjese enzima određene koncentracije i 10 μ l 2 μ M riboflavina. Enzimska reakcija započeta je osvjetljavanjem i prekinuta nakon 10 minuta te je izmjerena apsorbancija (B). Na isti način su izmjerene apsorbancije u uzorcima sa svim pripremljenim razrjeđenjima. Aktivnost SOD-a izražena je kao inhibicija redukcije NBT (%) = $[(A_{\text{max}} - B) / A_{\text{max}}] \times 100$. U računalnom programu *Origin 50* izrađena je krivulja aktivnosti enzima (na apscisu se nanese volumeni proteinskog ekstrakta s enzimom koji su upotrijebljeni za pripremu razrjeđenja, a na ordinatu % inhibicije NBT-a) i određen volumen ekstrakta koji uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT-a. Konačna aktivnost SOD-a izražena je kao jedinica aktivnosti enzima po masi svježije tvari. Jedna jedinica (engl. *Unit*, U) aktivnosti SOD-a definira se kao količina enzima koja uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT-a u prisutnosti riboflavina na svjetlu (mjereno pri 560 nm). Svaki uzorak izmjereno je u triplikatu.

2.11. Izolacija topljivih i membranskih proteina za SDS elektroforezu i imunodetekcija proteina D1 i RubisCO LSU

2.11.1. Izolacija topljivih i membranskih proteina

Listovi klijanaca su u tarioniku usitnjeni pomoću tekućeg dušika. Oko 0,5 g fino usitnjenog praha prebačeno je u kivetu i dodano 1 ml vrućeg (80°C) ekstrakcijskog pufera sljedećeg sastava: 0,1 M Tris/HCl pufer (pH 8,0), 4,5 %-tni detergent SDS (natrijev dodecilsulfat), 25 %-tni glicerol i 0,01 M reducirajući agens DTT (ditiotreitol). Ekstrakcija se odvijala tijekom 10 minuta na temperaturi 80°C u termomikseru, uz uključenu opciju miješanja. Uzorci su potom ohlađeni na ledu i centrifugirani na 18000 x g pri 4°C tijekom 10 minuta. Supernatant je mikropipetom odvojen u novu kivetu, a kruti talog je još jednom ekstrahiran s 1 ml istog pufera, u istim denaturirajućim uvjetima. Supernatanti su spojeni, određena je koncentracija prisutnih proteina i ekstrakt je korišten prilikom elektroforeze.

2.11.2. Određivanje koncentracije topljivih i membranskih proteina

Koncentracija proteina u uzorcima pripremljenim u prethodno opisanom postupku mjerena je spektrofotometrijskom metodom prema Bradford (1976). Metoda se zasniva na vezivanju boje Coomassie briljant plavo G-250 (engl. Coomassie Brilliant Blue) na proteine, pri čemu nastaje zeleno-smeđe do plavo obojenje. Smatra se da se u kiseloj sredini elektrostatskim silama sulfatne grupe boje vežu s bazičnim aminokiselinskim ostacima polipeptida. Apsorbancija smjese proteinskog ekstrakta i Bradford radne otopine koja sadrži boju mjerena je pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracija proteina svakog pojedinog uzorka ekstrapolirana je iz standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja govodeg albuminskog seruma (engl. Bovine Serum Albumin, BSA) poznatih koncentracija. Konačna koncentracija proteina izražena je u jedinici $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ ekstrakta.

Bradford radna otopina pripremljena je miješanjem 3 ml 95 %-tnog etilnog alkohola, 6 ml 88 %-tne ortofosforne kiseline, 6 ml Bradford matične otopine i destilirane vode do 100 ml. Za Bradford matičnu otopinu 87,5 mg CBB G-250 otopiti u 25 ml 95 %-tnog etilnog alkohola i dodati 50 ml 88 %-tne ortofosforne kiseline.

2.11.3. Razdvajanje topljivih i membranskih proteina denaturirajućom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS - PAGE)

Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišten je 12 %-tni poliakrilamidni gel koji je sadržavao SDS (Laemmli 1970). Volumen proteinskog ekstrakta (5 - 8 μ l) koji je sadržavao 20 μ g proteina pomiješan je s 1 μ l 6 puta koncentriranog pufera za nanošenje uzoraka (2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 1,2 g SDS-a, 3 ml glicerola, 20 mg bromfenol plavila, 1,2 ml 2-merkaptoetanol; dopuniti destiliranom vodom do ukupnog volumena od 10 ml). Smjesa je kratko promiješana na vibracijskoj mješalici i denaturirana zagrijavanjem na 95°C u termomikseru tijekom 5 minuta. Ovako pripremljeni uzorci su nakon hlađenja Hamilton iglom naneseni u jažice gela. Mješavina proteina poznatih molekularnih masa u rasponu od 10 do 250 kD korištena je kao biljeg molekularnih masa (Bio Rad). Tijekom prolaska proteina kroz gel za sabijanje (prvih 30 minuta) elektroforeza je tekla pri jakosti struje od 15 mA, a nakon toga pri konstantnoj jakosti od 20 mA, sve dok boja nije dosegla dno gela. Elektroforeza je sveukupno trajala približno 150 minuta.

2.11.4. Imunodetekcija proteina D1 i RubisCO LSU

Western analiza je izuzetno osjetljiva tehnika za određivanje prisutnosti određenih proteina koji se nalaze u kompleksnom proteinskom ekstraktu. Tehnika se sastoji od nekoliko koraka: prijenos proteina na membranu, bojanje prenesenih proteina na membrani i na kraju imunodetekcija proteina. Ovom analizom su detektirana dva proteina: D1 - protein aktivnih reakcijskih središta fotosustava II i velika podjedinica RubisCO-a (engl. *Large Subunit*, LSU).

2.11.4.1. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Nakon razdvajanja SDS elektroforezom, proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu metodom "Western blotting"-a (Towbin i sur. 1979). Za elektroprijenos proteina korišten je horizontalni, polusuhi ("semi-dry") sustav Fastblot B 43 (Biometra). Poliakrilamidni gel je odmah nakon razdvajanja proteina stavljen u katodni pufer za prijenos (20 mM Tris, 150 mM glicin, 0,1 %-tni SDS) s ciljem ekvibracije te uklanjanja soli i detergenata prije prijenosa (inkubacija uz zibanje). Nitrocelulozna membrana (Bio Rad) i filter papiri potrebni za prijenos izrezani su prema dimenzijama gela i uronjeni u anodni pufer za prijenos (20 mM Tris, 150 mM glicin, 30 %-tni metanol) na ekvibraciju u trajanju od najmanje 5 minuta. Nakon toga je

složen "sendvič" za prijenos: anoda (+), filter papir namočen kratko u anodni pufer, membrana, gel, filter papir namočen kratko u katodni pufer, katoda (-). Staklenim štapićem je pažljivo istisnut zrak između gela i membrane koji bi mogao spriječiti uspješan prijenos. Na poklopac s ugrađenom katodom stavljen je teret mase oko 2 kg. Elektrode su priključene na izvor struje i puštena je struja jakosti $0,65 \text{ mA} \times \text{cm}^{-2}$ gela. Prijenos se odvijao tijekom 2 sata u hladnjaku, pri temperaturi 4°C . Po završetku prijenosa, pincetom su odstranjeni filter papiri, a membrana je odmah korištena u postupku detekcije proteina.

2.11.4.2. Bojanje proteina na nitroceluloznoj membrani

Uspješnost prijenosa provjerena je bojanjem membrane otopinom Ponceau (0,2 %-tni Ponceau S u 3 %-tnoj TCA) tijekom 10 minuta uz konstantno zibanje. Boja se reverzibilno veže na proteine. Proteinske pruge su postale vidljive odbojavanjem membrane u destiliranoj vodi.

2.11.4.3. Detekcija proteina D1 i RubisCO LSU

Prije imunodetekcije membrana je inkubirana preko noći na 4°C u otopini za blokiranje koja je sadržavala 5 %-tno nemasno mlijeko u prahu otopljeno u puferu TBST (priprema pufera: 6,06 g Tris-a i 8,8 g NaCl-a otopiti u 1000 ml destilirane vode, pH podesiti na vrijednost 7,5 s 5 M HCl i na kraju dodati 1 ml detergenta Tween 20). Ovim postupkom membrana je u potpunosti odbojana (proteini mlijeka vežu oslobođene molekule boje) i blokirana su vezna mjesta za nespecifično vezanje protutijela (Sabolić 2007). Nakon blokiranja membrana je inkubirana s primarnim protutijelima koji specifično prepoznaju ciljni protein tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi (komercijalna primarna protutijela, anti-PsbA / D1 i anti-RbcL / LSU (Agrisera), razrijeđena su 1:5000 u otopini za blokiranje). Membrana je po isteku dva sata inkubacije ispirana 3 puta po 5 minuta, s po 10 ml pufera TBST, kako bi se uklonilo nevezano protutijelo. Inkubacija membrane sa sekundarnim protutijelima, u kompleksu s peroksidazom iz hrena (Santa Cruz Biotechnology), odvijala se tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Sekundarna protutijela prethodno su razrijeđena 1:10000 u otopini za blokiranje. Membrana je ponovno ispirana puferom TBST, 3 x 5 minuta. Sva ispiranja, kao i inkubacije, odvijala su se uz konstantno zibanje.

Vizualizacija proteinskih pruga izvršena je kemiluminiscencijskom reakcijom supstrata i enzima (peroksidaza iz hrena) čiji produkt emitira svjetlost na mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela. Korišten je komercijalni supstrat za detekciju kemiluminiscencijom (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) koji se sastoji od luminola i vodikovog

peroksida. Na stranu membrane na kojoj se nalaze proteini pipetom je nanesen supstrat za detekciju koji je prekrpio cijelu površinu membrane (pripremljen prema uputi proizvođača). Membrana je potom položena između dvije prozirne folije. Nakon inkubacije od 5 minuta supstrat je istisnut, a membrana je prislonjena na fotografski film (Medical X-Ray Film Blue, Agfa), izrezan prema veličini membrane, u za to predviđenoj kazeti. Eksponiranje filma je trajalo jednu minutu. Film je razvijen i fiksiran (Dentus D i F, Agfa) standardnom metodom. Ovisno o jačini signala određeno je vrijeme sljedeće ekspozicije.

2.12. Statistička obrada podataka

Prvi korak statističke analize sastojao se od četverofaktorijalne analize varijance (ANOVA) gdje se analizirao pojedinačno svaki eksperiment, pri čemu su faktori bili ponavljanje, zasušivanje, svjetlosni tretman i dan. U zavisnosti od parametra, bilo je ukupno 3, 10, 15 odnosno 25 ponavljanja; dvije varijante faktora zasušivanje (kontrola i tretman zasušivanjem) i dva svjetlosna tretmana (niski i visoki intenzitet svjetlosti) praćena kroz deset dana u sva tri eksperimenta. Ponavljanje je u modelu bila jedina slučajna varijabla.

Drugi korak statističke analize bio je dvofaktorijalna kombinirana ANOVA kroz sva tri ponavljanja eksperimenta u kojem su korištene pojedinačne standardne pogreške četverofaktorijalne analize iz pojedinačnih eksperimenata s odgovarajućim stupnjevima slobode stvarajući skupnu (engl. "pooled") standardnu pogrešku. U ovoj kombiniranoj analizi, faktori su bili eksperiment (sveukupno tri) i skupni izraz za trofaktorijalnu interakciju, gdje su ulazni podaci bile srednje vrijednosti četrdeset varijanti (kombinacije zasušivanje x svjetlosni tretman x dan) uprosječene kroz replike s odgovarajućim standardnim pogreškama iz pojedinačnih eksperimenata. U konačnici, korišteni su rezultati t-testa iz skupne analize iskazanih kao najmanja značajna razlika (engl. "Least Significant Difference", LSD) na razini značajnosti od 0.05. Statistički značajne razlike označene su različitim slovima, dok ista slova predstavljaju podatke između kojih nema razlike.

Kombinirana ANOVA napravljena je i posebno za svaki svjetlosni tretman prilikom uzgoja (LL i HL), pri čemu su ulazni podaci bili srednje vrijednosti dvadeset varijanti (10 kontrola i 10 tretmana) uprosječene kroz replike s odgovarajućim standardnim pogreškama iz pojedinačnih eksperimenata. Na kraju su korišteni rezultati t-testa iz skupne analize iskazanih kao najmanja značajna razlika (LSD) na razini značajnosti od 0.05, kako je opisano i u prethodnom ulomku.

Osim analize varijance, izračunati su korelacijski koeficijenti između svih izmjerenih parametara u oba uvjeta uzgoja i suši, na razini značajnosti $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**).

Prilikom statističkih analiza korišten je programski paket PLABSTAT, Verzija 3A, 2010 (Utz, 1995).

3. REZULTATI

3.1. Relativni sadržaj vode u listu (RWC)

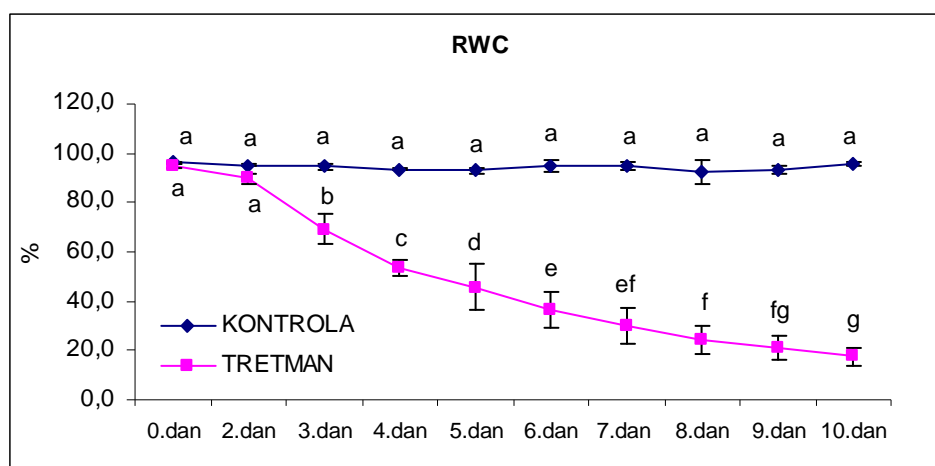
Relativni sadržaj vode (RWC) mjereno je tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 10 ponavljanja, nakon čega su izračunate srednje vrijednosti. S obzirom da su eksperimenti ponovljeni tri puta, konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek svih 30 mjerenja.

Slika 25 A prikazuje srednje vrijednosti RWC-a u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=6,46). U uvjetima suše značajno smanjenje RWC-a, u odnosu na kontrolne biljke, zabilježeno je trećeg dana. Izmjerena vrijednost je iznosila 69,11 %, dok je u kontroli istog dana iznosila 94,54 %. Sljedećih dana tretmana sušom vrijednosti su se kontinuirano smanjivale, a desetog dana suše izmjereni RWC iznosio je 17,57 %. Relativni sadržaj vode u listovima kontrolnih biljaka kroz svih deset dana nije se mijenjao, pa je prosječna vrijednost iznosila $94,31 \pm 1,95$ %. Sve vrijednosti mogu se iščitati iz Tablice 4.

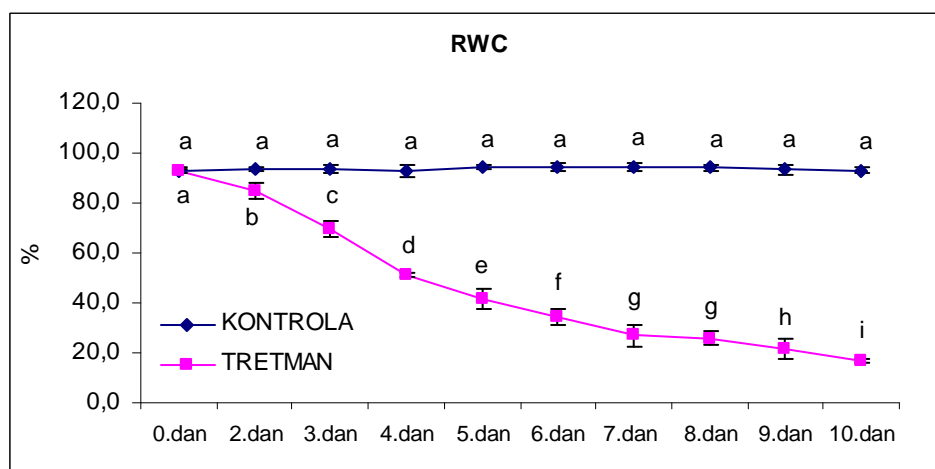
Značajno smanjenje srednje vrijednosti RWC-a drugog dana suše, u odnosu na kontrolu, zabilježeno je u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL, što je prikazano na Slici 25 B (LSD=3,79). RWC drugog dana suše iznosio je 84,76 %, a kontinuirano smanjenje odvijalo se sve do desetog dana u kojemu je vrijednost iznosila 16,87 %. Kontrolne biljke zadržale su sličan relativni sadržaj vode u listovima tijekom svih deset dana mjerenja, a srednja vrijednost je iznosila $93,79 \pm 0,65$ % (Tablica 4).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 4. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti (označene različitim slovima) određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za RWC u listovima iznosila 5,28. Analiza varijance pokazala je da nema statistički značajne razlike u relativnom sadržaju vode tijekom 10 dana suše u listovima klijanaca kontinuirano uzgajanih na LL i onih uz predtretman na HL. Značajna razlika je pokazana samo u usporedbi s kontrolnim biljkama. RWC vrijednosti kontrolnih biljaka uzgajanih na LL i uz predtretman na HL bile su jednake.

A) LL



B) HL



Slika 25. Srednje vrijednosti i standardne devijacije relativnog sadržaja vode (RWC) tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=6,46), B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=3,79).

Tablica 4. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija relativnog sadržaja vode (RWC) tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=5.28).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	96,25 ± 0,23 a	95,03 ± 1,00 a	93,18 ± 0,97 a	92,93 ± 0,69 a
2.	95,13 ± 0,18 a	89,89 ± 2,01 b	93,64 ± 0,95 a	84,76 ± 3,05 b
3.	94,54 ± 1,27 a	69,11 ± 6,16 c	93,40 ± 1,53 a	69,61 ± 3,07 c
4.	93,57 ± 0,36 a	53,46 ± 3,44 d	93,14 ± 2,42 a	50,95 ± 0,92 d
5.	92,85 ± 0,82 a	45,41 ± 9,32 e	94,44 ± 0,86 a	41,63 ± 4,02 e
6.	95,25 ± 2,45 a	36,15 ± 7,29 f	94,29 ± 1,42 a	34,70 ± 3,29 fg
7.	94,55 ± 1,65 a	30,20 ± 7,20 g	94,38 ± 1,92 a	26,92 ± 4,51 gh
8.	92,36 ± 4,88 a	24,43 ± 5,95 hi	94,00 ± 0,82 a	25,87 ± 3,05 gh
9.	93,57 ± 1,63 a	21,11 ± 5,09 hi	93,41 ± 2,00 a	21,78 ± 3,94 hi
10.	95,51 ± 0,99 a	17,57 ± 3,80 i	93,16 ± 0,90 a	16,87 ± 0,55 i

3.2. Razina oštećenosti biomembrana (EL)

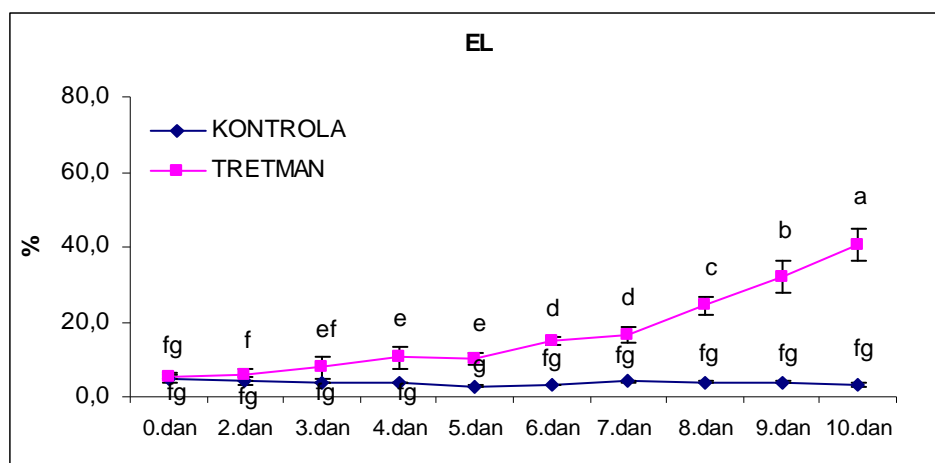
Razina oštećenosti biomembrana procijenjena je mjerenjem količine propuštenih elektrolita (EL). Parametar EL mjeren je tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 10 ponavljanja. S obzirom da su eksperimenti ponovljeni tri puta, konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek svih 30 mjerenja.

Srednje vrijednosti parametra EL u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL prikazane su na Slici 26 A. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=2,84). Količina propuštenih elektrolita kod biljaka izloženih suši, u odnosu na kontrolne biljke, značajno se povećavala od četvrtog dana. Izmjerena vrijednost u biljkama izloženim suši iznosila je 10,48 %, dok je u kontroli bila 3,67 %. Desetog dana suše izmjerena je najveća vrijednost koja je iznosila 40,46 % (oko četiri puta veća u odnosu na četvrti dan). Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 5. Količina propuštenih elektrolita u listovima kontrolnih biljaka tijekom deset dana nije se značajno mijenjala. Prosječna vrijednost iznosila je $3,89 \pm 1,09$ %.

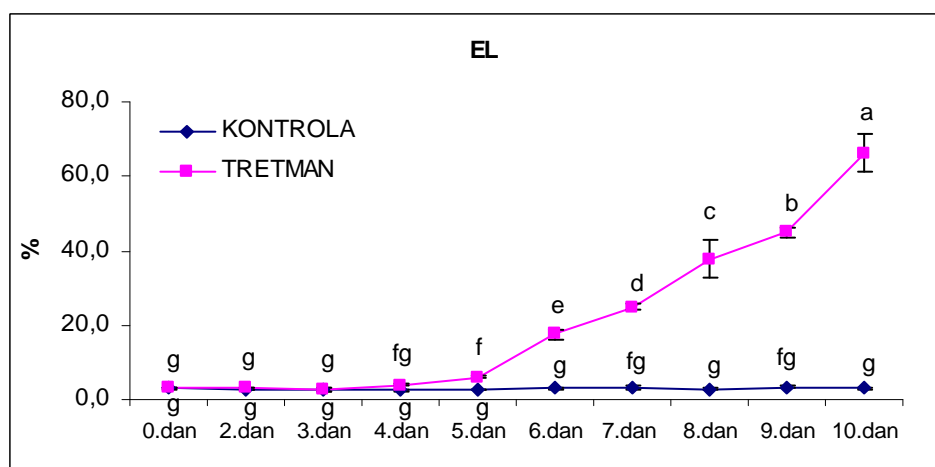
Slika 26 B prikazuje srednje vrijednosti parametra EL u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=2,89). Značajni porast srednje vrijednosti parametra EL u uvjetima suše, u odnosu na kontrolu, zabilježen je petog dana, kada je izmjerena vrijednost iznosila 6,05 % (a u kontroli 2,55 %). Trend kontinuiranog rasta nastavljen je sve do desetog dana, do kojega je vrijednost porasla preko deset puta (iznosila je 66,27 %). Navedene vrijednosti prikazane su u Tablici 5. U kontrolnim biljkama tijekom svih deset dana količina propuštenih elektrolita nije se mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je $2,94 \pm 0,39$ %.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 5. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti (označene različitim slovima) određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za EL u listovima iznosila 2,86. Analiza varijance pokazala je da nema statistički značajne razlike u količini propuštenih elektrolita tijekom deset dana u kontrolnim biljkama kontinuirano uzgajanim na LL i onima koje su uzgajane uz predtretman na HL.

A) LL



B) HL



Slika 26. Srednje vrijednosti i standardne devijacije količine propuštenih elektrolita (EL) tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=2,84) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=2,89).

Tablica 5. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija količine propuštenih elektrolita (EL) tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=2,86).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	4,97 ± 1,34 hi	5,33 ± 0,62 hi	3,12 ± 0,29 i	3,11 ± 0,07 i
2.	4,24 ± 0,96 hi	5,87 ± 1,38 hi	2,82 ± 0,28 i	3,10 ± 0,35 i
3.	3,75 ± 0,24 hi	7,79 ± 2,75 gh	2,57 ± 0,51 i	2,89 ± 0,48 i
4.	3,67 ± 0,09 hi	10,48 ± 2,82 g	2,56 ± 0,20 i	4,01 ± 0,30 hi
5.	2,80 ± 0,14 i	10,11 ± 1,57 g	2,55 ± 0,06 i	6,05 ± 0,33 h
6.	3,18 ± 0,19 i	15,11 ± 1,11 f	3,14 ± 0,21 i	17,56 ± 1,28 f
7.	4,12 ± 0,30 hi	16,52 ± 2,02 f	3,23 ± 0,36 hi	24,95 ± 0,77 e
8.	3,86 ± 0,24 hi	24,28 ± 2,26 e	2,72 ± 0,27 i	37,84 ± 5,24 c
9.	3,98 ± 0,52 hi	31,79 ± 4,32 d	3,32 ± 0,22 hi	45,00 ± 1,44 b
10.	3,03 ± 0,50 i	40,46 ± 4,35 c	3,06 ± 0,16 i	66,27 ± 5,26 a

3.3. Razina lipidne peroksidacije (TBARS)

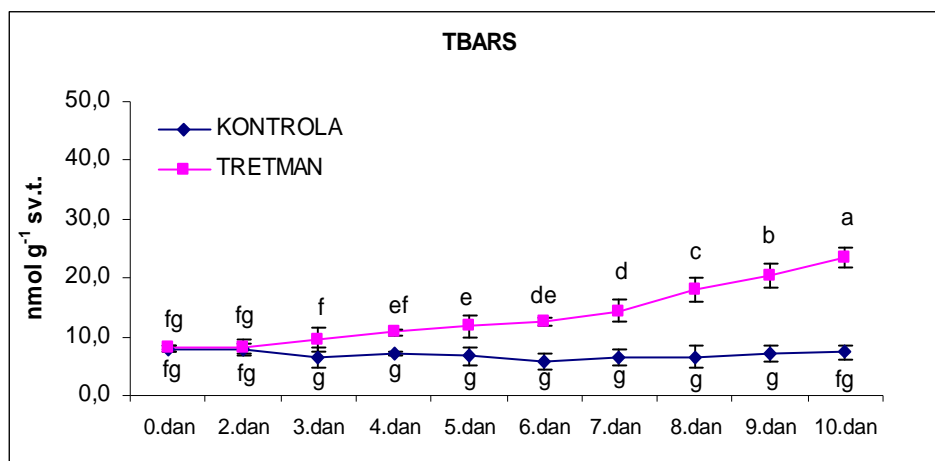
Razina peroksidacije lipida procijenjena je mjerenjem koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja. S obzirom da su eksperimenti ponovljeni tri puta, konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek 9 mjerenja.

Na Slici 27 A prikazane su srednje vrijednosti koncentracije TBARS u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=2,21). Kod biljaka izloženih suši, koncentracija TBARS, u odnosu na kontrolne biljke, značajno se povećala trećeg dana. Izmjerena vrijednost iznosila je 9,49 nmol g⁻¹ sv.t. u suši, a 6,49 nmol g⁻¹ sv.t. u kontroli. Najveća vrijednost izmjerena je desetog dana suše (23,40 nmol g⁻¹ sv.t.), što je oko dva i pol puta više u odnosu na treći dan, a tri puta više u odnosu na kontrolu istog, desetog dana (7,42 nmol g⁻¹ sv.t.). Navedene vrijednosti prikazane su u Tablici 6. U kontrolnim biljkama koncentracija TBARS tijekom deset dana nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost bila je 6,86 ± 1,02 nmol g⁻¹ sv.t.

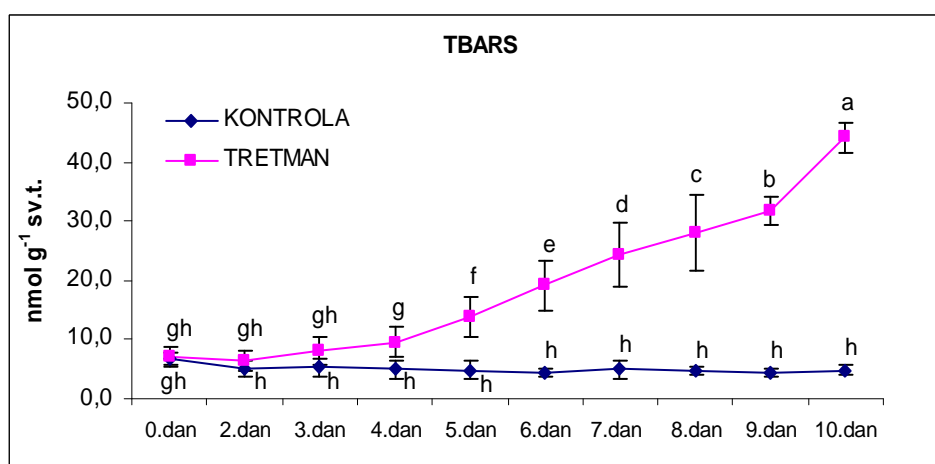
Slika 27 B prikazuje srednje vrijednosti koncentracije TBARS u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=3,41). Značajni porast TBARS u uvjetima suše zabilježen je četvrtog dana, kada je izmjerena vrijednost iznosila 9,61 nmol g⁻¹ sv.t., u odnosu na kontrolnu od 4,95 nmol g⁻¹ sv.t. Trend kontinuiranog rasta nastavljen je sve do desetog dana, do kojega je vrijednost porasla više od četiri puta u odnosu na četvrti dan (iznosila je 44,14 nmol g⁻¹ sv.t.), a nešto više od devet puta u odnosu na kontrolu. Navedene vrijednosti prikazane su u Tablici 6. U kontrolnim biljkama tijekom svih deset dana koncentracija TBARS nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je 5,53 ± 1,20 nmol g⁻¹ sv.t.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 6. Statistički značajne razlike (p<0,05) između srednjih vrijednosti (označene različitim slovima) određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za koncentraciju TBARS u listovima iznosila 3,48. ANOVA je pokazala je da nema statistički značajne razlike u koncentraciji produkata peroksidacije lipida (TBARS) tijekom deset dana u kontrolnim biljkama kontinuirano uzgajanim na LL i onima koje se uzgajane uz predtretman na HL.

A) LL



B) HL



Slika 27. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije produkata peroksidacije lipida (TBARS) u nmol g^{-1} svježe tvari tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=2,21) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=3,41).

Tablica 6. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija koncentracije produkata peroksidacije lipida (TBARS) u nmol g^{-1} svježe tvari tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=3,48).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	7,87 ± 0,52 gh	8,08 ± 0,56 gh	6,72 ± 0,98 gh	7,10 ± 1,64 gh
2.	7,76 ± 1,00 gh	8,19 ± 1,19 gh	5,04 ± 1,35 h	6,33 ± 1,63 gh
3.	6,49 ± 1,67 gh	9,49 ± 2,11 g	5,30 ± 1,54 h	8,03 ± 2,32 gh
4.	7,12 ± 0,47 gh	10,82 ± 0,47 fg	4,95 ± 1,47 h	9,61 ± 2,68 g
5.	6,63 ± 1,44 gh	11,78 ± 1,94 fg	4,85 ± 1,43 h	13,94 ± 3,35 f
6.	5,84 ± 1,33 h	12,52 ± 0,73 fg	4,36 ± 0,55 h	19,11 ± 4,26 e
7.	6,34 ± 1,37 gh	14,44 ± 1,72 f	5,01 ± 1,50 h	24,25 ± 5,36 d
8.	6,58 ± 1,78 gh	18,03 ± 1,88 e	4,85 ± 0,71 h	28,00 ± 6,42 c
9.	7,17 ± 1,43 gh	20,53 ± 1,99 e	4,33 ± 0,69 h	31,67 ± 2,37 b
10.	7,42 ± 1,17 gh	23,40 ± 1,79 de	4,79 ± 0,86 h	44,14 ± 2,60 a

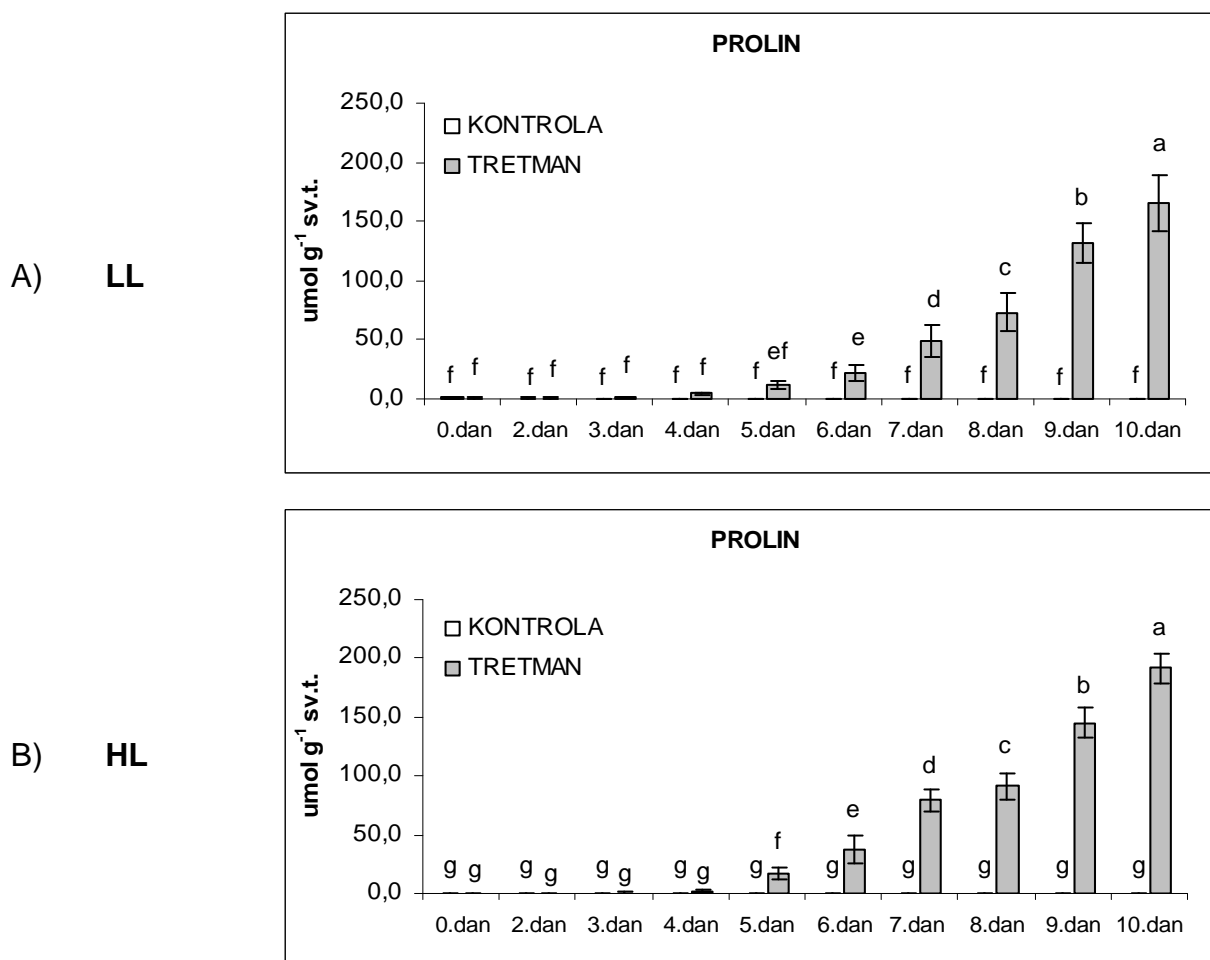
3.4. Sadržaj slobodnog prolina

Sadržaj slobodnog prolina mjereno je tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjereno je u 3 ponavljanja. Konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek 9 mjerenja budući da su eksperimenti ponovljeni tri puta.

Na Slici 28 A prikazane su srednje vrijednosti sadržaja slobodnog prolina u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=12,67). Šestog dana suše zabilježeno je značajno povećanje sadržaja slobodnog prolina ($22,58 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$) u odnosu na kontrolne biljke ($0,60 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Trend kontinuiranog porasta nastavljen je sve do desetog dana suše, kada je izmjerena najveća vrijednost, $165,47 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$, što je sedam puta više u odnosu na odnosu na šesti dan suše. Sadržaj slobodnog prolina u kontrolnim biljkama tijekom deset dana nije se značajno mijenjao, a prosječna vrijednost iznosila je $0,68 \pm 0,18 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 7.

Slika 28 B prikazuje srednje vrijednosti sadržaja slobodnog prolina u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=8,65). Značajni porast slobodnog prolina u uvjetima suše zabilježen je petog dana, kada je izmjerena vrijednost iznosila $17,56 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$, u odnosu na kontrolnu od $0,47 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Trend kontinuiranog rasta nastavljen je sve do desetog dana, do kojega je vrijednost porasla gotovo jedanaest puta u odnosu na peti dan suše, a iznosila je $191,51 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Sve srednje vrijednosti prikazane su u Tablici 7. Tijekom deset dana mjerenja sadržaj prolina u listovima kontrolnih biljaka nije se značajno mijenjao, a zabilježene vrijednosti iznosile su od $0,47$ do $0,50 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ sv.t.}$

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 7. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti (označene različitim slovima) određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za sadržaj slobodnog prolina u listovima iznosila 11,51. ANOVA je pokazala da nema statistički značajne razlike u sadržaju slobodnog prolina tijekom deset dana u kontrolnim biljkama kontinuirano uzgajanim na LL i onima koje su uzgajane uz predtretman na HL.



Slika 28. Srednje vrijednosti i standardne devijacije sadržaja slobodnog prolina u $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježe tvari tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=12,67) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=8,65).

Tablica 7. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija sadržaja slobodnog prolina u $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježe tvari tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=11,51).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	0,85 ± 0,10 i	0,80 ± 0,27 i	0,48 ± 0,14 i	0,51 ± 0,16 i
2.	0,72 ± 0,18 i	0,84 ± 0,21 i	0,47 ± 0,08 i	0,58 ± 0,08 i
3.	0,71 ± 0,06 i	1,33 ± 0,18 i	0,48 ± 0,15 i	0,68 ± 0,19 i
4.	0,68 ± 0,13 i	4,33 ± 0,94 i	0,48 ± 0,15 i	2,11 ± 0,66 i
5.	0,63 ± 0,21 i	12,01 ± 3,87 hi	0,47 ± 0,10 i	17,56 ± 5,17 h
6.	0,60 ± 0,15 i	22,58 ± 6,85 h	0,48 ± 0,15 i	37,32 ± 11,46 g
7.	0,67 ± 0,13 i	48,27 ± 13,58 g	0,47 ± 0,12 i	79,20 ± 10,00 f
8.	0,59 ± 0,16 i	73,31 ± 15,65 f	0,49 ± 0,07 i	91,00 ± 11,29 e
9.	0,50 ± 0,02 i	131,84 ± 16,57 d	0,45 ± 0,12 i	144,69 ± 12,67 c
10.	0,56 ± 0,15 i	165,47 ± 22,95 b	0,50 ± 0,10 i	191,51 ± 12,47 a

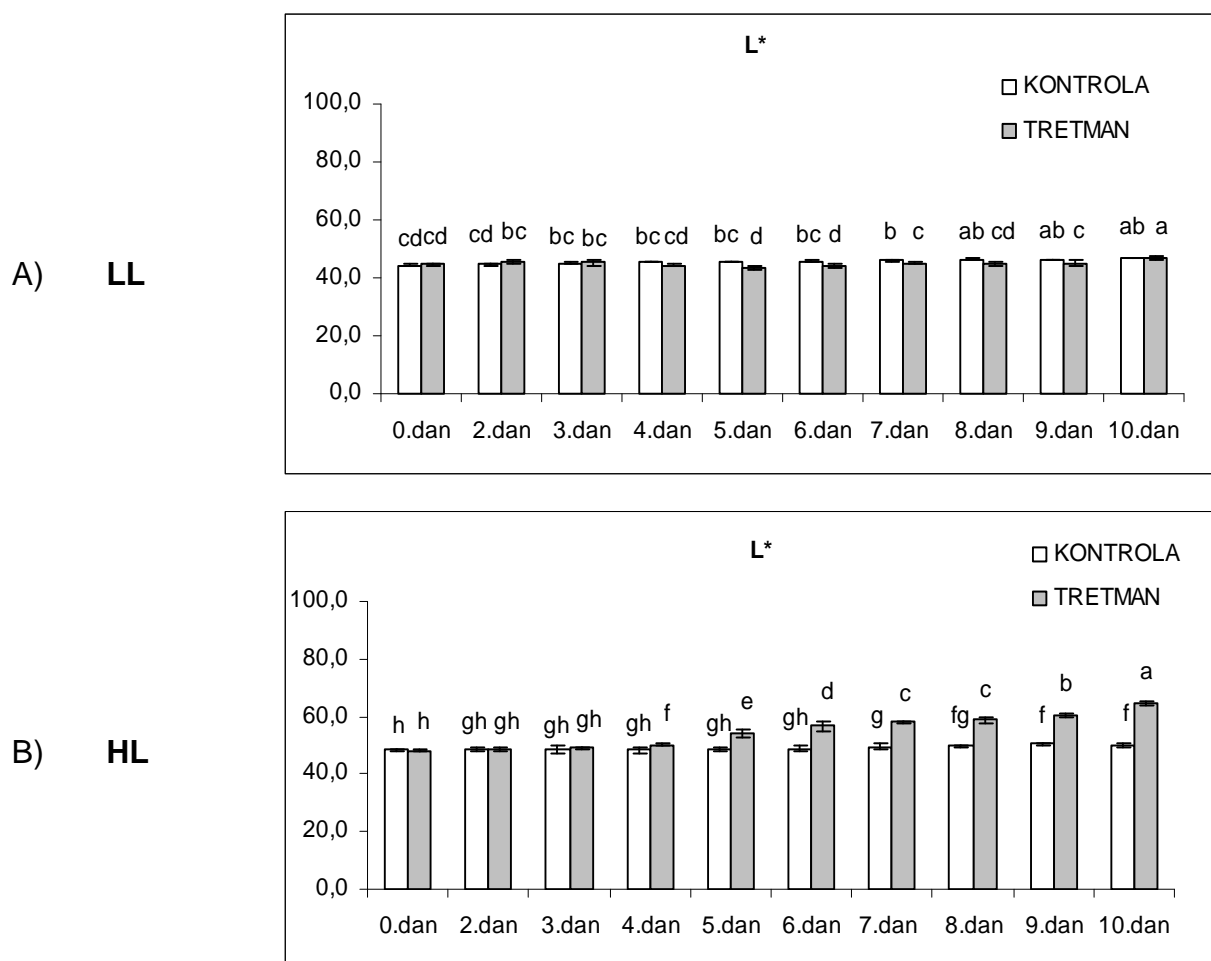
3.5. Promjena boje listova

Promjena boje listova određivana je kromametrom ($L^*a^*b^*$ sustav) tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 15 ponavljanja. S obzirom da su eksperimenti ponovljeni tri puta konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek 45 mjerenja.

L^* vrijednost, koja se može mjeriti u rasponu od 0 (crno) do 100 (bijelo), označava relativnu svjetlinu uzorka. Srednje vrijednosti relativne svjetline uzoraka u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL prikazane su na Slici 29 A. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,86$). Vrijednosti L^* u listovima tretmana sušom od 0. do 10. dana varirale su u rasponu od $45,26 \pm 1,73$, pri čemu se statistički značajno od svih razlikovala samo najveća vrijednost izmjerena desetog dana suše (46,98), no ista se nije razlikovala od desetog dana u kontroli (46,74). Vrijednosti L^* u listovima kontrolnih biljaka varirale su u rasponu od $45,53 \pm 1,21$. Smanjenje vrijednosti parametra L^* zabilježeno je u listovima tretmana petog dana suše (43,53), u odnosu na listove kontrole (45,39). Isti odnos ostao je nepromijenjen do devetog dana suše. Sve srednje vrijednosti su navedene u Tablici 8.

Slika 29 B prikazuje srednje vrijednosti relativne svjetline u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL ($LSD=0,94$). Značajni porast relativne svjetline listova zabilježen je četvrtog dana u uzorcima izloženim suši. Vrijednost L^* u tretmanu sušom iznosila je 50,13 dok je u kontroli iznosila 48,55. Značajno povećanje L^* vrijednosti odvijalo se sve do desetog dana, u kojemu je vrijednost iznosila 64,68. U listovima kontrolnih biljaka zabilježena L^* vrijednost značajno se razlikovala nultog, sedmog i desetog dana, u smislu povećanja relativne svjetline uzoraka. Sve srednje vrijednosti navedene su u Tablici 8.

Rezultati ANOVA-e između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 8. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za parametar L^* iznosila 1,05. ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku u svjetlini uzoraka tijekom deset dana u kontrolnim biljkama kontinuirano uzgajanim na LL i onima koje se uzgajane uz predtretman na HL.



Slika 29. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra L*, koji određuje relativnu svjetlinu uzorka, tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,86) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,94).

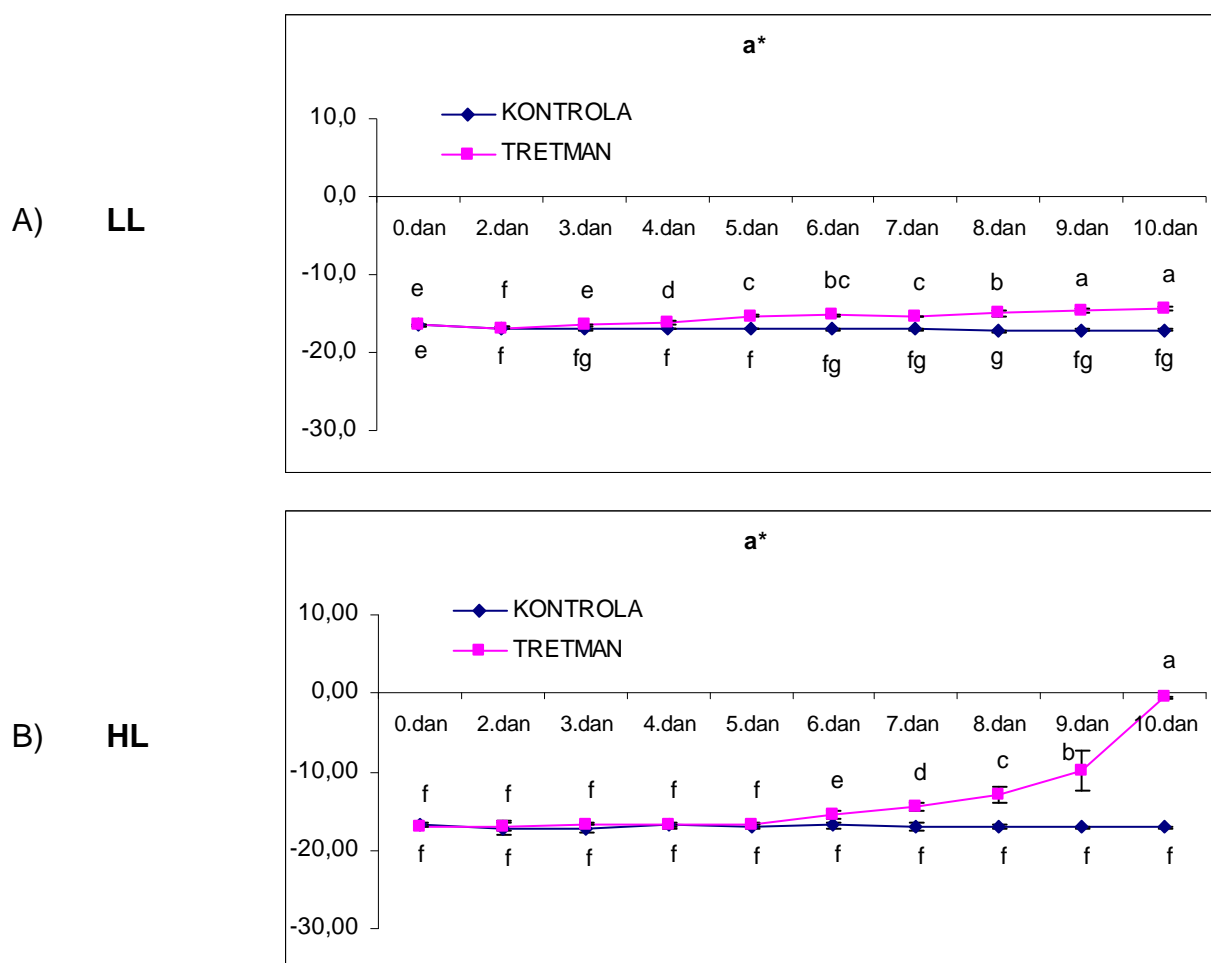
Tablica 8. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra L*, koji određuje relativnu svjetlinu uzorka, tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=1,05).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	44,32 ± 0,21 k	44,52 ± 0,41 k	48,41 ± 0,47 gh	48,17 ± 0,22 h
2.	44,65 ± 0,36 jk	45,44 ± 0,59 jk	48,68 ± 0,90 gh	48,48 ± 0,89 gh
3.	45,16 ± 0,59 jk	45,34 ± 0,88 jk	48,48 ± 1,23 gh	49,12 ± 0,51 gh
4.	45,41 ± 0,02 jk	44,40 ± 0,37 k	48,55 ± 1,04 gh	50,13 ± 0,32 fg
5.	45,39 ± 0,06 jk	43,53 ± 0,53 k	48,71 ± 0,80 gh	54,24 ± 1,64 e
6.	45,69 ± 0,30 j	44,18 ± 0,69 k	48,74 ± 0,94 gh	56,80 ± 1,69 d
7.	46,02 ± 0,41 ij	45,14 ± 0,37 jk	49,36 ± 1,02 fg	58,14 ± 0,48 c
8.	46,47 ± 0,24 ij	44,86 ± 0,63 jk	49,65 ± 0,44 fg	58,75 ± 1,31 c
9.	46,49 ± 0,06 ij	45,13 ± 1,15 jk	50,44 ± 0,28 f	60,21 ± 0,62 b
10.	46,74 ± 0,19 ij	46,98 ± 0,55 i	50,04 ± 0,98 fg	64,68 ± 0,71 a

Negativna vrijednost parametra a^* određuje zelenu boju, dok pozitivna određuje crvenu boju uzoraka. Slika 30 A prikazuje promjene zelene boje u listovima klijanaca koji su kontinuirano uzgajani na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=0,31). Slabo, ali statistički značajno povećanje vrijednosti parametra a^* (smanjenje zelene boje) u listovima tretmana sušom zabilježeno je trećeg dana (-16,48), u odnosu na kontrolu (-17,00), i dalje je značajno raslo do petog dana (-15,29). Do sedmog dana nije bilo značajnih promjena u listovima tretmana sušom, no u osmom i devetom danu su zabilježena nova značajna povećanja parametra a^* međusobno u tretmanima (-14,94 i -14,61), kao i u usporedbi s kontrolama. Najveća srednja vrijednost iznosila je -14,44 u desetom danu suše (Tablica 9). Zelena boja kontrolnih uzoraka tijekom deset dana varirala je u rasponu od $16,91 \pm 0,38$.

Srednje vrijednosti parametra a^* u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazane su na Slici 30 B (LSD=1,05). Značajan porast vrijednosti parametra a^* (smanjenje zelene boje) u uvjetima suše, u odnosu na kontrolu, zabilježen je šestog dana. U tretmanu sušom vrijednost je iznosila -15,53, dok je u kontroli iznosila -16,81. Od šestog do desetog dana suše vrijednosti su svakodnevno kontinuirano značajno rasle. Desetog dana suše zabilježena je vrijednost iznosila -0,55. U listovima kontrolnih biljaka nije bilo značajnih promjena zelene boje, a izmjerene vrijednosti svih deset dana su varirale u rasponu od -16,73 do -17,32.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 9. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za parametar a^* iznosila 0,81. ANOVA nije pokazala statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka kontinuirano uzgajanih na LL i onih koje su uzgajane uz predtretman na HL.



Slika 30. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra a^* (negativna vrijednost - zelena boja; pozitivna - crvena boja) tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,31) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=1,05).

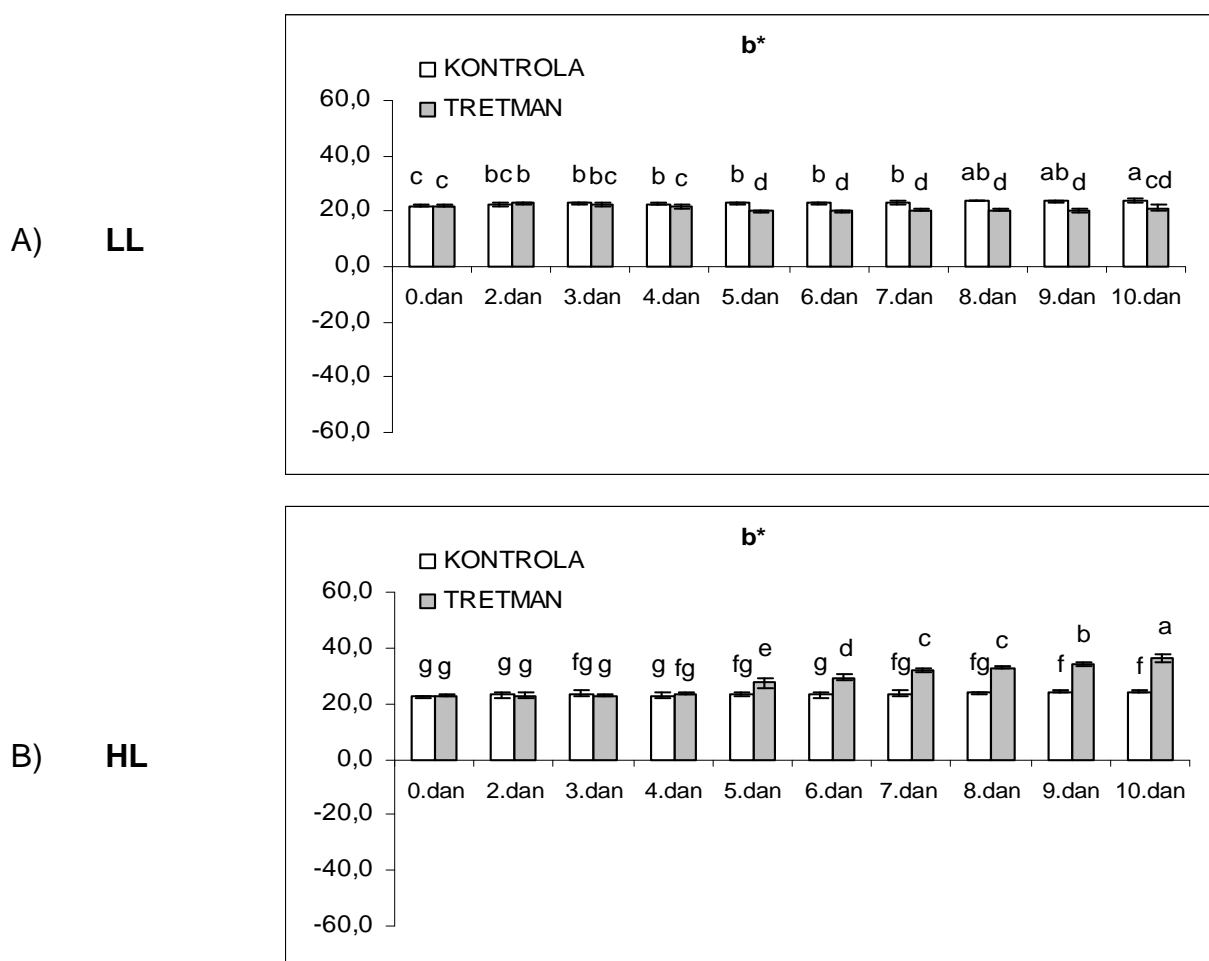
Tablica 9. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra a^* , tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,81).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	-16,53 ± 0,17 fg	-16,45 ± 0,11 fg	-16,73 ± 0,15 fg	-16,90 ± 0,19 fg
2.	-16,87 ± 0,14 fg	-16,89 ± 0,11 fg	-17,20 ± 0,74 g	-16,91 ± 0,66 fg
3.	-17,00 ± 0,15 g	-16,48 ± 0,18 fg	-17,32 ± 0,54 g	-16,69 ± 0,14 fg
4.	-16,94 ± 0,09 g	-16,10 ± 0,30 f	-16,87 ± 0,47 fg	-16,81 ± 0,18 fg
5.	-16,97 ± 0,07 g	-15,29 ± 0,21 ef	-16,90 ± 0,33 fg	-16,78 ± 0,16 fg
6.	-17,03 ± 0,16 g	-15,25 ± 0,25 e	-16,81 ± 0,42 fg	-15,53 ± 0,52 ef
7.	-16,99 ± 0,15 g	-15,35 ± 0,06 ef	-16,97 ± 0,48 g	-14,41 ± 0,45 d
8.	-17,29 ± 0,07 g	-14,94 ± 0,33 de	-17,01 ± 0,27 g	-12,97 ± 0,94 c
9.	-17,06 ± 0,05 g	-14,61 ± 0,28 de	-17,08 ± 0,10 g	-9,95 ± 2,57 b
10.	-17,10 ± 0,13 g	-14,44 ± 0,29 de	-17,07 ± 0,14 g	-0,55 ± 0,08 a

Pozitivna vrijednost parametra b^* određuje žutu boju listova. Slika 31 A prikazuje srednje vrijednosti parametra b^* u listovima klijanaca koji su kontinuirano uzgajani na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,78$). U uvjetima suše vrijednosti nultog i desetog dana iznosile su 21,90 odnosno 21,23, i među njima nije bilo statički značajne razlike. U odnosu na kontrolu razlika se pojavila četvrtog dana suše i ostala ista do kraja eksperimenta. U kontrolnim biljkama nije bilo značajnih promjena u parametru b^* , vrijednosti su varirale u rasponu od 21,97 (0. dan) do 23,88 (10. dan) (Tablica 10).

Slika 31 B prikazuje srednje vrijednosti parametra b^* u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL ($LSD=1,15$). Značajan porast vrijednosti parametra b^* (povećanje žute boje) u uvjetima suše, u odnosu na kontrolu, zabilježen je petog dana. U tretmanu sušom vrijednost je iznosila 27,34, dok je u kontroli iznosila 23,23. Od petog do desetog dana suše vrijednosti su svakodnevno rasle. Desetog dana suše zabilježena je vrijednost iznosila 36,27 (u kontroli 24,32). U listovima kontrolnih biljaka izmjerene vrijednosti parametra b^* , koji opisuje promjene žute boje, kroz deset dana su varirale u rasponu od 2,31 do 24,32, što se vidi iz Tablice 10.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 10. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za parametar b^* iznosila 1,06. ANOVA nije pokazala statistički značajnu razliku između kontrolnih biljaka kontinuirano uzgajanih na LL i onih koje su uzgajane uz predtretman na HL.



Slika 31. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra b^* (negativna vrijednost - plava boja; pozitivna vrijednost - žuta boja) tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama.

A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD= 0,78) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=1,15).

Tablica 10. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra a^* tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=1,06).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	21,97 ± 0,49 h	21,90 ± 0,22 h	22,31 ± 0,31 gh	22,87 ± 0,44 gh
2.	22,41 ± 0,52 gh	23,05 ± 0,33 g	23,01 ± 1,03 gh	22,75 ± 1,14 gh
3.	22,80 ± 0,52 gh	22,54 ± 0,58 gh	23,44 ± 1,08 fg	22,76 ± 0,29 gh
4.	22,76 ± 0,23 gh	21,60 ± 0,56 hi	22,95 ± 0,80 gh	23,68 ± 0,08 fg
5.	22,79 ± 0,47 gh	20,06 ± 0,53 i	23,23 ± 0,86 g	27,34 ± 1,48 e
6.	23,00 ± 0,35 gh	20,14 ± 0,42 i	23,03 ± 1,10 gh	29,34 ± 1,13 d
7.	23,07 ± 0,47 g	20,55 ± 0,21 i	23,58 ± 1,21 fg	31,91 ± 0,44 c
8.	23,83 ± 0,17 fg	20,33 ± 0,43 i	23,82 ± 0,32 fg	32,90 ± 0,37 c
9.	23,71 ± 0,34 fg	20,17 ± 0,52 i	24,23 ± 0,25 fg	34,08 ± 0,63 b
10.	23,88 ± 0,47 fg	21,23 ± 0,96 hi	24,32 ± 0,44 f	36,27 ± 1,72 a

3.6. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

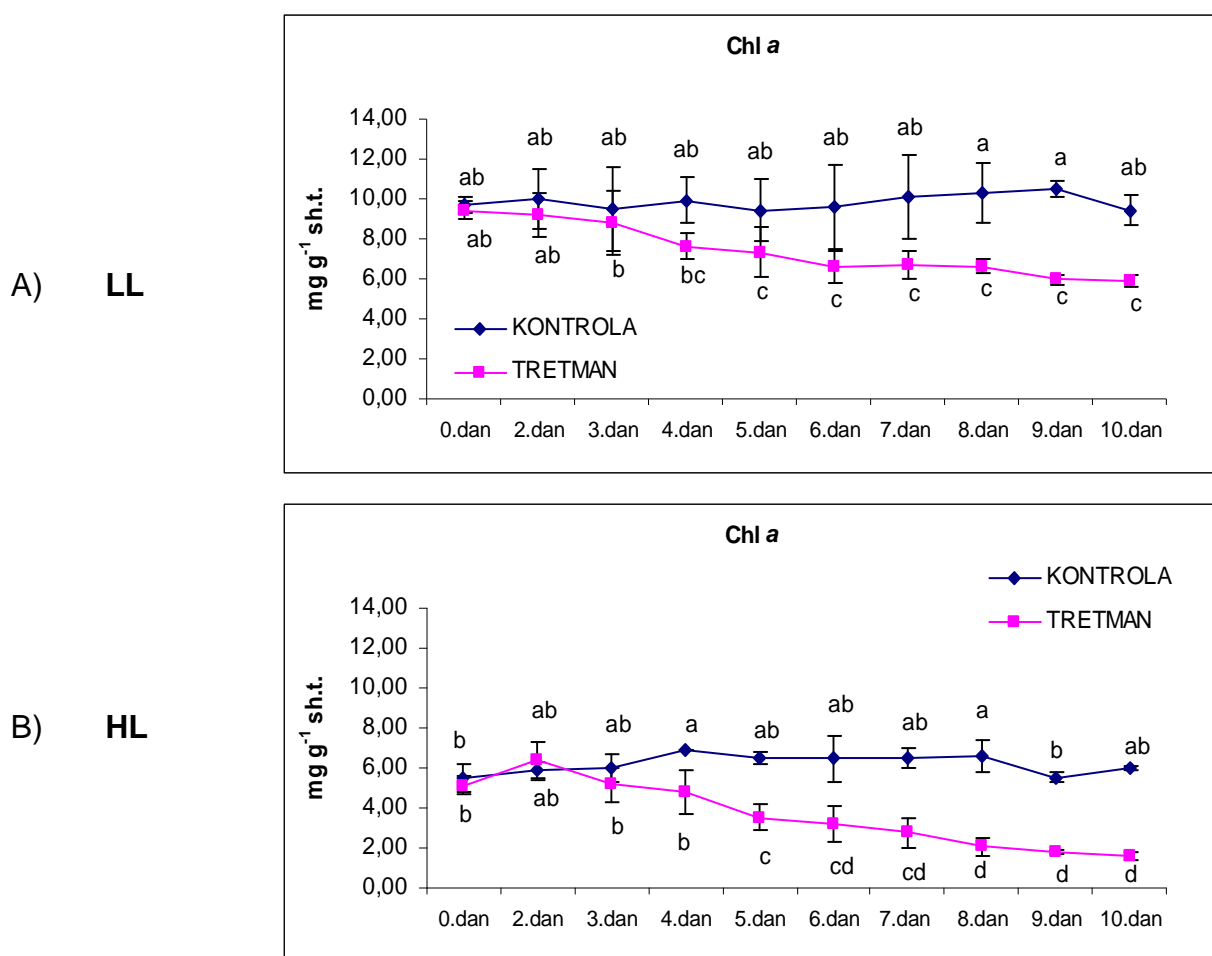
Koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih klorofila *a+b* mjerena je tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeran je u 3 ponavljanja. S obzirom da su eksperimenti ponovljeni tri puta, konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek 9 mjerenja.

3.6.1. Klorofil *a*

Srednje vrijednosti koncentracije klorofila *a* u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL prikazane su na Slici 32 A. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=1,44). Petog dana suše zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije klorofila *a* (7,35 mg g⁻¹ sh.t.), u odnosu na kontrolne biljke (9,40 mg g⁻¹ sh.t.). Do kraja eksperimenta taj se odnos dalje nije značajno mijenjao. Koncentracija klorofila *a* desetog dana suše iznosila je 5,92 mg g⁻¹ sh.t. U listovima kontrolnih biljaka tijekom deset dana koncentracija klorofila *a* nije se mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je 9,94 ± 0,54 mg g⁻¹ sh.t. (Tablica 11).

U listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (Slika 32 B) značajno smanjenje koncentracije klorofila *a*, u odnosu na kontrolu (6,90 mg g⁻¹ sh.t.), zabilježeno je od četvrtog dana suše (4,81 mg g⁻¹ sh.t.). Do desetog dana koncentracija klorofila *a* u suši značajno je smanjena do vrijednosti 1,59 mg g⁻¹ sh.t. Prosječna vrijednost koncentracije klorofila *a* u listovima kontrolnih biljaka iznosila je 6,21 ± 0,70 mg g⁻¹ sh.t. (Tablica 11). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=1,04).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 11. Statistički značajne razlike (p<0,05) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za klorofil *a* u listovima iznosila 1,53. ANOVA je pokazala statistički značajno veću koncentraciju klorofila *a* u listovima kontrolnih klijanaca koji su kontinuirano uzgajani na LL, u odnosu na kontrolne klijance uzgajane na LL uz predtretman na HL.



Slika 32. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila a u mg g^{-1} sh.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=1,44) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=1,04).

Tablica 11. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija koncentracije klorofila a u mg g^{-1} sh.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=1,53).

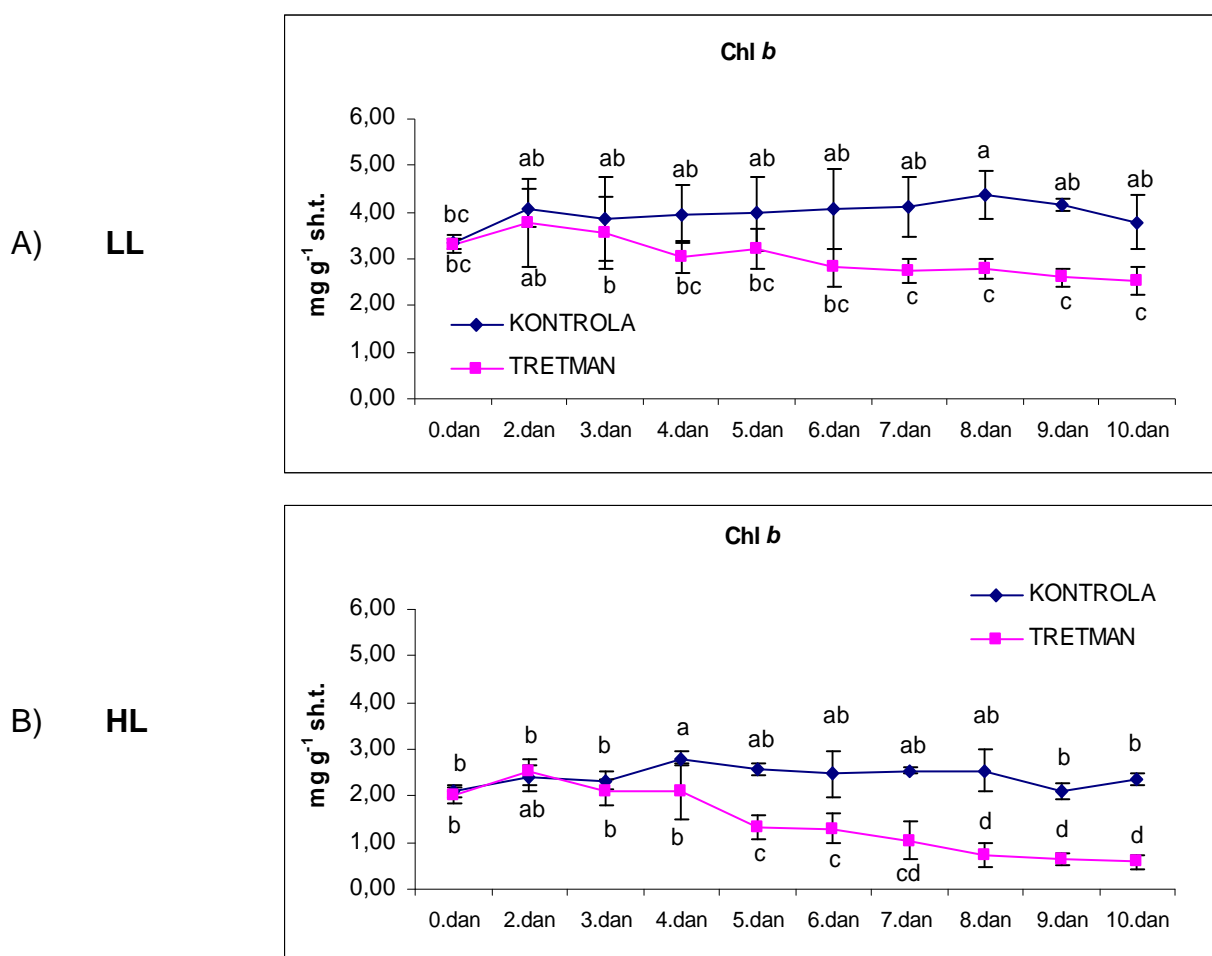
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	9,72 ± 0,42 ab	9,44 ± 0,43 ab	5,51 ± 0,71 cd	5,12 ± 0,45 d
2.	9,99 ± 1,54 ab	9,22 ± 1,12 ab	5,86 ± 0,44 cd	6,44 ± 0,91 cd
3.	9,47 ± 2,10 ab	8,81 ± 1,64 b	5,98 ± 0,72 cd	5,16 ± 0,86 d
4.	9,94 ± 1,11 ab	7,63 ± 0,67 bc	6,90 ± 0,04 c	4,81 ± 1,11 de
5.	9,40 ± 1,55 ab	7,35 ± 1,22 bc	6,48 ± 0,29 cd	3,53 ± 0,67 e
6.	9,60 ± 2,06 ab	6,63 ± 0,82 cd	6,49 ± 1,14 cd	3,20 ± 0,88 ef
7.	10,11 ± 2,11 ab	6,69 ± 0,66 c	6,50 ± 0,51 cd	2,78 ± 0,73 ef
8.	10,30 ± 1,47 ab	6,64 ± 0,33 cd	6,60 ± 0,85 cd	2,07 ± 0,44 ef
9.	10,48 ± 0,41 a	5,97 ± 0,27 cd	5,53 ± 0,26 cd	1,81 ± 0,10 f
10.	9,44 ± 0,76 ab	5,92 ± 0,27 cd	6,00 ± 0,08 cd	1,59 ± 0,22 f

3.6.2. Klorofil *b*

Slika 33 A prikazuje srednje vrijednosti koncentracije klorofila *b* u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=0,71). Značajno smanjenje koncentracije klorofila *b* (2,75 mg g⁻¹ sh.t.) zabilježeno je sedmog dana suše u odnosu na kontrolne biljke (4,12 mg g⁻¹ sh.t.). Taj se odnos do kraja eksperimenta dalje nije značajno mijenjao. Desetog dana suše koncentracija klorofila *b* iznosila je 2,54 mg g⁻¹ sh.t. U listovima kontrolnih biljaka tijekom deset dana koncentracija klorofila *b* nije se mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je 3,87 ± 0,51 mg g⁻¹ sh.t. (Tablica 12).

U listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (Slika 33 B) značajno smanjenje koncentracije klorofila *b*, u odnosu na kontrolu (2,80 mg g⁻¹ sh.t.), zabilježeno je od četvrtog dana suše (2,10 mg g⁻¹ sh.t.). Do desetog dana koncentracija klorofila *b* u suši značajno je smanjena do vrijednosti 0,59 mg g⁻¹ sh.t. Izmjerena koncentracija klorofila *b* u listovima kontrolnih biljaka tijekom deset dana nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost je iznosila je 2,45 ± 0,36 mg g⁻¹ sh.t. (Tablica 12). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=0,40).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 12. Statistički značajne razlike (p<0,05) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za klorofil *b* u listovima iznosila 0,69. ANOVA je pokazala statistički značajno veću koncentraciju klorofila *b* u listovima kontrolnih klijanaca koji su kontinuirano uzgajani na LL, u odnosu na kontrolne klijance uzgajane na LL uz predtretman na HL.



Slika 33. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila *b* u mg g^{-1} sh.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,71) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,40).

Tablica 12. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija koncentracije klorofila *b* u mg g^{-1} sh.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,69).

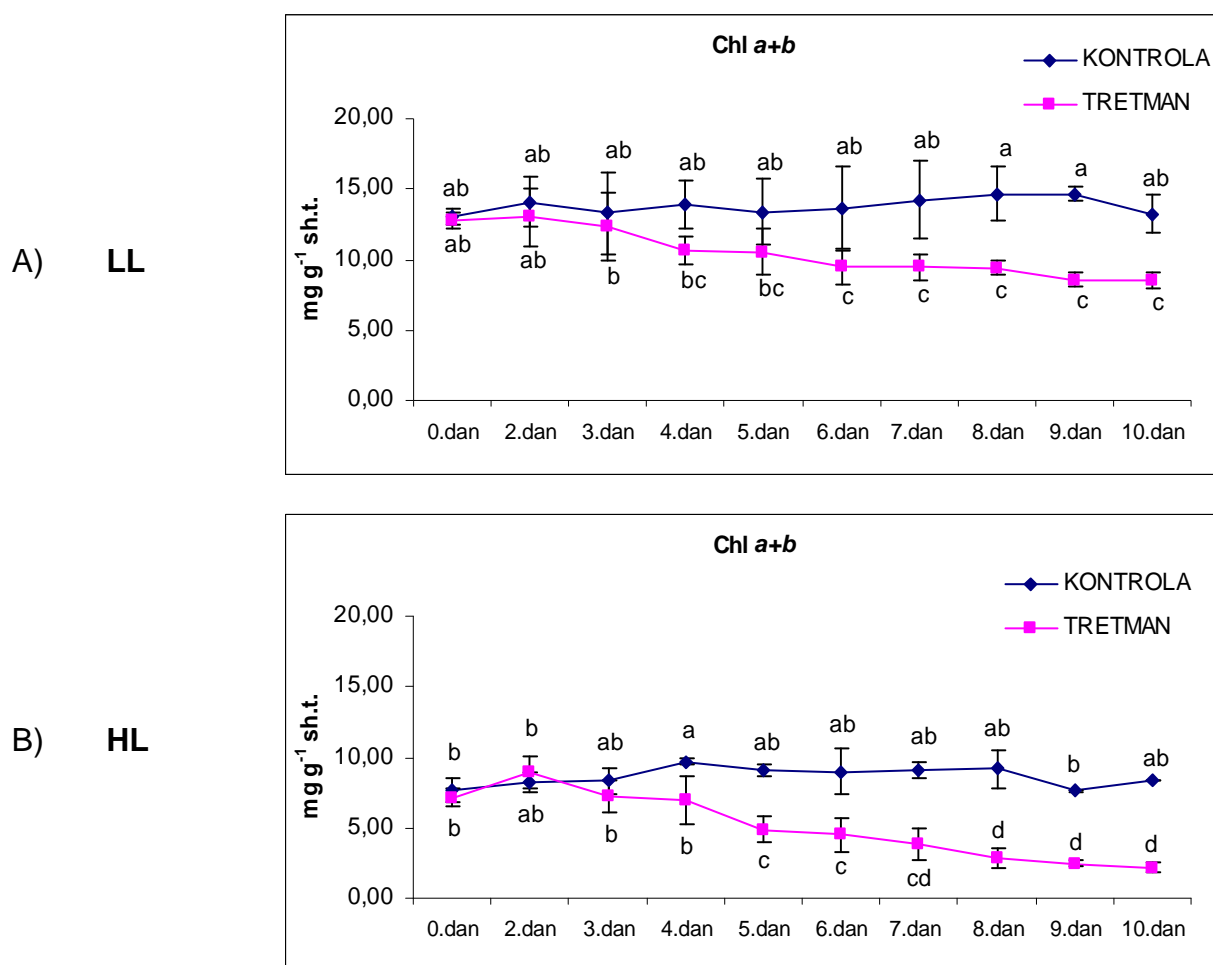
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	3,36 ± 0,15 bc	3,29 ± 0,15 bc	2,09 ± 0,13 d	2,01 ± 0,17 de
2.	4,09 ± 0,41 ab	3,77 ± 0,93 ab	2,38 ± 0,26 cd	2,51 ± 0,27 cd
3.	3,86 ± 0,89 ab	3,56 ± 0,79 b	2,34 ± 0,21 cd	2,09 ± 0,27 d
4.	3,96 ± 0,61 ab	3,05 ± 0,33 bc	2,80 ± 0,16 cd	2,10 ± 0,59 d
5.	3,97 ± 0,78 ab	3,21 ± 0,44 bc	2,57 ± 0,11 cd	1,33 ± 0,25 e
6.	4,06 ± 0,85 ab	2,81 ± 0,40 c	2,47 ± 0,48 cd	1,29 ± 0,32 ef
7.	4,12 ± 0,64 ab	2,75 ± 0,26 cd	2,55 ± 0,08 cd	1,05 ± 0,40 ef
8.	4,37 ± 0,53 a	2,79 ± 0,21 cd	2,55 ± 0,46 cd	0,73 ± 0,24 ef
9.	4,17 ± 0,13 ab	2,60 ± 0,20 cd	2,11 ± 0,18 d	0,65 ± 0,12 ef
10.	3,78 ± 0,58 ab	2,54 ± 0,30 cd	2,35 ± 0,12 cd	0,59 ± 0,15 f

3.6.3. Ukupni klorofili (*a+b*)

Srednje vrijednosti koncentracije ukupnih klorofila (Chl *a+b*) u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL prikazane su na Slici 34 A. Statistički značajno smanjena koncentracija ukupnih klorofila u listovima izloženim suši zabilježena je šestog dana (9,44 mg g⁻¹ sh.t.), u odnosu na koncentraciju u listovima kontrolnih biljaka (13,66 mg g⁻¹ sh.t.). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=2,07). Između listova tretiranih sušom i kontrolnih listova spomenuti je odnos ostao nepromijenjen do kraja eksperimenta. Desetog dana suše koncentracija ukupnih klorofila iznosila je 8,46 mg g⁻¹ sh.t. (Tablica 13). Prosječna vrijednost ukupnih klorofila u kontrolnim biljkama tijekom deset dana mjerenja iznosila je 13,88 ± 0,80 mg g⁻¹ sh.t.

U listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (Slika 34 B) značajno smanjenje koncentracije ukupnih klorofila, u odnosu na kontrolu (9,71 mg g⁻¹ sh.t.), zabilježeno je četvrtog dana suše (6,91 mg g⁻¹ sh.t.). Do desetog dana koncentracija ukupnih klorofila u suši značajno je smanjena do vrijednosti 2,19 mg g⁻¹ sh.t. Izmjerena koncentracija ukupnih klorofila u listovima kontrolnih biljaka tijekom eksperimenta nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je 8,66 ± 1,06 mg g⁻¹ sh.t. (Tablica 13). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=1,41).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 13. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za ukupne klorofile (*a+b*) u listovima iznosila 2,16. ANOVA je pokazala statistički značajno veću koncentraciju ukupnih klorofila u kontrolnim listovima klijanaca koji su kontinuirano uzgajani na LL, u odnosu na kontrolne klijance uzgajane na LL uz predtretman na HL.



Slika 34. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ukupnih klorofila ($a+b$) u mg g^{-1} sh.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=2,07) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=1,41).

Tablica 13. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija ukupnih klorofila ($a+b$) u mg g^{-1} sh.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=2,16).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	13,08 ± 0,57 ab	12,73 ± 0,57 ab	7,60 ± 0,85 cd	7,13 ± 0,61 cd
2.	14,08 ± 1,74 ab	12,99 ± 2,04 ab	8,24 ± 0,70 cd	8,95 ± 1,14 cd
3.	13,33 ± 2,90 ab	12,36 ± 2,42 b	8,31 ± 0,93 cd	7,25 ± 1,11 d
4.	13,90 ± 1,68 ab	10,68 ± 0,99 bc	9,71 ± 0,20 c	6,91 ± 1,70 de
5.	13,37 ± 2,32 ab	10,56 ± 1,65 bc	9,05 ± 0,40 cd	4,86 ± 0,93 e
6.	13,66 ± 2,91 ab	9,44 ± 1,21 c	8,96 ± 1,62 cd	4,49 ± 1,19 ef
7.	14,23 ± 2,75 ab	9,44 ± 0,89 c	9,05 ± 0,59 cd	3,83 ± 1,13 ef
8.	14,67 ± 1,97 a	9,43 ± 0,46 c	9,15 ± 1,31 cd	2,81 ± 0,68 ef
9.	14,65 ± 0,52 a	8,57 ± 0,44 cd	7,64 ± 0,08 cd	2,46 ± 0,21 f
10.	13,22 ± 1,32 ab	8,46 ± 0,55 cd	8,36 ± 0,04 cd	2,19 ± 0,37 f

3.7. Fluorescencija klorofila *a*

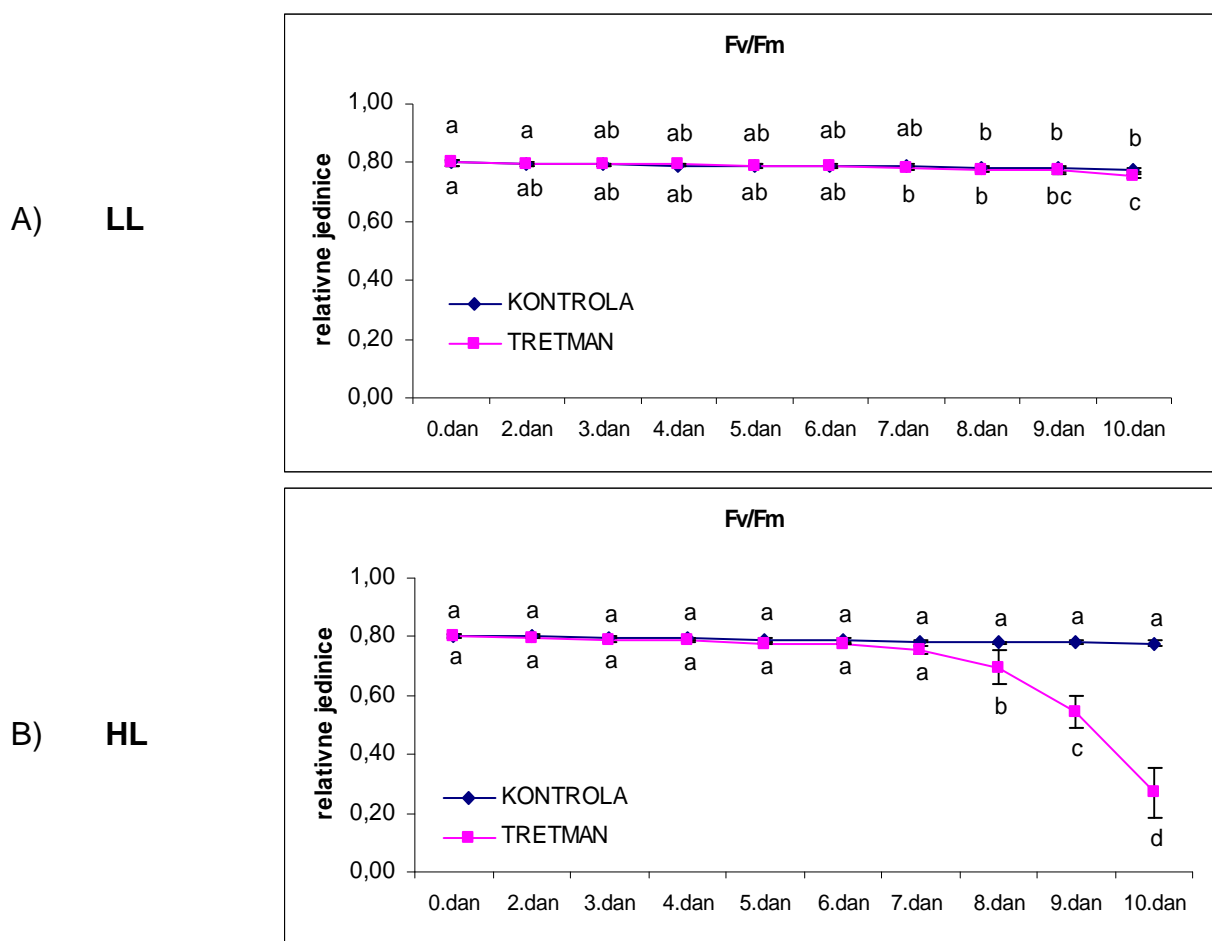
Fluorescencija klorofila *a* mjerena je tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 25 ponavljanja. S obzirom da su eksperimenti ponovljeni tri puta, konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek 75 mjerenja.

3.7.1. Maksimalni prinos kvanta PSII ($F_v/F_m = TR_0/ABS$)

Vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII tijekom deset dana suše u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL (Slika 35 A) iznosile su u prosjeku $0,78 \pm 0,02$. Isti parametar (F_v/F_m) u listovima kontrolnih biljaka imao je prosječnu vrijednost $0,79 \pm 0,01$ (Tablica 14). Maksimalni prinos kvanta PSII (F_v/F_m) samo se u listovima desetog dana suše statistički značajno razlikovao od listova kontrolnih biljaka. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,01$).

Promjene maksimalnog prinosa kvanta PSII u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazane su na Slici 35 B. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,04$). U odnosu na listove kontrole, čija je prosječna vrijednost tijekom deset dana iznosila $0,79 \pm 0,01$, značajno smanjenje srednje vrijednosti ovog parametra u uvjetima suše zabilježeno je osmog dana (0,69). Devetog dana suše vrijednost F_v/F_m bila je značajno niža (0,54), dok je najniža vrijednost izmjerena desetog dana, a iznosila je 0,27 (Tablica 14).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 14. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za maksimalni prinos kvanta PSII (F_v/F_m) u listovima iznosila 0,03. ANOVA je pokazala da u slučaju ovog parametra fluorescencije nema statistički značajne razlike između kontrolnih listova klijanaca koji su kontinuirano uzgajani na LL i kontrolnih klijanaca uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 35. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra F_v/F_m tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,01) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,04).

Tablica 14. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra F_v/F_m tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,03).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	0,80 ± 0,01 a	0,80 ± 0,01 a	0,80 ± 0,01 a	0,80 ± 0,01 a
2.	0,80 ± 0,00 a	0,79 ± 0,00 ab	0,80 ± 0,01 a	0,80 ± 0,00 a
3.	0,79 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab	0,80 ± 0,00 a	0,79 ± 0,00 ab
4.	0,79 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab
5.	0,79 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab	0,79 ± 0,00 ab	0,78 ± 0,00 ab
6.	0,79 ± 0,01 ab	0,79 ± 0,01 ab	0,79 ± 0,01 ab	0,77 ± 0,00 ab
7.	0,79 ± 0,01 ab	0,78 ± 0,01 ab	0,78 ± 0,01 ab	0,76 ± 0,01 b
8.	0,78 ± 0,01 ab	0,78 ± 0,01 ab	0,78 ± 0,00 ab	0,69 ± 0,06 c
9.	0,78 ± 0,01 ab	0,77 ± 0,01 ab	0,78 ± 0,01 ab	0,54 ± 0,06 d
10.	0,78 ± 0,01 ab	0,76 ± 0,01 b	0,78 ± 0,01 ab	0,27 ± 0,08 e

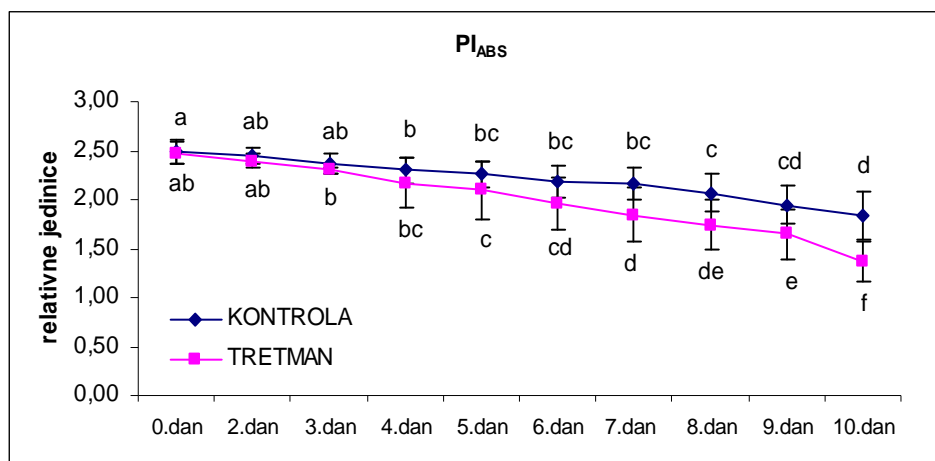
3.7.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})

Slika 36 A prikazuje srednje vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) tijekom deset dana suše u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Smanjenje indeksa fotosintetske učinkovitosti od nultog do desetog dana može se primijetiti u tretmanu sušom (od 2,47 do 1,37), kao i u kontroli (od 2,50 do 1,84). Značajno smanjenje vrijednosti parametra PI_{ABS} u listovima biljaka tretiranih sušom, u odnosu na listove kontrolnih biljaka, zabilježeno je od sedmog do desetog dana suše. Sedmog dana u kontroli je izmjerena vrijednost 2,16, a u tretmanu sušom 1,84. Desetog dana je u kontroli bila 1,84, a u tretmanu 1,37 (Tablica 15). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,18$).

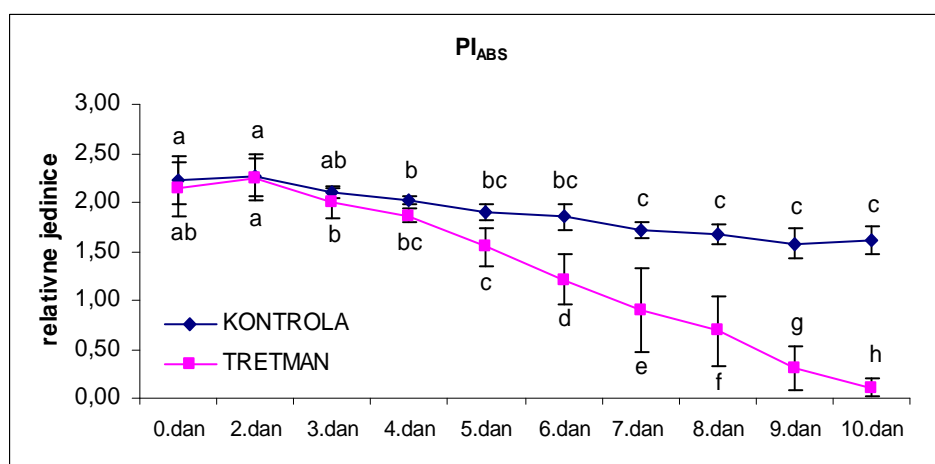
Promjene indeksa fotosintetske učinkovitosti u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL mogu se pratiti na Slici 36 B. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,19$). U odnosu na listove kontrolnih biljaka, čija je prosječna vrijednost tijekom deset dana iznosila $1,92 \pm 0,34$, značajno smanjenje srednje vrijednosti ovog parametra u uvjetima suše zabilježeno je šestog dana (1,21). U listovima tretmana sušom vrijednosti parametra PI_{ABS} kontinuirano su se smanjivale do desetog dana, u kojemu je zabilježena najmanja srednja vrijednost (0,09). Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 15.

U Tablici 15 prikazani su rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u listovima iznosila 0,29. ANOVA je pokazala da se u parametru PI_{ABS} nisu međusobno razlikovali listovi kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i listovi kontrolnih klijanaca uzgajanih na LL uz predtretman na HL.

A) LL



B) HL



Slika 36. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra PI_{ABS} tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,18) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,19).

Tablica 15. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija PI_{ABS} tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,29).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	2,50 ± 0,12 a	2,47 ± 0,11 ab	2,23 ± 0,24 ab	2,13 ± 0,27 bc
2.	2,45 ± 0,08 ab	2,39 ± 0,07 ab	2,26 ± 0,19 ab	2,25 ± 0,24 ab
3.	2,37 ± 0,09 ab	2,30 ± 0,03 ab	2,10 ± 0,06 bc	1,99 ± 0,14 bc
4.	2,30 ± 0,14 ab	2,17 ± 0,26 b	2,02 ± 0,04 bc	1,86 ± 0,06 c
5.	2,26 ± 0,14 ab	2,10 ± 0,29 bc	1,90 ± 0,09 bc	1,54 ± 0,19 d
6.	2,19 ± 0,16 b	1,95 ± 0,27 bc	1,85 ± 0,14 c	1,21 ± 0,26 e
7.	2,16 ± 0,17 b	1,84 ± 0,27 c	1,72 ± 0,08 cd	0,90 ± 0,43 f
8.	2,07 ± 0,19 bc	1,80 ± 0,37 cd	1,67 ± 0,11 cd	0,69 ± 0,36 g
9.	1,94 ± 0,19 bc	1,64 ± 0,26 cd	1,58 ± 0,15 cd	0,31 ± 0,23 h
10.	1,84 ± 0,24 c	1,37 ± 0,21 de	1,61 ± 0,14 cd	0,11 ± 0,09 h

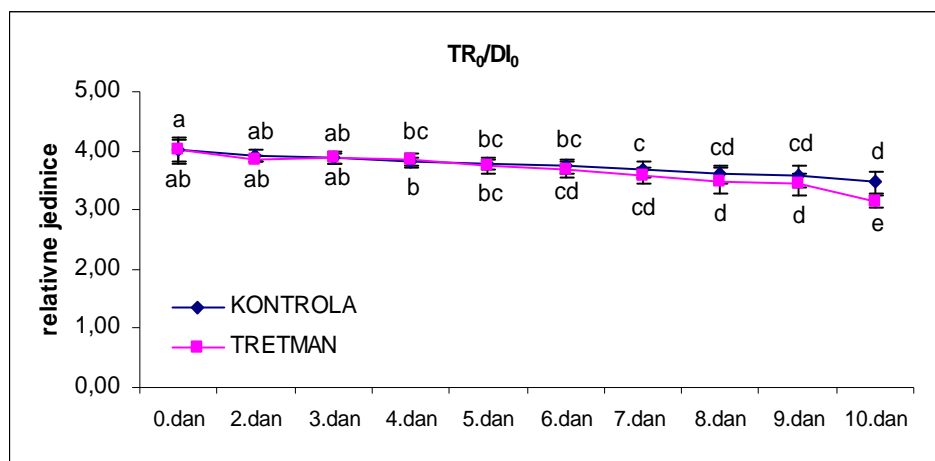
3.7.3. Omjer hvatanja ekscitona i disipacije energije (TR_0/DI_0)

Srednje vrijednosti omjera hvatanja ekscitona i disipacije energije u listovima kontrolnih biljaka i biljaka izloženih suši tijekom deset dana, kontinuirano uzgajanih na LL prikazuje Slika 37 A. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,15$). Prosječna vrijednost tijekom suše iznosila je $3,56 \pm 0,43$, dok je u kontroli bila $3,74 \pm 0,28$. Značajno smanjena srednja vrijednost ovog parametra zabilježena je desetog dana suše (3,15), u odnosu na kontrolu (3,46) (Tablica 16).

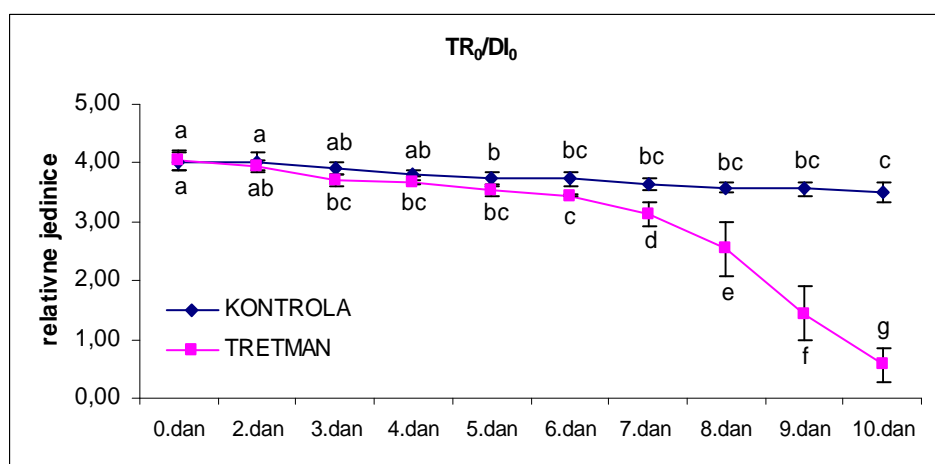
Slika 37 B prikazuje promjene u omjeru hvatanja ekscitona i disipacije energije u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL. U odnosu na listove kontrole, čija je prosječna vrijednost tijekom deset dana iznosila $3,78 \pm 0,27$, značajno smanjenje srednje vrijednosti ovog parametra u uvjetima suše zabilježeno je sedmog dana (3,13). Trend značajnog svakodnevnog smanjivanja vrijednosti u suši je nastavljen, a najmanja vrijednost izmjerena desetog dana iznosila je 0,57, što se vidi iz Tablice 16. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,23$).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 16. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za omjer hvatanja ekscitona i disipacije energije (TR_0/DI_0) u listovima iznosila 0,26. ANOVA je pokazala da se parametar TR_0/DI_0 ne razlikuje u listovima kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.

A) LL



B) HL



Slika 37. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra TR_0/DI_0 tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,15) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,23).

Tablica 16. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra TR_0/DI_0 tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,26).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	4,01 ± 0,21 ab	4,00 ± 0,20 ab	4,02 ± 0,16 a	4,05 ± 0,18 a
2.	3,91 ± 0,10 ab	3,87 ± 0,05 ab	4,03 ± 0,15 a	3,96 ± 0,10 ab
3.	3,88 ± 0,09 ab	3,88 ± 0,10 ab	3,92 ± 0,10 ab	3,71 ± 0,11 bc
4.	3,81 ± 0,08 ab	3,85 ± 0,11 ab	3,82 ± 0,05 ab	3,68 ± 0,04 bc
5.	3,79 ± 0,09 ab	3,74 ± 0,11 bc	3,74 ± 0,10 b	3,52 ± 0,09 bc
6.	3,75 ± 0,12 b	3,68 ± 0,12 bc	3,73 ± 0,13 b	3,45 ± 0,03 c
7.	3,69 ± 0,14 bc	3,58 ± 0,14 bc	3,64 ± 0,11 bc	3,13 ± 0,19 d
8.	3,60 ± 0,14 bc	3,49 ± 0,22 bc	3,58 ± 0,09 bc	2,53 ± 0,46 e
9.	3,57 ± 0,19 bc	3,44 ± 0,18 c	3,56 ± 0,13 bc	1,44 ± 0,45 f
10.	3,46 ± 0,19 c	3,15 ± 0,11 d	3,50 ± 0,16 bc	0,57 ± 0,29 g

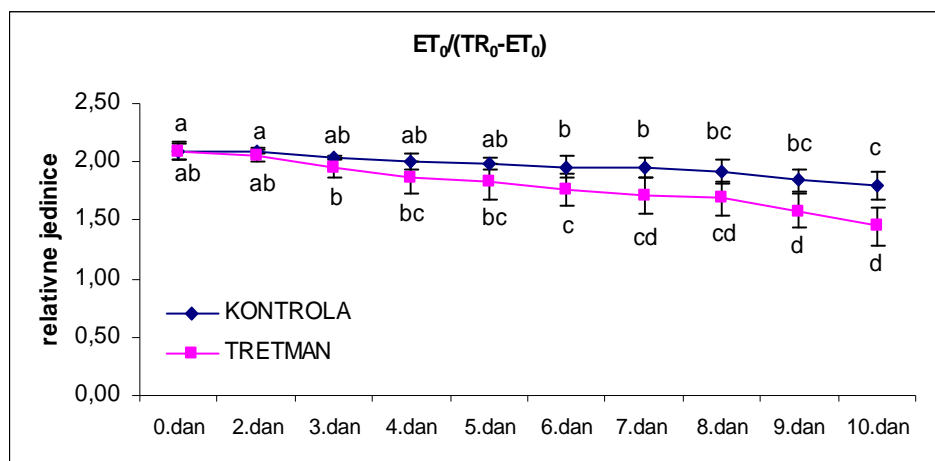
3.7.4. Transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$)

Srednje vrijednosti transporta elektrona dalje od primarnog Q_A u listovima biljaka kontinuirano uzgajanih na LL prikazuje Slika 38 A. Tijekom deset dana vrijednosti ovog parametra su se polako smanjivale u suši (od 2,09 do 1,45), kao i u kontrolama (od 2,10 do 1,80). Značajno smanjenje transporta elektrona dalje od primarnog akceptora zabilježeno je šestog dana suše (1,76), u odnosu na kontrolu (1,96). Daljnje smanjenje je uočeno sve do desetog dana suše. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,13$). Točne vrijednosti mogu se vidjeti u Tablici 17.

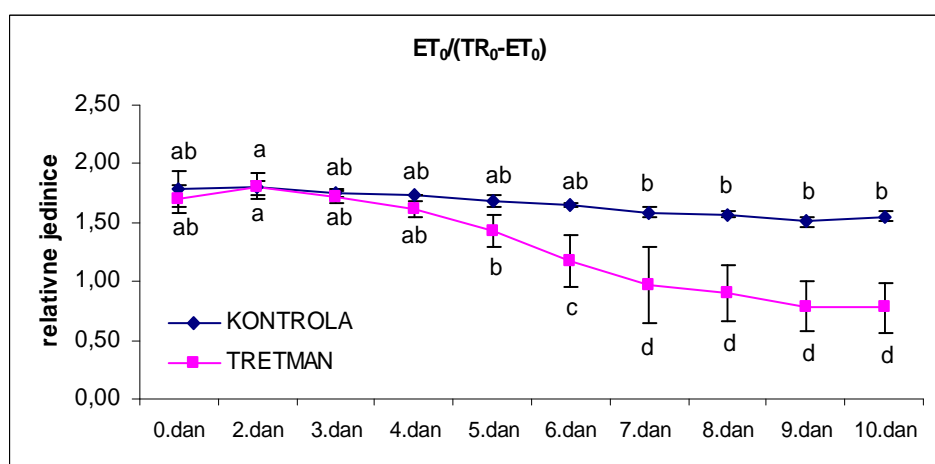
Slika 38 B prikazuje promjene transporta elektrona dalje od primarnog Q_A u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL. U odnosu na listove kontrole, čija je prosječna vrijednost tijekom deset dana iznosila $1,66 \pm 0,15$, značajno smanjenje srednje vrijednosti ovog parametra ($LSD=0,19$) u uvjetima suše zabilježeno je šestog dana, kada je srednja vrijednost iznosila 1,17. Trend smanjenja transporta elektrona u suši nastavljen je do desetog dana, u kojem je srednja vrijednost iznosila je 0,77 (Tablice 17).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 17. Najmanja značajna razlika (LSD) za transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A iznosi 0,18 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti. ANOVA je pokazala da se parametar $ET_0/(TR_0-ET_0)$ razlikuje u listovima kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL, nultog i drugog dana, kao i kasnije, od šestog dana do kraja eksperimenta.

A) LL



B) HL



Slika 38. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,13) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,19).

Tablica 17. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,18).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	2,10 ± 0,08 a	2,09 ± 0,07 a	1,78 ± 0,15 bc	1,71 ± 0,12 bc
2.	2,10 ± 0,02 a	2,06 ± 0,04 a	1,80 ± 0,06 bc	1,81 ± 0,11 bc
3.	2,03 ± 0,02 ab	1,95 ± 0,08 ab	1,75 ± 0,04 bc	1,72 ± 0,05 bc
4.	2,01 ± 0,07 ab	1,87 ± 0,14 b	1,74 ± 0,01 bc	1,62 ± 0,07 cd
5.	1,99 ± 0,05 ab	1,84 ± 0,16 b	1,69 ± 0,05 bc	1,43 ± 0,13 d
6.	1,96 ± 0,10 ab	1,76 ± 0,14 bc	1,65 ± 0,02 c	1,17 ± 0,22 e
7.	1,95 ± 0,09 ab	1,71 ± 0,15 bc	1,59 ± 0,04 cd	0,96 ± 0,32 f
8.	1,92 ± 0,09 ab	1,69 ± 0,14 bc	1,57 ± 0,02 cd	0,90 ± 0,23 fg
9.	1,84 ± 0,09 b	1,58 ± 0,15 cd	1,51 ± 0,04 cd	0,79 ± 0,21 fg
10.	1,80 ± 0,12 bc	1,45 ± 0,16 d	1,56 ± 0,04 cd	0,77 ± 0,21 g

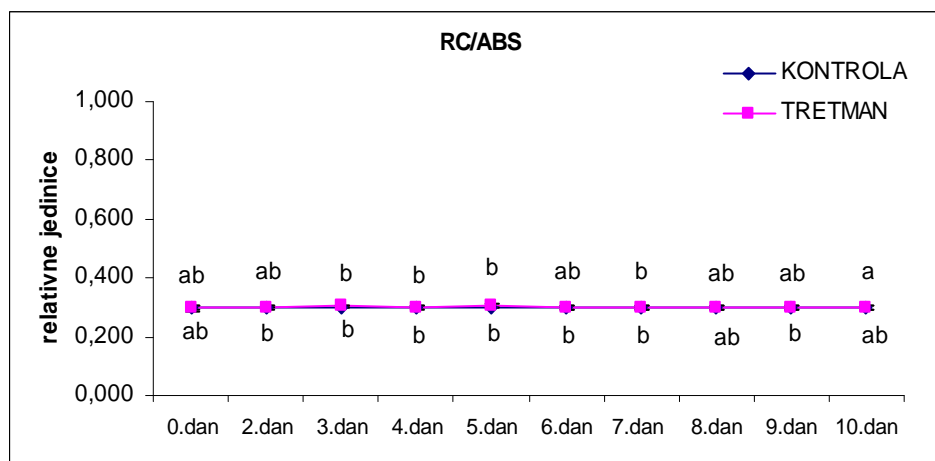
3.7.5. Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS)

U listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL omjer koncentracije reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS) tijekom deset dana suše nije se značajno mijenjao ($LSD=0,003$) u odnosu na omjer navedenog u kontrolnim biljkama, što se vidi na Slici 39 A. Prosječna vrijednost navedenog parametra u listovima tretmana sušom od 0. do 10. dana, kao i u kontrolama, iznosila je 0,30 (Tablica 18).

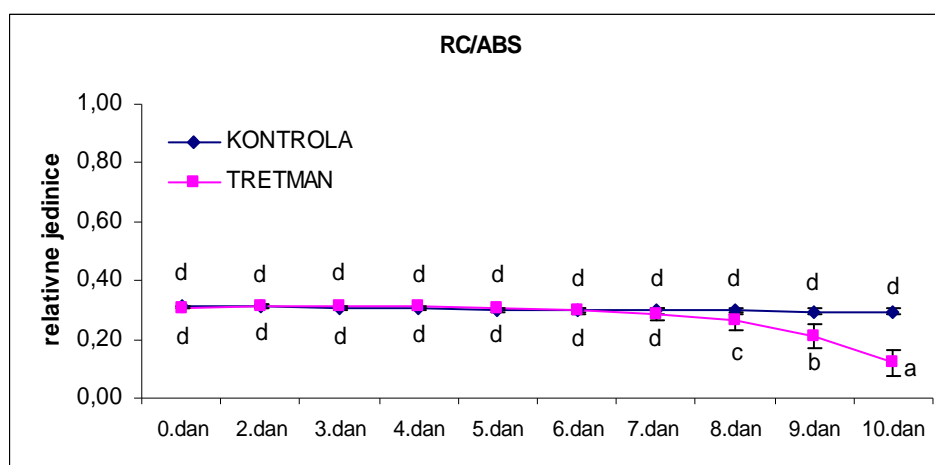
Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS) u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazan je na Slici 39 B. Prosječna vrijednost parametra RC/ABS u listovima kontrolnih biljaka kroz deset dana iznosila je $0,30 \pm 0,01$. Od osmog dana pa sve do kraja eksperimenta zabilježeno je značajno smanjenje srednjih vrijednosti parametra RC/ABS u listovima biljaka izloženih suši, u odnosu na kontrolu. Srednja vrijednost osmog dana u tretmanu sušom iznosila je 0,26, a u kontroli 0,30. Devetog dana mjerenja srednja vrijednost u tretmanu je značajno smanjena na 0,21, a desetog na 0,12, što se vidi iz Tablice 18. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,028$).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 18. Najmanja značajna razlika (LSD) za omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila iznosi 0,024 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti. Nije zabilježena razlika između kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.

A) LL



B) HL



Slika 39. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra RC/ABS tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,003) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,028).

Tablica 18. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra RC/ABS tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,024).

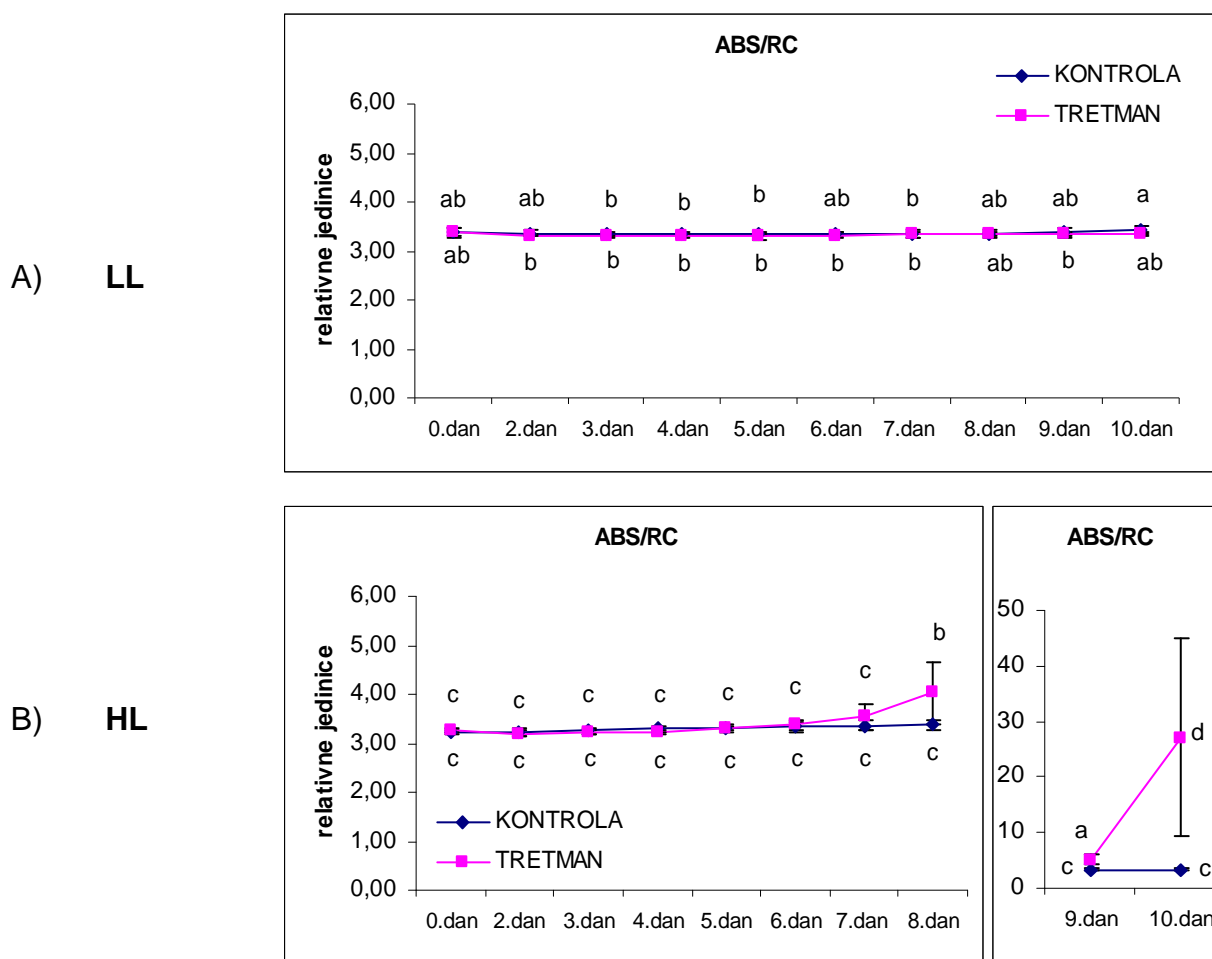
DAN	LL				HL				
	Kontrola		Tretman sušom		Kontrola		Tretman sušom		
0.	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd	0,31	± 0,00	d
2.	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,00	cd	0,31	± 0,01	d
3.	0,30	± 0,00	cd	0,30	± 0,00	cd	0,31	± 0,01	cd
4.	0,30	± 0,00	cd	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,00	cd
5.	0,30	± 0,00	cd	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd
6.	0,30	± 0,00	cd	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd
7.	0,30	± 0,00	cd	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd
8.	0,30	± 0,00	cd	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd
9.	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd	0,29	± 0,01	cd
10.	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd	0,30	± 0,01	cd
							0,12	± 0,04	e

3.7.6. Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC)

U listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC) tijekom deset dana suše nije se značajno mijenjala (LSD=0,07) u odnosu na apsorpciju kontrolnih biljaka, što se vidi na Slici 40 A. Prosječna vrijednost navedenog parametra u listovima tretmana sušom od 0. do 10. dana iznosila je $3,36 \pm 0,04$, dok je u listovima kontrolnih biljaka iznosila $3,38 \pm 0,05$ (Tablica 19).

Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC) u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazana je na Slici 40 B. Prosječna vrijednost parametra ABS/RC u listovima kontrolnih biljaka kroz deset dana iznosila je $3,31 \pm 0,10$. Od osmog dana pa sve do kraja eksperimenta zabilježen je značajni porast srednjih vrijednosti parametra ABS/RC u listovima biljaka izloženih suši, u odnosu na kontrolu. Srednja vrijednost osmog dana u tretmanu sušom iznosila je 4,02, a u kontroli 3,37. Devetog dana mjerenja srednja vrijednost u tretmanu je značajno porasla na 5,17. Iz grafičkog prikaza (kao iz priložene Tablice 19), jasno se vidi da postoji značajna razlika između srednje vrijednosti u uzorcima desetog dana suše i svih ostalih izmjerenih uzoraka. Zbog izuzetno velike srednje vrijednosti i standardne devijacije desetog dana, isti je (zajedno s devetim) prikazan na posebnom grafu s prilagođenim vrijednostima ordinate. Iz istog razloga, analiza varijance je napravljena bez desetog dana. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=0,38).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka (osim desetog dana tretmana u eksperimentu u kojem su biljke uzgajane uz predtretman na HL) tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 19. Najmanja značajna razlika (LSD) za apsorpciju po aktivnom reakcijskom središtu iznosi 0,30 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti. Nije zabilježena razlika između kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 40. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra ABS/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,07) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,38).

Tablica 19. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra ABS/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,30).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	3,37 ± 0,11 cd	3,39 ± 0,09 cd	3,22 ± 0,05 d	3,25 ± 0,05 cd
2.	3,35 ± 0,06 cd	3,32 ± 0,02 cd	3,21 ± 0,09 d	3,19 ± 0,06 d
3.	3,33 ± 0,04 cd	3,29 ± 0,03 cd	3,26 ± 0,06 cd	3,21 ± 0,04 d
4.	3,33 ± 0,02 cd	3,32 ± 0,06 cd	3,29 ± 0,04 cd	3,21 ± 0,03 d
5.	3,33 ± 0,04 cd	3,29 ± 0,07 cd	3,32 ± 0,08 cd	3,29 ± 0,05 cd
6.	3,35 ± 0,05 cd	3,32 ± 0,07 cd	3,33 ± 0,10 cd	3,37 ± 0,09 cd
7.	3,34 ± 0,05 cd	3,34 ± 0,07 cd	3,36 ± 0,10 cd	3,54 ± 0,28 c
8.	3,35 ± 0,05 cd	3,35 ± 0,09 cd	3,37 ± 0,09 cd	4,02 ± 0,63 b
9.	3,40 ± 0,08 cd	3,33 ± 0,08 cd	3,40 ± 0,11 cd	5,17 ± 0,89 a
10.	3,42 ± 0,08 cd	3,35 ± 0,05 cd	3,39 ± 0,09 cd	27,06 ± 17,8 e

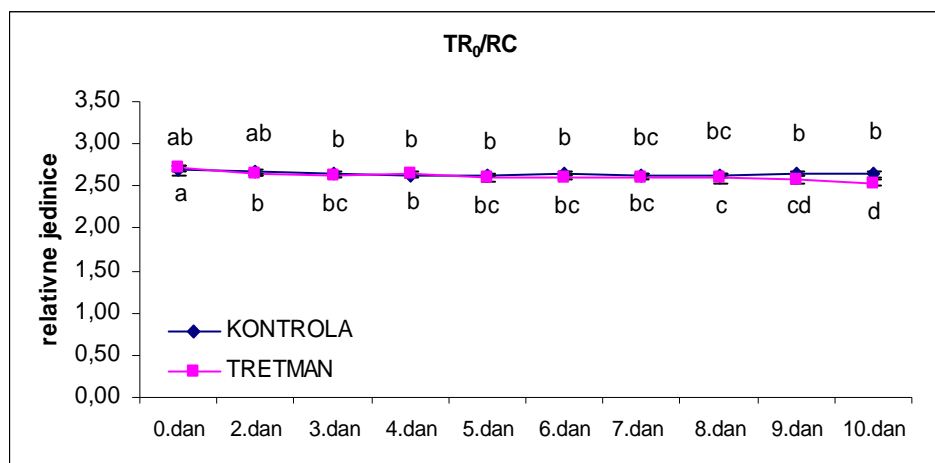
3.7.7. Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC)

U listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL (Slika 41 A) hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) tijekom deset dana suše značajno se smanjilo u tretmanu sušom devetog (2,58) i desetog dana (2,54), u odnosu na kontrolu (2,65). Prosječna vrijednost navedenog parametra u listovima kontrolnih biljaka od 0. do 10. dana iznosila je $2,67 \pm 0,04$ (Tablica 20). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,04$).

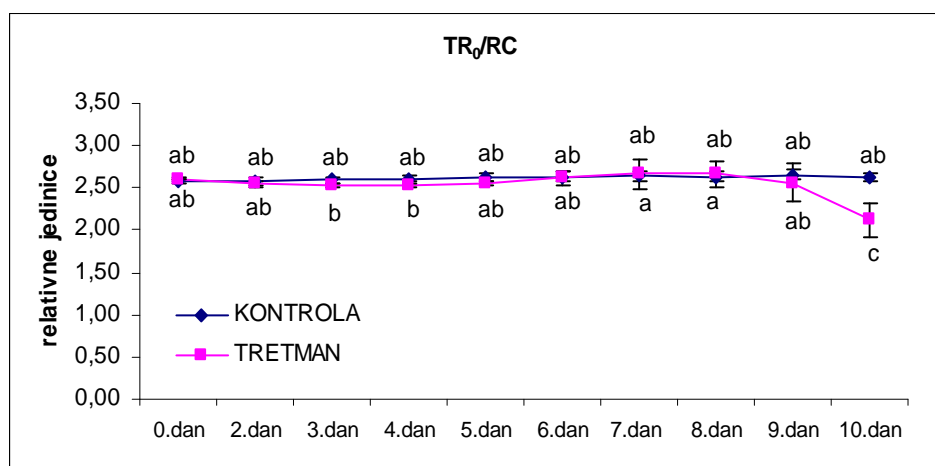
Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazana je na Slici 41 B. Značajno smanjenje ($LSD=0,12$) srednje vrijednosti parametra TR_0/RC zabilježeno je samo desetog dana u listovima biljaka izloženih suši, u odnosu na kontrolu. Srednja vrijednost toga dana u tretmanu sušom iznosila je 2,12, a u kontroli 2,63 (Tablica 20). Prosječna vrijednost parametra TR_0/RC u listovima tretmana sušom do desetog dana iznosila je $2,60 \pm 0,08$, dok je u listovima kontrolnih biljaka prosjek kroz svih deset dana iznosio $2,62 \pm 0,04$.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 20. Najmanja značajna razlika (LSD) za apsorpciju po aktivnom reakcijskom središtu iznosi 0,11 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti. ANOVA je pokazala da se samo srednja vrijednost desetog dana suše u biljkama uzgajanim na LL uz predtretman na HL (2,12) značajno razlikovala od svih ostalih tipova uzoraka.

A) LL



B) HL



Slika 41. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra TR_0/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,04) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,12).

Tablica 20. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra TR_0/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,11).

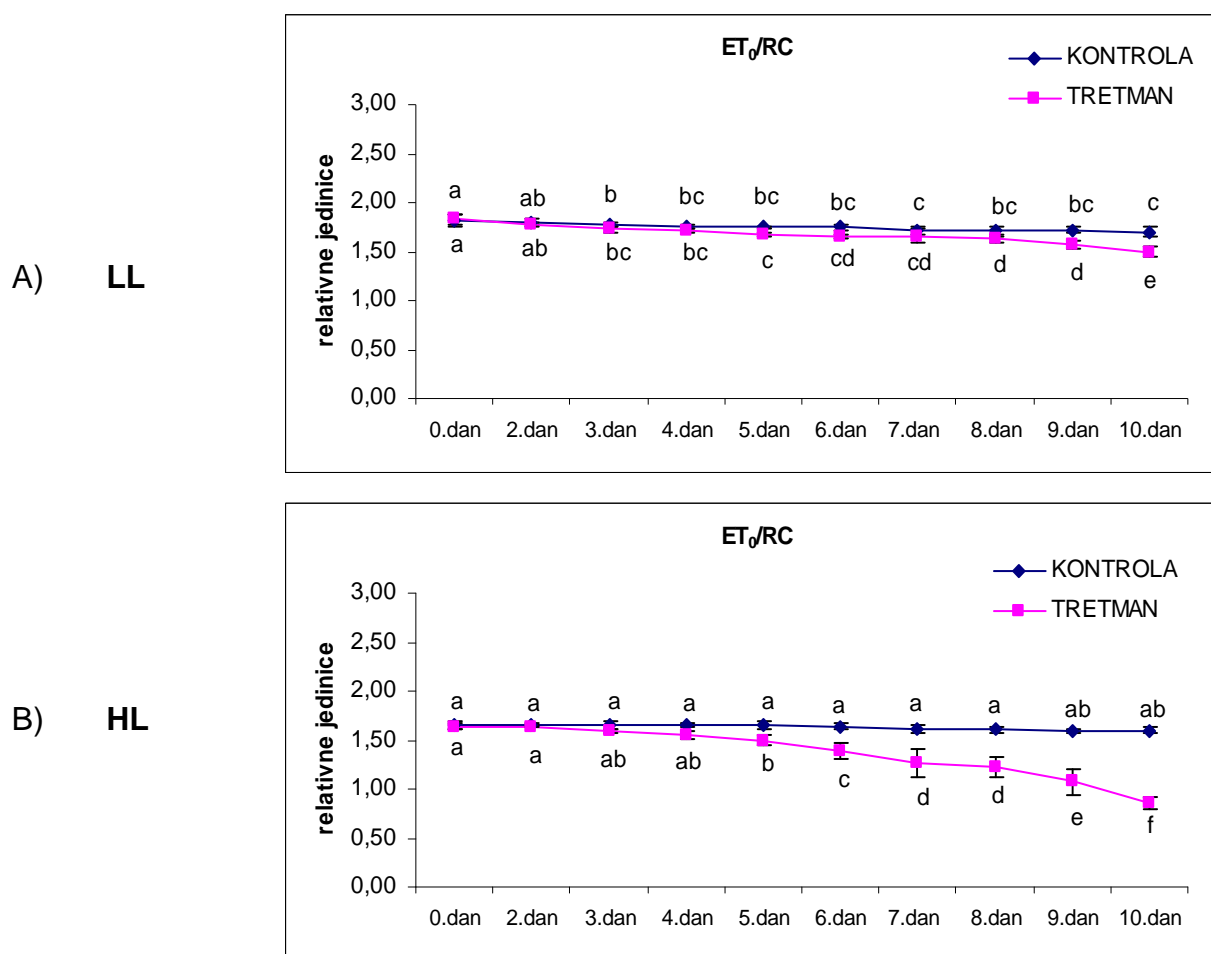
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	2,69 ± 0,06 ab	2,71 ± 0,04 a	2,58 ± 0,03 b	2,61 ± 0,02 ab
2.	2,67 ± 0,03 ab	2,64 ± 0,01 ab	2,57 ± 0,05 b	2,55 ± 0,04 b
3.	2,65 ± 0,02 ab	2,62 ± 0,02 ab	2,59 ± 0,04 b	2,53 ± 0,02 b
4.	2,64 ± 0,01 ab	2,64 ± 0,04 ab	2,61 ± 0,03 ab	2,52 ± 0,02 b
5.	2,64 ± 0,02 ab	2,59 ± 0,04 b	2,62 ± 0,05 ab	2,56 ± 0,02 b
6.	2,65 ± 0,02 ab	2,61 ± 0,04 ab	2,63 ± 0,06 ab	2,61 ± 0,08 ab
7.	2,62 ± 0,02 ab	2,61 ± 0,04 ab	2,64 ± 0,06 ab	2,67 ± 0,17 ab
8.	2,62 ± 0,02 ab	2,59 ± 0,05 b	2,63 ± 0,06 ab	2,66 ± 0,16 ab
9.	2,65 ± 0,03 ab	2,58 ± 0,05 b	2,65 ± 0,06 ab	2,56 ± 0,23 b
10.	2,65 ± 0,03 ab	2,54 ± 0,03 b	2,63 ± 0,05 ab	2,12 ± 0,20 c

3.7.8. Transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC)

Slika 42 A prikazuje srednje vrijednosti transporta elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) tijekom deset dana u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. U odnosu na listove kontrolnih biljaka, čija je prosječna vrijednost tijekom deset dana iznosila $1,76 \pm 0,06$, značajno smanjenje srednje vrijednosti parametra ET_0/RC u uvjetima suše zabilježeno je osmog dana (1,62). U listovima tretmana sušom vrijednosti su se dalje smanjivale do desetog dana, u kojem je zabilježena najmanja srednja vrijednost (1,50). Sve vrijednosti navedene su u Tablici 21. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,05$).

Promjene elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL mogu se pratiti na Slici 42 B. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,10$). Značajno smanjenje srednje vrijednosti parametra ET_0/RC u uvjetima suše zabilježeno je petog dana (1,50), u odnosu na kontrolu istog dana (1,64). Trend smanjenja vrijednosti ovog parametra u listovima tretmana sušom nastavljen je sve do desetog dana, kada je vrijednost iznosila 0,85, što se vidi i u Tablici 21. Prosječna vrijednost u kontrolama tijekom deset dana iznosila je $1,63 \pm 0,04$.

U Tablici 21 prikazani su rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) u listovima iznosila 0,08. ANOVA je za ovaj parametar pokazala statistički značajnu razliku između listova kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i listova kontrolnih klijanaca uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 42. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra ET_0/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,05) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,10).

Tablica 21. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra ET_0/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,08).

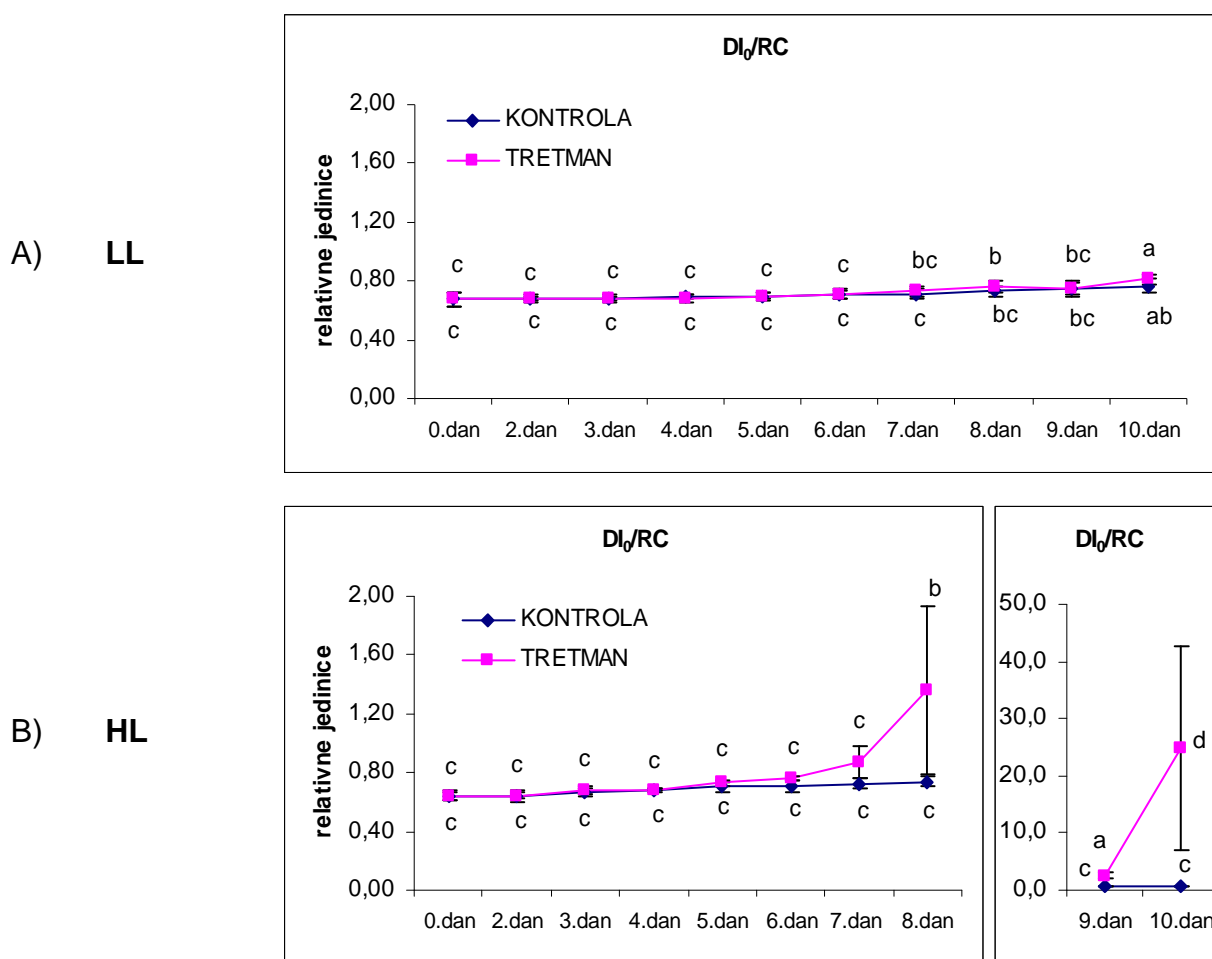
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	1,82 ± 0,06 a	1,83 ± 0,05 a	1,65 ± 0,04 bc	1,64 ± 0,04 c
2.	1,81 ± 0,03 ab	1,78 ± 0,02 ab	1,65 ± 0,03 bc	1,64 ± 0,01 c
3.	1,77 ± 0,01 ab	1,73 ± 0,03 b	1,65 ± 0,04 bc	1,60 ± 0,02 c
4.	1,76 ± 0,02 ab	1,72 ± 0,02 bc	1,66 ± 0,02 bc	1,56 ± 0,04 cd
5.	1,75 ± 0,01 ab	1,68 ± 0,02 bc	1,64 ± 0,04 c	1,50 ± 0,05 d
6.	1,75 ± 0,03 ab	1,66 ± 0,02 bc	1,63 ± 0,03 c	1,38 ± 0,09 e
7.	1,71 ± 0,05 bc	1,66 ± 0,07 bc	1,62 ± 0,05 c	1,26 ± 0,14 f
8.	1,72 ± 0,04 bc	1,62 ± 0,03 c	1,61 ± 0,03 c	1,22 ± 0,09 f
9.	1,72 ± 0,03 bc	1,57 ± 0,04 cd	1,59 ± 0,02 c	1,07 ± 0,14 g
10.	1,70 ± 0,05 bc	1,50 ± 0,05 d	1,60 ± 0,02 c	0,85 ± 0,06 h

3.7.9. Disipacija po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC)

U listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL disipacija po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) tijekom deset dana suše nije se značajno mijenjala u odnosu na disipaciju u listovima kontrolnih biljaka, što je prikazano na Slici 43 A. Prosječna vrijednost navedenog parametra u listovima tijekom deset dana tretmana sušom iznosila je $0,75 \pm 0,07$, dok je u listovima kontrolnih biljaka iznosila $0,72 \pm 0,05$ (Tablica 22). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,04$).

Disipacija po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazana je na Slici 43 B. Prosječna vrijednost ovog parametra u listovima kontrolnih biljaka kroz svih deset dana iznosila $0,70 \pm 0,06$. Značajni porast srednje vrijednosti parametra DI_0/RC , u odnosu na kontrolu, zabilježen je od osmog dana u listovima biljaka izloženih suši. Srednja vrijednost toga dana u tretmanu sušom iznosila je 1,36, a u kontroli 0,74 (Tablica 22). Devetog dana mjerenja srednja vrijednost u tretmanu je značajno porasla na 2,61. Iz grafičkog prikaza (kao iz priložene Tablice 22), jasno se vidi da postoji značajna razlika između srednje vrijednosti u uzorcima desetog dana suše i svih ostalih izmjerenih uzoraka. Zbog izuzetno velike srednje vrijednosti i standardne devijacije desetog dana, isti je (zajedno s devetim) prikazan na posebnom grafu s prilagođenim vrijednostima ordinate, kao i u slučaju parametra ABS/RC . Iz istog razloga, analiza varijance je napravljena bez desetog dana. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=0,31$).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka (osim desetog dana tretmana u eksperimentu u kojem su biljke uzgajane uz predtretman na HL) tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 22. Najmanja značajna razlika (LSD) za disipaciju po aktivnom reakcijskom središtu iznosi 0,23 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti. Nije zabilježena razlika između kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 43. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra DI_0/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=0,04) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=0,31).

Tablica 22. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra DI_0/RC tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=0,23).

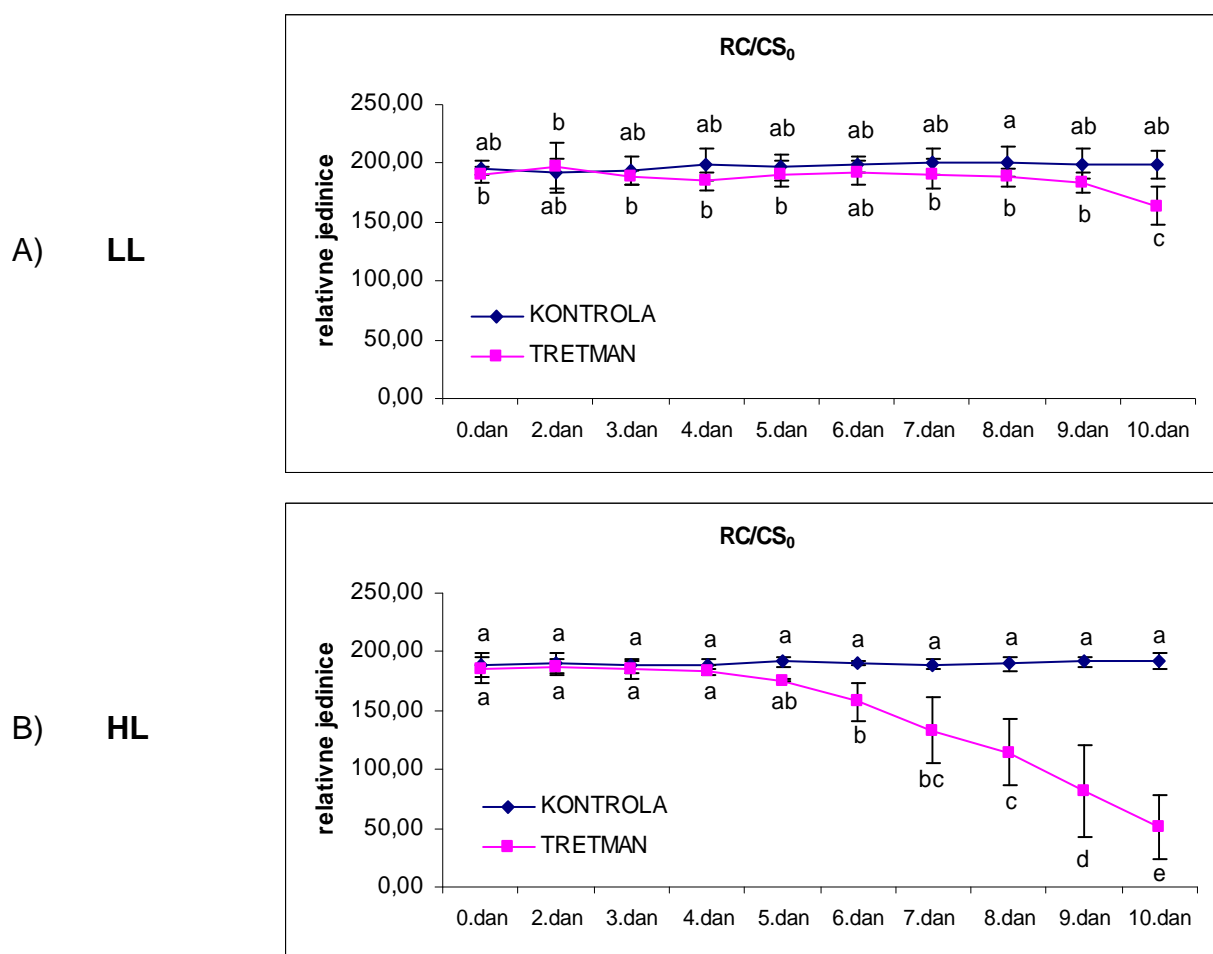
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	0,67 ± 0,05 c	0,68 ± 0,05 c	0,64 ± 0,03 c	0,65 ± 0,03 c
2.	0,68 ± 0,03 c	0,68 ± 0,01 c	0,64 ± 0,04 c	0,64 ± 0,02 c
3.	0,68 ± 0,02 c	0,68 ± 0,02 c	0,66 ± 0,03 c	0,68 ± 0,02 c
4.	0,69 ± 0,02 c	0,69 ± 0,03 c	0,68 ± 0,01 c	0,69 ± 0,01 c
5.	0,70 ± 0,02 c	0,70 ± 0,03 c	0,70 ± 0,03 c	0,73 ± 0,02 c
6.	0,71 ± 0,03 c	0,71 ± 0,03 c	0,71 ± 0,04 c	0,76 ± 0,02 c
7.	0,71 ± 0,03 c	0,73 ± 0,04 c	0,73 ± 0,04 c	0,87 ± 0,11 c
8.	0,73 ± 0,03 c	0,76 ± 0,04 c	0,74 ± 0,03 c	1,36 ± 0,57 b
9.	0,75 ± 0,05 c	0,75 ± 0,04 c	0,75 ± 0,04 c	2,61 ± 0,67 a
10.	0,77 ± 0,05 c	0,81 ± 0,03 c	0,75 ± 0,05 c	24,94 ± 17,8 d

3.7.10. Gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS₀)

Srednje vrijednosti gustoće aktivnih reakcijskih središta u listovima biljaka kontinuirano uzgajanih na LL prikazane su na Slici 44 A. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=9,19). Vrijednosti parametra RC/CS₀ u kontrolnim biljkama tijekom deset dana nisu se značajno mijenjale, a prosječna vrijednost iznosila je $196,53 \pm 4,81$. Značajno smanjena srednja vrijednost gustoće aktivnih reakcijskih središta zabilježena je osmog (188,60) i desetog dana suše (163,99), u odnosu na kontrolu osmog (201,33) i desetog (198,25) dana (Tablica 23).

Slika 44 B prikazuje promjene u gustoći aktivnih reakcijskih središta u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=25,97). U odnosu na listove kontrole, čija je prosječna vrijednost tijekom deset dana iznosila $187,88 \pm 1,95$, značajno smanjenje srednje vrijednosti ovog parametra u uvjetima suše zabilježeno je šestoga dana (157,57). Trend značajnog svakodnevnog smanjivanja vrijednosti parametra RC/CS₀ u suši je nastavljen, a najmanja vrijednost izmjerena desetog dana iznosila je 51,39, što se vidi i iz Tablice 23.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 23. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za gustoću aktivnih reakcijskih središta u listovima iznosila 19,96. ANOVA je pokazala da se parametar RC/CS₀ ne razlikuje u listovima kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 44. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra RC/CS_0 tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=9,19) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=25,97).

Tablica 23. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra RC/CS_0 tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=19,96).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	195,72 ± 5,94 ab	191,01 ± 6,83 ab	188,67 ± 10,6 ab	184,81 ± 11,2 ab
2.	191,72 ± 12,9 ab	196,64 ± 21,3 a	190,96 ± 8,15 ab	186,83 ± 7,35 ab
3.	193,89 ± 12,0 ab	188,05 ± 5,93 ab	188,43 ± 6,16 ab	184,88 ± 7,23 ab
4.	198,50 ± 13,4 a	184,94 ± 7,40 ab	189,44 ± 4,36 ab	183,94 ± 4,34 ab
5.	196,98 ± 10,9 a	190,98 ± 10,9 ab	191,42 ± 3,79 ab	175,81 ± 0,81 b
6.	198,39 ± 6,91 a	192,79 ± 10,2 ab	190,28 ± 1,80 ab	157,57 ± 16,3 bc
7.	200,90 ± 11,1 a	190,97 ± 12,9 ab	189,29 ± 4,72 ab	133,32 ± 28,4 c
8.	201,33 ± 12,5 a	188,60 ± 7,61 ab	189,65 ± 5,53 ab	114,74 ± 28,7 c
9.	199,66 ± 12,3 a	183,51 ± 8,64 ab	191,86 ± 4,56 ab	81,46 ± 39,6 d
10.	198,25 ± 11,8 a	163,99 ± 16,1 b	192,32 ± 7,07 ab	51,39 ± 27,6 e

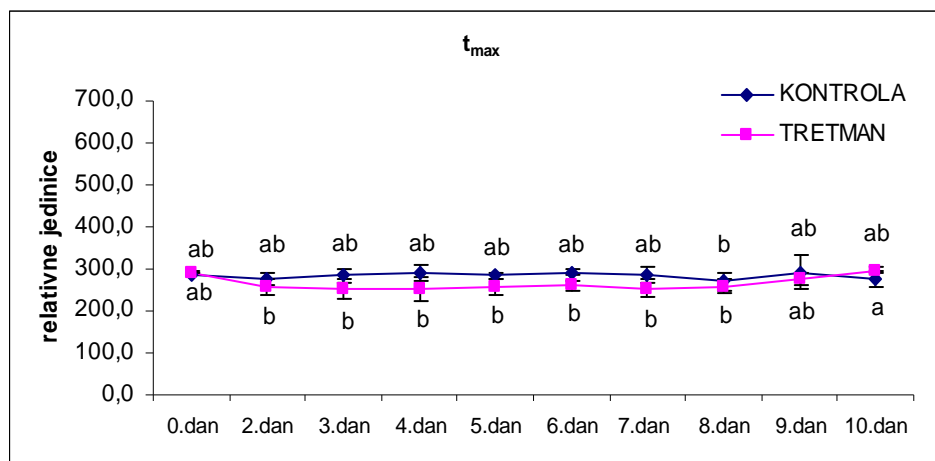
3.7.11. Vrijeme potrebno da se postigne F_m (t_{max})

U listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL vrijeme potrebno za postizanje maksimalne fluorescencije (t_{max}) tijekom deset dana suše nije se značajno mijenjalo u odnosu na isti parametar u listovima kontrolnih biljaka (prikazano na Slici 45 A) (LSD=22,87). Prosječna vrijednost parametra t_{max} u listovima tijekom deset dana tretmana sušom iznosila je $274,33 \pm 22,2$, dok je u listovima kontrolnih biljaka iznosila $281,20 \pm 11,07$ (Tablica 24).

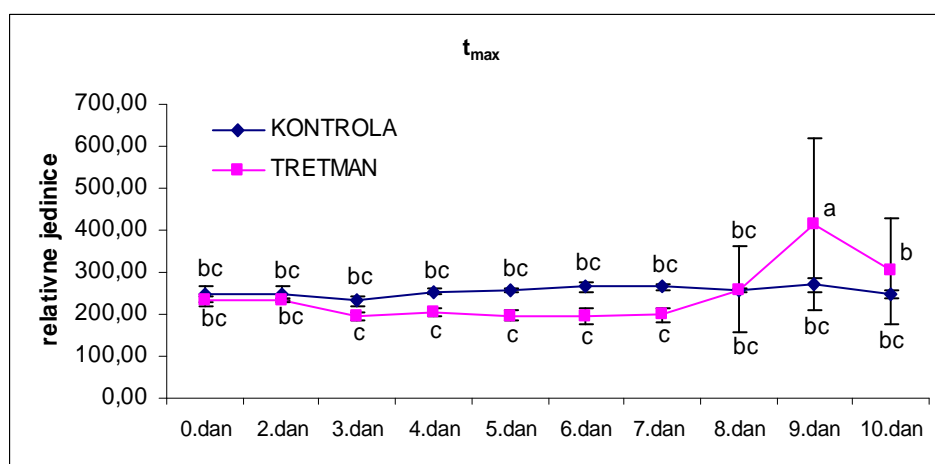
Slika 45 B prikazuje parametar t_{max} u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL. U uvjetima suše značajna promjena ovog parametra, u odnosu na kontrolu, uočena je samo devetog dana ($414,27$). Prosječna vrijednost parametra t_{max} u listovima kontrolnih biljaka tijekom deset dana iznosila je $250,47 \pm 19,4$ (Tablica 24). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=94,85).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 24. Najmanja značajna razlika (LSD) za parametar t_{max} iznosi 71,65 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti. ANOVA je pokazala da se srednje vrijednosti parametra t_{max} u listovima kontrolnih biljaka u oba tipa uzgoja međusobno ne razlikuju.

A) LL



B) HL



Slika 45. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra t_{max} tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=22,87) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=94,85).

Tablica 24. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra t_{max} tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=71,65).

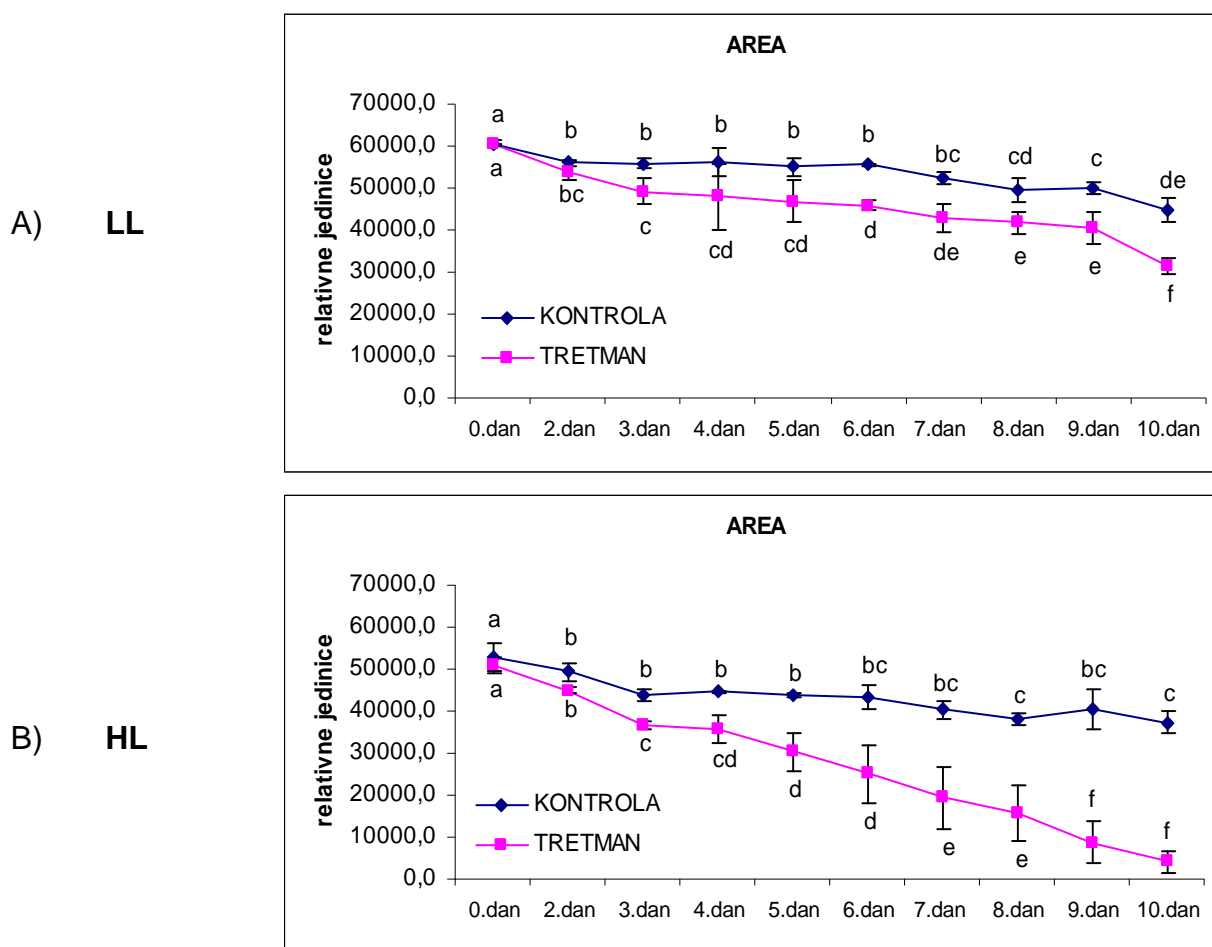
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	287,20 ± 1,74 bc	292,27 ± 3,00 bc	249,07 ± 19,9 bc	231,87 ± 10,7 bc
2.	277,73 ± 13,6 bc	259,20 ± 19,1 bc	249,60 ± 15,8 bc	234,27 ± 3,63 bc
3.	283,73 ± 15,8 bc	252,53 ± 24,2 bc	231,07 ± 12,4 c	194,93 ± 7,72 c
4.	289,07 ± 18,9 bc	252,13 ± 30,5 bc	254,53 ± 7,80 bc	204,40 ± 10,0 c
5.	284,80 ± 7,99 bc	256,00 ± 18,1 bc	256,00 ± 4,92 bc	197,07 ± 12,4 bc
6.	292,00 ± 8,27 bc	261,20 ± 11,4 bc	266,13 ± 12,2 bc	195,73 ± 17,3 c
7.	285,87 ± 17,9 bc	254,00 ± 22,3 bc	264,93 ± 7,86 bc	199,07 ± 17,2 c
8.	270,13 ± 21,0 bc	259,47 ± 17,4 bc	256,67 ± 6,06 bc	258,27 ± 103 bc
9.	292,27 ± 41,1 bc	276,80 ± 12,6 bc	269,87 ± 16,5 bc	414,27 ± 206 a
10.	275,73 ± 17,8 bc	296,53 ± 8,33 bc	247,87 ± 9,49 bc	303,48 ± 126 b

3.7.12. Površina iznad OJIP krivulje (AREA)

Slika 46 A prikazuje srednje vrijednosti površina iznad OJIP krivulje (AREA) u listovima biljaka kontinuirano uzgajanih na LL. Tijekom deset dana vrijednosti ovog parametra su se smanjivale u suši (od 60489 do 31554), kao i u kontrolama (od 60503 do 44833). Značajno smanjenje parametra AREA zabilježeno je od trećeg dana suše (49205), u odnosu na kontrolu (55875) (Tablici 25). Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=4108,94).

Promjene površine iznad OJIP krivulje u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazane su na Slici 46 B. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=5358,47). U odnosu na listove kontrole, značajno smanjenje srednje vrijednosti parametra AREA u uvjetima suše zabilježeno je trećeg dana, kada je srednja vrijednost iznosila 36639 (u kontroli 43877). Trend svakodnevnog značajnog smanjenja površine iznad OJIP krivulje u suši nastavljen je do desetog dana, kada je srednja vrijednost iznosila 4054 (Tablice 25).

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 25. Najmanja značajna razlika (LSD) za površinu iznad OJIP krivulje iznosi 5046,73 i prema njoj su određene statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti. ANOVA je za parametar AREA pokazala značajnu razliku između listova kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i listova kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 46. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra AREA tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL i B) biljke uzgajane na LL uz pretretman na HL.

Tablica 25. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija parametra AREA tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=5046,73).

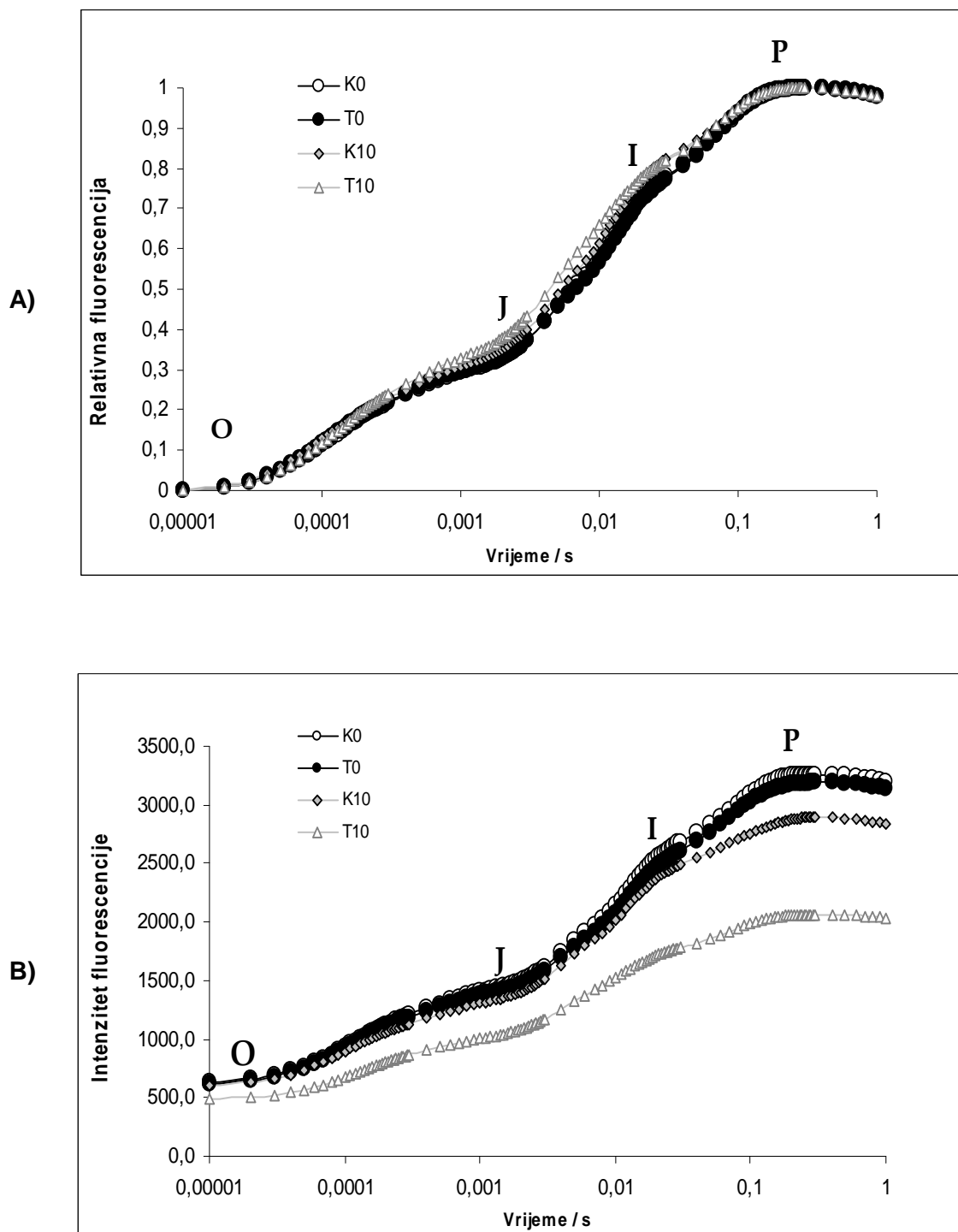
DAN	LL			Pretretman HL								
	Kontrola		Tretman sušom	Kontrola		Tretman sušom						
0.	60503	± 122	a	60489	± 703	a	52713	± 3332	bc	51002	± 2036	bc
2.	56108	± 754	ab	53893	± 2196	b	49347	± 1986	bc	44845	± 789	cd
3.	55875	± 1242	ab	49205	± 3112	bc	43877	± 1311	cd	36639	± 1088	e
4.	56065	± 3252	ab	47937	± 7710	c	44548	± 368	cd	35626	± 3201	ef
5.	55040	± 2110	ab	46766	± 5081	cd	43837	± 500	cd	30351	± 4458	f
6.	55628	± 162	ab	45841	± 1267	cd	43460	± 2868	cd	25035	± 6933	g
7.	52258	± 1348	bc	42833	± 3383	d	40420	± 2104	de	19355	± 7297	h
8.	49447	± 2757	bc	41724	± 2689	de	38109	± 1218	de	15841	± 6751	h
9.	50025	± 1567	bc	40386	± 3805	de	40513	± 4576	de	8803	± 5219	i
10.	44833	± 2977	cd	31554	± 1895	f	37364	± 2548	e	4054	± 2632	i

3.7.13. OJIP porast fluorescencije klorofila *a*

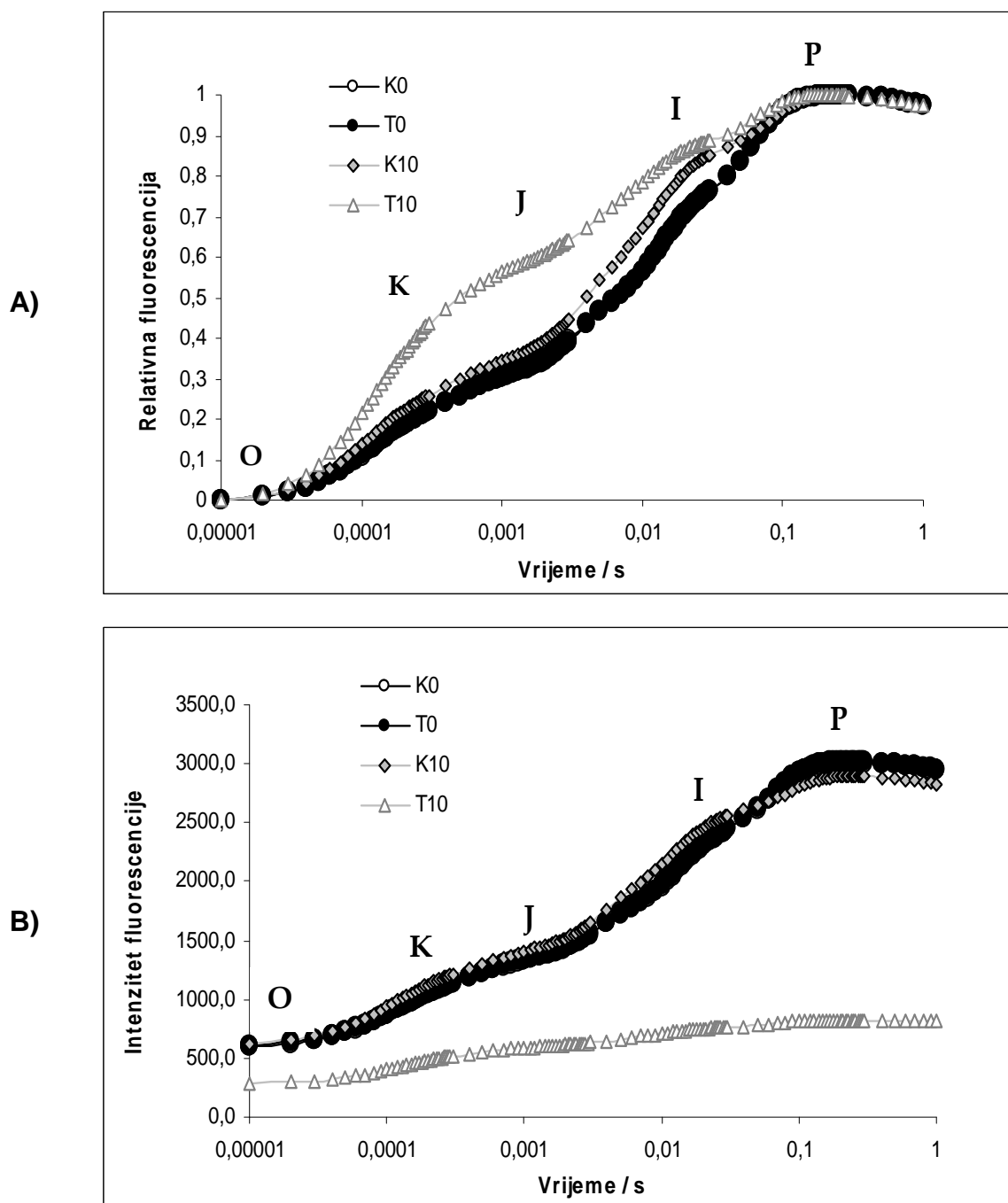
Krivulje intenziteta fluorescencije (OJIP krivulje) prikazane su na logaritamskoj vremenskoj skali prema podacima mjerenja fluorescencije klorofila *a* nultog i desetog dana u uvjetima suše i kontrolama, u oba tipa uzgoja (LL i HL) (Slike 47 i 48).

Slika 47 A prikazuje normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila *a* izmjeren nultog (K0 i T0) i desetog dana (K10 i T10) u listovima biljaka kontinuirano uzgajanih u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti (LL). Oznaka K predstavlja kontrolne uzorke, a oznaka T uzorke iz tretmana sušom. Nultog dana u kontroli i tretmanu krivulja je zadržala tipičan oblik, za razliku od desetog dana kada se u tretmanu javlja blagi porast intenziteta fluorescencije u koraku J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms). Odstupanje od tipičnog oblika krivulje desetog dana u tretmanu se vidi i na Slici 47 B na kojoj je prikazan porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije.

Slika 48 A prikazuje normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila *a* izmjeren nultog (K0 i T0) i desetog dana (K10 i T10) u listovima biljaka uzgajanih u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti (HL), a potom izloženih suši na niskom intenzitetu svjetlosti. Oznaka K predstavlja kontrolne uzorke, a oznaka T uzorke iz tretmana sušom. Nultog dana u kontroli i tretmanu krivulja je zadržala tipičan oblik. Desetog dana suše zabilježen je veliki porast intenziteta fluorescencije u koraku J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms) i koraku I (intenzitet fluorescencije nakon 30 ms). Porast intenziteta fluorescencije zabilježen je i prije koraka J, što bi moglo odgovarati koraku K (intenzitet fluorescencije nakon približno 300 μ s). Odstupanja od tipičnog oblika krivulje desetog dana u tretmanu se vidi i na Slici 48 B na kojoj je prikazan porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije. Krivulja desetog dana u tretmanu je gotovo ravna, što znači da su slične vrijednosti intenziteta fluorescencije nakon 50 μ s (F_0) i maksimalne fluorescencije (F_m).



Slika 47. A) Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila a izmjereni nultog (K0 i T0) i desetog dana (K10 i T10) u listovima biljaka kontinuirano uzgajanih u uvjetima LL; B) porast fluorescencije klorofila a bez normalizacije (K=kontrola; T=tretman sušom).



Slika 48. A) Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila a izmjeren nultog (K0 i T0) i desetog dana (K10 i T10) u listovima biljaka prethodno uzgojenih u uvjetima HL; B) porast fluorescencije klorofila a bez normalizacije (K=kontrola; T=tretman sušom)

3.8. Aktivnost antioksidacijskih enzima

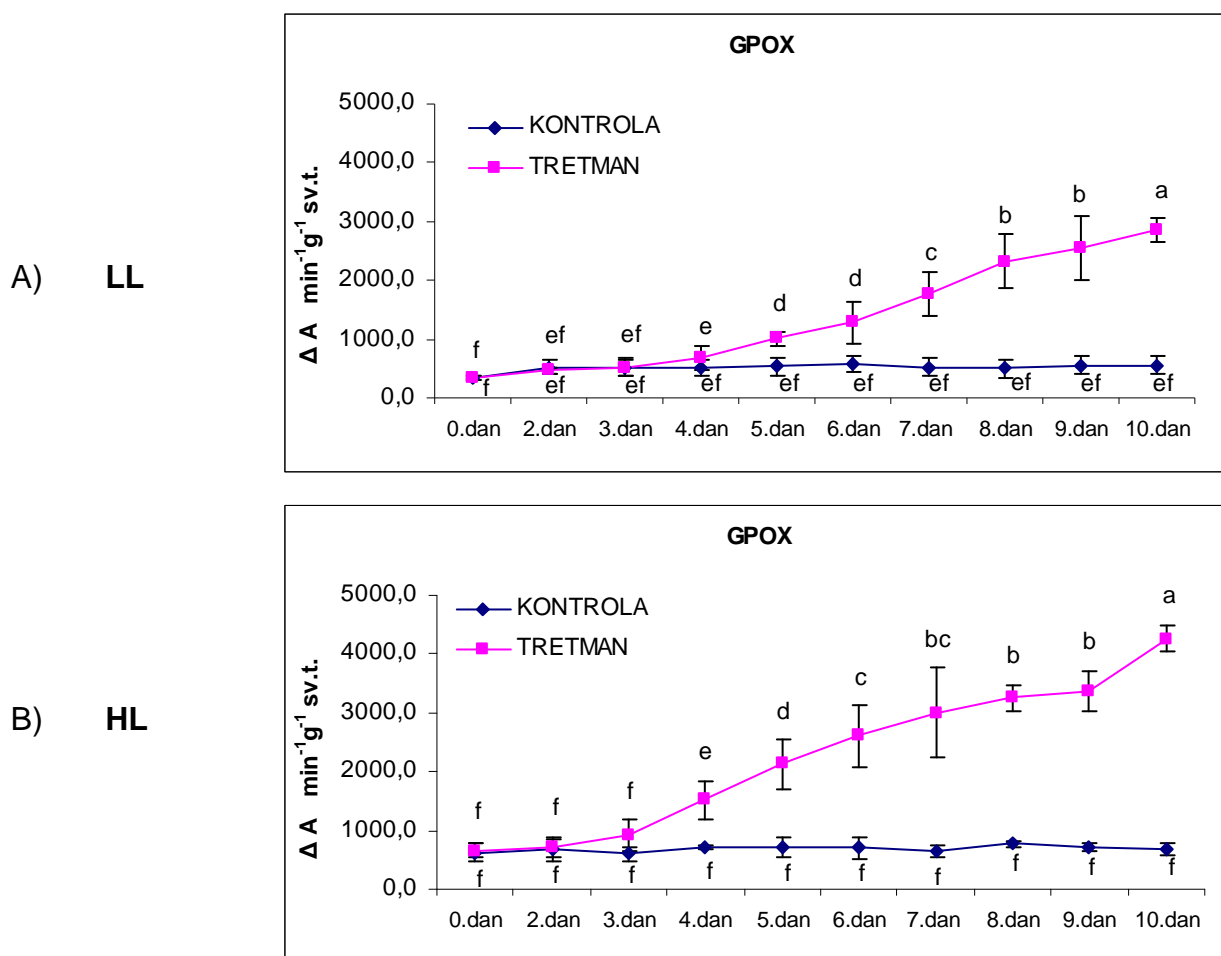
Aktivnost antioksidacijskih enzima (GPOX, APX, CAT i SOD) mjerena je tijekom 10 dana u listovima klijanaca ječma izloženih suši i kontrolnim biljkama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja. Budući da su eksperimenti ponovljeni tri puta, konačna srednja vrijednost predstavlja prosjek 9 mjerenja.

3.8.1. Aktivnost gvajakol-peroksidaza (GPOX)

Srednje vrijednosti aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL prikazane su na Slici 49 A. Petog dana suše zabilježen je značajan porast aktivnosti ($1016,77 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) u odnosu na kontrolne biljke ($531,96 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Trend kontinuiranog porasta aktivnosti nastavljen je sve do desetog dana suše, u kojemu je srednja vrijednost bila najveća ($2841,76 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Ta je vrijednost bila pet puta veća u odnosu na kontrolu istog dana ($558,07 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Aktivnost enzima GPOX u kontrolnim biljkama tijekom deset dana nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je $463,92 \pm 115,9 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($\text{LSD}=265,33$). Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 26.

Slika 49 B prikazuje srednje vrijednosti aktivnosti gvajakol-peroksidaze u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL. Značajni porast aktivnosti ($\text{LSD}=415,64$) u uvjetima suše zabilježen je četvrtog dana, kada je srednja vrijednost iznosila $1522,03 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$, u odnosu na kontrolnu od $709,17 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Trend porasta aktivnosti nastavljen je sve do desetog dana, do kojega je vrijednost porasla približno tri puta u odnosu na četvrti dan suše, a iznosila je $4268,29 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ U odnosu na kontrolu desetog dana, aktivnost u suši istog dana je bila povećana šest puta. Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 26. Tijekom svih deset dana aktivnost enzima GPOX u listovima kontrolnih biljaka nije se značajno mijenjala, a prosjek zabilježenih vrijednosti iznosio je $686,14 \pm 89,77 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 26. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti (označene različitim slovima) određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za aktivnost gvajakol-peroksidaze u listovima iznosila 376,89. ANOVA je pokazala je da nema statistički značajne razlike u aktivnosti ovog enzima tijekom deset dana između kontrolnih biljaka kontinuirano uzgajanih na LL i onih koje su uzgajane uz predtretman na HL.



Slika 49. Srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti gvajakol-peroksidaza (GPOX) u $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=265,33) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=415,64).

Tablica 26. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija aktivnosti gvajakol-peroksidaza (GPOX) u $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=376,89).

DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	348,0 ± 27,7 h	325,1 ± 32,4 h	623,8 ± 152,2 gh	658,7 ± 107,1 gh
2.	522,7 ± 120,4 gh	459,5 ± 48,6 gh	666,0 ± 195,4 gh	705,2 ± 174,9 gh
3.	524,7 ± 144,7 gh	524,4 ± 136,3 gh	596,4 ± 115,1 gh	904,9 ± 274,7 fg
4.	496,6 ± 138,9 gh	679,4 ± 188,7 gh	709,2 ± 39,4 gh	1522,0 ± 321,8 ef
5.	532,0 ± 146,3 gh	1016,8 ± 119,3 fg	713,3 ± 169,3 gh	2141,3 ± 425,7 d
6.	579,8 ± 120,8 gh	1275,5 ± 370,2 f	699,6 ± 201,2 gh	2609,1 ± 536,7 cd
7.	526,2 ± 162,5 gh	1754,5 ± 374,6 e	648,7 ± 111,7 gh	3001,8 ± 761,3 bc
8.	505,0 ± 148,8 gh	2327,4 ± 448,1 d	775,9 ± 46,1 g	3249,8 ± 210,3 b
9.	560,3 ± 153,9 gh	2553,3 ± 535,2 cd	707,3 ± 64,8 gh	3372,4 ± 342,0 b
10.	558,1 ± 152,4 gh	2841,8 ± 204,4 c	674,3 ± 100,3 gh	4268,3 ± 207,0 a

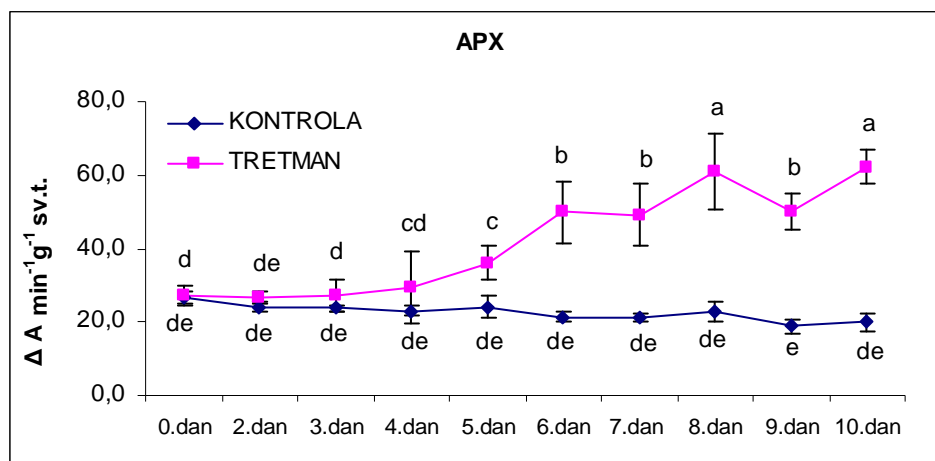
3.8.2. Aktivnost askorbat-peroksidaza (APX)

Slika 50 A prikazuje srednje vrijednosti aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=7,95). Petog dana suše zabilježen je značajan porast aktivnosti ($36,05 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) u odnosu na kontrolne biljke ($24,21 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Daljnji značajni porast aktivnosti zabilježen je šestog ($49,85 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) i osmog dana suše ($61,01 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Desetog dana suše nije došlo do značajnih promjena u aktivnosti ovog enzima. U listovima kontrolnih biljaka tijekom deset dana aktivnost enzima APX nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je $22,68 \pm 3,88 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 27.

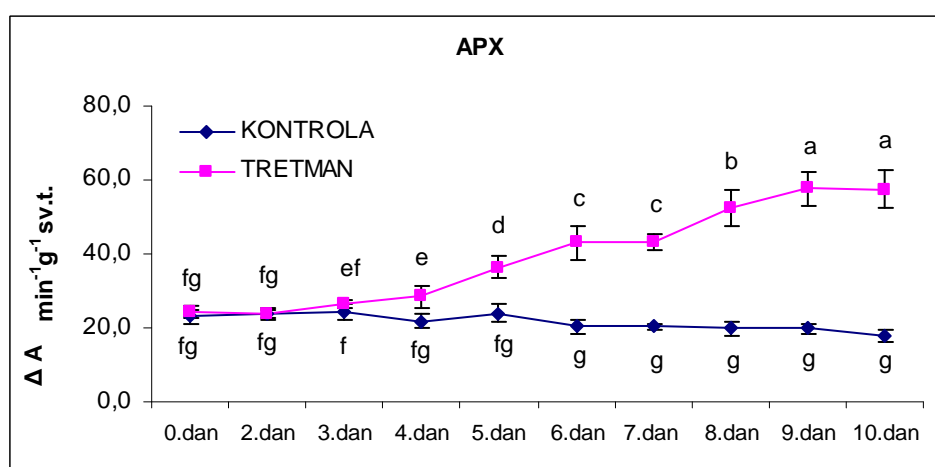
Na Slici 50 B prikazane su promjene srednjih vrijednosti aktivnosti askorbat-peroksidaze u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL. Značajni porast aktivnosti (LSD=3,90) u uvjetima suše zabilježen je četvrtog dana, kada je srednja vrijednost iznosila $28,55 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$, u odnosu na kontrolnu od $21,87 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Daljnji značajni porast aktivnosti zabilježen je petog ($36,36 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$), šestog ($43,09 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$), osmog ($52,48 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) i devetog dana ($57,75 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) suše. Desetog dana aktivnost je bila istovjetna devetome. Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 27. Tijekom deset dana aktivnost enzima APX u listovima kontrolnih biljaka nije se značajno mijenjala, a prosjek zabilježenih vrijednosti iznosio je $21,04 \pm 3,38 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 27. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za aktivnost askorbat-peroksidaze u listovima iznosila 6,48. ANOVA je pokazala je da nema statistički značajne razlike u aktivnosti ovog enzima tijekom deset dana između kontrolnih biljaka kontinuirano uzgajanih na LL i onih koje su uzgajane uz predtretman na HL.

A) LL



B) HL



Slika 50. Srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti askorbat-peroksidaza (APX) u $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=7,95) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=3,90).

Tablica 27. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija aktivnosti askorbat-peroksidaza (APX) u $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=6,48).

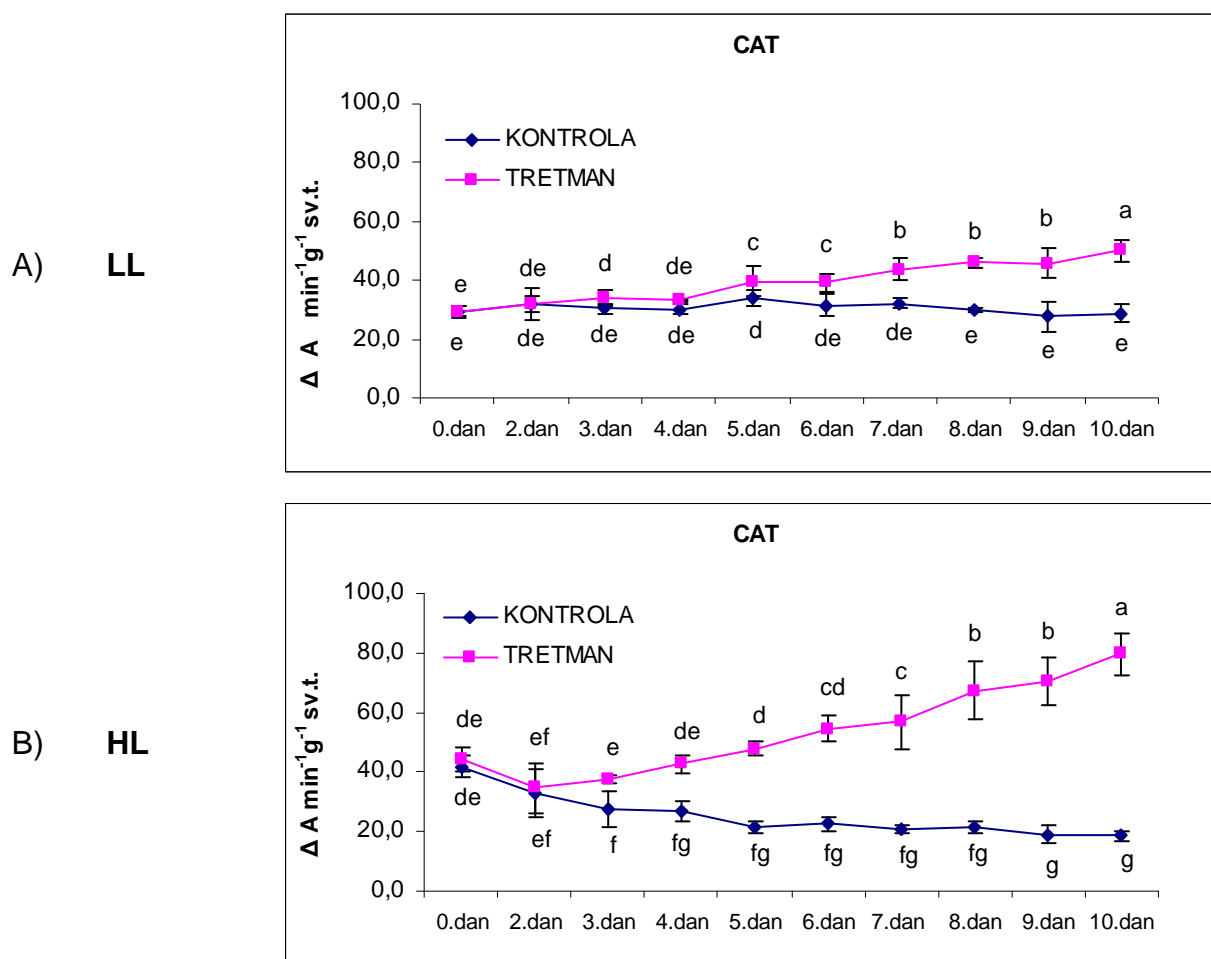
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	26,56 ± 1,78 ef	27,07 ± 2,81 ef	23,05 ± 1,87 ef	24,17 ± 1,52 ef
2.	24,13 ± 1,20 ef	26,69 ± 1,62 ef	24,01 ± 1,25 ef	23,75 ± 1,35 ef
3.	23,83 ± 0,91 ef	27,33 ± 4,44 ef	24,41 ± 2,06 ef	26,42 ± 1,08 ef
4.	23,00 ± 1,48 ef	29,30 ± 9,84 e	21,87 ± 1,68 f	28,55 ± 2,96 e
5.	24,21 ± 2,97 ef	36,05 ± 4,63 d	24,03 ± 2,60 ef	36,36 ± 3,07 d
6.	21,42 ± 1,33 f	49,85 ± 8,39 b	20,27 ± 1,78 f	43,09 ± 4,50 c
7.	21,48 ± 1,09 f	49,20 ± 8,27 bc	20,28 ± 0,93 f	43,36 ± 2,05 c
8.	22,90 ± 2,91 ef	61,01 ± 10,50 a	19,90 ± 1,91 f	52,48 ± 4,87 b
9.	18,80 ± 1,76 f	50,01 ± 4,75 b	19,85 ± 1,42 f	57,75 ± 4,53 ab
10.	19,89 ± 2,46 f	62,20 ± 4,55 a	17,66 ± 1,60 f	57,40 ± 5,16 ab

3.8.3. Aktivnost katalaza (CAT)

Na Slici 51 A prikazane su srednje vrijednosti aktivnosti enzima katalaza u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=4,06). Aktivnost enzima u listovima biljaka izloženih suši u odnosu na kontrolne biljke, značajno se povećala petog dana. Srednja vrijednost iznosila je $39,65 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ u suši, a $33,90 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ u kontroli. Do kraja eksperimenta aktivnost je dalje značajno porasla sedmog ($43,82 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) i desetog ($50,15 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$) dana suše. Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 28. U kontrolnim biljkama aktivnost enzima CAT tijekom deset dana nije se značajno mijenjala, a prosječna vrijednost iznosila je $30,84 \pm 3,07 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$

Slika 51 B prikazuje srednje vrijednosti aktivnosti katalaza u biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD=8,03). Značajni porast aktivnosti u uvjetima suše zabilježen je već trećeg dana, kada je izmjerena vrijednost iznosila $37,45 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$, u odnosu na kontrolnu $27,74 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Trend kontinuiranog rasta nastavljen je sve do desetog dana, do kojega je vrijednost dvostruko porasla u odnosu na treći dan (iznosila je $79,70 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$), a nešto više od četiri puta u odnosu na kontrolu. Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 28. U kontrolnim biljkama tijekom deset dana zabilježeno je smanjivanje aktivnosti enzima u odnosu na nulti dan. Nultog dana srednja vrijednost je iznosila $41,80 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$, drugog $32,90 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$, a desetog $18,50 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv.t.}$

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 28. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između srednjih vrijednosti (označene različitim slovima) određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za aktivnost katalaza u listovima iznosila 7,05. ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna razlike u aktivnosti katalaza tijekom deset dana u kontrolnim biljkama kontinuirano uzgajanim na LL i onima koje se uzgajane uz predtretman na HL.



Slika 51. Srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti katalaza (CAT) u $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=4,06) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=8,03).

Tablica 28. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija aktivnosti katalaza (CAT) u $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=7,05).

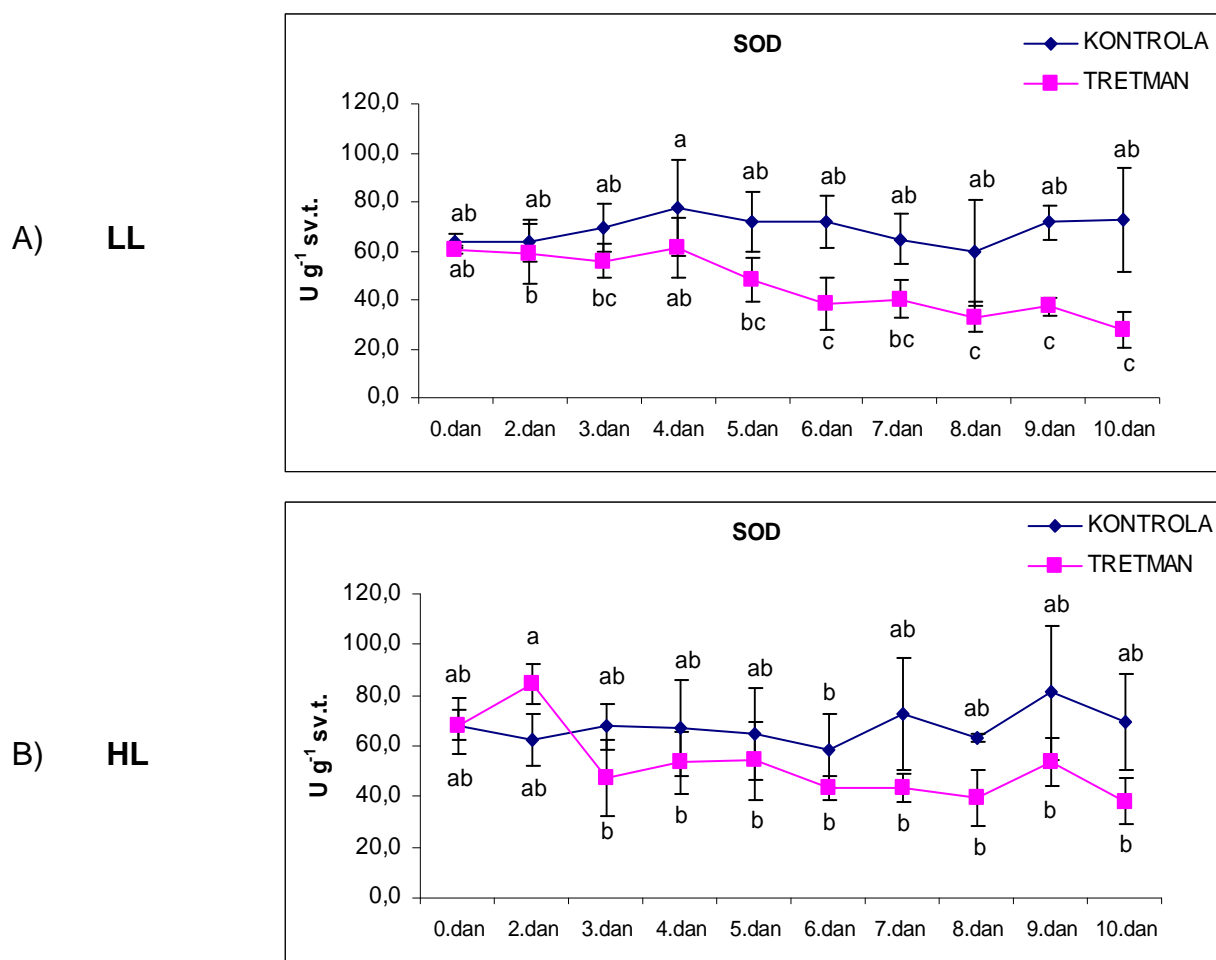
DAN	LL		Predtretman HL	
	Kontrola	Tretman sušom	Kontrola	Tretman sušom
0.	29,17 ± 1,84 fg	29,52 ± 1,76 fg	41,80 ± 3,86 de	44,29 ± 4,35 de
2.	31,97 ± 2,74 f	31,93 ± 5,38 f	32,90 ± 7,93 ef	34,72 ± 8,49 ef
3.	30,41 ± 1,71 f	33,90 ± 2,89 ef	27,74 ± 6,06 fg	37,45 ± 1,21 ef
4.	30,24 ± 1,64 f	33,21 ± 0,45 ef	26,69 ± 3,44 fg	42,71 ± 3,20 de
5.	33,90 ± 2,71 ef	39,65 ± 5,29 e	21,74 ± 1,97 g	47,92 ± 2,37 d
6.	31,61 ± 3,52 f	39,14 ± 2,99 ef	22,48 ± 2,56 g	54,67 ± 4,59 cd
7.	32,24 ± 1,83 f	43,82 ± 3,63 de	20,68 ± 1,21 g	56,79 ± 9,25 c
8.	29,77 ± 0,77 fg	46,06 ± 1,69 de	21,70 ± 2,01 g	67,24 ± 9,86 b
9.	27,77 ± 5,19 fg	45,91 ± 5,03 de	19,10 ± 3,09 g	70,26 ± 8,16 b
10.	28,78 ± 3,15 fg	50,15 ± 3,88 cd	18,50 ± 1,41 g	79,70 ± 6,90 a

3.8.4. Aktivnost superoksid-dismutaza (SOD)

Slika 52 A prikazuje srednje vrijednosti aktivnosti enzima superoksid-dismutaze u listovima biljaka kontinuirano uzgajanih na LL. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=18,81$). Značajno smanjenje aktivnosti SOD-a zabilježeno je šestoga dana suše, u kojemu je srednja vrijednost iznosila $38,39 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$, u odnosu na kontrolu ($71,71 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$). Sedmog dana aktivnost u listovima tretmana i kontroli nije se razlikovala. Od osmog do desetog dana odnos između tretmana i kontrola bio je istovjetan šestom danu. Srednje vrijednosti aktivnosti SOD-a u kontrolnim uzorcima nisu se značajno mijenjale tijekom deset dana mjerenja, a varirale su od $59,23 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$ do $77,47 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$ Sve vrijednosti prikazane su u Tablici 29.

Srednje vrijednosti aktivnosti superoksid-dismutaza u listovima biljaka koje su uzgajane na LL uz predtretman na HL prikazane su na Slici 52 B. Statistički značajne razlike određene su prema najmanjoj značajnoj razlici ($LSD=23,36$). Srednje vrijednosti aktivnosti enzima SOD tijekom deset dana suše varirale su u rasponu od $38,28 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$ do $84,73 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$ U listovima kontrole aktivnosti su varirale u rasponu od $58,20 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$ do $81,23 \text{ U g}^{-1} \text{ sv.t.}$ (Tablica 29). Analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike između aktivnosti SOD-a u listovima tijekom suše i listovima kontrole.

Rezultati analize varijance između srednjih vrijednosti svih tipova uzoraka tijekom 10 dana mjerenja prikazani su u Tablici 29. Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između srednjih vrijednosti određene su prema najmanjoj značajnoj razlici (LSD) koja je za aktivnost SOD-a u listovima iznosila 20,72. ANOVA je pokazala da se aktivnost ovog enzima ne razlikuje u listovima kontrolnih biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL i kontrolnih biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.



Slika 52. Srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti superoksid-dismutaza (SOD) u $U\ g^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama. A) biljke koje su kontinuirano uzgajane na LL (LSD=18,81) i B) biljke uzgajane na LL uz predtretman na HL (LSD=23,36).

Tablica 29. Usporedba srednjih vrijednosti i standardnih devijacija aktivnosti superoksid-dismutaza (SOD) u $U\ g^{-1}$ sv.t. tijekom 10 dana u listovima biljaka izloženih suši i kontrolnim biljkama (ANOVA, LSD=20,72).

DAN	LL			Predtretman HL		
	Kontrola	Tretman sušom		Kontrola	Tretman sušom	
0.	63,86 ± 2,90 ab	60,55 ± 1,73 bc		67,84 ± 10,92 ab	68,18 ± 5,94 ab	
2.	63,80 ± 8,61 b	58,50 ± 12,15 bc		62,39 ± 10,12 b	84,73 ± 7,93 a	
3.	69,28 ± 10,05 ab	55,67 ± 6,94 bc		67,59 ± 9,23 ab	47,60 ± 15,14 bc	
4.	77,47 ± 19,52 ab	61,40 ± 12,22 b		67,09 ± 18,65 ab	53,31 ± 12,13 bc	
5.	71,87 ± 11,98 ab	47,97 ± 9,00 bc		64,68 ± 17,86 ab	54,09 ± 15,74 bc	
6.	71,71 ± 10,60 ab	38,39 ± 10,38 c		58,20 ± 14,56 bc	43,36 ± 4,72 bc	
7.	64,71 ± 10,08 ab	40,34 ± 7,64 c		72,48 ± 22,29 ab	43,60 ± 5,58 bc	
8.	59,23 ± 21,37 bc	32,99 ± 5,95 c		63,26 ± 1,61 b	39,81 ± 11,05 c	
9.	71,51 ± 6,86 ab	37,25 ± 3,40 c		81,23 ± 26,40 ab	53,86 ± 9,54 bc	
10.	72,72 ± 20,91 ab	27,52 ± 7,24 c		69,57 ± 19,20 ab	38,28 ± 9,42 c	

3.9. Koeficijenti korelacije između dobivenih rezultata

Osim analize varijance izračunate su korelacije između svih izmjerenih parametara u oba uvjeta uzgoja (LL i HL) i suši. Koeficijenti korelacije značajni na razini $p < 0,05$ označeni su jednom zvjezdicom (*), dok su koeficijenti korelacije značajni na razini $p < 0,01$ označeni s dvije zvjezdice (**). Sve korelacije su prikazane u Tablici 30.

	APX	CAT	GPOX	SOD	LP	PRO	Chl a	Chl b	Chl a+b	RWC	EL	L*	a*	b*	tmax	AREA	TR ₀ / ABS	ABS/ RC	TR ₀ / RC	ET ₀ / RC	DI ₀ / RC	RC/ CS ₀	TR ₀ / DI ₀	ET ₀ / (TR ₀ - ET ₀)	
CAT	0.823**																								
GPOX	0.882**	0.901**																							
SOD	-0.868**	-0.670**	-0.745**																						
LP	0.873**	0.930**	0.952**	-0.711**																					
PRO	0.874**	0.810**	0.912**	-0.706**	0.926**																				
Chl a	-0.560**	-0.690**	-0.776**	0.467**	-0.657**	-0.585**																			
Chl b	-0.517**	-0.657**	-0.741**	0.416**	-0.633**	-0.552**	0.988**																		
Chl a+b	-0.549**	-0.682**	-0.768**	0.454**	-0.652**	-0.577**	0.999**	0.994**																	
RWC	-0.939**	-0.825**	-0.897**	0.867**	-0.853**	-0.811**	0.646**	0.591**	0.632**																
EL	0.878**	0.862**	0.923**	-0.706**	0.974**	0.973**	-0.606**	-0.579**	-0.600**	-0.822**															
L*	0.398*	0.685**	0.747**	-0.260	0.700**	0.562**	-0.836**	-0.844**	-0.840**	-0.457**	0.624**														
a*	0.666**	0.785**	0.787**	-0.501**	0.895**	0.819**	-0.562**	-0.552**	-0.561**	-0.625**	0.898**	0.683**													
b*	0.360*	0.684**	0.693**	-0.196	0.709**	0.533**	-0.674**	-0.690**	-0.680**	-0.395*	0.621**	0.955**	0.691**												
t_{max}	0.194	0.124	0.107	0.079	0.261	0.372*	0.203	0.187	0.199	0.002	0.369*	0.005	0.365*	0.149											
AREA	-0.640**	-0.747**	-0.887**	0.527**	-0.815**	-0.741**	0.877**	0.852**	0.872**	0.719**	-0.774**	-0.904**	-0.723**	-0.824**	-0.023										
TR₀/ABS	-0.518**	-0.698**	-0.700**	0.335*	-0.812**	-0.732**	0.523**	0.520**	0.523**	0.475**	-0.813**	-0.728**	-0.970**	-0.750**	-0.423**	0.715**									
ABS/RC	0.441**	0.561**	0.551**	-0.160	0.655**	0.565**	-0.414**	-0.427**	-0.419**	-0.370*	0.649**	0.605**	0.827**	0.710**	0.656**	-0.614**	-0.979**								
TR₀/RC	-0.413**	-0.575**	-0.561**	0.345*	-0.612**	-0.581**	0.503**	0.466**	0.493**	0.432**	-0.617**	-0.535**	-0.805**	-0.441**	-0.047	0.564**	0.813**	0.015							
ET₀/RC	-0.647**	-0.821**	-0.899**	0.490**	-0.872**	-0.786**	0.867**	0.849**	0.864**	0.688**	-0.834**	-0.933**	-0.835**	-0.875**	-0.124	0.966**	0.826**	-0.695**	0.653**						
DI₀/RC	0.478**	0.603**	0.591**	-0.199	0.678**	0.600**	-0.472**	-0.473**	-0.474**	-0.421**	0.672**	0.623**	0.845**	0.698**	0.620**	-0.658**	-0.992**	0.991**	-0.118	-0.733**					
RC/CS₀	-0.651**	-0.856**	-0.857**	0.458**	-0.910**	-0.801**	0.750**	0.751**	0.752**	0.643**	-0.875**	-0.879**	-0.902**	-0.886**	-0.292	0.876**	0.892**	-0.839**	0.638**	0.952**	-0.855**				
TR₀/DI₀	-0.634**	-0.759**	-0.821**	0.436**	-0.883**	-0.821**	0.609**	0.594**	0.606**	0.607**	-0.881**	-0.792**	-0.930**	-0.814**	-0.446**	0.844**	0.950**	-0.910**	0.688**	0.905**	-0.924**	0.933**			
ET₀/ (TR₀-ET₀)	-0.618**	-0.738**	-0.876**	0.478**	-0.792**	-0.726**	0.904**	0.889**	0.902**	0.679**	-0.755**	-0.921**	-0.689**	-0.838**	-0.043	0.974**	0.674**	-0.628**	0.477**	0.965**	-0.658**	0.870**	0.810**		
PI_{ABS}	-0.657**	-0.743**	-0.895**	0.501**	-0.846**	-0.793**	0.806**	0.787**	0.802**	0.692**	-0.826**	-0.888**	-0.772**	-0.841**	-0.192	0.968**	0.768**	-0.707**	0.525**	0.964**	-0.728**	0.893**	0.903**	0.973**	

Tablica 30. Koeficijenti korelacije između svih izmjerenih parametara u oba uvjeta uzgoja i suši; * koeficijent korelacije značajan na razini $p < 0,05$,

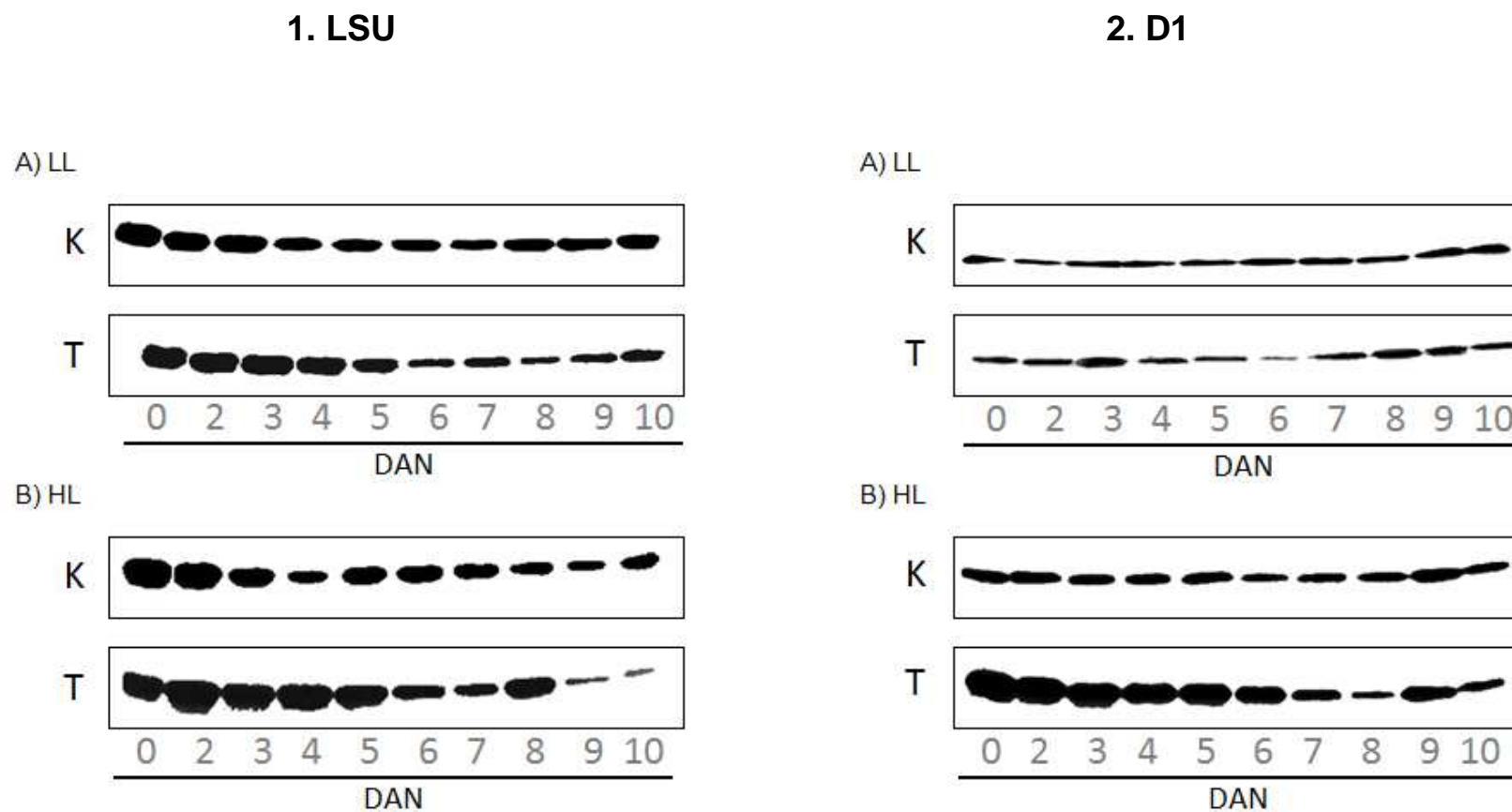
** koeficijent korelacije značajan na razini $p < 0,01$.

3.10. Imunodetekcija proteina D1 i RubisCO LSU

Imunodetekcija komponenata fotosintetskog aparata, proteina D1 reakcijskih centara fotosustava II i velike podjedinice enzima RubisCO (LSU), izvršena je u listovima klijanaca ječma *Hordeum vulgare* L. izloženim suši (T) tijekom deset dana i kontrolnim biljkama (K) u oba uvjeta uzgoja. Rezultati su prikazani na Slici 53.

U listovima klijanaca pojavila se po jedna vrpca koja je detektirana kao velika podjedinica proteina RubisCO-a (LSU) (Slika 53. 1A - kontinuirani uzgoj na LL; 1B - uzgoj na LL uz predtretman na HL). Razina vrpce u tretmanu sušom u uvjetima kontinuiranog uzgoja na LL (1A) smanjena je od šestog dana, u odnosu na kontrolu. Razina vrpce u tretmanu sušom u uvjetima LL uz predtretman na HL (1B) smanjena je tek devetog i desetog dana, u odnosu na kontrolu. Prvih pet dana u suši, ekspresija ovog proteina je čak nešto veća nego u kontrolama.

Po jedna vrpca D1 proteina detektirana je u listovima klijanaca u oba eksperimenta (Slika 53. 2A - kontinuirani uzgoj na LL; 2B - uzgoj na LL uz predtretman na HL). Razina vrpce u listovima biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL (2A) nije se razlikovala u tretmanu sušom tijekom deset dana i kontrolama. Razina vrpce u tretmanu sušom u uvjetima LL uz predtretman na HL (2B) smanjena je samo osmog dana, u odnosu na kontrolu. Ekspresija ovog proteina je tijekom suše veća nego u kontrolama, a smanjenje ekspresije se može primijetiti povećanjem dehidracije.



Slika 53. Relativne razine komponenta fotosintetskog aparata, LSU i D1 proteina, u listovima biljaka izloženih suši (T) tijekom deset dana i listovima kontrolnih biljaka (K); 1 A. i 2 A. LSU i D1 u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL; 1 B. i 2 B. LSU i D1 biljaka uzgajanih na LL uz predtretman na HL.

4. RASPRAVA

Nedostatak vode predstavlja jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika biljnog rasta, razvoja i produktivnosti. Suša, kao abiotički tip stresa, bila je predmetom ovog istraživanja. Izazvana je prestankom zalijevanja deset dana starih klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L., sorta Bravo) koji su prethodno uzgajani na dva različita svjetlosna režima, niskom (LL) i visokom intenzitetu (HL) svjetlosti. U prvim potpuno razvijenim listovima praćene su fiziološke i biokemijske promjene tijekom aklimatizacije uvjetima suše kroz deset dana. Suša uzrokuje oksidacijski stres, što je istraženo mjerenjem produkata peroksidacije lipida, nakon čega je određena stabilnost biomembrana mjerenjem količine propuštenih elektrolita. Određena je koncentracija slobodnog prolina u stanicama, aktivnost antioksidacijskih enzima te su kvantitativno analizirani fotosintetski pigmenti. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a in vivo* istražene su promjene učinkovitosti fotosustava II (PSII). SDS-elektroforezom i imunodetekcijom praćena je ekspresija komponenata fotosintetskog aparata, proteina D1 i velike podjedinice RubisCO-a (LSU). Klijanici su se tijekom uzgoja adaptirali na visoki intenzitet svjetlosti, no zbog toga im je bio smanjen kapacitet za aklimatizaciju na stres uzrokovan sušom.

4.1. Utjecaj zasušivanja na biljke uzgajane u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti

Klijanci ječma uzgajani su u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti (70-80 PPFD; LL), a potom izloženi suši na istom svjetlosnom režimu, što je rezultiralo pojavom oksidacijskog stresa. Odrani intenzitet svjetlosti bio je optimalan za rast klijanaca, a ipak dovoljno nizak kako bi se izbjegla pojava fotoinhibicije, što bi rezultiralo dodatnim stresom.

Suša značajno utječe na vodni status biljke, a relativni sadržaj vode (RWC) u listovima jedan je od primarnih pokazatelja dehidracije (Yamasaki i Dillenburg 1999, Jongdee i sur. 2002). U ovom radu rezultati mjerenja pokazali su da je relativni sadržaj vode u listu (RWC) značajno smanjen trećeg dana tretmana sušom, i taj je trend značajno nastavljen do desetog dana, u kojem je RWC iznosio svega 17,57 %, u odnosu na kontrolu od 95,51 %, što je prikazano na Slici 25 A. Pojava ovakvog progresivnog pada vrijednosti RWC-a nije neobična u uvjetima suše koja se prati u biljaka koje rastu u relativno maloj količini supstrata (Lawlor i Tezara 2009). Smanjenje RWC-a u klijancima dvije vrste pšenice (*Triticum durum* Desf. i *Triticum aestivum* L.) raslim u supstratu u kontroliranim uvjetima pokazali su Keles i Öncel (2004). Važnost mjerenja parametra RWC potvrdili su Jongdee i sur. (2002) koji su kapacitet

održavanja visokog sadržaja vode u listovima opisali vrlo dobrim kriterijem za selekciju genotipova riže tolerantnih na stres potaknut sušom. Već je ranije pokazano da su pri niskom RWC-u oštećene stanične biomembrane, odnosno da se povećanjem gubitka vode povećava i oštećenje biomembrana. O tom procesu diskutirali su Kocheva i sur. (2004), Filek i sur. (2012) te Marcińska i sur. (2012) koji su dehidraciju u klijancima ječma, odnosno pšenice potaknuli dodatkom polietilen glikola (PEG) u hranidbeni medij. Stupanj oštećenja biomembrana u ovom radu određen je mjerenjem količine propuštenih elektrolita. Izmjerene vrijednosti pokazale su da je početak narušavanja integriteta biomembrana (destabilizacije) započeo dan nakon smanjenja RWC-a, odnosno četvrtog dana suše (Slika 26 A). Do desetog dana količina propuštenih elektrolita bila je oko četiri puta veća od količine četvrtog dana, a oko deset puta veća od prosječne vrijednosti u kontrolama.

Usporedno sa smanjenjem RWC-a trećeg dana suše zabilježen je porast lipidne peroksidacije za oko 30 % u odnosu na kontrolu. Do desetog dana taj se postotak povećao na 68 % (Slika 27 A). Sličan odnos relativnog sadržaja vode u listovima i razine lipidne peroksidacije pokazali su Türkan i sur. (2005) tijekom istraživanja utjecaja suše na otporne i osjetljive kultivare graha, te Nayyar i Gupta (2006) ispitujući razlike u fiziološkim i biokemijskim odgovorima između C₃ (pšenica) i C₄ (kukuruz) biljaka u uvjetima suše.

Propuštanje elektrolita kroz biomembrane i porast produkata peroksidacije lipida prvi su pokazatelji oštećenja membranskih proteina i lipida u uvjetima oksidacijskog stresa. Oštećenje membrana se često uzima kao pojedinačni parametar prilikom određivanja oštećenja lipida tijekom različitih stresnih uvjeta (Gill i Tuteja 2010). Inicijaciju peroksidacije lipida mogu potaknuti H₂O₂ i 'O₂' no ona ipak najčešće započinje odvajanjem atoma vodika od molekule prekursora (PUFA) u prisutnosti ·OH pri čemu nastaje organski radikal i voda.

Za hidroksilne radikale (·OH), kao najreaktivnije radikale kisika, još uvijek nije poznat specifični antioksidans koji bi ih neutralizirao. Pretpostavlja se da bi aminokiselina prolin mogla imati određenu ulogu u smanjivanju njihovog štetnog djelovanja na biljni metabolizam. Značajna akumulacija prolina u listovima klijanaca započela je šestog dana suše, a do desetog dana ta se količina povećala oko sedam puta (Slika 28 A). Nakupljanje prolina vjerojatno predstavlja početak biljne aklimatizacije na uvjete suše. Već je ranije pokazano da akumulacija kompatibilnih metabolita ima važnu ulogu u aklimatizacijskim procesima u uvjetima suše, budući da sudjeluje u održavanju hidratiziranog stanja proteina (Hoekstra i sur. 2001, Szabados i sur. 2011).

U ovom eksperimentu potvrđen je isti odnos prolina i relativnog sadržaja vode kao i tijekom dosadašnjih istraživanja. Viša razina prolina izmjerena je u tkivima nižeg RWC-a u dva mjeseca starim klijancima ječma nakon deset dana suše (Bandurska 2000), kao i u listovima uročnjaka nakon devet dana suše (Sperdouli i Moustakas 2012).

U uvjetima kontinuiranog uzgoja na LL uslijed dehidracije došlo je do pojave venuća (gubitak turgora) i polaganog sušenja listova klijanaca, no nije bilo uočljive promjene u boji listova, što se može vidjeti na Slici 54, koja prikazuje klijance nultog dana (A - prije izlaganja suši), i zatim četvrtog (B), sedmog (C) i desetog dana (D) suše. Vizualna procjena promjene boje listova tijekom suše upotpunjena je podacima dobivenim kolorimetrijskom analizom, koja se temelji na kvantificiranju boje mjerenjem reflektirane svjetlosti s površine objekta. Dobiveni podaci (kolorimetrijski parametri) interpretirani su prema $L^*a^*b^*$ sustavu, kako je prikazano na Slici 23. Parametar L^* opisuje relativnu svjetlinu listova pri čemu je za crne površine vrijednosti 0, a za bijele 100. Petog dana suše uočeno je minimalno, ali ipak značajno smanjenje parametra L^* , za 4,1 % u odnosu na kontrolu (Slika 29 A). Odnos je ostao nepromijenjen do devetog dana eksperimenta, a u desetom se kontrole i tretmani uopće nisu razlikovali. Ove varijacije nisu velike i moguće je da potječu od samog odabira listova prilikom mjerenja, a simptom "zatamnjenja" može se objasniti djelomičnim smanjenjem površine listova, odnosno tendenciji ka rolanju (Shao i sur. 2008), uslijed kojeg dolazi do različite refleksije svjetlosti. Ukoliko je negativan, parametar a^* opisuje zelenu boju objekta, a ukoliko je pozitivan opisuje crvenu boju. Tijekom deset dana mjerenja, u suši i kontrolama dobivene se negativne vrijednosti parametra a^* (Slika 30 A). Značajno povećanje ovog parametra, za 3,1 % u odnosu na kontrolu, zabilježeno je trećeg dana suše, dakle, istog dana u kojemu je prvi puta značajno smanjen RWC. Do kraja eksperimenta zelena boja u listovima tretmana sušom bila je smanjena za 15,1 %. Pozitivne b^* vrijednosti opisuju prisutnost žute boje u listovima (Slika 31 A). Efekt smanjenja žute boje od četvrtog do desetog dana suše (od 5,1 do 11,1 % u odnosu na kontrolu) može se objasniti istom pojavom prethodno opisanom za parametar L^* . Metodu kolorimetrijskog određivanja boje kromametrom koristili su Schmitzer i sur. (2009) za procjenu korelacije između kromatskih vrijednosti i glavnih antocijana u senescentnim listovima različitih kultivara javora (*Acer palmatum* Thunb.). Ranije je već pokazano da je ekspresije crvene boje u listovima u snažnoj korelaciji s antocijanima prisutnim u vakuolama epidermalnih ili mezofilnih stanica. U većine kultivara izmjerena je veća a^* vrijednost, a niža b^* , što znači prisutnost više crvene boje i manje žute.



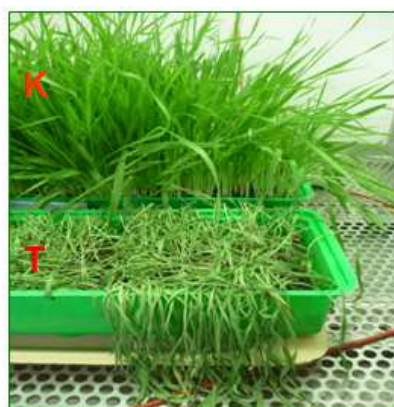
A) 0. dan



B) 4. dan



C) 7. dan



D) 10. dan

Slika 54. Klijanci ječma kontinuirano uzgajani u uvjetima LL. A) 0. dan - deset dana stari klijanci prije izlaganja suši; klijanci u kontroli i tretmanu sušom: B) 4.dan, C) 7.dan, D) 10.dan.

Količina pigmenata u listovima ovisi o razvojnem stadiju (Lepeduš i sur. 2011), ali i o stresnim čimbenicima okoline (Yordanov i sur. 2000). U uvjetima kontinuiranog uzgoja na LL petog dana suše došlo je do značajnog smanjenja koncentracije klorofila *a*, za 21,8 % u odnosu na kontrolu. Unatoč smanjenju koncentracije klorofila *a* za oko 36 % desetog dana suše, taj se odnos nije pokazao značajno različitim od petoga dana. Značajno smanjenje koncentracije klorofila *b*, za 33,3 %, zabilježeno je sedmog dana suše i taj odnos je ostao isti do kraja eksperimenta. Koncentracija ukupnih klorofila *a+b* prema tome značajno je smanjena šestog dana suše i to smanjenje od oko 30 % u odnosu na kontrolu nije se mijenjalo do kraja eksperimenta (Slika 34 A). Dakle, povećanjem stupnja dehidracije nije došlo do progresivnog smanjenja koncentracije klorofila, odnosno degradacije fotosintetskih pigmenata, što je pokazano i kolorimetrijskim parametrima. Kocheva i sur. (2005) proučavali su kratkoročni osmotski stres u klijancima ječma, u kojemu je dehidracija izazvana PEG-om. Tijekom istraživanog perioda relativni sadržaj vode smanjen je za 30 %, pri čemu nije došlo do značajnih promjena u koncentracijama klorofila *a* i *b*. Promjena u koncentraciji klorofila nije bilo niti u 70 dana starim klijancima hibrida pšenice i raži koji su suši bili izloženi kroz četiri tjedna (Hura i sur. 2009). Smanjenje koncentracije klorofila *a* i *b*, u ovisnosti o suši, detektirali su Munne-Bosch i Peñuelas (2004) u vrsti *Arbutus unedo* L. (planika) te Li i sur. (2006) u ječmu, pri čemu je suša bila izazvana tek nakon cvatnje.

Gubitkom vode iz stanica javljaju se promjene u ključnim procesima primarnog biljnog metabolizma. Središnju ulogu u biljnom metabolizmu u uvjetima suše ima fotosinteza (Flexas i sur. 2004). Ovisno o količini fotosintetskih pigmenata, odnosno aktivnih reakcijskih središta fotosustava II (PSII) i dostupnom CO₂ ovisit će funkcioniranje fotosinteze. Smatra se da je PSII jedna od glavnih regulacijskih komponenata transportnog lanca elektrona u kloroplastima (Foyer i Noctor 2000, Lepeduš i sur. 2011). Procjena učinkovitost PSII mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u ovom je radu korištena za proučavanje fotosintetskog aparata u uvjetima suše. Metoda je izuzetno zahvalna zbog rada u uvjetima *in vivo*, bez oštećenja biljnog materijala. Za većinu biljnih vrsta u optimalnim uvjetima maksimalni prinos kvanta PSII (F_v/F_m) iznosi od 0,80 do 0,83 (Schreiber i sur. 1994).

U uvjetima suše na LL maksimalni prinos kvanta PSII bio je vrlo visok, unatoč visokoj dehidraciji. Progresivno smanjivanje RWC-a nije potaknulo fotooštećenje PSII sve do kraja eksperimenta. Samo desetog dana suše zabilježeno je značajno smanjenje vrijednosti ovog parametra u odnosu na kontrolu, i to za svega 2,6 %. U listovima kontrolnih biljaka prosječna vrijednosti parametra F_v/F_m tijekom deset dana mjerenja iznosila je $0,79 \pm 0,01$. Oukarroum i sur. (2007) su u svom istraživanju tolerantnosti različitih sorata ječma na sušu također pokazali neosjetljivost parametra F_v/F_m , te ga okarakterizirali kao neučinkovitog pokazatelja

istraživanog stresa. Isto su pokazali i Kocheva i sur. (2004), koji su sušu u ječmu izazvali dodatkom PEG 800 u hranidbeni medij, a mjerenja izvodili nakon 6, 12, 24 i 48 sati. Parametar F_v/F_m nije se promijenio niti tijekom praćenja suše u vinove loze (Christen i sur. 2007).

Kao bolji pokazatelj stresa izazvanog sušom u ovom radu se pokazao parametar PI_{ABS} , indeks fotosintetske učinkovitosti, čije smanjenje je zabilježeno sedmog dana suše. U odnosu na kontrolu tog je dana smanjen za 10,9 %, a do desetog dana smanjuje se za 25,5 % (Slika 36 A). Značajnost ovog parametra ogleda se kroz nekoliko ključnih procesa bitnih za njegovo izračunavanje. To su apsorpcija fotona svjetlosti (ABS), hvatanje ekscitona ili "trapping" (TR) i transport elektrona (ET). Ovi se procesi, kao i disipacija energije (DI) mogu izraziti po aktivnom reakcijskom središtu (RC) (Strasser i sur. 2004).

Gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0) u uvjetima suše na LL značajno je smanjena samo desetog dana suše, 17,3 % u odnosu na kontrolu (Slika 44 A), što objašnjava pojavu smanjenja maksimalne učinkovitosti PSII upravo toga dana. Unatoč pokazanom smanjenju gustoće aktivnih reakcijskih središta, parametar ABS/RC ostao je nepromijenjen čak i posljednjeg dana suše (Slika 40 A), što navodi na zaključak da nije došlo do promjene u količini molekula klorofila koje su sposobne apsorbirati energiju. Disipacija energije u obliku topline (DI_0/RC) također nije zabilježena niti u jednom danu suše u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti, što se vidi na Slici 43 A.

Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) smanjeno je devetog (za 2,6 %) i desetog dana suše (za 4,2 %), u odnosu na kontrolu (Slika 41 A), dok je elektronski transport (ET_0/RC) smanjen već od osmog dana suše za 5,8 %, a do desetog dana za 11,8 % (Slika 42 A). Omjer hvatanja ekscitona i disipacije energije (TR_0/DI_0) jedan je od parametara pomoću kojih se izračunava indeks fotosintetske učinkovitosti. Smanjenje ovog parametra desetog dana suše (9 % u odnosu na kontrolu) nije moglo biti potaknuto porastom disipacije jer ona uopće nije pokazana. Prema tome na smanjenje parametra TR_0/DI_0 mogao je utjecati samo "trapping" po aktivnom RC, koji je zaista i bio smanjen zadnjih dana suše. Parametar $ET_0/(TR_0-ET_0)$ opisuje pretvorbu ekscitacijske energije uslijed odvajanja naboja, što potom pokreće transport elektrona dalje od plastokinona kao primarnog akceptora elektrona. Smanjenje vrijednosti ovog parametra već od šestog dana suše (za 10,2 %), u odnosu na kontrolu (Slika 38 A), navodi na zaključak da je upravo smanjenje elektronskog transporta ključno za smanjenje indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Tretman sušom u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti, u biljaka koje su kontinuirano uzgajane na LL, nije utjecao na promjenu vremena potrebnog za postizanje maksimalne fluorescencije (t_{max}).

Nultog dana u kontroli i tretmanu OJIP krivulja je zadržala tipičan oblik kakav su pokazali Strasser i sur. (2004). Desetog dana uočen je slabi porast intenziteta fluorescencije nakon 2 ms (korak J), u odnosu na kontrolu (Slika 47 A).

Za funkcioniranje fotosintetskog aparata bitna je optimalna razina svih njegovih komponenata (Minagawa i Takahashi 2004). Imunodetekcijom je pokazana pojavnost vrpce proteina D1 (32-34 kDa) i LSU (50-55 kDa) (Slika 53, 1A i 2A). D1 protein je uz D2 ključni polipeptid u formiranju reakcijskih središta fotosustava II (PSII). U uvjetima kontinuiranog uzgoja na LL relativna razina D1 proteina tijekom deset dana suše nije se mijenjala u odnosu na kontrolu (Slika 53, 2A). Gotovo isto je pokazao i parametar F_v/F_m koji opisuje maksimalnu učinkovitost PSII. F_v/F_m značajno je bio smanjen samo desetog dana, no izmjerena vrijednost toga dana (0,76) i dalje je bila relativno visoka, što znači da je fotosintetski aparat ostao funkcionalan unatoč visokoj dehidraciji. U prilog ovim rezultatima ide i izmjerena koncentracija klorofila koja nije bila drastično smanjena. RubisCO je ključni enzim u fiksaciji CO_2 i njegova funkcija utječe na transport elektrona. Relativna razina proteina LSU (velike podjedinice RubisCO-a) u listovima klijanaca smanjena je od šestog dana suše, u usporedbi s kontrolom, što se može povezati sa smanjenim transportom elektrona, koji za posljedicu ima smanjenje indeksa fotosintetske učinkovitosti ($P_{I_{ABS}}$), čija je tendencija smanjenja zabilježena od sedmog dana suše. Smanjenjem količine RubisCO-a nastaju prevelike količine NADPH, a nema slobodnih akceptora (NADP^+) koji bi primali elektrone, pa se oni prenose na alternativne akceptore (Flexas i Medrano 2002).

Reaktivne kisikove jedinice (ROS) neizbježni su nusprodukti transporta elektrona na kisik kao alternativnog akceptora, odnosno produkti prijenosa ekscitacijske energije s tripletnog klorofila na molekularni kisik, čak i u normalnim uvjetima, bez dodatnog utjecaja stresa. Izvor formiranja ROS-a u fotosintetski kompetentnim biljnim stanicama najčešće su kloroplasti zbog prisutnosti velike količine kisika (Asada 2006), a njihova uloga u biljnom metabolizmu prilično je dobro razjašnjena (Gill i Tuteja 2010). Već je na početku spomenuta inicijacija peroksidacije lipida uslijed stvaranja ROS-a, što za posljedicu ima veliki porast TBARS. Nakon porasta lipidne peroksidacije, koji je nastupio trećeg dana suše, i povećanog propuštanja elektrolita kroz biomembrane četvrtog dana, petoga dana dolazi do pojačane aktivacije enzima antioksidacijskog sustava. Tijekom fotosinteze nastaju visoke koncentracije vodikovog peroksida (H_2O_2). U kloroplastima Mehlerovom reakcijom nastaju superoksidni radikali (O_2^-) fotoredukcijom kisika na PSI. Superoksidni radikali se potom disproporcioniraju u H_2O_2 i O_2 pomoću enzima superoksid-dismutaze (Makino i sur. 2002) ili se reakcija odvija spontano, ali u tom slučaju puno sporije. H_2O_2 se, osim spomenutim putem, može formirati i tijekom brojnih drugih enzimskih i neenzimskih reakcija (Slika 6) (Neill i sur. 2002). Uloga

enzimskih i neenzimskih komponenata relativno je dobro opisana u brojnim radovima (Arora i sur. 2002, Gill i Tuteja 2010). Pojačana aktivnost antioksidacijskih enzima potaknuta je pojavom reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) koje signaliziraju nastanak oksidacijskog stresa (Gaspar i sur. 2002).

Aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaza (GPOX), askorbat-peroksidaza (APX) i katalaza (CAT) mjerene se u ovom eksperimentu i svi su pokazali porast aktivnosti petoga dana suše. Akumulacija prolina šestoga dana može se objasniti kao početak biljne aklimatizacije na stresne uvjete, što zbog funkcije u održavanju hidratiziranog stanja proteina (kompatibilni osmolit), što zbog pretpostavljene uloge u uklanjanju hidroksilnih radikala (smanjujući tako i lipidnu peroksidaciju). Rezultati u ovom radu pokazali su nisku aktivnost enzima i koncentraciju prolina kao neenzimske antioksidacijske komponente u listovima kontrolnih biljaka, a povećavale su se s povećanjem stupnja dehidracije (RWC).

GPOX, u odnosu na CAT i APX, sudjeluje u uklanjanju manje količine H_2O_2 , koristeći ga prilikom oksidacije različitih organskih supstrata pri čemu ga prevode u vodu. Ipak, u uvjetima suše se pokazala kao vrlo aktivan enzim, što su pokazali Bandurska i Józwiak (2010) u vrste *Festuca rubra*, Yang i sur. (2008) u klijancima vrste *Picea asperata* i drugi. Aktivnost enzima GPOX u ovom istraživanju petog dana suše bila je dvostruko veća u odnosu na kontrolu. Tijekom pojačavanja dehidracije i aktivnost se snažno pojačavala, a posljednjeg dana suše bila je čak pet puta veća od aktivnosti u kontrolnim biljkama (Slika 49 A). CAT i APX su ključni enzimi koji u uklanjaju H_2O_2 . Petog dana suše aktivnost APX-a je, u odnosu na kontrolu, porasla 1,5 puta, dok je katalaza porasla 1,2 puta, što nije neobično budući da je poznato da APX ima veći afinitet prema H_2O_2 . Do osmog dana aktivnost APX-a je porasla 2,7 puta i dalje više nije rasla, a CAT je do desetog dana postigla aktivnost svega 1,7 puta veću u odnosu na kontrolu (Slike 50 A i 51 A). APX je prema tome vjerojatno vrlo učinkovito uklanjao peroksid na samom mjestu nastanka pa je manja količina difundirala do peroksisoma gdje ih je dalje razgradila katalaza. U dosadašnjoj literaturi superoksid-dismutaza (SOD) je uglavnom opisana kao enzim koji se prvi aktivira u uvjetima različitih stresnih čimbenika. Katalizira dismutaciju superoksidnih radikala i pretvara ih u manje toksičan vodikov peroksid i kisik. Unatoč mnogim istraživanjima koja su potvrdila vrlo visoku antioksidacijsku učinkovitost SOD-a u ovom radu to nije bio slučaj. Do petog dana suše aktivnost mu je bila jednaka kao i u kontrolama, a šestog dana se smanjila i ostala nepromijenjena do kraja tretmana sušom (Slika 52 A).

4.2. Utjecaj zasušivanja u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti na biljke prethodno uzgajane na visokom intenzitetu svjetlosti tijekom deset dana

Klijanci ječma su uzgajani u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti (~450 PPFD; HL), a potom je suša tijekom deset dana praćena u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti (70-80 PPFD; LL). Predtretman na HL proveden je u svrhu ispitivanja učinka stresa HL tijekom klijanja na ponašanje klijanaca u uvjetima zasušivanja.

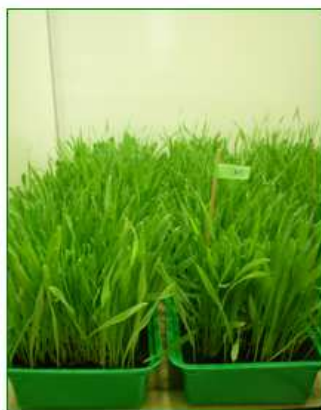
Izmjereni relativni sadržaj vode u listovima klijanaca (RWC), kao indikator stupnja dehidracije, smanjivao se gotovo identično kao i u eksperimentu bez predtretmana na HL. Smanjenje je započelo već drugog dana suše, a do desetog dana se RWC smanjio do niskih 16,87 %, u odnosu na kontrolu u kojoj je izmjerena vrijednost iznosila 93,16 % (Slika 25 B). Kombinirana analiza varijance pokazala je da nema statistički značajne razlike u relativnom sadržaju vode tijekom 10 dana suše u listovima klijanaca kontinuirano uzgajanih na LL i onih uz predtretman na HL (Tablica 4).

Smanjenjem RWC-a na 50,95 % četvrtog dana suše započeo je proces peroksidacije lipida, koji se kontinuirano povećavao tijekom suše. Već je u prethodnom potpoglavlju peroksidacija lipida spomenuta kao vrlo dobar indikator stresa. Desetog dana suše razina lipidne peroksidacije u listovima bila je povećana 9,2 puta u odnosu na kontrolu (Slika 26 B), za razliku od peroksidacije lipida u uvjetima kontinuiranog uzgoja na LL kad je povećanje desetog dana suše iznosilo tek 3,2 puta više nego u kontroli. Količina propuštenih elektrolita uslijed oštećenja membranskih lipida i proteina značajno se povećala petog dana suše, u odnosu na kontrolu, a do desetog dana se povećala čak dvadesetak puta (Slika 27 B) što je dvostruko više u usporedbi s prethodnim eksperimentom. Početak značajnog nakupljanja slobodnog prolina u stanicama zabilježen je petog dana suše, a do desetog se dana njegova koncentracija povećala gotovo jedanaest puta (Slika 28 B).

Povećanje dehidracije četvrtog dana suše potaknulo je peroksidaciju lipida, nakon čega je petog dana suše detektirano pojačano propuštanje elektrolita, što ukazuje na početak oštećenja biomembrana. Kao odgovor biljke na novonastale promjene istoga dana započinje akumulacija prolina. Akumulacija kompatibilnih metabolita, kao što je prolin, označava metaboličku adaptaciju u uvjetima vodnog ili osmotskog stresa. Njihova uloga je u zaštiti stanice osmotskom prilagodbom ili stabiliziranjem membrana (Hare i Cress 1997, Verbruggen i Hermans 2008). Povezanost mjerenih parametara pokazuju i korelacije koje se

moгу vidjeti iz Tablice 30. Smanjenje RWC-a u listovima visoko je korelirano ($p < 0,01$) s propuštanjem elektrolita (-0,822) i lipidnom peroksidacijom (-0,853), kao i s akumulacijom prolina (-0,811). Vrlo visoka pozitivna korelacija ($p < 0,01$) uočena je između propuštanja elektrolita i lipidne peroksidacije (0,974), parametara koji predstavljaju indikatore oštećenja membrana, propuštanja elektrolita s akumulacijom prolina (0,973), kao i akumulacija prolina s peroksidacijom lipida (0,926). Slične korelacije pokazali su Sperdoui i Moustakas (2012) u istraživanju interakcije prolina, šećera i antocijanina tijekom fotosintetske aklimacije uročnjaka uvjetima suše.

U listovima biljaka koje su uzgajane i zasušivane na LL uz predtretman na HL uslijed smanjenja relativne količine vode došlo je do pojave venuća i polaganog sušenja listova, uz vidljive promjene u boji listova, što pokazuje i Slika 55. Kolorimetrijski parametri $L^*a^*b^*$ sustava potvrdili su vizualne promjene boje tijekom suše. Relativna svjetlina listova (L^*) započela je rasti četvrtog dana suše, u kojemu je bila za 3,3 % veća nego u listovima kontrolnih biljaka. Pojačavanjem stupnja dehidracije do desetog dana taj je postotak porastao na 29,3 (Slika 29 B). Parametar L^* u visokoj je korelaciji ($p < 0,01$) s RWC-om iako koeficijent nije visok (-0,457). Smanjenje zelene boje listova opisuje povećanje vrijednosti parametra a^* , koje započinje šestog dana suše (Slika 30 B). U odnosu na kontrolu, tog je dana suše zabilježeno povećanje tek za 7,6 %. Povećanjem dehidracije kontinuirano je smanjivana i količina zelene boje u listovima. Na kraju eksperimenta zabilježeno je povećanje parametra a^* za 96,8 %, u odnosu na kontrolu, što nam govori da je došlo do potpunog gubitka zelene boje. Isto potvrđuje i značajna korelacija ($p < 0,01$) između parametra RWC i a^* (-0,625). Povećanje vrijednosti parametra b^* opisuje povećanje količine žute boje u listovima. Petog dana suše ovaj je parametar bio povećan 17,7 %, u odnosu na boju u kontroli, a do desetog dana porastao je do 49,1 % (Slika 31 B). Najslabija je korelacija ($p < 0,05$) između parametra RWC i kolorimetrijskog parametra a^* (-0,395). Parametri $L^*a^*b^*$ u visokoj su korelaciji s izmjerenom koncentracijom klorofila (Tablica 30), što ukazuje na mogućnost primjene ove nedestruktivne metode u opisivanju razine degradacije fotosintetskih pigmenata.

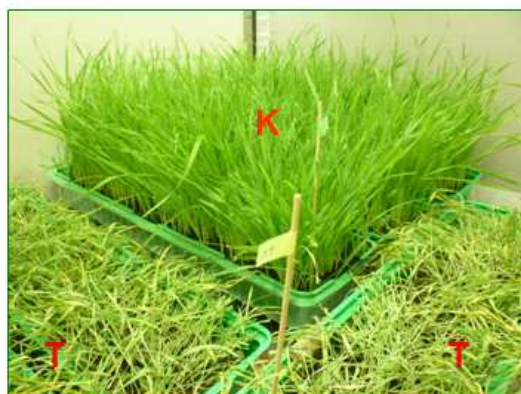


A) 0. dan



B) 4. dan

C) 7. dan



D) 10. dan

Slika 55. Klijanci ječma uzgajani u uvjetima LL uz predtretman na HL. A) 0. dan - deset dana stari klijanci prije izlaganja suši; klijanci u kontroli i tretmanu sušom: B) 4.dan, C) 7.dan, D) 10.dan.

Uslijed smanjenja relativne količine vode, u listovima biljaka koje su uzgajane i zasušivane na LL uz predtretman na HL četvrtog dana suše došlo je do značajnog smanjenja koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, a prema tome i ukupnih klorofila *a+b*. Koncentracija ukupnih klorofila u listovima klijanaca tog je dana bila smanjena za 28,8 % u odnosu na koncentraciju istih u listovima kontrolnih biljaka. Desetog dana eksperimenta koncentracija klorofila *a* smanjila se za 73,5 % (Slika 32 B), a koncentracija ukupnih klorofila za 73,8 % (Slika 34 B). Ovaj rezultat navodi na zaključak da je predtretman na HL utjecao na smanjenje koncentracije pigmentata, odnosno na njihovu degradaciju u suši, a isto su pokazali i kolorimetrijski parametri L^* , a^* i b^* .

Aktivna reakcijska središta PSII, uz molekule CO_2 te aktivan enzim RubisCO, potrebna su za optimalno odvijanje fotosinteze. Maksimalni prinos kvanta fotosustava II (F_v/F_m) značajno je smanjen osmog dana suše, u kojemu je vrijednost iznosila 0,69, u odnosu na prosječnu vrijednost u listovima kontrola $0,79 \pm 0,01$. F_v/F_m je prema tome osmog dana smanjen za 12,7 %, a taj je trend nastavljen do kraja eksperimenta (Slika 35 B). Desetog dana je zabilježna vrijednost F_v/F_m 0,27, što znači da je drastično smanjena (za 65,8 %), za razliku od istog dana u uvjetima kontinuiranog uzgoja na LL u kojemu je smanjenje iznosilo minimalnih 2,6 %, a vrijednost iznosila 0,76. Unatoč različitim vrijednostima koeficijentata korelacije, zabilježena korelacija bila je vrlo visoka ($p < 0,01$) između parametra F_v/F_m i RWC (-0,475), koncentracije klorofila *a* (0,523), lipidne peroksidacije (-0,812) i koncentracije prolina (-0,732). Izmjereni rezultati pokazuju da je maksimalni prinos kvanta fotosustava II podložan utjecaju visokog intenziteta svjetlosti. S obzirom da se smatra da je granična vrijednost pri kojoj je PSII funkcionalan 0,75 (Bolhàr-Nordenkampf i sur. 1989) može se zaključiti da je u navedenim uvjetima zasušivanja funkcionalnost PSII smanjena od osmog dana ($F_v/F_m=0,69$).

Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) i ovdje se pokazao jednako dobrim parametrom za detektiranje stresa potaknutog sušom. Značajne promjene u fotosintezi uočene su šestog dana suše kada se smanjila vrijednost parametra PI_{ABS} , za 34,6 % u odnosu na kontrolu. Desetog dana zabilježeno je smanjenje indeksa fotosintetske učinkovitosti za preko 90 % u odnosu na kontrolu, a izmjerena srednja vrijednost 0,11 (Slika 36 B) opisuje u potpunosti nefunkcionalan fotosintetski aparat. Gustoća aktivnih reakcijskih središta klorofila (RC/CS_0) značajno je smanjena od šestog dana suše pa sve do desetog (Slika 44 B). Smanjenje je zabilježeno od 17,2 % do 73,3 %. Sukladno ovom rezultatu, i koncentracija klorofila bila je desetog dana suše smanjena za isti postotak, u odnosu na kontrolu.

Broj molekula klorofila koje su sposobne apsorbirati energiju može se procijeniti preko parametra ABS/RC. Prema povećanju tog parametra može se zaključiti da je došlo do inaktivacije određenog broja reakcijskih središta. Zushi i sur. (2012) su došli do jednakog zaključka mjereći fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima visoke temperature u listovima rajčice. Prvo značajno povećanje ABS/RC, za 19,3 % u odnosu na kontrolu, dogodilo se osmog dana suše (Slika 40 B). Istog dana suše povećana je i disipacija energije (DI_0/RC), ali za puno veći postotak (83,8 %) (Slika 43 B). Porast vrijednosti oba parametra zabilježen je i u devetom danu suše, a u desetom su detektirane neuobičajeno visoke vrijednosti koje su, kao i PI_{ABS} istog dana, ukazale na činjenicu da se radi o potpuno nefunkcionalnom fotosintetskom aparatu u listovima klijanaca.

Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) smanjeno je samo desetog dana suše, za 19,4 % u odnosu na kontrolu (Slika 41 B). Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) značajno se smanjio već petog dana suše, i to za 8,5 %. Smanjenje je svakodnevno značajno nastavljeno, a do desetog dana zabilježeno je smanjenje od 46,9 % u odnosu na kontrolu (Slika 42 B). Smanjenje omjera hvatanja ekscitona i disipacije energije (TR_0/DI_0) od sedmoga dana suše (14,0 % u odnosu na kontrolu) pa sve do desetoga (83,7 % u odnosu na kontrolu) moralo je biti potaknuto porastom disipacije, jer "trapping" koji je vrlo malo smanjen samo desetog dana, nije mogao imati značajnu ulogu u prilično velikom smanjenju omjera TR_0/DI_0 (Slika 37 B) (Lepeduš i sur. 2009).

Pretvorba ekscitacijske energije uslijed odvajanja naboja, $ET_0/(TR_0-ET_0)$, što potom pokreće transport elektrona dalje od plastokinona kao primarnog akceptora elektrona, smanjuje se od šestog dana suše (za 29,1 % u odnosu na kontrolu) pa sve do desetog (50,6 %) (Slika 38 B). Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS) smanjivao se od osmog dana suše do kraja eksperimenta (Slika 39 B). Budući da se indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) izračunava iz parametara $ET_0/(TR_0-ET_0)$, TR_0/DI_0 i RC/ABS može se zaključiti da su u ovom slučaju sva tri parametra zaslužna za konačnu, smanjenu vrijednost indeksa fotosintetske učinkovitosti. Van Heerden i sur. (2007) su opisali parametar PI_{ABS} kao vrlo osjetljiv indikator fiziološkog stanja pustinskih biljaka u uvjetima suše, prilikom mjerenja u laboratorijskim i poljskim pokusima, te ukazali na povezanost između indeksa fotosintetske učinkovitosti i fiksacije CO_2 . Predtretman na HL u tretmanu sušom na niskom intenzitetu svjetlosti nije utjecao na promjenu vremena potrebnog za postizanje maksimalne fluorescencije (t_{max}), što se vidi na Slici 45 B. Nultog dana u uvjetima uzgoja na visokom intenzitetu svjetlosti krivulja je imala tipičan oblik (Slika 48 A), već ranije prikazan u literaturi (Strasser i sur. 2004). Desetog dana suše, zabilježen je veliki porast intenziteta

fluorescencije na koraku J (mjeren nakon 2 ms), kao i na koraku I (mjeren nakon 30 ms). Porast intenziteta fluorescencije prije koraka J uočen je nakon približno 300 μ s, što bi moglo odgovarati koraku K (Slika 48 A). Korak K (n 200 - 400 μ s) pojavljuje se u tranzijentima u nekoliko viših biljaka suhих i toplih podneblja (Strasser i sur. 2004). Obično je ovaj korak skriven unutar O-J porasta intenziteta fluorescencije jer uglavnom ne predstavlja dovoljno jaku limitaciju transporta elektrona kroz PSII. Oukarroum i sur. (2007) su također pokazali stimulaciju koraka K u različitim sortama ječma u uvjetima suše. Isticanje koraka K može se objasniti poremećenom ravnotežom u PSII između elektrona koji napuštaju reakcijska središta s akceptorske strane i elektrona pristiglih s donorske strane.

Pojavnost vrpce proteina D1 (32-34 kDa) i LSU (50-55 kDa) imunodetekcijom je pokazana i u listovima klijanaca koji su prije tretmana sušom bili uzgajani pri visokom intenzitetu svjetlosti (Slika 53, 1B i 2B). Relativna razina D1 proteina u listovima prvih šest dana suše bila je viša nego u listovima kontrolnih uzoraka (Slika 53, 2A). Smanjenje ekspresije D1 proteina u suši uočava se povećavanjem stupnja dehidracije. Unatoč činjenici da postoji mehanizam oporavka D1 proteina, stvaranje ROS-a je bilo toliko veliko da oporavak više nije bio moguć, što se odrazilo i na vrijednost parametra fluorescencije F_v/F_m (maksimalnu učinkovitost PSII) čije značajno smanjenje je zabilježeno osmog dana suše. U radu Lu i Zhang (1999), koji su pratili sušu u listovima pšenice, smanjenje učinkovitosti fotosustava II povezano je s gubitkom ili smanjenjem D1 i D2 proteina PSII. Relativna razina proteina LSU u listovima klijanaca smanjena je od šestog dana suše, što se može povezati s indeksom fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), koji je istog dana značajno smanjen u odnosu na kontrolu. Također devetog i desetog dana suše parametar PI_{ABS} pokazao je fotosintetsku neučinkovitost, a proteinske vrpce su znatno smanjene. Smanjenjem količine RubisCO-a smanjuje se fiksacija CO_2 , a time i ukupna fotosinteza (van Heerden 2007). Nastaje suvišak NADPH i ATP-a uslijed čega se reducira plastokinon i inhibira kompleks za cijepanje vode što se naziva fotoinhibicijom (Mubarakshina i sur. 2006). Suvišak apsorbirane svjetlosne energije se rasipa u obliku topline, što u ovom radu potvrđuje i značajno povećanje parametra DI_0/RC .

Unatoč gotovo identičnom trendu smanjenja relativnog sadržaja vode (RWC), u listovima kontinuirano uzgajanim na LL i listovima uzgajanim uz predtretman na HL, u tretmanu sušom je zabilježeno potpuno drugačije funkcioniranje PSII i ukupne fotosinteze. Svi nevedeni parametri OJIP testa, odnosno fluorescencije korofila a, pokazuju da je predtretman na HL uzrokovao degradaciju fotosintetskih pigmenata u uvjetima suše, smanjenje broja aktivnih reakcijskih središta, povećanu apsorpciju, a potom i disipaciju energije, te u konačnici potpuno zaustavljanje fotosintetskih procesa.

Objašnjenje se moralo potražiti u kontrolnim uzorcima tijekom uzgoja na oba svjetlosna režima, u uvjetima niskog (LL) i visokog intenziteta svjetlosti (HL). Izmjereni rezultati u listovima kontrolnih biljaka uzgajanih na LL i HL razlikovali su se sadržajem fotosintetskih pigmenata. Koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, a prema tome i ukupna koncentracija klorofila (*a+b*) značajno je povećana u biljaka uzgajanih na niskom intenzitetu svjetlosti, što se može vidjeti u Tablicama 11-13. Smanjenu količinu klorofila u listovima biljaka uzgajanih na HL potvrđuje i kolorimetrijski parametar L^* iz kojeg se može zaključiti da su listovi na HL bili svjetliji (Tablica 8). Niže koncentracije fotosintetskih pigmenata u biljaka koje su uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti ukazuju na razvijenost mehanizma za zaštitu od fotoinhibicije. Sličan odnos među koncentracijama fotosintetskih pigmenata pokazali su Sarijeva i sur. (2007) u listovima sunca i sjene vrsta *Ginkgo biloba* L. i *Fagus sylvatica* L., Yang i sur. (2008) u vrste *Picea asperata* Mast., Verhoeven i sur. (2005) u vrste *Taxus x media* i drugi. Većina biljaka ima sposobnost prilagođavanja na količinu svjetlosti u uvjetima u kojima žive na način da mijenjaju sadržaj klorofila i gustoću kloroplasta tijekom procesa aklimatizacije (Wang i sur. 2007) što se onda odražava na fotosintetsku učinkovitost.

Ostali izmjereni parametri u ovom istraživanju (fiziološki i biokemijski), uz izuzetak katalaze, nisu pokazali razlike u kontrolama prilikom razvoja u različitim svjetlosnim režimima, što znači da su se biljke prilikom samog rasta adaptirale na svjetlosni stres i održavale normalne metaboličke procese. Tek djelovanjem suše kao sljedećeg stresnog čimbenika javili su se problemi u metaboličkim aktivnostima i to vjerojatno zbog smanjene koncentracije fotosintetskih pigmenata, a potom je i njihova degradacija tekla puno brže, u usporedbi s degradacijom fotosintatskih pigmenata u biljaka uzgajanih na LL. Također, pokazano je jače oštećenje membrana, povećano nakupljanje prolina i pojačana aktivnost enzima, prvo se aktivira katalaza (CAT), a potom gvajakol-peroksidaza (GPOD) i askorbat-peroksidaza (APX).

Porastom intenziteta svjetlosti stopa fotosinteze linearno raste, a kada se transportni lanac elektrona zasiti svjetlošću poprima konstantnu vrijednost (plato). Daljnje pojačavanje intenziteta svjetlosti može oštetiti fotosintetski aparat zbog pojave fotoinhibicije (Pevalek-Kozlina 2003). Zatvaranje puči rezultira povišenjem temperature listova uslijed čega se pojačava fotorespiraciju. Krause i sur. 2012 su istraživali utjecaj visokog intenziteta svjetlosti na klijance različitih drvenastih vrsta. Maksimalni prinos kvanta PSII u uvjetima podnevnog osvjetljenja u svim je vrstama bio značajno niži nego u jutarnjim satima kada je prisutno slabije osvjetljenje. Zasjeñeni listovi tijekom eksperimenta imali su nešto učinkovitiji PSII od nezasjeñenih. Ukupni klorofili u nekih su listova bili smanjeni tijekom zasjeñenja, dok su kod nekih ostali nepromijenjeni, vjerojatno ovisno o kapacitetu biljne zaštite protiv fotoinhibicije. Dinamika između sakupljanja i iskorištenja svjetlosti dobar je pokazatelj funkcioniranja

fotosintetskog aparata. Višak ekscitacijske energije u fotosustavu II (PSII) vodi ka smanjenju učinkovitosti fotosintetskog aparata, odnosno akumulaciji ROS-a uslijed čega se javlja oksidacijski stres (Lawlor i Tezara 2009).

Povećana aktivnost enzima antioksidacijskog sustava u listovima klijanaca uzgajanih na HL, a potom izloženih suši na LL, javlja se ranije nego u listovima koji su tijekom cijelog eksperimenta uzgajani na LL. Aktivnost katalaze (CAT) značajno se povećala već treći dan suše kada je 1,3 puta bila veća u odnosu na kontrolu. Do kraja eksperimenta povećala se 4,3 puta (Slika 51 B). U usporedbi s aktivnošću u uvjetima LL aktivnost katalaze je porasla dva dana prije i dvostruko bila povećana u desetom danu. Očito je bilo prisutno puno više reaktivnih kisikovih jedinki, odnosno vodikovog peroksida kojeg katalaza razgrađuje u peroksisomima. Već 0. dana u slučaju katalaze se vidi da su biljke na HL bile izložene stresu. Srednja vrijednost aktivnosti enzima CAT 0. dana u uvjetima rasta na HL bila je značajno povećana 1,4 puta u odnosu na aktivnost istog dana u biljkama raslim na LL (Tablica 28). Aktivnosti gvajakol-peroksidaze (GPOX) i askorbat-peroksidaze (APX) značajno je porasla četvrtog dana suše, u odnosu na kontrolu. GPOX se povećala za 2,1 puta (Slika 49 B), a APX za 1,3 puta (Slika 50 B). Do kraja eksperimenta aktivnosti su se povećavale kako je odmicao tretman sušom. Desetog dana su postignute maksimalne vrijednosti porasta aktivnosti, u slučaju APX-a za 3,2 puta, a GPOX-a za 6,3 puta (Slika 49 B i 50 B). U usporedbi s aktivnostima izmjerenim u uvjetima LL, aktivnosti enzima na HL su bile značajno povećane.

Bandurska i Jóźwiak (2010) povezali su visoku aktivnost enzima GPOX s pojačanim nakupljanjem prolina, što je pokazano i u ovom istraživanju. Korelacija između koncentracije prolina i aktivnosti gvajakol-peroksidaze vrlo je visoka, a koeficijent iznosi 0,810 ($p < 0,01$). Značajno povećanu aktivnost katalaze i gvajakol peroksidaze tijekom suše izazvane prestankom zalijevanja pokazao je i Abogadallah (2011) u listovima vrste *Pancratium maritimum*, za koju se na temelju ranije provedenih istraživanja pretpostavlja da je tolerantna na sušu, a djelomično i na solni stres.

Tijekom deset dana mjerenja, analiza varijance je pokazala da nema statistički značajnih razlika u aktivnosti enzima SOD (Slika 51) što pokazuje da će nastavak istraživanja koja se bave ovom problematikom biti svrsishodan. Zhang i sur. (2004) su ukazali na potrebu istraživanja pojedinih izoenzima u svrhu dobivanja novih spoznaja, upravo iz razloga što brojna dosadašnja istraživanja nisu pokazala uniformnu strategiju uključivanja ovog enzima tijekom suše. Kako ovom radu nije istraživani utjecaj suše na dinamiku otvaranja i zatvaranja puči buduća će istraživanja, uz druge aspekte, svakako obuhvatiti i ovaj. Cjelokupno

istraživanje daje dobru podlogu za buduća istraživanja tolerancije biljaka na sušu, ali i mehanizama njihovog oporavka.

Lawlor i Tezara (2009) ukazali su na problem koji se pojavljuje pri tumačenju rezultata fizioloških mjerenja tijekom nedostatka vode i međusobnoj usporedbi istih zbog različitih eksperimentalnih uvjeta (biljna vrsta, način izazivanja suše, rast na otvorenom ili u kontroliranim uvjetima, trajanje i jačina stresa i dr.). Ukoliko se eksperimenti provode u relativno malim volumenima supstrata RWC, osmotski potencijal i gubitak turgora progresivno se smanjuju kroz nekoliko dana stresnog utjecaja. Također je ukazao na potrebu višestrukog ponavljanja eksperimenta i uzorkovanja u više replika, što je u ovom radu i uzeto u obzir. Kako bi se mogao što bolje objasniti mehanizam fotosinteze u uvjetima suše trebalo bi se na neki način standardizirati fiziološke i molekularne studije.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu istraživao se utjecaj ekstremnog zasušivanja u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti (LL) na klijance ječma (*Hordeum vulgare* L.), prethodno uzgojene na niskom (LL) odnosno visokom (HL) intenzitetu svjetlosti, usporedbom fizioloških i biokemijskih parametara. Na temelju rezultata istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Smanjenje relativnog sadržaja vode (RWC) u listovima klijanaca ječma uslijed zasušivanja dovodi do pojačane peroksidacije lipida koja uzrokuje oštećenja biomembrana što se ogleda u povećanoj količini propuštenih elektrolita.
2. Također, smanjenje relativnog sadržaja vode u listovima uslijed zasušivanja prouzročilo je degradaciju klorofila, pri čemu je predtretman HL uzrokovao bržu i jaču degradaciju i klorofila *a* i klorofila *b* u odnosu na uzgoj u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti.
3. Osim degradacije ukupnih klorofila, smanjenje RWC-a dovelo je i do smanjenja ukupne fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS} , F_v/F_m), neovisno o uvjetima uzgoja (LL, HL).
4. Budući da je smanjenje vrijednosti oba glavna pokazatelja fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS} , F_v/F_m) bilo brže i znatno jače izraženo u biljkama koje su prethodno uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti, može se zaključiti da je ovaj predtretman uzrokovao promjene u fotokemijskim i nefotokemijskim procesima u tilakoidnim membranama.
5. Kao najznačajniji mehanizam smanjenja fotosintetske učinkovitosti pokazalo se smanjenje elektronskog transporta nakon primarnog akceptora Q_A^- ($ET_0/(TR_0-ET_0)$), što je vremenski (6. dan suše) bilo usko povezano s degradacijom proteina RubisCO LSU, koja indicira slabiju funkcionalnost Calvin-Benson-ovog ciklusa.
6. Osim smanjene vrijednosti parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ neovisno o uvjetima uzgoja (LL, HL), u biljkama predtretim HL tijekom zasušivanja aktivna reakcijska središta postaju disipacijska (porast vrijednosti DI_0/RC i smanjenje vrijednosti TR_0/DI_0), čime se umanjuje sposobnost hvatanja ekscitona što dodatno pojačava fotoinhibiciju (PI_{ABS} je bio 93% niži u odnosu na kontrolne biljke, dok je u biljaka uzgajanih u uvjetima LL PI_{ABS} bio 25% niži u odnosu na kontrolne biljke zadnjeg dana zasušivanja).

7. Smanjenje vrijednosti parametra TR_0/DI_0 u klijanaca uzgojenih u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti, do kojeg je najvećim dijelom došlo zbog pojačane disipacije suviška ekscitacijske energije, podudara se (7. dan suše) s degradacijom proteina D1, što je, uz bržu i izraženiju degradaciju klorofila *b* glavni razlog smanjenja maksimalnog prinosa kvanta PSII (F_v/F_m) i ukupne fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u usporedbi s klijancima uzgajanim u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti.
8. Mjerenje reflektirane svjetlosti kromametrom (kvantifikacija boje) pokazalo je značajnu korelaciju s izmjerenim koncentracijama fotosintetskih pigmenata što pokazuje da se ova nedestruktivna metoda može uspješno primijeniti u opisivanju razine degradacije fotosintetskih pigmenata.
9. Rezultati mjerenja koncentracije ukupnih klorofila, parametara OJIP testa i imunodetekcija glavnih fotosintetskih proteina (D1 i RubisCO LSU) nedvojbeno ukazuju da se procesi fotosinteze nisu mogli neometano odvijati tijekom ekstremnog zasušivanja, kao i na pojačanu fotoinhibiciju zbog primjene predtretmana HL. Uvjeti tijekom zasušivanja nužno dovode do izraženog oksidacijskog stresa, vidljivog kao povećana razina lipidne peroksidacije (TBARS), što inducira antioksidacijski odgovor biljaka koji se očitovao kroz povećanu aktivnost enzima katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, te povećanje akumulacije prolina kao neenzimske komponente antioksidacijskog sustava.
10. U biljaka ječma koje su uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti i biljaka uzgojenih u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti prije izlaganja suši nisu utvrđene razlike u vrijednostima mjerenih parametara što pokazuje da se ječam tijekom uzgoja u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti adaptirao. Iznimku čine povećana aktivnost enzima katalaze i niže koncentracije fotosintetskih pigmenata u biljaka koje su uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti što je povezano sa zaštitom biljaka od fotoinhibicije.
11. Unatoč adaptaciji tijekom predtretmana HL biljke su tijekom zasušivanja pokazale intenzivniju peroksidaciju lipida i akumulaciju prolina. Također, povećana aktivnost enzima uključenih u antioksidacijski odgovor (GPOX, APX i CAT) izmjerena je ranije u biljaka izloženih predtretmanu HL nego li u biljaka koje su tijekom cijelog eksperimenta uzgajane na niskom intenzitetu svjetlosti.

12. Pokazalo se da su se biljke ječma izložene suši, a prethodno uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti uspjele adaptirati na nepovoljne uzgojne uvjete, no zbog toga im se smanjila adaptabilnost na slijedeći stres (suša) u nizu. To pokazuje da će biljke teže podnositi sušu ako su prethodno bile izložene visokoj insolaciji.

Dobiveni rezultati upotpunjavaju dosadašnje spoznaje o povezanosti oksidacijskog stresa uzrokovanog zasušivanjem i visokim intenzitetom svjetlosti s aktivnošću enzima antioksidacijskog sustava, razinom oštećenja biomembrana, uključivanjem osmoprotektanata i regulacijom fotosintetske učinkovitosti. Također, rezultati mogu pomoći u procjeni potrebe navodnjavanja u uvjetima suše s ciljem smanjenja štetnog utjecaja.

6. LITERATURA

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzym* 105: 121-126
- Abogadallah GM (2011) Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Sci* 180: 540-547
- Allen JF (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci* 8: 15–19
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedreño MA (2009) Clas III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60(2): 377-390
- Andersson I, Backlund A (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Biochem* 46: 275-291
- Appenroth K-J, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ (2001) Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ Pollut* 115: 49-64
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci India* 82: 1227-1238
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plantarum* 85: 235-241
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396
- Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim H H, Pozzi C, Rohde W, Salamini F (2000) On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol Biol Evol* 17(4): 499–510
- Bai LP, Sui FG, Ge TD (2006) Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere* 16(3): 326–332
- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F (2008) From intercellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biologies* 331: 806-814
- Bandurska H (2000) Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injury? I. Free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. *Acta Physiol Plant* 22(4): 409-415
- Bandurska H, Józwiak V (2010) A comparison of the effects of drought on proline accumulation and peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* L. and *Lolium perenne* L. *Acta Soc Bot Pol* 79(2): 111-116
- Barber J, Anderson B (1992) Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17: 61-66
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207

- Blake T, Blake V, Bowman J, Abdel-Haleem H (2011) Barley feed uses and quality improvement. U: Ullrich SE (ur.) Barley: Production, Improvement and Uses, str. 522-531. Wiley-Blackwell, Oxford, UK
- Bolhár-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Öuqist G, Schreiber U, Lechner EG (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A Review of Current Instrumentation. *Funct Ecol* 3: 497–514
- Borisova (Mubarakshina) MM, Kozuleva MA, Rudenko NN, Naydov IA, Klenina IB, Ivanov BN (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins. *BBA-Bioenergetics* 1817: 1314-1321
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brcko A, Pěnčík, Magnus V, Prebeg T, Mlinaric S, Antunovic J, Lepedus H, Cesar V, Strnad M, Rolčík J, Salopek-Sondi B (2012) Endogenous auxin profile in the christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit: free and amide conjugated IAA. *J Plant Growth Regul* 31: 63–78
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants, John Wiley & Sons, Rockville, USA
- Chaerle L, Van Der Straeten D (2000) Imaging techniques and early detection of plant stress. *Trends Plant Sci* 5(11): 495-501
- Chaerle L, Hagenbeek D, De Bruyne E, Valcke R, Van Der Straeten D (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant–pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol* 45: 887–896
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30: 239-264
- Chen L, Jia H, Tian Q, Du L, Gao Y, Miao X, Liu Y (2012) Protecting effect of phosphorylation on oxidative damage of D1 protein by down-regulating the production of superoxide anion in photosystem II membranes under high light. *Photosynth Res* 112: 141-148
- Christen D, Schönmann S, Jermini M, Strasser RJ, Defago G (2007) Characterisation and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environ Exp Bot* 60: 504-514
- Collins HM, Burton RA, Topping DL, Liao ML, Bacic A, Fincher GB (2010) Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem* 87: 272–282
- Cooper GM, Hausman RE (2010) Stanica: Molekularni pristup (Lauc G, ur. prijevoda na hrvatski jezik), Medicinska naklada, Zagreb

- Correia MJ, Osório ML, Osório J, Barrote I, Martins M, David MM (2006) Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environ Exp Bot* 58: 75-84
- Cosio C, Dunand C (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J Exp Bot* 60(2): 391-408
- Dai F, Nevo E, Wu D, Comadran J, Zhou M, Qiu L, Chen Z, Beiles A, Chen G, Zhang G (2012) Tibet is one of the centers of domestication of cultivated barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(42): 16969-73
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Phys* 42: 55-76
- Dolferus R, Ji X, Richards RA (2011) Abiotic stresses and control of grain number in cereals. *Plant Sci* 181: 331-341
- Dubravec K (1991) *Botanika*, Fakultet poljoprivrednih znanosti, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišna naknada d.o.o., Zagreb
- Edelman M, Matoo AK (2008) D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynth Res* 98: 609–620
- Ehsanpour AA, Fatahian N (2003) Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell Tiss Org* 73: 53-56
- Feng ZY, Zhang LL, Zhang YZ, Ling HQ (2006) Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. *Genet Mol Biol* 29(2): 330-33
- Filek M, Walas S, Mrowiec H, Rudolphy-Skórska E, Sieprawska A, Biesaga-Kościelniak J (2012) Membrane permeability and micro- and macroelement accumulation in spring wheat cultivars during the short-term effect of salinity- and PEG-induced water stress. *Acta Physiol Plant* 34: 985-995
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J Exp Bot* 61(12): 3211-3222
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biol* 6: 1-11
- Flexas J, Medrano H (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revised. *Ann Bot* 89: 183-189
- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* 146: 359-388
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plantarum* 119: 355-364

- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J. (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul* 37: 263–285
- Genkov T, Spreitzer RJ (2009) Highly conserved small subunit residues influence Rubisco large subunit catalysis. *J Biol Chem* 284(44): 30105-30112
- Gianopolities CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48: 909-930
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21: 79–102
- Heldt HW (1999) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. str. 289-330. Oxford University Press Inc., New York
- Henzler T, Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot* 51: 2053-2066
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of Class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42 (5): 462-468
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6(9): 431-438
- Huang AHC, Cavalieri AJ (1979) Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves. *Plant Physiol* 63: 531-535
- Hura T, Hura K, Grzesiak S (2009) Physiological and biochemical parameters for identification of QTLs controlling the winter triticale drought tolerance at the seedling stage. *Plant Physiol Bioch* 47: 210-214
- Joly D, Carpentier R (2007) The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors. *J Photoch Photobio B* 88: 43-50
- Jones HG, Jones MB (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms. U: Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (ur.) *Plants Under Stress*, str. 1–10. Cambridge university Press, Cambridge
- Jongdee B, Fukai S, Cooper M (2002) Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Res* 76(2-3): 153-163
- Jurić S, Hazler-Pilepić K, Tomašić A, Lepeduš H, Jeličić B, Puthiyaveetil S, Bionda T, Vojta L, Allen JF, Schleiff E, Fulgosi H (2009) Tethering of ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *Plant J* 60(5): 783-794

- Katanić Z, Atić L, Ferhatović DŽ, Cesar V, Lepeduš H (2012) PSII Photochemistry in vegetative buds and needles of norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurement. *Acta Biol Hung* 63(2): 218-230
- Keles Y, Öncel I (2004) Growth and Solute Composition in Two Wheat Species Experiencing Combined Influence of Stress Conditions. *Russ J Plant Physl* 51(5): 203-208
- Kereša S, Barić M, Horvat M, Habuš Jerčić I (2008) *Sjemenarstvo* 25(1): 35-45
- Kocheva K, Lambrev P, Georgiev G, Goltsev V, Karabaliev M (2004) Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *Bioelectrochemistry* 63: 121-124
- Kocheva KV, Busheva MC, Georgiev GI, Lambrev PH, Goltsev VN (2005) Influence of short-term osmotic stress on the photosynthetic activity of barley seedlings. *Biol Plantarum* 49(1): 145-148
- Kocsy G, Laurie R, Szalai G, Szilágyi V, Simon-Sarkadi L, Galiba G, de Ronde JA (2005) Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. *Physiol Plantarum* 124: 227-235
- Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Lalić A, Lepeduš H, Dvojković K, Abičić I, Katanić Z, Antunović J, Kovačević V (2011) Photosynthetic efficiency in juvenile stage and winter barley breeding for improved grain yield and stability. *Poljoprivreda* 17(1): 28-35
- Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Drezner G, Lalić A, Lepeduš H, Zdunić Z, Jurković Z, Dvojković K, Katanić Z, Kovačević V (2012) Photosynthetic efficiency and quantitative reaction of bread winter wheat to mild short-term drought conditions. *Turk J Agric For*, DOI: 10.3906/tar-1202-27
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol* 188: 655-673
- Krause GH, Winter K, Matsubara S, Krause B, Jahns P, Virgo A, Aranda J, García M (2012) Photosynthesis, photoprotection, and growth of shade-tolerant tropical tree seedlings under full sunlight. *Photosynth Res* 113: 273-285
- Kruk J, Holländer-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J Plant Physiol* 162: 749-757
- Lalić A, Abičić I, Kovačević J, Šimić G, Drezner G, Novoselović D, Dvojković K, Guberac V (2012) Procjena sorti ozimog ječma u uvjetima proizvodnje Republike Hrvatske. U: Pospišil M (ur.) 47. hrvatski i 7. međunarodni simpozij agronoma, Zbornik radova, str. 289-293. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
- Lawlor DW (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann Bot-London* 89: 871-885
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275-294

- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate nad metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103: 561-579
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lepeduš H, Brkić I, Cesar V, Jurković V, Antunović J, Jambrović A, Brkić J, Šimić D (2012) Chlorophyll analyses of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Period Biol* 114(1): 73-76
- Lepeduš H, Gaća V, Viljevac M, Kovač S, Fulgosi H, Šimić D, Jurković V, Cesar V (2011) Changes in photosynthetic performace and antioxidative strategies during maturation of Norway maple (*Acer platanoides* L.) leaves. *Plant Physiol Biochem* 49: 368-376
- Lepeduš H, Jurković V, Štolfa I, Ćurković-Perica M, Fulgosi H, Cesar V (2010) Changes in photosystem II photochemistry in senescencing maple leaves. *Croat Chem Acta* 83(4): 379-386
- Lepeduš H, Tomašić A, Jurić S, Katanić Z, Cesar V, Fulgosi H (2009) Photochemistry of PSII in *A. thaliana* mutant. *Food Technol Biotechnol* 47 (3): 275–280
- Lepeduš H, Viljevac M, Cesar V, Ljubešić N (2005) Functioning of the photosynthetic apparatus under low and high light conditions in chlorotic spruce needles as evaluated by *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Russ J Plant Physl* 52(2): 165-170
- Lenk S, Chaerle L, Pfündel EE, Langsdorf G, Hagenbeek D, Lichtenthaler HK, Van Der Straeten D, Buschmann C (2007) Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *J Exp Bot* 58(4): 807-814
- León J, Rojo E, Sánchez-Serrano J (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52(354):1-9
- Li R, Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agr Sci China* 5(10): 751-757
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382
- Lichtenthaler HK, Burkart S (1999) Photosynthesis and high light stress. *Bulg J Plant Physiol* 23(3-4): 3-16
- Lin JS, Wang GX (2002) Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than in tolerant cultivars in spring wheat. *Plant Sci* 163: 627-637
- Lu C, Zhang J (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J Exp Bot* 50(336): 1199–1206
- Ma YH, Ma FW, Wang YH, Zhang JK (2011) The responses of the enzymes related with ascorbate-glutathione cycle during drought stress in apple leaves. *Acta Physiol Plant* 33: 173-180

- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch Biochem Biophys 444: 139–158
- Makino A, Miyake C, Yokota A (2002) Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the Cyclicelectron flow around PSI in rice leaves. Plant Cell Physiol 43(9): 1017-1026
- Mandre M (2002) Stress concepts and plants. - Forestry studies / Metsanduslikud uurimused 36: 9-16
- Manivannan P, Jaleel CA, Sankar B, Kishorekumar A, Somasundaram R, Lakshmanan GMA, Panneerselvam R (2007) Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. Colloid Surface B 59: 141-149
- Marcińska I, Czyczyło-Mysza I, Skrzypek E, Filek M, Grzesiak S, Grzesiak MT, Janowiak F, Hura T, Dziurka M, Dziurka K, Nowakowska A, Quarrie SA (2012) Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. Acta Physiol Plant, DOI:10.1007/s11738-012-1088-6
- Martinčić J, Kozumplik V (1996) Oplemenjivanje bilja, Nacionalna i sveučilišna knjižnica, Zagreb
- Mathe C, Barre A, Jourda C, Dunand C (2010) Evolution and expression of class III peroxidases. Arch Biochem Biophys 500: 58-65
- Mattoo K, Giardi MT, Raskind A, Edelman M (1999) Dynamic metabolism of photosystem II reaction center proteins and pigments. Physiol Plantarum 107: 454-461
- Matysik J, Alia, Bhalu B, Mohanty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Curr Sci India 82: 525-532
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. J Exp Bot 51(345): 659-668
- May MJ, Vernoux, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. J Exp Bot 49(321): 649-667
- Minagawa J, Takahashi Y (2004) Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. Photosynth Res 82: 241-263
- Mishra KB, Iannaccone R, Petrozza A, Mishra A, Armentano N, La Vecchia G, Trtílek M, Cellini F, Nedbal L (2012) Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. Plant Sci 182: 79-86
- Mishra AK, Singh VP (2010) A review of drought concepts. J Hydrol 391: 202-216
- Misra AN, Srivastava A, Strasser RJ (2001) Utilization of fast chlorophylla fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and Brassica seedlings. J Plant Physiol 158: 1173–1181

- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9): 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9(10): 490-498
- Mittler R (2006) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mubarakshina M, Khorobrykh S, Ivanov B. (2006) Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane. *BBA-Bioenergetics* 1757(11): 1496-1503
- Munné-Bosch S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162: 743-748
- Munné-Bosch S, Peñuelas J (2004) Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Sci* 166: 1105-1110
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Nayyar H, Gupta D (2006) Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environ Exp Bot* 58: 106-113
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395
- Nevo E, Fu JB, Pavlicek T, Khalifa S, Tavasi M, Beiles A (2012) Evolution of wild cereals during 28 years of global warming in Israel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 3412–3415
- Niyogi KK, Shih C, Chow WS, Pogson BJ, DellaPenna D (2001) Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth Research* 67: 139-145
- Niyomsoan S, Grant W, Olson DL, Mishra B (2002) Variation of color in titanium and zirconium nitride decorative thin films. *Thin Solid Films* 415: 187-194
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Phys* 49: 249–79
- Oukarroum A, El Madidi S, Schansker G, Strasser RJ (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLCJIP under drought stress and re-watering. *Environ Exp Bot* 60: 438-446
- Ozfidan C, Turkan I, Sekmen AH, Seckin B (2013) Time course analysis of ABA and non-ionic osmotic stress-induced changes in water status, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in *Arabidopsis thaliana* wild-type (Columbia) and ABA-deficient mutant (*aba2*). *Environ Exp Bot* 86: 44-51
- Qiu ZB, Liu X, Tian XJ, Yue M (2008) Effects of CO₂ pretreatment on drought stress resistance in wheat. *J Photoch Photobio B* 90: 17-25

- Pahlich E (1993) Larcher's definition of plant stress: a valuable principles for metabolic adaptability research. *Rev Bras Fisiol Veg* 5(2): 209-216
- Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9(11): 534-540
- Pevalek-Kozlina B (2003) *Fizologija bilja*. Profil, Zagreb
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *BBA-Bioenergetics* 1807: 989-998
- Pospíšil P, Dau H (2000) Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth Res* 65: 41-52
- Radić S, Peharec Štefanić P, Lepeduš H, Roje V, Pevalek-Kozlina B (2013) Salt tolerance of *Centaurea ragusina* L. is associated with efficient osmotic adjustment and increased antioxidative capacity. *Environ Exp Bot* 87: 39-48
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G, Perrotta C (2006) Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ* 29: 2143-2152
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161: 1189-1202
- Rintamäki E, Salo R, Lehtonen E, Aro EM (1995) Regulation of D1-protein degradation during photoinhibition of photosystem II *in vivo*: Phosphorylation of the D1 protein in various plant groups. *Planta* 195: 379-386
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(49): 19631-19636
- Robredo A, Pérez-López U, Sainz de la Maza H, González-Moro B, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A (2007) Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Environ Exp Bot* 59: 252-263
- Rosenqvist E (2001) Light acclimation maintains the redox state of the PSII electron acceptor Q_A within a narrow range over a broad range of light intensities. *Photosynth Res* 70: 299-310
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M (2011) Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Curr Opin Plant Biol* 14: 232-239
- Sabolić I (2007) Bojenje proteina nakon elektroforetskog prijenosa na membranu. U: Ambriović Ristov A (ur.) *Metode u Molekularnoj biologiji*, str. 587-590. Institut Ruđer Bošković, Zagreb

- Sarijeva G, Knapp M, Lichtenthaler HK (2007) Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* i *Fagus*. J Plant Physiol 164: 950-955
- Saruhan N, Terzi R, Saglam A, Kadioglu A (2009) The relationship between leaf rolling and ascorbate-glutathione cycle enzymes in apoplastic and symplastic areas of *Ctenanthe setosa* subjected to drought stress. Biol Res 42: 315-326
- Schmitzer V, Osterc G, Veberic R, Stampar F (2009) Correlation between chromaticity values and major anthocyanins in seven *Acer palmatum* Thunb. cultivars. Sci Hortic Amsterdam 119: 442–446
- Schreiber U (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorimetry and saturation pulse method: An overview. U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration, Vol 19, str. 279-319. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. Ecol Stu 100: 49-70
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R (1998) Effect of Water Stress on Cell Division and Cell-Division-Cycle 2-Like Cell-Cycle Kinase Activity in Wheat Leaves. Plant Physiol 117: 667-678
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. C R Biologies 331: 215-225
- Siegel BZ, Galston W (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. Plant Physiol 42: 221-226
- Slavin JL, Martini MC, Jacobs Jr DR, Marquart L (1999) Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. Am J Clin Nutr 70: 459-463
- Sperdoui I, Moustakas M (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. J Plant Physiol 169(6): 577-585
- Spreitzer RJ (2003) Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Arch Biochem Biophys 414: 141-149
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescent transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. U: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (ur.) Probing photosynthesis: Mechanisms, regulation and adaptation, str. 445-483. Taylor and Francis, London
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael (2004) Analysis of chlorophyll a fluorescence transient. U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration. Vol 19, str. 321-362. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands

- Strasser BJ, Strasser RJ (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test. U: Mathis P (ur.) Photosynthesis: From light to biosphere. Vol 5, str. 977-980. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Sun XW, Wang LY, Zhang LX (2007) Involvement of DEG5 and DEG8 proteases in the turnover of photosystem II reaction center D1 protein under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. Chinese Science Bulletin 52(13): 1742-1745
- Szabados L, Kovács H, Zilberstein A, Bouchereau A (2011) Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance. Advances in Botanical Research 57: 105-150
- Tausz M, Šircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? J Exp Bot 55(404): 1955-1962
- Thameur A, Ferchichi A, López-Carbonell M (2011) Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. S Afr J Bot 77: 222-228
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. Nature 491: 711-716
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytka H (2002) A specific role for tocopherol and chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett 516: 156-160
- Türkan I, Bor M, Özdemir F, Koca H (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. Vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci 168: 223-231
- Xu TW (1975) On the origin and phylogeny of cultivated barley with reference to the discovery of Ganzi wild two-rowed barley *Hordeum spontaneum* C. Koch. Acta Genet Sin 2: 129-137.
- Utz HF (1995) PLABSTAT Version 3A of 2010-07-19. A computer program for statistical analysis of plant breeding experiments. University of Hohenheim, Stuttgart.
- Valliyodan B, Nguyen HT (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Curr Opin Plant Biol 9: 189-195
- van Heerden PDR, Swanepoel JW, Krüger GHJ (2007) Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrubspecies exhibiting C₃-mode CO₂ assimilation. Environ Exp Bot 61: 124-136

- Varga B, Janda T, László E, Veisz O (2012) Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. *Acta Physiol Plant* 34: 849-858
- Vassilev A, Manolov P (1999) Chlorophyll fluorescence of barley (*H. vulgare* L) seedlings grown in excess of Cd. *Bulg J Plant Physiol* 25(3-4): 67-76
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* 35: 753-759
- Verhoeven AS, Swanberg A, Thao M, Whiteman J (2005) Seasonal changes in leaf antioxidant systems and xanthophyll cycle characteristics in *Taxus x media* growing in sun and shade environments. *Physiol Plantarum* 123: 428-434
- Verma S, Dubey RS (2003) Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655
- Yamasaki S, Dillenburg LR (1999) Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. *Rev Bras Fisiol Veg* 11(2): 69-75
- Yang Y, Han C, Liu Q, Lin B, Wang J (2008) Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiol Plant* 30: 433-440
- Yanxia H, Haoru T, Young Z, Qing C (2010) Cloning and sequence analysis of dehydroascorbate reductase gene (dhar) from strawberry by SON-PCR. *Agric Biol J N Am* 1(4): 726-730
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38(1): 171-186
- You J, Hu H, Xiong L (2012) An ornithine δ -aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Sci* 197: 59-69
- Wang Y, Frei M (2011) Stressed food - The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agr Ecosyst Environ* 141: 271-286
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14
- Wang S, Wan C, Wang Y, Chen H, Zhou Z, Fu H, Sosebee RE (2004) The characteristics of Na⁺, K⁺ and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *J Arid Environ* 56: 525-539
- Wang H, Wang F, Wang G, Majourhat K (2007) The responses of photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of nectarine (*Prunus persica* var. Nectarina Maxim) to greenhouse and field grown conditions. *Sci Hort* 112: 66-72
- Ward JK, Tissue DT, Thomas RB (1999) Comparative responses of model C3 and C4 plants to drought and low and elevated CO₂. *Glob Change Biol* 5: 858-867
- Wood AJ (2005) Eco-physiological adaptations to limited water environments. U: Jenks MA, Hasegawa PM (ur.) *Plant abiotic stress*, str. 1-13. Blackwell Publishing, USA

- Wright AH, DeLong JM, Gunawardena, Prange RK (2011) The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants. *Photosynth Res* 107: 223-225
- Zhang F, Guo JK, Yang YL, He WL, Zhang LX (2004) Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiol Plant* 26(3): 345-352
- Zhao CX, Guo LY, Cheruth AJ, Shao HB, Yang HB (2008) Prospectives for applying molecular and genetic methodology to improve wheat cultivars in drought environments. *C. R. Biologies* 331: 579-586
- Zushi K, Kajiwara S, Matsuzoe N (2012) Chlorophyll *a* fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. *Sci Hortic* 148: 39-46
- http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration_Hordeum_vulgare0B.jpg, 20.11.2012.
- http://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent_reactions, 20.12.2012.
- <http://faostat.fao.org>, 20.11.2012.

7. SAŽETAK

Okolišni stresovi su ograničavajući čimbenici poljoprivredne proizvodnje širom svijeta. Suša, kao i ostali abiotički stresovi, negativno utječe na kakvoću i količinu svih proizvedenih žitarica, pa tako i ječma, što bi u budućnosti moglo stvarati izuzetno velike probleme budući da su žitarice osnova prehrane većini svjetske populacije.

Budući da je ječam (*Hordeum vulgare* L.) žitarica koja često biva izložena sušnom periodu tijekom svog rasta i razvoja izabran je za modelni organizam u ovom istraživanju. Odabrana je novija, još neistražena sorta ječma Bravo, selekcionirana na Poljoprivrednom Institutu Osijek. Istraživan je utjecaj ekstremnog zasušivanja na klijance ječma usporedbom fizioloških i biokemijskih parametara. Suša je izazvana prestankom zalijevanja klijanaca koji su prethodno rasli u uvjetima visokog odnosno niskog intenziteta svjetlosti. Desetodnevna dehidracija provedena je u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti. Istraživanje je obuhvatilo: određivanje relativnog sadržaja vode u listu, procjenu oštećenosti biomembrana, određivanje razine lipidne peroksidacije i sadržaja slobodnog prolina, te određivanje i praćenje promjene boje listova. Također, određena je koncentracija fotosintetskih pigmenata, te izmjeren polifazni rast fluorescencije klorofila *a* na temelju čega je izračunat niz parametara koji govore o učinkovitosti fotosustava II. Imunodetekcijom proteina D1 i RubisCO LSU pokazane su promjene u njihovoj pojavnosti tijekom suše. Antioksidacijski odgovor određen je mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima, gvajakol-peroksidaze, askorbat-peroksidaze, katalaze i superoksid-dismutaze.

Rezultati provedenog istraživanja pokazuju da je u mladim biljkama ječma suša uzrokovala smanjenje relativnog sadržaja vode i povećanje peroksidacije lipida koja za posljedicu ima povećano oštećenje biomembrana što se ogleda u povećanoj količini propuštenih elektrolita. Tijekom zasušivanja koncentracija klorofila se smanjivala kao i ukupna fotosintetska učinkovitost što su pokazali parametri OJIP testa: indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) i maksimalni prinos kvanta fotosustava II (F_v/F_m). Također, ustanovljeno smanjenje elektronskog transporta nakon primarnog akceptora Q_A^- vremenski je bilo povezano s degradacijom proteina RubisCO LSU. Antioksidacijski odgovor biljaka izloženih suši pokazuje se kroz povećanu aktivnost enzima katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze i povećane koncentracije prolina kao neenzimske komponente.

Uzgoj ječma u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti uzrokovao je adaptaciju klijanaca na svjetlosni stres što su pokazali rezultati izmjereni nakon desetodnevnog uzgoja, a prije izlaganja suši. Usporedba vrijednosti mjerenih parametara u odnosu na vrijednosti izmjerene u biljkama koje su uzgajane u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti pokazala je da među njima nema značajnih razlika. Iznimku čine povećana aktivnost katalaze i niže koncentracije

fotosintetskih pigmenata u biljaka koje su uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti što je povezano sa zaštitom biljaka od fotoinhibicije.

U biljkama koje su prethodno uzgajane u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti tijekom zasušivanja aktivna reakcijska središta postaju disipacijska, čime se umanjuje sposobnost hvatanja ekscitona što dodatno pojačava fotoinhibiciju, a smanjenje vrijednosti pokazatelja fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS} , F_v/F_m) bilo je brže i znatno jače izraženo. Također, utvrđeno smanjenje vrijednosti parametra TR_0/DI_0 do kojeg je najvećim dijelom došlo zbog pojačane disipacije suviška ekscitacijske energije, podudara se s degradacijom proteina D1 i bržom i izraženijom degradacijom klorofila *b*. Lipidna peroksidacija i nakupljanje prolina bili su izraženiji. Povećana aktivnost enzima uključenih u antioksidacijski odgovor izmjerena je ranije nego u biljaka koje nisu tijekom uzgoja bile izložene visokom intenzitetu svjetlosti. Također, utvrđeno je da su se biljke ječma izložene suši, a prethodno uzgajanje u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti uspjele adaptirati na nepovoljne uzgojne uvjete, no zbog toga im se smanjila adaptabilnost na slijedeći stres (suša) u nizu. To pokazuje da će biljke teže podnositi sušu ako su prethodno bile izložene visokoj insolaciji.

Dobiveni rezultati upotpunjavaju dosadašnje spoznaje o povezanosti oksidacijskog stresa uzrokovanog zasušivanjem i visokim intenzitetom svjetlosti s aktivnošću enzima antioksidacijskog sustava, razinom oštećenja biomembrana, uključivanjem osmoprotektanata i regulacijom fotosintetske učinkovitosti. Također, rezultati mogu pomoći u procjeni potrebe navodnjavanja u uvjetima suše s ciljem smanjenja štetnog utjecaja.

8. SUMMARY

Among the most limiting factors of agricultural production worldwide are environmental stresses. Drought and other abiotic stresses are negatively affecting the quality and quantity of all produced grain, including barley. In future, this menace could generate great concern since crop plants represent one of the main nutrition ingredients for majority of world population.

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the crops frequently imposed to drought stress during growth and development. For that reason barley is chosen as a model organism in this study. Cultivar Bravo, selected in Agricultural Institute Osijek, is one of the novel and still unexplored cultivars. Physiological and biochemical parameters for screening extreme drought impact on seedlings were investigated. Barley seedlings were grown at low or high light. Subsequently, drought stress was induced by withholding water for ten days. During that period seedlings were grown at low light conditions. Relative water content as a measure of leaf water status, electrolyte leakage and lipid peroxidation level as indicators of membrane injury, as well as free proline content was determined. Visual changes of leaf color were estimated according to results obtained from colorimetric measurements. Concentrations of photosynthetic pigments were also measured as well as polyphasic raise of chlorophyll *a* fluorescence (OJIP-raise). Calculated OJIP test parameters described efficiency of photosystem II. Changes of D1 and RubisCO LSU proteins were detected during drought period using imunodetection method. Antioxidative response was determined by measuring activity of antioxidative enzymes: guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, catalase and superoxide dismutase.

According to duration of drought stress, decrease in leaf relative water content caused higher lipid peroxidation level what was reflecting on biomembrane injury determined by enhanced electrolyte leakage. Chlorophyll concentration was also decreasing during drought period. Reduced maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m) and performance index (PI) showed decreasing of total photosynthetic efficiency. Further more, decreased electron transport beyond Q_A^- occurred at the same time as the degradation of RubisCO LSU protein. Increased activity of catalases, guaiacol peroxidases and ascorbate peroxidases as well as higher accumulation of free proline indicated antioxidative response to drought stress.

The results obtained by measurements the day before starting the drought stress showed that seedlings grown at high light conditions were adapted to excess light during ten days growth. Comparison of those results with results obtained by measurements in plants grown under low light conditions showed no significant differences among them. Exceptions were

higher activity of catalases and lower concentrations of photosynthetic pigments in plants grown under high light intensity what could be related to the protection from photoinhibition.

During exposure to drought, barley leaves previously grown in conditions of high light showed changed function of their active reaction centers by conversion in centers of dissipation energy, thus decreasing the ability for excitons capture resulting with enhanced photoinhibition. Significantly faster and more dramatic decrease in OJIP parameters values (PI_{ABS} and F_v/F_m) showed lower efficiency of photosystem II. The decrease of parameter TR_0/DI_0 value was also found what was caused by enlarged increase in dissipation of excess excitation energy and coinciding with degradation of D1 protein as well as faster and more noticeable degradation of chlorophyll *b*. Lipid peroxidation level as well as the proline accumulation were more pronounced. The increased activity of enzymes involved in the antioxidative response was measured earlier, compared to plants continuously grown at low light. Seedlings grown at high light conditions showed adaptation to excess light during development, but decreased tolerance to next stress factor (drought). According to these results we conclude that drought tolerance will be lowered in plants previously exposed to higher insolation.

These results contribute to previous knowledge of correlation among drought induced stress and high light stress with the activity of antioxidative enzymes, biomembrane damages, accumulation of osmoprotectants and regulation of photosynthetic efficiency. Also, obtained results can contribute in the assessment of irrigation in order to reduce adverse impacts of drought conditions.

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11. siječnja 1983. godine u Đakovu. Osnovnu školu Josipa Kozarca završila sam u Semeljcima, u kojima i živim. Po završetku Opće gimnazije A. G. Matoša u Đakovu (2001. godine) upisala sam Pedagoški fakultet u Osijeku, smjer Biologija-kemija. Diplomirala sam 11.11.2006. godine (Diploma Odjela za biologiju i Odjela za kemiju) i time stekla zvanje profesora biologije i kemije.

Od svibnja 2007. godine zaposlena sam kao asistent na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku gdje sudjelujem u izvođenju praktičnog dijela nastave u sklopu kolegija: Biologija stanice, Genetika, Razvojna biologija biljaka, Fizikalni temelji instrumentalnih metoda u biologiji, Biljna mikrotehnika i metode mikroskopije i Kultura biljnih stanica i tkiva. Iste godine upisala sam Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti (modul: Biologija biljaka).

Znanstvena istraživanja obavljam u okviru projekata u kojima sudjelujem kao istraživač: od 2008. godine na projektima "Stanična i tkivna diferencijacija tijekom razvoja biljnih organa" (073-0731674-0841) prof.dr.sc. Vere Cesar i "Utjecaj oksidativnog stresa na organizaciju i funkciju biljnih stanica i tkiva" (073-0731674-1673) prof.dr.sc. Hrvoja Lepeduša, a od 2011. godine i na projektu prof.dr.sc. Josipa Kovačevića "Fiziologija stresa i gospodarska svojstva različitih kultivara pšenice i ječma" (073-0731674-0552).

Sudjelovala sam na devet međunarodnih skupova, a u koautorstvu sam objavila tri znanstvena rada.

Član sam Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

Znanstveni rad objavljen u CC časopisu:

Brcko A, Pěnčík, Magnus V, Prebeg T, Mlinarić S, **Antunović J**, Lepedus H, Cesar V, Strnad M, Rolčík J, Salopek-Sondi B (2012) Endogenous auxin profile in the christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit: free and amide conjugated IAA. *J Plant Growth Regul* 31: 63-78

Znanstveni radovi objavljeni u drugim časopisima:

Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Lalić A, Lepeduš H, Dvojković K, Abičić I, Katanić Z, **Antunović J**, Kovačević V (2011) Photosynthetic efficiency in juvenile stage and winter barley breeding for improved grain yield and stability. *Poljoprivreda* 17(1): 28-35

Lepeduš H, Brkić I, Cesar V, Jurković V, **Antunović J**, Jambrović A, Brkić J, Šimić D (2012) Chlorophyll analyses of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum* 114(1): 73-76

Sažeci u zbornicima skupova:

Lepeduš H, Čupić T, Popović S, Mlinarić S, Jurković V, **Antunović J**, Cesar V (2012) Chlorophylls content and photochemistry of thylakoid membranes in two pea cultivars with different leaf colouration. *Book of Abstracts of the FEBS 3+ Meeting From molecules to life and back*, Dumić J, Kovarik Z, Varljen J (ur.). Zagreb: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 120-121

Vojta L, Carić D, **Antunović J**, Lepeduš H, Ilakovac-Kveder M, Cesar V, Fulgosi H (2012) TROL-FNR interakcija utječe na raspodjelu fotosintetskih elektrona prema daljnjim putevima prijenosa energije. *Zbornik sažetaka (11. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem)*, Jelaska SD, Klobučar GIV, Šerić Jelaska L, Leljak Levanić D, Lukša Ž (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 171-172

Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, Lalić A, Lepeduš H, Kovačević V, Dvojković K, Abičić I, Katanić Z, **Antunović J** (2011) Fotosintetska učinkovitost u mladom stadiju razvoja i oplemenjivanje ozimog ječma na prinos zrna i njegovu stabilnost. *46. hrvatski i 6. međunarodni simpozij agronoma*, *Zbornik sažetaka*, Pospišil M (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 82-83

- Lepeduš H, Jurković V, **Antunović J**, Cesar V, Šimić D (2011) Genetska analiza parametara fluorescencije klorofila a kod kukuruza. 46 hrvatski i 6 međunarodni simpozij agronoma, Zbornik sažetaka, Pospišil M (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 51-52
- Antunović J**, Mlinarić S, Lepeduš H, Lalić A, Kovačević J, Cesar V (2010) Biokemijski odgovori klijanaca ječma na stres izazvan sušom. Treći hrvatski botanički kongres, Knjiga sažetaka, Jasprica N, Pandža M, Milović M (ur.). Zagreb: Školska knjiga d.o.o., 35-35
- Lepeduš H, Lalić A, Jurković Z, Kovačević J, **Antunović J**, Štolfa I, Cesar V (2010) Lodging related stem anatomy and guaiacol peroxidases in two barley cultivars. 5th Slovenian Symposium on Plant Biology, Book of abstracts, Dolenc Koce J, Vodnik D, Pongrac P (ur.). Ljubljana: Slovenian Society of Plant Biology, 54-54
- Mlinarić S, **Antunović J**, Cesar V, Lepeduš H (2010) Chloroplast proteins and PSII photochemistry in young and mature leaves of common fig. The secret life of biomolecules, HDBMB 2010, Book of abstracts, Kovarik Z, Varljen J (ur.). Opatija: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 81-81
- Begović L, Mlinarić S, **Antunović J**, Katanić Z, Lepeduš H, Cesar V (2009) Physiological responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term cobalt exposure. 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, Besendorfer V, Kopjar N, Vidaković-Cifrek Ž, Tkalec M, Bauer N, Lukša Ž (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 93-94
- Mlinarić S, **Antunović J**, Štolfa I, Cesar V, Lepeduš H (2008) Diurnal changes of Rubisco LSU accumulation and photosynthetic efficiency during maturation of common fig leaves. Book of abstracts of the HDBMB 2008, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Strelec I, Glavaš-Obrovac Lj (ur.). Osijek: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 111-112