OPORAVAK KLIJANACA JEČMA REHIDRACIJOM NAKON STRESA IZAZVANOG SUŠOM

Mihaljević, Ljuba

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:367773

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Ljuba Mihaljević

OPORAVAK KLIJANACA JEČMA REHIDRACIJOM NAKON STRESA IZAZVANOG SUŠOM

Diplomski rad

Osijek, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Diplomski rad
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

OPORAVAK KLIJANACA JEČMA REHIDRACIJOM NAKON STRESA IZAZVANOG SUŠOM

Ljuba Mihaljević

Rad je izrađen u: Laboratorij za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju
Mentor: Dr. sc. *Vera Cesar*, **red. prof.**
Neposredni voditelj: Dr. sc. *Jasenka Antunović Dunić*

Kratak sažetak:

Tolerancija na sušu jedna je od najčešće istraživanih značajki s obzirom na globalni problem nedostatka vode. U ovom radu cilj je bio utvrditi pri kojoj najnižoj vrijednosti relativnog sadržaja vode u listu (RWC) je ponovnim usvajanjem vode moguć oporavak fizioloških i biokemijskih procesa, s posebnim naglaskom na fotosintetski aparat. Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je uzgajan deset dana u uzgojnoj komori i potom izložen suši u trajanju od 7 do 10 dana, ovisno o eksperimentu, nakon čega je uslijedio oporavak rehidracijom tijekom četiri dana. Rezultati mjerenja fluorescencije klorofila *a* pokazali su da je kritična točka za mogućnost oporavka fotosintetskih procesa rehidracijom osmi dan suše, odnosno RWC od 21 %. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) na kraju perioda rehidracije porastao je do kontrolnih vrijednosti što je ukazalo na potpuni oporavak fotosintetskog aparata. Unatoč tome što se ostali mjereni parametri (RWC, razina lipidne peroksidacije i sadržaj slobodnog prolina) nisu u potpunosti izjednačili s kontrolama pokazana je visoka tendencija ka ponovnom uspostavljanju homeostaze koja je prethodno bila narušena snažnom sušom.

Broj stranica: 79
Broj slika: 16
Broj tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 84
Broj priloga: 2
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Hordeum vulgare*, suša, oporavak, relativni sadržaj vode u listu, fotosinteza

Datum obrane: 21. 07. 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. **Dr. sc.** *Janja Horvatić*, **izv. prof.**
2. **Dr. sc.** *Vera Cesar*, **red. prof.**
3. **Dr. sc.** *Ivna Štolfa*, **doc.**
4. **Dr. sc.** *Vesna Peršić*, **doc.**

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek MS thesis
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

RECOVERY OF DROUGHT STRESSED BARLEY SEEDLINGS BY RE-WATERING

Ljuba Mihaljević

Thesis performed at: Plant molecular and cellular biology laboratory, Department of BIology
Supervisor: PhD *Vera Cesar*, **Full Professor**
Assistant in Charge: PhD *Jasenka Antunović Dunić*

Short abstract:

Drought tolerance is one of the most studied features considering the global problem of water deficit. The main goal of this study was to determine the lowest value of relative water content in leaf (RWC) in which re-watering might recover physiological and biochemical processes, with particular emphasis on the photosynthetic apparatus. Barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) were cultivated in the growth chamber for ten days and then subjected to drought. The drought lasted from 7 to 10 days, depending on the experiment, after which the plants were re-watered daily for four days. The results of chlorophyll *a* fluorescence measurements showed that the critical point for photosynthesis recovery is the eighth day of drought or RWC of 21%, respectively. At the end of the rehydration, increased performance index (PI_{ABS}) reached the value as in control and thus pointed to a full recovery of the photosynthetic apparatus. Despite the fact that the other measured parameters (RWC, the level of lipid peroxidation and free proline content) were not fully equalized with the controls, observed results indicated a high tendency for the re-establishment of homeostasis, previously disrupted by severe drought.

Number of pages: 79
Number of figures: 16
Number of tables: 3
Number of references: 84
Number of appendices: 2
Original in: Croatian

Key words: *Hordeum vulgare*, drought stress, recovery, leaf relative water content, photosynthesis

Date of the thesis defence: 21. 07. 2015.

Reviewers:
1. **PhD** *Janja Horvatić,* **Associate Professor**
2. **PhD** *Vera Cesar*, **Full Professor**
3. **PhD** *Ivna Štolfa*, **Assistant Professor**
4. **PhD** *Vesna Peršić,* **Assistant Professor**

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Veri Cesar na pomoći i savjetima prilikom odabira teme i izrade diplomskog rada. Svojim znanjem i pristupačnošću uvelike je doprinijela mom obrazovanju.

Veliko hvala i dr. sc. Jasenki Antunović Dunić na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći prilikom pisanja.

Svojim roditeljima, Marku i Ljiljani te braći veliko hvala na beskrajnom strpljenju i podršci koju su mi pružali tijekom studija.

Na kraju se želim zahvaliti svim svojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Opća svojstva i morfološke osobine ječma (*Hordeum vulgare* L.) ... 2
1.2. Fotosinteza ... 4
1.2.1. Građa fotosintetskog aparata ... 4
1.2.2. Fluorescencija klorofila *a* ... 7
1.3. Primanje i kretanje vode u biljaka ... 10
1.4. Stres i biljke ... 12
1.4.1. Biokemijski mehanizmi oksidacijskog stresa ... 14
1.4.2. Mehanizmi prevladavanja stresa izazvanog sušom ... 16
1.5. Ciljevi istraživanja ... 20
2. MATERIJAL I METODE ... 21
2.1. Biljni materijal i opis eksperimenta ... 22
2.2. Određivanje relativnog sadržaja vode u listu ... 24
2.3. Određivanje razine lipidne peroksidacije ... 25
2.4. Određivanje sadržaja slobodnog prolina ... 26
2.5. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata ... 27
2.6. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* ... 28
2.7. Izolacija topljivih i membranskih proteina za SDS elektroforezu i imunodetekciju proteina RubisCO LSU ... 30
2.7.1. Izolacija topljivih i membranskih proteina ... 30
2.7.2. Određivanje koncentracije topljivih i membranskih proteina ... 30
2.7.3. Razdvajanje topljivih i membranskih proteina SDS elektroforezom ... 31
2.7.4. Imunodetekcija proteina RubisCO LSU ... 31
2.7.4.1. Prijenos proteina na PVDF membranu ... 31
2.7.4.2. Bojanje proteina na PVDF membrani ... 32
2.7.4.3. Detekcija proteina RubisCO LSU ... 32
2.8. Statistička obrada podataka ... 34
3. REZULTATI ... 35
3.1. Relativni sadržaj vode u listu (RWC) ... 37
3.2. Razina lipidne peroksidacije (TBARS) ... 39
3.3. Sadržaj slobodnog prolina ... 41
3.4. Koncentracija fotosintetskih pigmenata ... 43

3.4.1. Klorofil *a* 43
3.4.2. Klorofil *b* 45
3.4.3. Koncentracija ukupnih klorofila (Chl *a*+*b*) 47
3.5. Fluorescencija klorofila *a* 49
3.5.1. Maksimalni prinos kvanta PSII (F_v/F_m) 49
3.5.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) 51
3.6. Imunodetekcija proteina Rubisco LSU 53
4. RASPRAVA 55
5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 64
6. LITERATURA 67
7. PRILOZI 77

1. UVOD

1.1. Opća svojstva i morfološke osobine ječma (*Hordeum vulgare* L.)

Među žitaricama, ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jedna od najčešće uzgajanih vrsta diljem svijeta. Zahvaljujući svojoj genetičkoj raznovrsnosti ječam je dobro prilagođen različitim okolišnim uvjetima, rasprostranjen je od arktičkih širina pa do tropskih područja, kao i na visokim nadmorskim visinama (Marok i sur., 2013). Prvenstveno se ječam sijao i koristio u ljudskoj ishrani, ali se danas više od 85% ukupnog prinosa koristi u životinjskoj ishrani. Dobro je poznato kako je ječam bogat topljivim vlaknima, ponajviše β-glukanima za koje je poznato da snižavaju razinu kolesterola te smanjuju rizik od koronarnih bolesti srca. Zbog bolje tolerancije ječma na sušu u odnosu na pšenicu, ječam postaje jedan od glavnih izvora hrane u siromašnijim zemljama, no klimatske promjene globalnih razmjera utječu na pojačanu aridizaciju odnosno smanjenje površina za usjeve (Mishra i Singh, 2010; Nevo i sur., 2012).

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) pripada redu *Poales*, porodici *Poaceae* te rodu *Hordeum* čiji se pripadnici dijele u tri grupe obzirom na broj kromosoma: diploidne (2n=14 kromosoma), tetraploidne i heksaploidne. Stabljika ječma je šuplja i sastoji se od 5 do 7 koljenaca (nodija) i međukoljenaca (internodija). Listovi ječma sastoje se od lisnog rukavca (cumulus) i plojke, bez razvijene peteljke te imaju paralelnu nervaturu. Lisni rukavac obavija nodij stabljike te stvara zadebljanja. Cvjetovi su skupljeni u sastavljene klasove (Slika 1). Za razliku od ostalih žitarica u usjeku klasnog vretena može biti jedan, dva ili tri klasića od kojih plodan može biti samo jedan, sva tri ili jedan do tri, na čemu se i zasniva sistematika ječma. Klasići su postavljeni jedan iznad drugoga, pa tako oblikuju red: kod višerednog (šesterorednog) ječma razvijena su sva tri klasića pa sa svake strane klasa postoje tri reda, odnosno ukupno šest redova (zrna), dok je kod dvorednog ječma potpuno razvijen samo jedan klasić sa svake strane klasa. Plod je ječma zrno (karyopis). Sastoji se od omotača (ljuske), endosperma i klice.



Slika 1. Ilustracija ječma, *Hordeum vulgare* L. (web1)

Kultivirani ječam (*Hordeum vulgare* L.) se dijeli na pet konvarijeteta na temelju različitih osobina klasića (Martinčić i Kozumplik, 1996):

1. dvoredni ječam (*Hordeum vulgare convar. distichum*)
2. višeredni ječam (*Hordeum vulgare convar. hexastihum*)
3. prijelazni ječam (*Hordeum vulgare convar. intermedium*)
4. nepotpuni ječam (*Hordeum vulgare convar. deficiens*)
5. labilni ječam (*Hordeum vulgare convar. labile*).

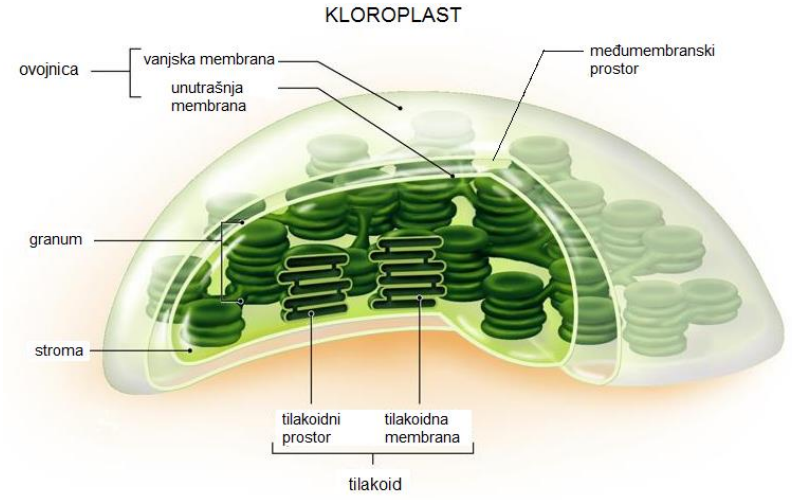
1.2. Fotosinteza

Fotosinteza je proces u kojemu se apsorbirana energija Sunčeva svjetla koristi za pokretanje sinteze ugljikohidrata uz korištenje ugljikovog dioksida i vode. Pretvorba svjetlosne energije u kemijsku tijekom fotosinteze predstavlja izvor metaboličke energije za sve biološke sustave (Cooper i Hausman, 2010). Djelotvoran dio spektra za fotosintezu je područje crvene i plave svjetlosti, dok se središnji dio spektra, koji odgovara zelenoj svjetlosti, ne koristi za fotosintezu (Pevalek-Kozlina, 2003). Samo apsorbirana svjetlost može postati kemijski djelotvorna, a ključna molekula za apsorpciju svjetlosti kod svih fotoautotrofnih organizama je klorofil, koji se nalazi u kloroplastima. U svjetlosnim reakcijama fotosinteze fotokemijska oksidacija vode do molekularnog kisika povezana je sa stvaranjem reduciranog NADPH i ATP-a. Redukcija CO_2 do ugljikohidrata povezana je s potrošnjom navedenih spojeva a događa se u nizu reakcija nazvanih Calvinovim ciklusom. U Calvinov ciklus ugljik ulazi u obliku CO_2, a napušta ga u obliku šećera. Za redukciju CO_2 koristi se ATP kao izvor energije i NADPH kao izvor visoko energiziranih elektrona. Calvinov se ciklus može podijeliti u tri stadija: 1) fiksacija molekule CO_2 na molekulu ribuloza-1,5-difosfata i stvaranje dvije molekule 3-fosfoglicerata, 2) redukcija karboksilne kiseline do ugljikohidrata u obliku gliceraldehid-3-fosfata i 3) regeneracija akceptora CO_2, ribuloza-1,5-difosfata iz gliceraldehid-3-fosfata (Pevalek-Kozlina, 2003). U tilakoidnim membranama odvijaju se svjetlosne reakcije fotosinteze, dok se reakcije Calvinova ciklusa odvijaju u stromi kloroplasta (Cooper i Hausman, 2010).

1.2.1. Građa fotosintetskog aparata

Fotosinteza se u zelenih biljaka odvija u specijaliziranim organelima, kloroplastima (Stryer, 2006). Fotosintetski najaktivnije tkivo u viših biljaka je mezofil lista čije stanice sadrže od 30 do 100 kloroplasta. Kloroplasti su obavijeni ovojnicom izgrađenom od vanjske i unutrašnje membrane između kojih je

međustanični prostor (Slika 2). Unutrašnja membrana okružuje stromu koja sadrži ribosome, kružnu molekulu DNA, topljive enzime i tilakoide. Tilakoidi su membranske strukture nalik na spljoštene vrećice. Nakupina takvih struktura čini granum. Granumi su međusobno povezani mambranskim strukturama koje se nazivaju stroma tilakoidima. Pretpostavlja se da su lumeni svih tilakoida povezani u jedinstveni tilakoidni prostor (Alberts i sur., 2002). Samo jedna molekula ili jedan par molekula klorofila *a* može pokretati svjetlosne reakcije predajući svoj ekscitirani elektron primarnom akceptoru elektrona. Mjesto gdje se ta molekula nalazi naziva se reakcijskim središtem. Ostale molekule klorofila i karotenoidi služe kao antene za hvatanje svjetlosti. Oni apsorbiraju fotone i prevode energiju od molekule do molekule sve dok ne stigne u reakcijsko središte. Čitav ovaj aparat – antenski kompleks s reakcijskim središtem klorofila *a* i akceptorom elektrona naziva se svjetlosnim sustavom ili fotosustavom.

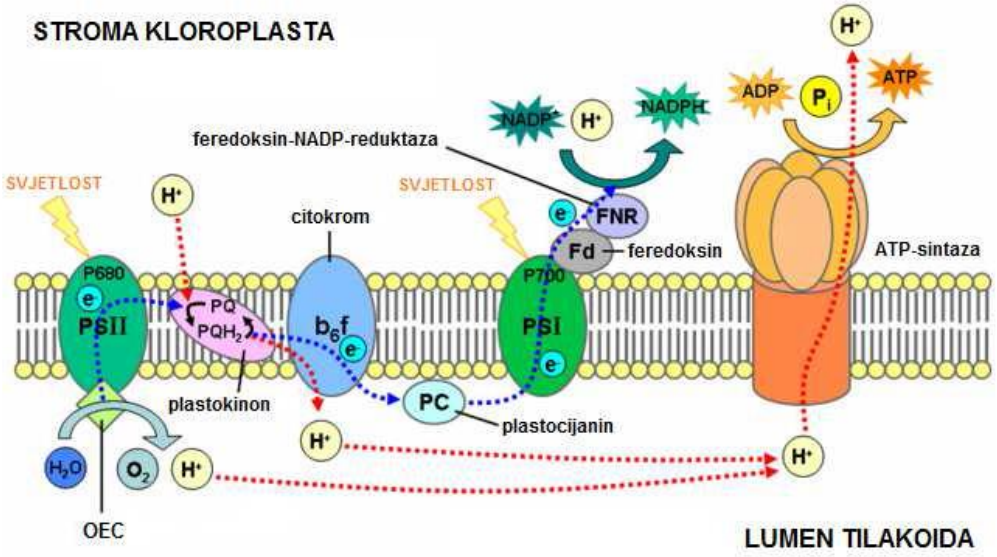


Slika 2. Shematski prikaz građe kloroplasta (web 2)

U tilakoidnim membranama prisutna su dva tipa fotosustva, fotosustav I (PSI) i fotosustav II (PSII). U reakcijskom središtu fotosustava I nalazi se specijalizirana molekula klorofila *a* koja se označava kao P700, a maksimalno apsorbira tamnocrvenu svjetlost valne duljine od 700 nm. U reakcijskom središtu fotosustava II nalazi se molekula klorofila *a* koja se označava kao P680, a maksimalno apsorbira crvenu svjetlost valne duljine 680 nm. Ta su dva

fotosustava fizički i kemijski odvojena. Svaki od njih ima svoje vlastite antenske pigmente i reakcijsko središte, a međusobno su povezani transportnim lancem elektrona.

Osim fotosintetskih pigmenata, u kloroplastima se nalaze DNA, RNA i ribosomi te proteini. Neke od proteina kodira kloroplastna DNA, a neke nuklearna DNA. RubisCO je ključni enzim u fotosintezi, odgovoran za asimilaciju ugljika. Građen je od 8 velikih podjedinica (engl. "Large SubUnits", LSU), veličine 50 - 55 kDa, koje su kodirane u kloroplastnoj DNA i 8 malih podjedinica (engl. *S*mall *S*ubUnits, SSU), veličine 12 - 18 kDa koje su kodirane u nuklearnoj DNA, sintetizirane u citoplazmi te potom unešene u kloroplaste. LSU ima glavnu kataličku funkciju enzima (Andersson i Backlund, 2008). U kloroplastnoj DNA kodirani su i proteini D1 i D2 (32 - 34 kDa), najvažniji među proteinima reakcijskih središta fotosustava II.



Slika 3. Shematski prikaz fotosintetskih reakcija koje se odvijaju na svjetlu (web 3)

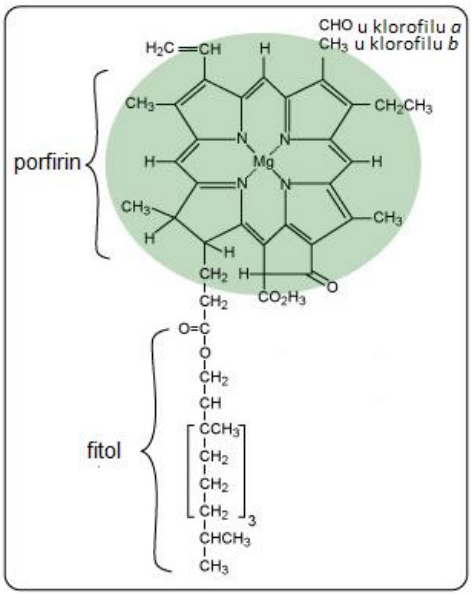
U reakcijskim središtima fotosustava odvijaju se primarne reakcije fotosinteze, dok antena kompleksi apsorbiraju fotone svjetlosti i prenose energiju pobuđenih elektrona do klorofila u reakcijskom središtu. Fotosustav II apsorbiranu energiju

koristi za redukciju plastokinona, oksidaciju vode i stvaranje transmembranskog gradijenta protona. 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 mobilnimnosačima elektrona (plastokinon (PQ) i plastocijanin (PC)) (Slika 3). Prijenos visokoenergiziranih elektrona od PSII, preko nosača, do PSI povezan je s transtilakoidnim prijenosom protona u lumen tilakoida. Energiju pohranjenu u tom gradijentu iskorištava 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).

1.2.2. Fluorescencija klorofila *a*

U fotosintezi najveće značenje ima molekula klorofila *a*. Osnovna struktura klorofila je porfirinski sustav kojeg čine četiri pirolska prstena međusobno povezana metilnim skupinama u prstenasti sustav. U središtu porfirinskog prstena nalazi se magnezij (Mg^{2+}) koji je povezan s atomima dušika pirolskih prstena. Za pirolski prsten broj IV porfirinskog kostura esterskom vezom vezan je fitol, alkohol s 20 C-atoma (Slika 4). Fitol je terpenoid izgrađen od četiri izoprenske jedinice koje ga čine hidrofobnim te je on odgovoran za topljivost klorofila u lipidima. Prstenasta struktura sadrži labavo vezane elektrone i to je dio molekule nužan za prijenos elektrona i redoks-reakcije. Klorofil *a* na pirolskom prstenu broj II ima metilnu supinu ($–CH_3$), a klorofil *b* aldehidnu skupinu (–CHO) (Pevalek-Kozlina, 2003). Apsorpcija svjetlosti plavog ili crvenog dijela spektra uzrokuje prijelaz molekule klorofila u pobuđeno stanje. Osnovno stanje klorofila je singletno stanje (S0). Apsorpcijom crvene i plave svjetlosti delokalizirani vanjski elektroni (π elektroni) se podižu u više orbitale, tj. na pobuđeno singletno (S1 i S2) ili tripletno stanje. Tripletno stanje klorofila nema značenje za fotosintetsku pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, ali može dovesti do stvaranja singletnog kisika. 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.* Fluorescentna svjetlost uvijek ima veću valnu duljinu i manju energiju od svjetlosti koja ju je izazvala. U optimalnim okolišnim

uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze. Navedena tri energetska procesa međusobno su u kompeticiji. Ukoliko se učinkovitost jednoga poveća, učinkovitost drugih se smanjuje (Maxwell i Johnson, 2000). Prema tome, informacije o promjenama fluorescencija klorofila *a* ukazuju na i na promjene fotokemije u fotosintezi, kao i na promjene u disipaciji energije u obliku topline. Iako na fluorescenciju otpada tek 1-2 % ukupne apsorbirane energije, njezino mjerenje je prilično jednostavno. Mjerenje i analiza fluorescencije klorofila *a* postala je nezamjenjiva metoda u istraživanju fotosinteze, prije svega jer nije destruktivna i pruža podatke o strukturi i funkciji fotosintetskog aparata odnosno efikasnosti fotosustava te funkciji transportnog lanca elektrona (Strasser i sur., 1995).



Slika 4. Struktura molekule klorofila (web 4)

Jedan od fluorometara pomoću kojih se kvantitativno i kvalitativno analizira proces fotosinteze je PEA-fluorometar (engl. ″Plant Efficiency Analyser″) koji mjeri fluorescenciju induciranu kontinuiranom svjetlošću. Promjene fluorescencije mjere se tijekom 1 sekunde pa je stoga često korišten naziv mjerenja ″brza″ fluorescencija (Strasser i sur., 2000). Saturacijski puls izaziva polifazni rast intenziteta fluorescencije koji ukazuje na osnovna svojstva PSII

odnosno na nakupljanje reduciranog oblika Q_A. Podaci dobiveni mjerenjem porasta fluorescencije od F_0 (minimalna fluorescencija, Q_A potpuno reduciran) do F_m (maksimalna fluorescencija) koriste se za izračunavanje parametara OJIP-testa koji daju informaciju o protoku energije i elektrona kroz fotosintetski aparat. Molekule klorofila prelaze u pobuđeno stanje apsorpcijom fotona (ABS), dio pobudne energije se rasipa (engl. ″Dissipation″, DI), a drugi se prenosi do reakcijskog središta (RC) u kojemu dolazi do odvajanja naboja i redukcije Q_A (engl. ″Trapping″, TR). Transport elektrona (ET) na Q_B i ostale nosače u konačnici vodi ka fiksaciji CO_2. ABS, TR, DI i ET izražavaju se po reakcijskom središtu ili ekscitiranoj površini (engl. ″Cross Section″, CS) (Strasser i sur., 2000).

Parametar F_v/F_m predstavlja maksimalni prinos kvanta PSII i daje informacije o primarnoj fotokemiji. Izračunava se iz omjera varijabilne fluorescencije (F_v) i maksimalne fluorescencije (F_m). Optimalna vrijednost ovog parametra je oko 0.83 u normalnim fiziološkim uvjetima, a smanjuje se uslijed djelovanja stresa (Maxwell i Johnson, 2000). Puno osjetljiviji parametar koji se može izračunati je indeks fotosintetske učinkovitosti (engl. "Performance Index") koji se često naziva i indeksom vitalnosti. Pokazano je da ovaj parametar može detektirati stres i prije nastanka simptoma vidljivih ljudskom oku (Christen i sur., 2007). Izračun navedenih parametara prikazan je u Tablici 1 poglavlja 2.7.

Brojna dosadašnja istraživanja u kojima se mjerila fluorescencija klorofila *a* pokazala su promjene u fotosintetskoj učinkovitosti potaknute sušom (Oukarroum i sur., 2007; Efeoğlu i sur. 2008; Lepeduš i sur., 2012; Šimić i sur., 2014; Antunović Dunić i sur., 2015) kao i drugim abiotičkim i biotičkim stresnim čimbenicima.

1.3. Primanje i kretanje vode u biljaka

Primanje vode iz okoliša u biljku te izlučivanje nazad u okoliš odvija se konstantno tijekom životnog ciklusa. Biljke nastoje održati vodnu ravnotežu no u prirodnim uvjetima to je gotovo nemoguće. Proces primanja vode je od velike važnosti za biljke jer na taj način primaju otopljene hranjive tvari. Količina usvojene vode ovisi o staništu i biljnoj vrsti. Primjerice kopnene biljke, kod kojih je viša stopa izlučivanja, primaju više vode u odnosu na vodene biljke. Metabolički aktivne biljne stanice sadrže prosječno 85 - 90 % vode. Istraživanja su pokazala da smanjivanje relativnog sadržaja vode na 70 - 80 % kod većine biljnih vrsta inhibira procese disanja, fotosinteze kao i diobu stanica, a daljnje smanjivanje na 50 - 60 % može dovesti i do stanične smrti. Voda u biljkama ima nekoliko uloga: služi kao otapalo, medij za kretanje molekula unutar i između stanica, utječe na molekularnu strukturu i svojstva proteina, nukleinskih kiselina te drugih makromolekula, a time posredno utječe i na karakteristike plazmatskih membrana (Pevalek-Kozlina, 2003).

Osnovni procesi koji omogućavaju primanje i provođenje vode u biljci su bubrenje i osmoza, a pogonska sila je pad kemijskog potencijala vode procesom difuzije u kojemu se molekule vode uvijek kreću iz područja više koncentracije vode u područje niže. Biljka će primati vodu sve dok se vodni potencijali unutar stanica ne izjednače s onima izvan njih. Strujanje vode u stanicu uslijed gradijenta vodnog potencijala izaziva u vakuoli turgorski tlak koji pritišće plazmalemu uz staničnu stijenku održavajući tako čvrstoću biljke. Ako biljka ne prima dovoljno vode, turgorski tlak opada, stanice postaju mlohave i biljka vene (Pevalek-Kozlina, 2003). Uvenuli dijelovi biljke mogu ponovno postati turgescentni dovođenjem vode dokle god su očuvane plazmatske membrane stanica (Wood, 2005). Prijenos vode je pasivan proces stoga biljke mogu primati vodu samo u slučaju kada je vrijednost vodnog potencijala biljke niža od vrijednosti vodnog potencijala u tlu. Isušivanjem tla isušuju se i biljke, održavajući vodni potencijal nižim od onoga u tlu akumulacijom otopljenih tvari u citoplazmi i vakuoli čime povećavaju osmotski potencijal staničnog soka. U uvjetima sa ograničenom količinom vode biljke izlučuju vodu u okoliš i time stanice dehidriraju, a osim vodnog potencijala smanjuje se i sadržaj vode u listovima (RWC, engl. "Relative Water Content") (Wood, 2005). U slučaju snažnog isušivanja, vodni potencijal

može pasti ispod točke trajnog venuća (točka u kojoj je vodni potencijal tla toliko nizak da biljka ne može primiti vodu niti kad se potpuno spriječi transpiracija) i biljke ostaju uvenute (Pevalek-Kozlina, 2003). No postoje i biljke koje su tolerantne na desikaciju, ekstremni gubitak svih molekula vode iz protoplazme stanica, te mogu preživjeti i snažan gubitak vode (RWC < 25 %) (Wood, 2005).

Biljka apsorbira vodu korjenovim dlačicama, a voda od epiderme do endoderme korijena može proći na dva načina: apoplastnim putem voda prolazi kroz stanične stijenke i međustanične prostore, a u staničnom putu voda prolazi kroz protoplaste. Voda se provodi do središnjeg provodnog cilindra kojeg čine provodna tkiva ksilema i floema. Provodni cilindar od kore korijena odvajaju stanice endoderme u čijim se stijenkama nalazi Casparyjeva pruga koja spriječava prolaz vode kroz apoplast. Dalje se voda s otopljenim tvarima prenosi elementima ksilema, trahejama i traheidama. Za strujanje vode u ksilemu važan je gradijent tlaka ostvaren predtlakom u korijenu koji omogućuje potiskivanje kontinuiranog vodenog stupca kroz provodne elemente. U sušnim uvjetima, kada je stopa transpiracije visoka, voda brzo putuje kroz stabljiku u listove te se gubi u obliku vodene pare. Glavna pokretačka struja za kretanje vode u ksilemu je transpiracijski usis koji se koristi padom vodnog potencijala između tla i atmosfere. Najveći pad vodnog potencijala i otpor javljaju se između površine listova i atmosfere. Taj veliki otpor posljedica je transpiracije gdje je potrebna energija za prijelaz vode iz tekuće u plinovitu fazu te se tako smanjuje koncentracija vode u staničnim stijenkama stanica lista. Što se više vode gubi transpiracijom, preostala voda u intersticijskim prostorima stvara sve oštrije meniskuse te tlak vode postaje negativniji i time čini pokretačku snagu za ksilemski transport. Brzina transpiracijske struje povećava se porastom transpiracije sve dok se ne aktiviraju mehanizmi regulacije puči odnosno dok ima dovoljno vode (Denffer i Ziegler, 1982).

Izlučivanje vode u biljkama odvija se transpiracijom (u obliku vodene pare) i gutacijom (u tekućem obliku odnosno u obliku kapljica). Listovi su glavni transpiracijski organi, a 97 % vode gubi se stomatalnom transpiracijom (Taiz i Zeiger, 2010). Biljne vrste iz porodice trava, među kojima je i ječam, imaju graminejski tip puči. Stanice zapornice ovakvog tipa puči imaju izduženi oblik i zadebljale stijenke koje se rastežu uslijed povećanja turgora (Lepeduš i Cesar, 2010). Tri su područja preko kojih se odvija gubitak vode u atmosferu: zračni

prostori unutar lista, pore puči i granični sloj zraka uz list. Vremenska kontrola otvaranja i zatvaranja puči služi povećavanju fotosintetske učinkovitosti odnosnosmanjivanju transpiracije. Preko noći, kada nema fotosinteze, a samim time ni potrebe za CO_2, puči su zatvorene i spriječen je nepotreban gubitak vode. Ujutro ukoliko je dovoljna opskrbljenost vodom i Sunčevim zračenjem, puči se otvaraju što smanjuje otpor difuziji ugljikova dioksida. Tada je gubitak vode transpiracijom velik, ali je opskrbljivanje vodom zadovoljavajuće dok se u poslijepodnevnim satima stopa transpiracije smanjuje. No, ukoliko je ujutro tlo suho, puči će se slabije otvoriti ili se neće otvoriti uopće, kako bi se na taj način biljci uštedila voda. Mehanizam otvaranja i zatvaranja puči reguliran je povećanjem, odnosno smanjenjem turgorskog tlaka u stanicama zapornicama u odnosu na susjedne stanice epiderme koje obično imaju ulogu pričuve iona i vode. Kalij u stanicama zapornicama pospješuje hidrataciju citoplazme, vodni i osmotski potencijal postaje negativniji pa voda ulazi u zapornice što za posljedicu ima otvaranje puči. Kod hidronastijskog gibanja puči stanice zapornice reagiraju na promjenu vodnog potencijala lista tek kad se on spusti ispod -0,5 MPa. U tom slučaju se zapornice mogu zatvoriti i na svjetlosti. Isto se može dogoditi primjerice kada se zalije biljka koja je bila u suši jer je do tada turgor stanica zapornica bio jednak, a turgor stanica susjedica je naglo porastao. Stanice epiderme imaju sposobnost bržeg primanja vode od stanica zapornica. Poznato je također da je u biljkama prisutan mehanizam za zaštitu od ekstremne nestašice vode (hidropasivna kontrola), pri čemu puči ostaju zatvorene sve do uspostave normalnog vodnog potencijala (Pevalek-Kozlina, 2003; Taiz i Zeiger, 2010).

1.4. Stres i biljke

Dobro je poznato kako su uvjeti u prirodi rijetko kada optimalni za rast i razvoj neke biljne vrste. Određeni biološki uvjeti na nekom području za jednu vrstu mogu biti stresni, dok za neku drugu mogu biti olakšavajući (Amrhein i sur., 2012). Stres se definira kao bilo koji nepovoljan uvjet ili tvar koja negativno utječe na biljni metabolizam, rast i razvoj (Lichtenthaler, 1996). Prema Strasser-u, čija definicija je citirana u preglednom radu Gaspar i sur. (2002), stres je stanje uzrokovano

čimbenicima koji imaju tendenciju mijenjanja ravnoteže. Čimbenike stresa općenito dijelimo na biotske i abiotske. Biotski čimbenici rezultat su djelovanja živih organizama kao što su insekti ili gljive, a abiotski djelovanja suše, pesticida, povećenog saliniteta, ekstremnih temperatura ili teških metala. Ovisno o duljini izlaganja nekom stresu te njegovoj jačini, biljke mogu taj stres prevladati aklimatizacijom, adaptacijom ili popravkom oštećenja (Kranner i sur., 2010).

Poznato je da su mnogi aktivni kemijski spojevi uključeni u kontrolu staničnih fizioloških procesa. U takve spojeve spadaju reaktivne kisikove jedinke (engl. "Reactive Oxygen Species", ROS), vodikov peroksid (H_2O_2) kao i reaktivne dušikove jedinke (NO) (Hancock i sur., 2002; Mittler, 2002).

Kao i drugi okolišni stresovi, tako i suša dovodi do oksidativnih oštećenja u biljnim stanicama. Pojačani nastanak reaktivnih kisikovih jedinki u biljkama tijekom suše uzrokuje oštećenja makromolekula i biomembrana (oksidiraju lipide membrana, denaturiraju proteine i mutiraju DNA) (Cruz de Carvalho, 2008). Suša i povišen salinitet se prvo očituju kao osmotski stres koji rezultira narušavanjem homeostaze i distribucije iona u stanicama, a zatim i kao oksidativni stres koji uzrokuje denaturaciju funkcionalnih i strukturalnih proteina. Kao posljedica toga različiti okolišni stresovi često aktiviraju slične puteve staničnog signaliziranja i odgovora kao što je regulacija antioksidanata te akumulacija kompatibilnih osmolita. Odgovor biljaka na stres uključuje brojne gene, biokemijske i molekularne mehanizme. Poznate su tri grupe gena uključenih u signalnu kaskadu i transkripcijsku kontrolu: prvu grupu čine Myc, MAP kinaze, SOS kinaze, fosfolipaze i transkripcijski faktori. Drugoj grupi gena pripadaju Hsps, šaperoni, LEA (engl. "Late Embryogenesis Abundant") i osmoprotektanti koji direktno sudjeluju u obrani membrana i proteina, a trećoj grupi pripadaju geni koji reguliraju primanje vode i iona kao što su akvaporini i transporteri iona (Wang, 2003). Primjerice, u suši dolazi do povećane sinteze apscizinske kiseline (ABA), fitohormona koji se sintetizira u korjenu i putuje floemom do listova gdje se veže na stanične receptore i time se signal širi, zatvaraju se puči čime je smanjena transpiracija. ABA signalni put ima važnu ulogu u odgovoru biljke na stres o čemu svjedoči i činjenica da su mnogi geni inducirani sušom također regulirani ABA-om (Wang, 2003).

1.4.1. Biokemijski mehanizmi oksidacijskog stresa

Iako je kisik nužan za respiraciju i aerobno stvaranje energije (ATP) te služi kao krajnji akceptor elektrona, ujedno je i toksičan za organizme ukoliko dođe do pomaka ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji jer dolazi do prekomjernog stvaranja ROS-a. Reaktivne kisikove jedinke su djelomično reducirani oblici atmosferskog kisika (O_2). Oni su rezultat ekscitacije elektona O_2 čime nastaje singletni kisik ($^1O_2$) ili prijenosa jednog, dva ili tri elektrona na molekularni kisik, čime nastaje superoksid radikal ($\bullet O_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2) odnosno hidroksilni radikal (•OH) (Gill i Tuteja, 2010). ROS su centralne komponente reakcije na stres i njihova razina određuje tip odgovora na stres (Vranová i sur., 2002).

Glavni izvor ROS-a u biljnim tkivima su reakcijska središta fotosustava I i II (PSI i PSII) na tilakoidima kloroplasta, točnije prijenos elektrona ili energije na molekulu kisika (redukcija kisika) tijekom procesa fotosinteze (Arora i sur., 2002). Ako klorofil u antenama dođe u pobuđeno stanje apsorpcijom svjetlosti i ukoliko se ona ne iskoristi učinkovito, elektronski spinovi u pobuđenom stanju mogu prevesti klorofil u tripletno stanje. Ako u blizini nema molekula karotenoida da ugase tripletno stanje klorofila (^{3}Chl), on će reagirati s osnovnim stanjem kisika ($^3O_2$) i tako stvoriti reaktivnu molekulu singletnog kisika ($^1O_2$) (Gill i Tuteja, 2010).

Feredoksin i prenosioci elektrona na reducirajućoj strani PSI imaju dovoljno negativan elektrokemijski potencijal teako doniraju elektrone kisiku što rezultira nastankom superoksidnog radikala $\bullet O_2^-$. Ova reaktivna kisikova jedinka je kratkoživuća (2-4 μs) i u tom kratkom poluživotu ne može prelaziti preko membrana već je podložna dismutaciji u vodikov peroksid H_2O_2 (Arora i sur., 2002; Gill i Tuteja, 2010).

Vodikov peroksid je srednje velika molekula i ima dugo vrijeme poluživota (1 ms). H_2O_2 ima dvostruku ulogu, u niskim koncentracijama djeluje kao signalna molekula te aktivira toleranciju na različite tipove stresa, dok u visokim koncentracijama oksidira druge molekule, a u konačnici može izazvati programiranu staničnu smrt (Gill i Tuteja, 2010). U prisutnosti metalnog katalizatora, H_2O_2 podliježe oksidaciji (Fentonovaili Haber-Weissova reakcija)

kojoj je krajnji produkt hidroksilni radikal (OH•). To je vrlo reaktivna molekula s kratkim poluživotom (1 μs) i vrlo visokim afinitetom prema biološkim molekulama (Arora i sur., 2002). Do sada još nije otkriven specifični antioksidans koji bi uklanjao hidroksilne radikale, no pretpostavlja se da u biljkama aminokiselina prolin, kao metabolit, ima ulogu u smanjenju toksičnog djelovanja radikala (Hayat i sur., 2012).

ROS su slobodni radikali kisika koji reagiraju s nizom različitih molekula kao što su lipidi, proteini ili DNA te uzrokuju njihova oštećenja (Mittler, 2002).

Na djelovanje ROS-a najosjetljivije su polinezasićene masne kiseline (engl. "PolyUnsaturated Fatty Acids", PUFA), najčešće linolna i linolenska kiselina, pri čemu nastaju lipidni hidroperoksidi, hidroksimasne kiseline i peroksilni radikali koji se dalje oksidiraju u prisustvu metala u lančanoj reakciji lipidne peroksidacije. Proces oksidacije lipida započinje fazom inicijacije u kojoj visoko reaktivni oksidans oduzima atom vodika višestruko nezasićenoj masnoj kiselini pri čemu nastaje alkilni, odnosno lipidni radikal. Ovaj proces se odvija na vodiku smještenom na α-metilen ugljiku. Bilo koji spoj koji ima sposobnost oduzeti vodikov atom masnoj kiselini može izazvati ovaj proces. Hidroksilni radikal je jedini od reaktivnih kisikovih radikala koji ima dovoljno energije da izazove lipidnu peroksidaciju. Lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s Fe^{2+} i Fe^{3+} pri čemu nastaju alkoksi radikali i lipidni peroksilni radikal. Lipidni hidroperoksidi (ROOH) nastali kao rezultat ove reakcije, mogu se u prisutnosti iona Fe^{2+} jednostavno pocijepati na različite reaktivne vrste poput lipidnih alkoksilnih radikala: epoksida, aldehida (primjerice malondialdehid, MDA) i alkohola. Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi. To su 4-hidroksialkenali i drugi srodni α,β-nezasićeni aldehidi koji se smatraju "drugim toksičnim glasnicima" primarnih slobodnih radikala. Iako se zovu "završni produkti lipidne peroksidacije", oni mogu u određenim uvjetima nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja. Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti slobodnih radikala, ali dovoljno velika da mogu reagirati s molekulama u okolini te tako oštetiti stanice pa i uzrokovati staničnu smrt (Gill i Tuteja, 2010).

1.4.2. Mehanizmi prevladavanja stresa izazvanog sušom

Jedan od mehanizama je odgađanje isušivanja, koji se odnosi na sposobnost tkiva da zadrži vodu. Drugi mehanizam je tolerancija na isušivanje koja se odnosi na sposobnost tkiva da funkcionira i kada je dehidrirano. Treći mehanizam je izbjegavanje suše kojim biljka svoj životni ciklus završi tijekom vlažne sezone, prije nastupa razdoblja intenzivne suše, a postiže se pojačanom metaboličkom aktivnošću i ubrzanim rastom (Gaspar, 2002). Smanjuje se stopa rasta listova čime se smanjuje stopa transpiracije, odnosno omogućuje se korištenje ograničene količine vode dulji vremenski period. Mnoge odrasle biljke u uvjetima suše ubrzavaju senescenciju i odbacuju starije listove (Mahajan i Tuteja, 2005; Shao i sur., 2008). Fiziološke i biokemijske promjene u biljkama tijekom suše uključuju gubitak tugora uslijed smanjenja vodnog potencijala u pa tako i smanjenje relativnog sadržaja vode u listu (RWC). Smanjenje dehidracije je drugi mehanizam kojim se biljka bori s nedostatkom vlage u tlu, a predstavlja zapravo fiziološku prilagodbu koja se očituje u niskoj metaboličkoj aktivnosti, sporijem rastu te zadržavanju visokog vodnog potencijala i turgora u stanicama tijekom razdoblja suše. Navedeno se događa zbog progresivnog zatvaranja puči, što za posljedicu ima smanjenje transpiracije (time i dehidracije), ali i smanjenje fotosinteze. Smanjenje fotosintetske aktivnosti, često praćeno razgradnjom fotosintetskih pigmenata, zamjećuje se već u prvim fazama manjka vode s obzirom na ograničenu difuziju CO_2 uslijed zatvaranja puči, što je usko povezano sa smanjenjem aktivnosti enzima RubisCo (nedovoljna količina CO_2 zaustavlja procese Calvinova ciklusa). U uvjetima nedostatka vode dolazi do prekomjerne redukcije $NADP^+$ koji je konačni akceptor elektrona u PSI te se tok elektrona preusmjerava na alternativne akceptore, primjerice kisik, pri čemu nastaje $\cdot O_2^-$ i ostali oblici ROS-a. RubisCO čini preko 50% ukupnih proteina u listovima biljaka i poznato je da se razgrađuje tijekom senescencije listova (Parry i sur., 1997). Nedostatak vode u tlu jače utječe na rast izdanka negoli na rast korijena, koji i u takvim uvjetima zadržava sposobnost proliferacije (Sicher i sur., 2012).

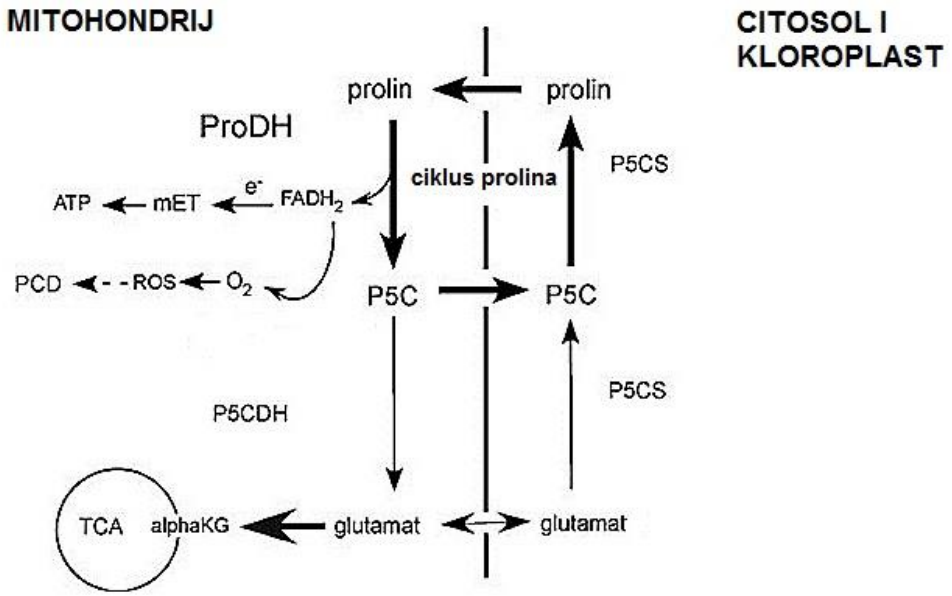
U fiziologiji stresa biljaka važno je razlikovati aklimatizaciju kao privremeni odgovor biljaka na stres od adaptacije kao krajnjeg, dugoročnog odgovora. Aklimatizacija je povećanje stupnja tolerancije, odnosno fenotipski odgovor na

različite kombinacije na okolišne uvjete. Biljke imaju nevjerojatnu sposobnost funkcionalne i strukturalne prilagodbe na različite sezonske promjene. Drugim riječima, organizam tijekom aklimatizacije mijenja svoju homeostazu, stabilno fiziološko stanje, kako bi mogao primiti kasnije promjene u okolišu. Adaptacija (prilagodba) je genetički determinirana razina otpornosti stečena selekcijom kroz generacije. Dakle, adaptacija na razini populacije ili aklimatizacija na razini jedinke, javljaju se kao kombinacija morfoloških, fizioloških, anatomskih i biokemijskim procesa koji ovise o procesima na molekularnoj razini (Gaspar, 2002).

Tolerantnost na dehidraciju zapravo predstavlja tolerantnost na promjene koje suša izaziva na razini stanica i molekula. Biljke to postižu osmotskom regulacijom**.** Osmotska regulacija definirana je kao smanjenje osmotskog potencijala u stanici zbog aktivnog nakupljanja određenih osmolita (osmoprotektanata) tijekom smanjenog vodnog potencijala u listu. Aktivna akumulacija raznih osmolita u stanicama omogućuje da se procesi koji ovise o turgoru nastave do neke mjere i u stresnim uvjetima (Kereša i sur., 2008). Tvari uključene u osmotsku regulaciju razlikuju se ovisno o vrsti, a mogu biti organske ili anorganske (anorganski ioni) prirode. Od anorganskih iona, za osmotsku regulaciju kod pšenice vrlo je važan kalij (K) kako su utvrdili Morgan i Tan (1996). Ipak, glavnu ulogu u osmoregulaciji imaju organski osmoliti. Organske osmolite moguće je podijeliti u dvije kategorije: (1) osmolite koji sadrže dušik kao što su slobodne aminokiseline (prolin), te kvaterni amonijski spojevi kao što su betain, poliamini i proteini; (2) ugljikohidratne osmolite poput šećernih alkohola (manitol, sorbitol), monosaharida (glukoza, fruktoza), oligosaharida (saharoza, trehaloza) te polisaharida (fruktan) (Reddy i sur., 2004).

Smatra se da prolin stabilizira makromolekule te da predstavlja zalihu ugljika i dušika za korištenje tijekom sušnog razdoblja, a njegova sinteza povećava kiselost citoplazme i može održavati odgovarajući odnos $NADP^+$/NADPH (Hare i Cress, 1997). Sinteza prolina odvija se u citoplazmi i kloroplastima, dok se razgradnja odvija u mitohondrijima. Široko je prihvaćena teorija da slobodni prolin nastaje iz glutamata preko Δ1-pirolin-5-karboksilata (P5C) kroz dvije sukcesivne redukcije katalizirane P5C sintetazom (P5CS) i P5C reduktazom (P5CR). Geni koji kodiraju ova dva enzima identificirani su kod više biljnih vrsta, a aktiviraju se

uslijed nedostatka vode i povišenih razina soli. Razgradnja prolina se odvija enzimatskim putem u koji su uključeni prolin dehidrogenaza (PDH) i P5C dehidrogenaza (P5CDH) (Slika 5). Razina transkripcije koja kodira PDH se smanjuje nakon duljeg izlaganja biljke NaCl-u i polietilen glikolu. To dokazuje da je sadržaj slobodnog prolina reguliran i na razini gena i ne potječe samo od stresom posredovane inaktivacije PDH, za koju se smatra da je vezana na unutarnju membranu mitohondrija. Nakon prestanka stresa, transkripcija AtPDH se naglo povećava prateći smanjenjeu transkripciji AtP5CS1. Nagli porast u aktivnosti PDH je dosljedan dokle god ima dovoljna količina prolina kao rezerve ugljika, dušika i energije za oporavak od stresa. Kod izoliranih tilakoida, pokazan je pozitivan utjecaj prolina u borbi protiv štetnog utjecaja singletnog kisika i hidroksilnih radikala na fotosustav II (Hare i Cress, 1997; Szabados i Savouré, 2010; Hayat i sur., 2012).



Slika 5. Shematski prikaz sinteze i razgradnje prolina u biljkama (web 5)

Brojna istraživanja tijekom proteklih nekoliko desetljeća fokusirana su na promjene u fiziološkim i biokemijskim procesima uzrokovane smanjenjem vodnog potencijala u stanicama različitih biljnih vrstama tijekom suše (Yordanov i sur., 2000; Reddy i sur., 2004; Cruz de Carvalho, 2008). Osim istraživanja koja se bave proučavanjem utjecaja suše, od velikog su značaja posljednjih godina i istraživanja oporavka dehidriranih biljaka tijekom perioda rehidracije (Oukarroum i sur., 2007; Mahdid i sur., 2011; Campos i sur., 2014). Sposobnost biljke da se oporavi nakon snažne suše karakteristika je koja se koristi prilikom oplemenjivačkih procesa, odnosno kreiranja tolerantnih kultivara. Sorte žitarica tolerantnije na sušu imaju veći potencijal rasta i produktivnosti u uvjetima smanjene količine vode, stoga je upravo tolerancija na sušu jedna od najčešće istraživanih značajki s obzirom na globalni problem zatopljavanja i smanjivanja površina adekvatnih za uzgoj žitarica.

U prirodnim uvjetima učestalost i intenzitet suše na određenom području, kao i količina padalina o kojima ovisi rehidracija, nisu ponovljivi tijekom nekoliko godina. Osim toga, nemoguće je izbjeći zbirni utjecaj različitih okolišnih čimbenika na rast biljaka. Stoga se eksperimenti često provode u uzgojnim komorama koji osiguravaju kontrolirane uvjete uzgoja (Bürling i sur., 2013).

Utjecaj ekstremnog desetodnevnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma sorte Bravo opisan je u doktorskom radu Antunović (2013). Prema dobivenim rezultatima, kritični trenutak u kojemu bi se mogao očekivati oporavak ponovnom hidracijom mogao bi biti onaj u kojemu je izmjereni RWC iznosio oko 20 %, što je značajno niža vrijednost u usporedbi sa do sada objavljenim istraživanjima koja su ukazala na mogući oporavak fotosintetskog aparata te različitih biokemijskih i fizioloških procesa tek pri RWC-u od oko 40 % (Efeoğlu i sur., 2009; Yang i sur., 2013).

Istraživanje ovog diplomskog rada provedeno je kako bi se procijenio odgovor biljke na deficit vode u kritičnom trenutku suše u kojemu je moguć oporavak i dinamika oporavka tijekom perioda rehidracije.

1.5. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog rada su:

- utvrditi pri kojoj najnižoj vrijednosti relativnog sadržaja vode u listu (RWC) je rehidracijom moguć oporavak fizioloških i biokemijskih procesa u dehidriranih i slabo vijabilnih klijanaca ječma, s posebnim naglaskom na fotosintetski aparat,
- istražiti dinamiku oporavka svakodnevnim mjerenjima fizioloških i biokemijskih parametara (RWC, razina lipidne peroksidacije, sadržaj slobodnog prolina, koncentracija fotosintetskih pigmenata i fluorescencija klorofila *a*) tijekom četiri dana rehidracije ponovnim zalijevanjem,
- prema dobivenim rezultatima procijeniti koja od korištenih metoda će najbrže detektirati početak oporavka.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal i opis eksperimenta

Kao modelni organizam u ovom istraživanju korišteni su klijanci ječma (*Hordeum vulgare* L.). Odabrana je sorta Bravo, jedna od superiornih sorti u uvjetima uzgoja Republike Hrvatske. Tolerantna je na rasprostranjene bolesti i dobro podnosi sušu (Lalić i sur., 2010). Ova je sorta selekcionirana na Poljoprivrednom institutu Osijek i priznata 2009. godine od strane Ministarstva poljoprivrede i šumarstva RH.

U ovom istraživanju korišteno je netretirano sjeme. Prije sijanja sjeme je imbibirano vodovodnom vodom tijekom 24 sata u tami. Imbibirano sjeme je potom sijano u plastične kadice s pripremljenom smjesom univerzalnog supstrata (Humokompovit H1, agroHoblaj) i pijeska u omjeru 3:1. Klijanci ječma su uzgajani u klima komori (Vötsch, Germany) tijekom 10 dana u kontroliranim uvjetima: fotoperioda 16/8 sati (svjetlo/tama), intenzitet svjetlosti 60 - 70 $\mu mol_{FOTONA} m^{-2} s^{-1}$, temperatura 22 ± 1/19 ºC (svjetlo/tama), vlažnost zraka 80 %. Ječam je sijan paralelno u dvije kadice (Slika 6) i tijekom desetodnevnog uzgoja zalijevan optimalnom količinom vode. Nakon 10 dana jedan dio biljaka je prestankom zalijevanja izložen suši a potom i tretmanu zalijevanjem u svrhu praćenja oporavka rehidracijom, dok je drugi dio svakodnevno zalijevan i služio kao kontrola.

Preliminarno su provedena četiri eksperimenta koja su se međusobno razlikovala u trajanju suše kojoj su klijanci ječma bili izloženi. U prvom eksperimentu suša je trajala 7 dana, u drugom 8, u trećem 9, a u četvrtom 10 dana. Tretman zalijevanjem odnosno period oporavka rehidracijom u svakom od eksperimenata trajao je jednako dugo - četiri dana. Prvo zalijevanje nakon suše bilo je do procjeđivanja, a svaki naredni dan tretmani su zalijevani jednakom količinom vode kao i kontrole.

Prvi potpuno razvijeni listovi klijanaca uzorkovani su i upotrijebljeni za provođenje analiza: prije izazivanja suše (0. dan eksperimenta), u suši ovisno o eksperimentu (7., 8., 9. ili 10. dan suše) i svaka 24 sata tijekom četiri dana oporavka rehidracijom (u daljnjem tekstu označeno kao: 24 h, 48 h, 72 h i 96 h). U svakom od šest uzorkovanja po pojedinom eksperimentu jedan tip uzoraka činile su

kontrole, a drugi suša ili tretmani zalijevanjem. Uzorkovanje 0-og dana izvršeno je kako bi se pokazalo da u eksperiment ulaze klijanci istog fiziološkog i biokemijskog statusa.



Slika 6. Uzgoj klijanaca u klima komori

Rezultati preliminarnih istraživanja dobiveni iz prva dva eksperimenta, u kojima je suša trajala 7 i 8 dana, ukazali su na mogući oporavak, a s obzirom na uočenu sličnost među njima oba su eksperimenta ponovljena još dva puta. Preliminarna istraživanja su također pokazala da oporavak nije moguć u biljaka koje su bile izložene suši 9 i 10 dana pa prema postavljenom cilju ovog istraživanja treći i četvrti eksperiment nije bilo potrebe ponavljati.

2.2. Određivanje relativnog sadržaja vode u listu

Za određivanje relativnog sadržaja vode u listu (engl. "Relative Water Content", RWC), listići klijanaca izrezani su na komadiće duljine oko 7 mm i odmah je izvagana masa svježe tvari (engl. "Fresh Weight", FW). Svaki tip uzoraka izmjeren je u 10 ponavljanja, a masa svježe tvari za pojedino ponavljanje iznosila je oko 0,1 g. Odvagano tkivo prebačeno je u pastične čaše s destiliranom vodom i ostavljeno stajati tri sata na sobnoj temperaturi u polumraku do potpune hidracije tkiva. Tkivo je potom izvađeno iz čaša na staničevinu kojom se odstranio višak vode te je izvagano čime je dobivena masa TW (engl. "Turgid Weight"). Izvagano tkivo pincetom je prebačeno u plastične kivete i stavljeno u sušionik na sušenje tijekom 24 sata pri 105 °C. Nakon 24 sata određena je masa suhe tvari (engl. "Dry Weight", DW). Sve odvage izmjerene su analitičkom vagom s preciznošću od 0,0001 g. Konačna vrijednost RWC-a izračunata je prema standardnom izrazu koristeći vrijednosti FW, TW i DW (Weatherley, 1950):

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

U ovom istraživanju analiza je djelomično modificirana (Keles i Öncel, 2004) obzirom da su Yamasaki i Dillenburg (1999) utvrdili da je analizu potrebno prilagođavati svakom pojedinom tipu biljnog materijala u svrhu dobivanja što točnijih rezultata.

2.3. Određivanje razine lipidne peroksidacije

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

Nakon usitnjavanja biljnog tkiva pomoću tekućeg dušika, 0,2 g finog praha je prebačeno u prethodno izvagane plastične kivete. U kivete je dodan 1 ml 0,1%-tne trikloroctene kiseline (TCA) i uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000 *x* g pri 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Potom je pipetom odvojeno 0,5 ml supernatanta kojemu je dodan 1 ml 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj TCA. Kivete s uzorcima prebačene su u termomikser (Eppendorf thermomixer compact), zagrijavane 30 minuta pri 95 °C i potom ohlađene na ledu. Nakon hlađenja, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 18 000 *x* g pri 4 °C. Supernatant je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje (Specord 40, Analytik Jena). Kao slijepa proba korištena je otopina 0,5 %-tne TBA u 20 %-tnoj TCA. Koncentracija TBARS-a izračunata je iz izmjerenih apsorbancija na 532 i 600 nm i ekstinkcijskog koeficijenta 155 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Verma i Dubey, 2003) koristeći formulu:

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

Koncentracija TBARS-a izražena je u (nmol) po gramu svježe tvari (sv.t.). Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja.

2.4. Određivanje sadržaja slobodnog prolina

Sadržaj slobodnog prolina u tkivu je određen metodom prema Bates i sur. (1973), uz određene prilagodbe. Tkivo je sitno narezano u porculanski tarionik te macerirano do sitnog praha u tekućem dušiku. Odvagano je 0,2 g tkiva u epruveti s čepom na navoj i dodano 10 ml 3 %-tne hladne sulfosalicilne kiseline za taloženje proteina. Smjesa je promiješana na vibracijskoj mješalici i centrifugirana 15 minuta na 3 500 *x* g. Odvojeno je 2 ml supernatanta i dodano 2 ml ledene octene kiseline i 2 ml kiselog ninhidrin reagensa (0,75 g ninhidrina otopiti u 18 ml ledene octene kiseline i 12 ml 6M ortofosfatne kiseline uz lagano zagrijavanje). Uzorci su promiješani 10 - 15 sekundi na vibracijskoj mješalici i stavljeni inkubirati 60 minuta u sušionik na 100 °C. Tijekom inkubacije je nastao crveno obojeni kompleks prolina i ninhidrina. Premještanjem uzoraka u ledenu kupelj, reakcija je zaustavljena. U uzorke je dodano 4 ml toluena i nakon miješanja na vibracijskoj mješalici 15 sekundi obojeni kompleks otopio se u toluenu. Nakon što su uzorci odstojali nekoliko minuta, razdvojile su se vodena i toluenska faza u koju je prešao obojeni kompleks. Pipetom je odvojeno 2 ml obojenog kompleksa u staklenu kivetu i spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija pri 520 nm. Kao slijepa proba korišten je toluen. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja. Koncentracija prolina ekstrahiranog iz tkiva je izračunata iz standardne krivulje pripremljene s poznatim koncentracijama L - prolina (2 - 300 µM). Sadržaj prolina izražen je kao µmol po gramu svježe tvari (sv.t.), a izračunat je iz izraza:

$$\mu mol_{PROLINA}/\ g\ sv.t. = \frac{[\mu M_{PROLINA} X\ 4\ mL_{TOLUENA} X\ 5_{(FAKTOR\ RAZRJEĐENJA)} X 0.001]}{g_{TKIVA}}$$

2.5. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Kako bi se odredila koncentracije fotosintetskih pigmenata, listovi klijanaca narezani su u porculanski tarionik i uz dodatak magnezijevog hidroksid karbonata usitnjeni do finog praha koristeći tekući dušik. Odvagano je oko 0,1 g usitnjenog tkiva u plastičnoj kiveti volumena 2 ml (prethodno izvaganoj) i ekstrahirano s 1 ml hladnog acetona (80%-tni), 15 minuta na ledu. Nakon ekstrakcije, homogenat je promiješan na vrtložnoj mješalici i centrifugiran 10 min na 10 000 *x* g pri 4 °C. Potom je supernatant dekantiran u plastičnu epruvetu s čepom na navoj, a u epruvetu s talogom je ponovno dodan 1 ml hladnog acetona. Postupak ekstrakcije je ponavljan četiri do pet puta, odnosno do obezbojenja taloga. Pomoću menzure izmjeren je volumen spajanih supernatanta svakog uzorka. Uzorak je potom izliven u staklenu kivetu te mu se spektofotometrijski mjerila apsorbancija pri valnim duljinama od 645 i 662 nm za klorofil *a* i klorofil *b*. Na temelju poznate mase, volumena i apsorbancije na navedenim valnim duljinama izračunata je koncentracija fotosintetskih pigmenata pomoću sljedećih formula (Lichtenthaler, 1987):

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

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

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

Chl *a* = koncentracija klorofila a u mg/g mase svježe tvari uzorka

Chl *b* = koncentracija klorofila b u mg/g mase svježe tvari uzorka

Chl *a*+*b* = koncentracija ukupnog klorofila u mg/g mase svježe tvari uzorka

V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u ml

m = masa uzorka u gramima

Svaki tip uzoraka izmjeren je u tri ponavljanja. Koncentracija klorofila u konačnici je izražena po masi suhe tvari (s.t.). Kako bi se dobio udio suhe tvari u biljnom tkivu, uzet je uzorak svježe tvari iz istog homogenata iz kojeg je uzet i uzorak za mjerenje koncentracije klorofila i potom izvagan. Uzorak je ostavljen u sušioniku tijekom 24 sata pri 105 °C te je nakon sušenja ponovno izvagan. Suha tvar je izražena kao omjer suhe i svježe tvari.

2.6. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*

Fluorescencija klorofila *a* u listovima klijanaca mjerena je pomoću Handy PEA-fluorometra (engl. "Plant Efficiency Analyser", Hansatech, UK). Prije samog mjerenja klijanci su bili 30 minuta u uvjetima tame. Na svakom tipu uzoraka izmjereno je 25 mjerenja, a svako pojedino mjerenje podrazumijeva novi listić. Mjerenje se sastoji od propuštanja crvene saturacijske svjetlosti (maksimum apsorpcije 650 nm, 3000 $\mu mol_{FOTONA} m^{-2} s^{-1}$) koja potiče polifazni rast fluorescencije klorofila. Promjene u intenzitetu fluorescencije bilježe se tijekom 1 s, počevši od 50 μs nakon osvjetljavanja. Tijekom prve 2 ms promjene se bilježe svakih 10 μs, a nakon toga svake ms do pune sekunde. Nakon otvaranja reakcijskih središta klorofila prilagodbom u tami izmjeri se minimalni intenzitet fluorescencije (F_0), dok se primjenom svjetlosti zatvaraju reakcijska središta čime se postiže maksimalni intenzitet fluorescencije (F_m). Polifazni rast intenziteta fluorescencije sastoji se od nekoliko stupnjeva koji se označavaju različitim slovima abecede: O (inicijalni stupanj – intenzitet fluorescencije nakon 50 μs), J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms), I (intenzitet fluorescencije nakon 30 ms) i P (maksimalna fluorescencija, F_m). Mjerenjem su dobiveni podaci o intenzitetu fluorescencije iz kojih su izračunati parametri OJIP testa (Strasser i sur., 2004) navedeni u Tablici 1. Za opisivanje funkcionalnosti fotosintetskog aparata u ovom radu su korištena dva najznačajnija i najčešće korištena parametra: indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) i maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m).

Tablica 1. Podaci za izračunavanje i parametri OJIP testa

PODACI DOBIVENI MJERENJEM POLIFAZNOG RASTA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a*	
F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μs (O stupanj)
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μs
FJ	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (J stupanj)
FI	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (I stupanj)
F_m	maksimalni intentzitet 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_o	ukupna brzina zatvaranja RC; $M_o = (TR_o/RC)-(ET_o/RC) = 4(F300\mu s-F_o)/(F_m-F_0)$
N	prometni broj; $N = S_m \times [(dV/dt)_0] / V_J$
PARAMETRI OJIP TESTA	
RC/CS_o	gustoća aktivnih reakcijskih središta; $RC/CS_o = F_v/F_m \times (V_J/M_0) \times ABS/Cso$
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_o/ABS**
ET_o/TR_o	efikasnost kojom "uhvaćeni" ("trapped") eksciton omogućava prijenos elektrona u elektron-transportnom lancu dalje od QA- ; $ET_o/TR_o = (1 - V_J)$
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu; $ABS/RC = M_o \times (1/V_J) \times [1/(F_V/F_m)]$
TR_o/RC	"trapping" po aktivnom reakcijskom središtu; $TR_0/RC = M_0 \times (1/V_J)$
ET_o/RC	transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu; $ET_0/RC = M_0 \times (1/V_J) \times (1-V_J)$
DI_o/RC	disipacija po aktivnom reakcijskom središtu; $DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti; **$PI_{ABS} = (RC/ABS) \times (TR_o/DI_0) \times [ET_o/(TR_o – ET_0)]$** $RC/ABS = (RC/TR_o)x(TR_o/ABS) = [(F_J-F_0)/4(F300\mu s-F_0)] \times (F_V/F_m)$ $TR_o/DI_o = F_V/F_0$ $ET_o/(TR_o – ET_o) = (F_m-F_J)/(F_J-F_0)$

2.7. Izolacija topljivih i membranskih proteina za SDS elektroforezu i imunodetekciju proteina RubisCO LSU

2.7.1. Izolacija topljivih i membranskih proteina

Kako bi se izolirali proteini, listovi klijanaca ječma usitnjeni su u tarioniku pomoću tekućeg dušika. U kivetu je odvagano 0,5 g tkiva i dodan je 1 ml vrućeg ekstrakcijskog pufera (80 °C) sljedećeg sastava: 0,1 M Tris/HCl pufer (pH 8,0), 4,5 %-tni detergent SDS (natrijevdodecilsulfat), 25 %-tni glicerol i 0,01 M reducirajući agens DTT (ditiotreitol). Uzorci su dobro izmiješani na vibracijskoj mješalici, a potom ekstrahirani 10 minuta na 80 °C u termomikseru uz uključeno miješanje. Nakon ekstrakcije uzorci su hlađeni 10 minuta na ledu te su centrifugirani 10 minuta 18000 *x g* pri 4 ºC. Supernatant je mikropipetom prebačen u novu kivetu, a talog je još jednom ekstrahiran s 1 ml vrućeg ekstrakcijskog pufera u istim denaturirajućim uvjetima. Nakon druge ekstrakcije supernatanti su spojeni i određena im je koncentracija proteina.

2.7.2. Određivanje koncentracije topljivih i membranskih proteina

Koncentracija proteina u uzorcima mjerena je spektrofotometrijskom metodom (Bradford, 1976) koja se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie briljant plavo G-250 (engl. "Comassie Brilliant Blue", CBB). CBB reagira prvenstveno sa pobočnim grupama Arg, a u manjoj mjeri i sa pobočnim grupama His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Apsorbancija smjese proteinskog ekstrakta i Bradford radne otopine koja sadrži boju mjerena je pri valnoj duljini 595 nm. Bradford radna otopina pripremljena je miješanjem 3 ml 95 %-tnog etilnog alkohola, 6 ml 88 %-tne ortofosforne kiseline, 6 ml Bradford matične otopine (87,5 mg CBB G-250 otopljeno u 25 ml 95 %-tnog etilnog alkohola i 50 ml 88 %-tne ortofosforne kiseline) i destilirane vode do ukupnog volumena od 100 ml. Koncentracija

proteina svakog pojedinog uzorka ekstrapolirana je iz standardne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja govođeg albuminskog seruma (engl. "Bovine Serum Albumin", BSA) poznatih koncentracija. Konačna koncentracija proteina izražena je u jedinici µg/µl ekstrakta.

2.7.3. Razdvajanje topljivih i membranskih proteina SDS elektroforezom

Kako bi se elektroforetski razdvojili proteini iz uzoraka, proteinski ekstrakti nanošeni su na 12%-tni poliakrilamidni gel sa SDS-om (Laemli, 1970). Proteinski ekstrakti koji su sadržavali 20 µg proteina pomiješani su s puferom 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-merkaptoetanola; dopuniti destiliranom vodom do ukupnog volumena od 10 ml). Smjesa je promiješana na vibracijskoj mješalici i stavljena u termomikser na denaturaciju pri 95 ºC tijekom 5 minuta. Nakon denaturacije uzorci su ohlađeni i nanijeti u jažice gela pomoću Hamilton igle. Kao biljeg molekularnih masa korištena je mješavina proteina poznatih molekularih masa od 10 do 250 kD (Bio Rad). Elektroforeza je tekla pri jakosti struje od 20 mA za jedan gel približno 120 minuta, sve dok se boja nije spustila na dno gela.

2.7.4. Imunodetekcija proteina RubisCO LSU

Metoda kojom se određuje prisutnost određenih proteina u proteinskom ekstraktu naziva se Western blot analiza. Metoda je osjetljiva i sastoji se od nekoliko koraka:

2.7.4.1. Prijenos proteina na PVDF membranu

Nakon SDS elektroforeze, proteini su razdvojeni i prenose se na membranu metodom Western blottinga pomoću horizontalnog, polusuhog (″semi-dry″) sustava 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) kako bi se uklonile soli i detergenti prije prijenosa. Prije prijenosa

proteina, PVDF membrana (Bio Rad) i filter papiri izrezani su da odgovaraju dimenzijama gela. Filter papiri i PVDF membrana (prethodno prvo natopljena kratko u metanolu) uronjeni su u anodni pufer za prijenos (20 mM Tris, 150 mM glicin, 30 %-tni metanol) na ekvilibraciju u trajanju od najmanje 5 minuta. Potom 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 pažljivo je istisnut zrak između gela i membrane koji bi mogao spriječiti uspješan prijenos. Na poklopac kojemu je ugrađena katoda stavljen je teret od oko 2 kg. Elektrode su priključene na izvor struje jakosti 0,65 mA *x* cm^{-2} gela. Prijenos se odvijao tijekom 2 sata u hladnjaku, pri temperaturi 4 ºC. Po završetku prijenosa, pincetom su odstranjeni filter papiri, a membrana je odmah korištena u postupku detekcije proteina.

2.7.4.2. Bojanje proteina na PVDF membrani

Nakon Western blottinga uspješnost prijenosa proteina provjerena je bojanjem membrane u Ponceau (0,2 %-tni Ponceau S u 3 %-tnoj TCA) tijekom 10 minuta uz stalno zibanje. Boja se reverzibilno veže na proteine, a proteinske pruge na membrani se vide nakon odbojavanja ispiranjem u destiliranoj vodi.

2.7.4.3. Detekcija proteina RubisCO LSU

Prije imunodetekcije membrana je inkubirana preko noći na 4 ºC 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). Nakon blokiranja membrana je inkubirana s primarnim protutijelom koji specifično prepoznaju ciljni protein tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi (primarno protutijelo anti-RbcL / LSU (Agrisera), razrijeđeno je 1:5000 u otopini za blokiranje). U svrhu uklanjanja nevezanog protutijela, membrana je nakon dva sata inkubacije ispirana 3 puta po 5 minuta s po 10 ml TBST-a. Inkubacija membrane sa sekundarnim protutijelima, u kompleksu s peroksidazom iz hrena

(Santa Cruz Biotechnology), odvijala se tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Sekundarno protutijelo prethodno je razrijeđeno 1:10000 u otopini za blokiranje. Membrana je ponovno isprana puferom TBST, 3 *x* 5 minuta. Sva ispiranja, kao i inkubacije, odvijala su se uz stalno zibanje. Kako bi se vizualizirale proteinske pruge, korištena je metoda kemiluminiscencijske reakcije supstrata i enzima (peroksidaze iz hrena) čiji produkt emitira svjetlost na mjestima vezanja sekundarnog protutijela. Za detekciju kemiluminiscencijom korišten je komercijalni supstrat koji se sastoji od luminola i vodikovog peroksida (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche). Supstrat za detekciju pripremi se prema uputi proizvođača i nanese se na stranu membrane na kojoj se nalaze proteini na način da prekrije cijelu membranu. Membrana je obložena prozirnom folijom s obje strane. Nakon inkubacije od 5 minuta, supstrat je istisnut, a na membranu je prislonjen fotografski film (Medical X-Ray Film Blue, Agfa) izrezan po dimenzijama membrane. Prvo eksponiranje filma, u za to predviđenoj kazeti, trajalo je jednu minutu nakon čega je film razvijen i fiksiran (Dentus D - razvijač i Dentus F - fiksir, Agfa). Duljina sljedećih ekspozicija određivana je ovisno o jačini signala.

2.8. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka dobivenih mjerenjima relativnog sadržaja vode u listu, lipidne peroksidacije, sadržaja slobodnog prolina, koncentracije fotosintetskih pigmenata i fluorescencije klorofila *a* u listovima ječma tijekom suše i tretmana zalijevanjem kao i pripadajućim kontrolnim biljkama provedena je korištenjem programskog paketa Statistica, Verzija 12.5, 2014.

Ispitivane skupine bile su srednje vrijednosti podataka dobivene mjerenjima: 0. dan eksperimenta - prije izazivanja stresa, u suši (7, 8, 9 ili 10 dan ovisno o eksperimentu), svaka 24 sata tijekom četiri dana tretmana zalijevanjem u svrhu rehidracije (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) i pripadajuće kontrole. Razlike između ispitivanih skupina utvrđene su analizom varijance (ANOVA), pojedinačno za svaki od 4 različita eksperimenta. Značajnost razlika između pojedinih skupina (0. dan, suša, 4 tretmana zalijevanjem i 6 kontrola = 12 testiranih skupina po tipu eksperimenta) na razini $p<0.05$ utvrđena je primjenom LSD (engl. "Least Significant Difference") testa. Statistički značajne razlike označene su različitim slovima, dok ista slova predstavljaju podatke između kojih nema razlike.

3. REZULTATI

Rezultati preliminarnih istraživanja dobiveni iz prva dva eksperimenta, u kojima je suša trajala 7 i 8 dana, ukazali su na mogući oporavak, a s obzirom na uočenu sličnost među njima oba su eksperimenta ponovljena. U ovom poglavlju prikazani su ponovljeni rezultati prvog (trajanje suše – 7 dana) i drugog (trajanje suše – 8 dana) eksperimenta.

Preliminarna istraživanja su također pokazala da oporavak nije moguć u biljaka koje su bile izložene suši 9 i 10 dana pa prema postavljenom cilju istraživanja treći i četvrti eksperiment nije bilo potrebe ponavljati. Rezultati su složeni u Tablici 2 (eksperiment u kojemu je suša trajala 9 dana) i Tablici 3 (eksperiment u kojemu je suša trajala 10 dana) u poglavlju Prilozi.

3.1. Relativni sadržaj vode u listu (RWC)

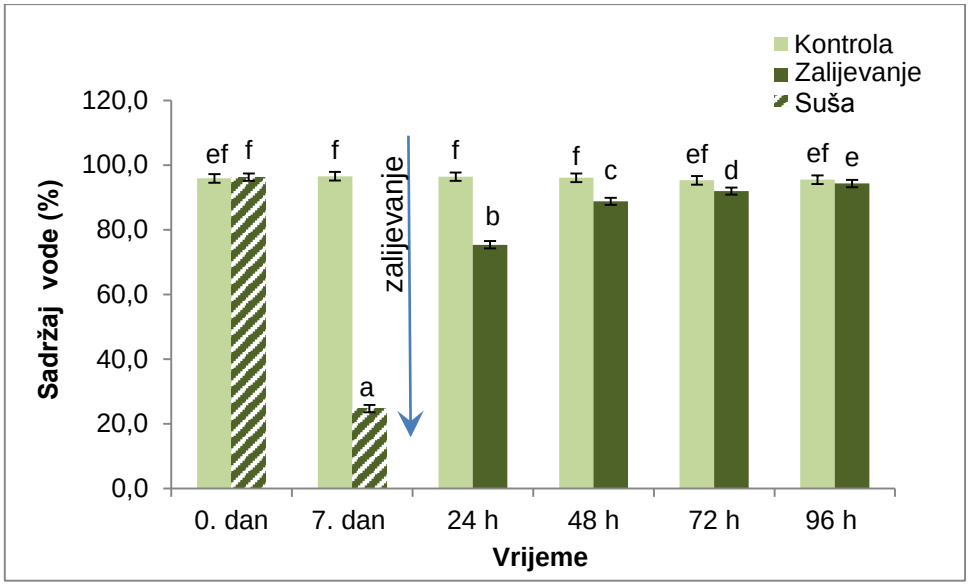
Relativni sadržaj vode u listu (RWC) mjeren je 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), nakon 7. (Slika 7 A) i 8. dana (Slika 7 B) suše te svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem koji je trajao četiri dana (na grafičkom prikazu označeno kao 24 h, 48 h, 72 h i 96 h), i pripadajućim kontrolama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 10 ponavljanja. Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (LSD, $p<0,05$) označene su različitim slovima.

Statistički značajan pad RWC-a zabilježen je sedmog dana suše (24,76 ± 1,68 %) u odnosu na kontrolne biljke (96,54 ± 1,32 %) istoga dana (Slika 7 A). 24 sata nakon početka rehidracije zalijevanjem u tretmanu je zabilježen statistički značajan porast RWC-a (75,33 ± 3,05 %), u odnosu na 7. dan suše. Trend značajnog porasta RWC-a nastavljen je kontinuirano svaka 24 sata do potpunog oporavka nakon četiri dana (96 h), kada je izmjerena vrijednost iznosila 94,29 ± 1,14 % i nije se značajno razlikovala od kontrole istoga dana (95,47 ± 1,33).

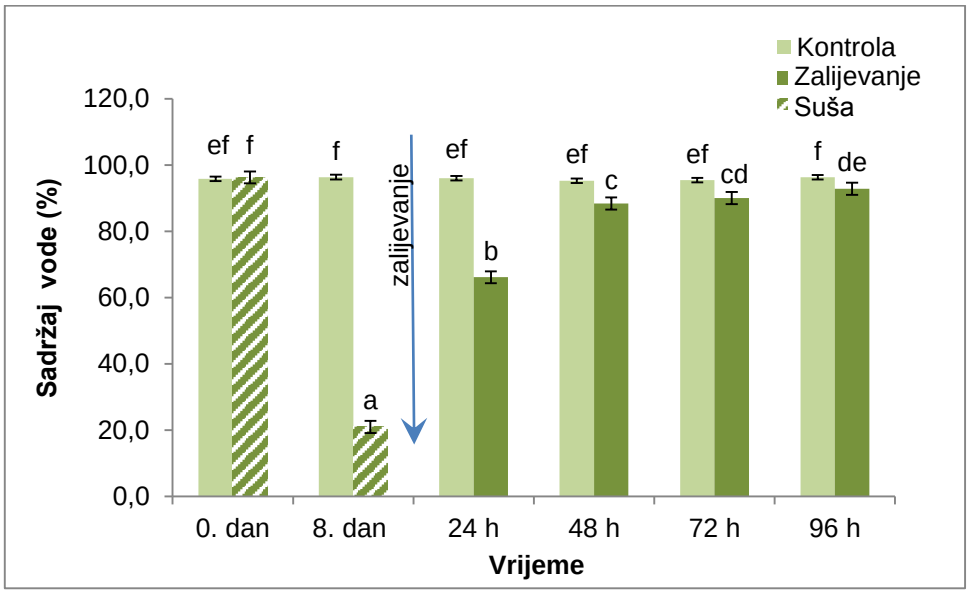
Slika 7 B prikazuje kako je 8. dana suše došlo do značajanog pada srednje vrijednosti RWC-a (20,97 ± 1,82 %) u odnosu na kontrolne biljke (96,41 ± 1,26 %) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije zalijevanjem zabilježen je značajni porast RWC-a (66,16 ± 10,96 %), u odnosu na 8. dan suše. RWC je značajno porastao i nakon 48 sati (88,41 ± 3,28 %), u odnosu na RWC izmjeren nakon 24 sata. Nakon 72 sata RWC se nije promijenio u odnosu na isti izmjeren nakon 48 sati. Izmjerena vrijednost RWC-a posljednjeg dana oporavka (92,86 ± 1,82 %) bila je značajno viša u odnosu na vrijednost izmjerenu nakon 48 sati. Ista se približila vrijednosti izmjerenoj u kontroli posljednjeg dana (96,34 ± 0,69 %) no međusobno su se te vrijednosti ipak značnajno razlikovale.

Relativni sadržaj vode izmjeren u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 7).

A)



B)



Slika 7. Srednje vrijednosti i standardne devijacije relativnog sadržaja vode (RWC) u listovima klijanaca izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

3.2. Razina lipidne peroksidacije (TBARS)

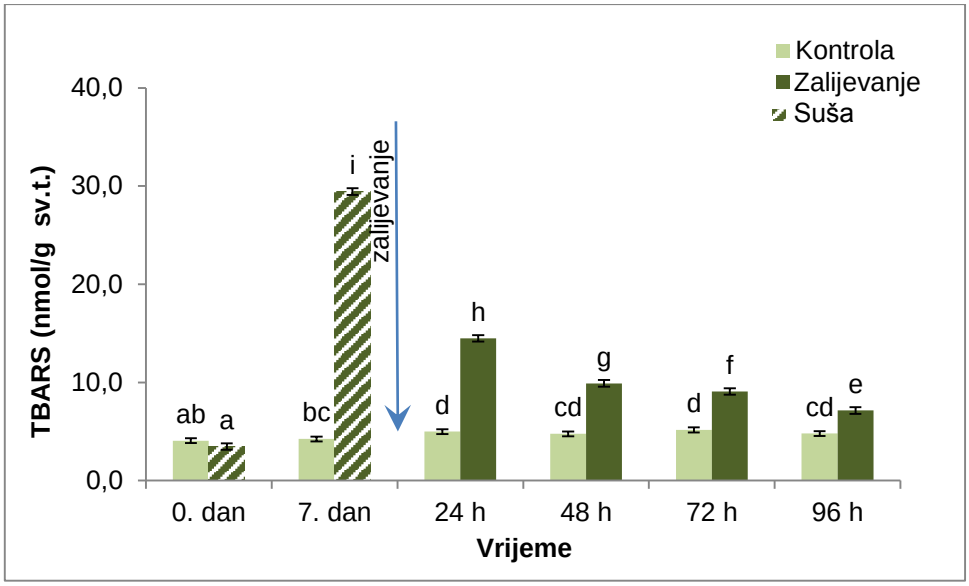
Razina lipidne peroksidacije procijenjena je mjerenjem koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS). Mjerenja su izvršena 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), nakon 7. (Slika 8 A) i 8. dana (Slika 8 B) suše te svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem koji je trajao četiri dana (na grafičkom prikazu označeno kao 24 h, 48 h, 72 h i 96 h), i pripadajućim kontrolama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja. Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (LSD, $p<0,05$) označene su različitim slovima.

Statistički značajan porast koncentracije TBARS-a zabilježen je sedmog dana suše (29,43 ± 0,79 nmol/g sv.t.) u odnosu na kontrolne biljke (4,24± 0,12 nmol/g sv.t.) istoga dana (Slika 8 A). 24 sata nakon početka rehidracije zabilježeno je značajano smanjenje koncentracije TBARS-a u tretmanu (14,49 ± 0,79 nmol/g sv.t.), dvostruko u odnosu na 7. dan suše. Trend značajnog smanjenja nastavljen je svaka 24 sata, sve do kraja eksperimenta, kada se izmjerena vrijednost (7,14 ± 0,34 nmol/g sv.t.) približila onoj u kontroli (4,80 ± 0,25 nmol/g sv.t.) no statistički se razlikovala od nje.

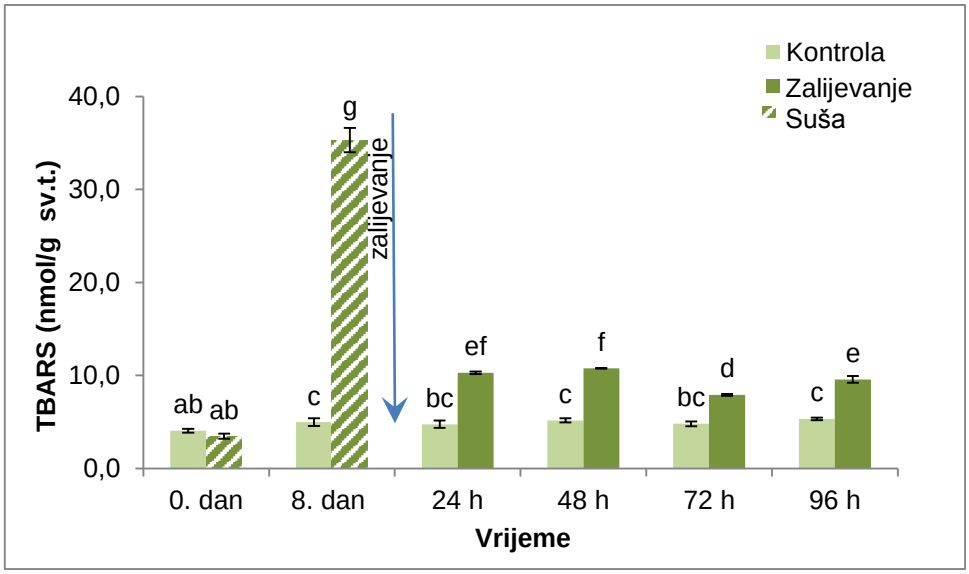
Slika 8 B prikazuje značajno povećanje srednje vrijednosti koncentracije TBARS-a osmog dana suše (35,30 ± 1,31 nmol/g sv.t.) u odnosu na kontrolne biljke (4,99 ± 0,43 nmol/g sv.t.) istoga dana. 24 sata od početka rehidracije zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije TBARS-a u tretmanu. Izmjerena vrijednost (10,29 ± 0,13 nmol/g sv.t.) bila je oko tri i pol puta niža u odnosu na 8. dan suše. Daljnje smanjenje zabilježeno je nakon 72 sata (7,90 ± 0,09 nmol/g sv.t.), dok se izmjerena vrijednost nakon 96 sati (9,58 ± 0,36 nmol/g sv.t.) nije razlikovala od vrijednosti izmjerene nakon 24 sata, a razlikovala se od kontrole (5,33 ± 0,15 nmol/g sv.t.).

Razina lipidne peroksidacije izmjerena u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 8).

A)



B)



Slika 8. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u nmol/g svježe tvari izmjerene u listovima klijanaca 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

3.3. Sadržaj slobodnog prolina

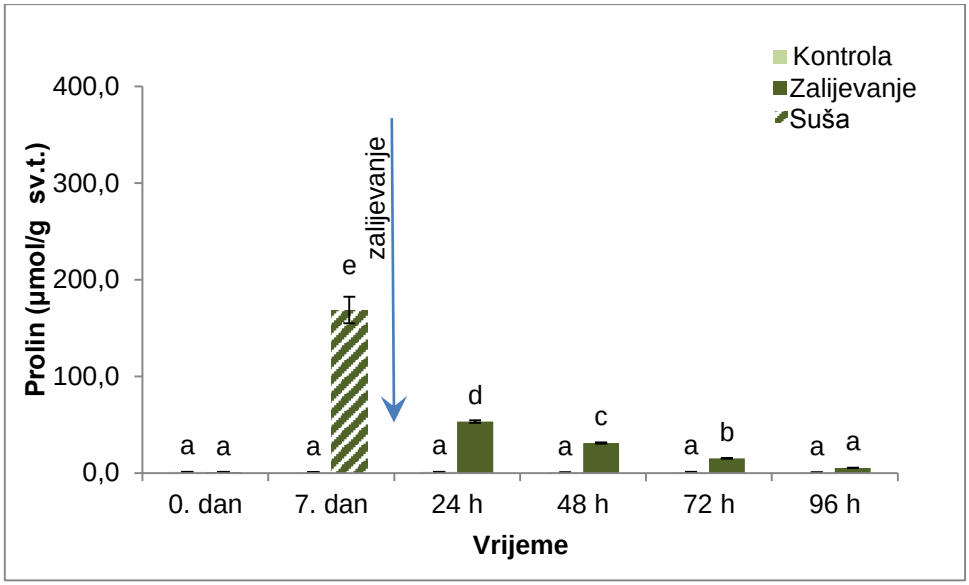
Sadržaj slobodnog prolina mjeren je 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), nakon 7. (Slika 9 A) i 8. dana (Slika 9 B) suše te svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem koji je trajao četiri dana (na grafičkom prikazu označeno kao 24 h, 48 h, 72 h i 96 h), i pripadajućim kontrolama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja. Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (LSD, $p<0,05$) označene su različitim slovima.

Sedmog dana suše (Slika 9 A) zabilježeno je značajno povećanje slobodnog prolina (168,61 ± 13,72 μmol/g sv.t.) u odnosu na kontrolne biljke (0,78 ± 0,09 μmol/g sv.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije sadržaj slobodnog prolina u tretmanu se oko tri puta smanjio (53,20 ± 1,35 μmol/g sv.t.) u odnosu na 7. dan suše. Trend značajnog smanjenja nastavljen je svaka 24 sata, sve do potpunog oporavka na kraju eksperimenta, kada je izmjerena vrijednost iznosila 5,28 ± 0,17 μmol/g sv.t. i nije se statistički značajno razlikovala od kontrole istog (posljednjeg) dana.

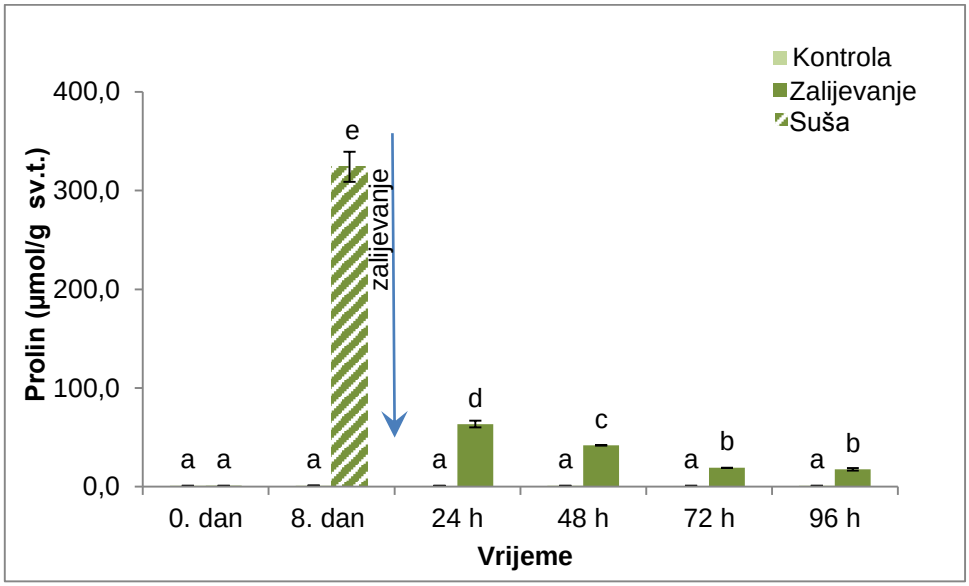
Osmog dana suše (Slika 9 B) zabilježeno je značajno povećanje srednje vrijednosti slobodnog prolina u listovima (324,03 ± 15,25 μmol/g sv.t.) u odnosu na kontrolne biljke (1,11 ± 0,25 μmol/g sv.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije sadržaj slobodnog prolina u tretmanima se za oko pet puta smanjio (63,53 ± 3,53 μmol/g sv.t.) u odnosu na 8. dan suše. Trend značajnog smanjenja nastavljen je nakon 48 sati (42,00 ± 0,32 μmol/g sv.t.) i 72 sata (19,19 ± 0,20 μmol/g sv.t.). Nakon 96 sati sadržaj prolina u tretmanu je ostao nepromijenjen u odnosu na prethodno mjerenje i značajno različit od kontrole.

Sadržaj slobodnog prolina izmjeren u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 9).

A)



B)



Slika 9. Srednje vrijednosti i standardne devijacije sadržaja slobodnog prolina u µmol/g svježe tvari izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

3.4. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

Koncentracija klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*) i ukupnih klorofila (Chl *a*+*b*) određena je 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), nakon 7. (Slike 10 A, 11 A i 12 A) i 8. dana (Slike 10 B, 11 B i 12 B) suše te svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem koji je trajao četiri dana (na grafičkom prikazu označeno kao 24 h, 48 h, 72 h i 96 h), i pripadajućim kontrolama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 3 ponavljanja. Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (LSD, $p<0,05$) označene su različitim slovima.

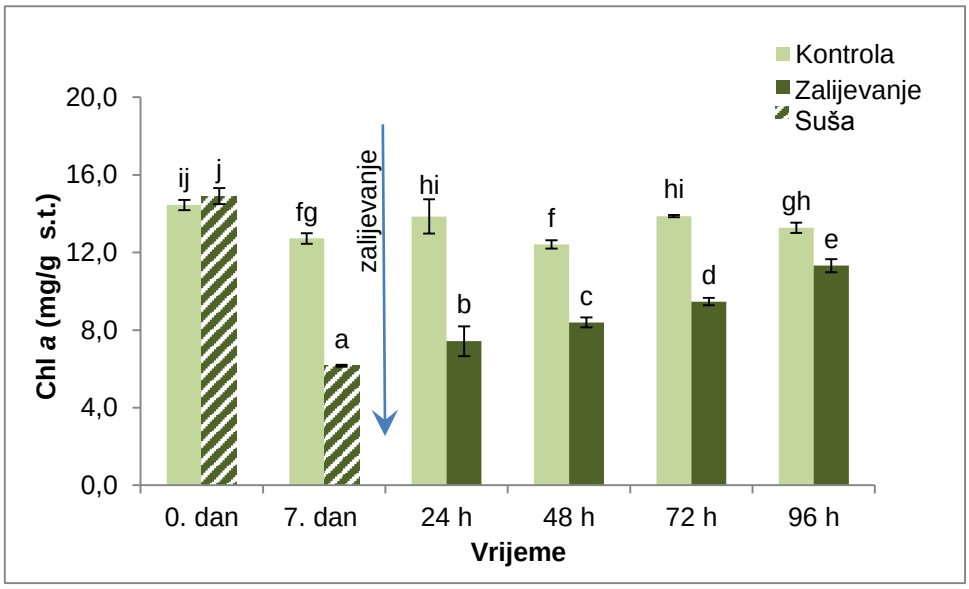
3.4.1. Klorofil *a*

Sedmog dana suše (Slika 10 A) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije klorofila *a* (6,16 ± 0,27 mg/g s.t.), u odnosu na kontrolne biljke (12,73 ± 0,05 mg/g s.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije koncentracija klorofila *a* je značajno porasla (7,43 ± 0,77 mg/g s.t.), u odnosu na 7. dan suše. Trend značajnog porasta koncentracije klorofila *a* u tretmanu zabilježen je svaka 24 sata, sve do kraja eksperimenta. Nakon 96 sati, izmjerena vrijednost u tretmanu (11,32 ± 0,34 mg/g s.t.) približila se kontroli, no statistički se razlikovala od nje.

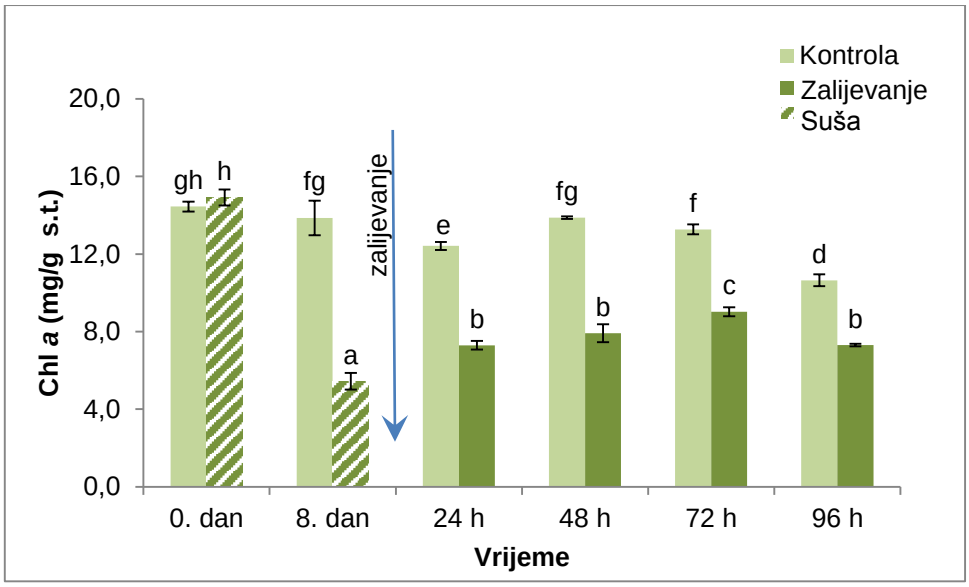
Nakon 8 dana suše (Slika 10 B) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije klorofila *a* (5,45 ± 0,43 mg/g s.t.), u odnosu na kontrolne biljke (13,86 ± 0,89 mg/g s.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije u tretmanu je zabilježen statistički značajan porast koncentracije klorofila *a* (7,30 ± 0,23 mg/g s.t.) u odnosu na 8. dan suše. Koncentracija klorofila *a* je u tretmanima ostala nepromijenjena nakon 48 i 96 sati, a izmjerene vrijednosti razlikovale su se od kontrole.

Koncentracija klorofila *a* izmjerena u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 10).

A)



B)



Slika 10. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila *a* u mg/g suhe tvari izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

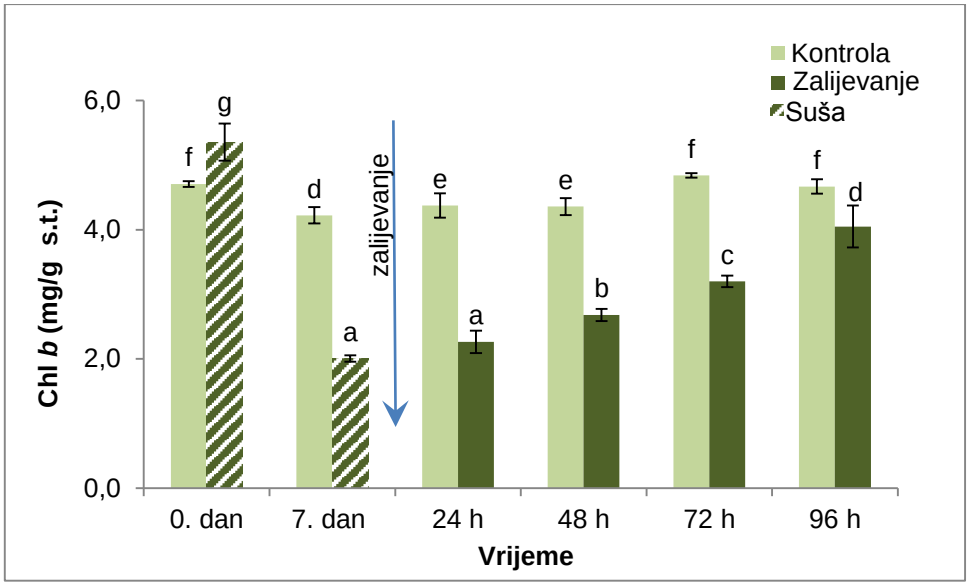
3.4.2. Klorofil *b*

Sedmog dana suše (Slika 11 A) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije klorofila *b* (2,01 ± 0,05 mg/g s.t.), u odnosu na kontrolne biljke (4,22 ± 0,13 mg/g s.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije koncentracija u tretmanu (2,26 ± 0,17 mg/g s.t.) se nije promijenila u odnosu na 7. dan suše, no povećava se nakon 48 sati (2,68 ± 0,10 mg/g s.t.) te nastavlja kontinuirano značajno rasti svaka 24 sata do kraja eksperimenta. Posljednjeg dana uzorkovanja, 96 sati nakon početka rehidracije zalijevanjem, izmjerena vrijednost koncentracije klorofila *b* (4,05 ± 0,33 mg/g s.t.) približila se kontrolnoj (4,67 ± 0,11 mg/g s.t.) no statistički se razlikovala od nje.

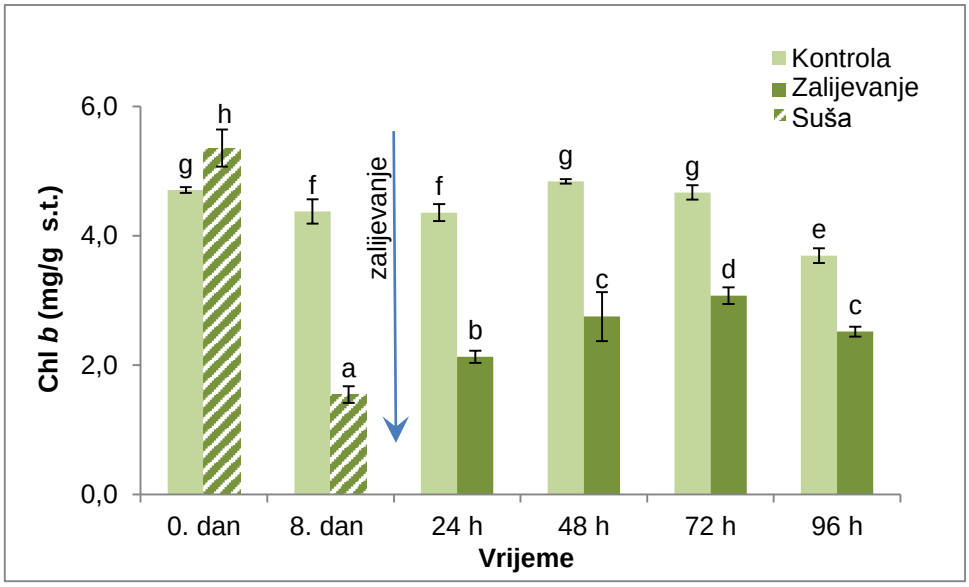
Nakon 8 dana suše (Slika 11 B) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije klorofila *b* (1,55 ± 0,13 mg/g s.t.), u odnosu na kontrole (4,38 ± 0,19 mg/g s.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije u tretmanu je zabilježen statistički značajan porast koncentracije klorofila *b* (2,13 ± 0,09 mg/g s.t.), u odnosu na 8. dan suše. Trend značajnog porasta je nastavljen 48 i 72 sata nakon početka zalijevanja, a nakon 96 sati izmjerena vrijednost (2,52 ± 0,08 mg/g s.t) bila je niža u odnosu na vrijednost nakon 72 sata i statistički značajno različita od kontrole (3,69 ± 0,11 mg/g s.t) posljednjeg dana eksperimenta.

Koncentracija klorofila *b* izmjerena u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 11).

A)



B)



Slika 11. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila *b* u mg/g suhe tvari izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

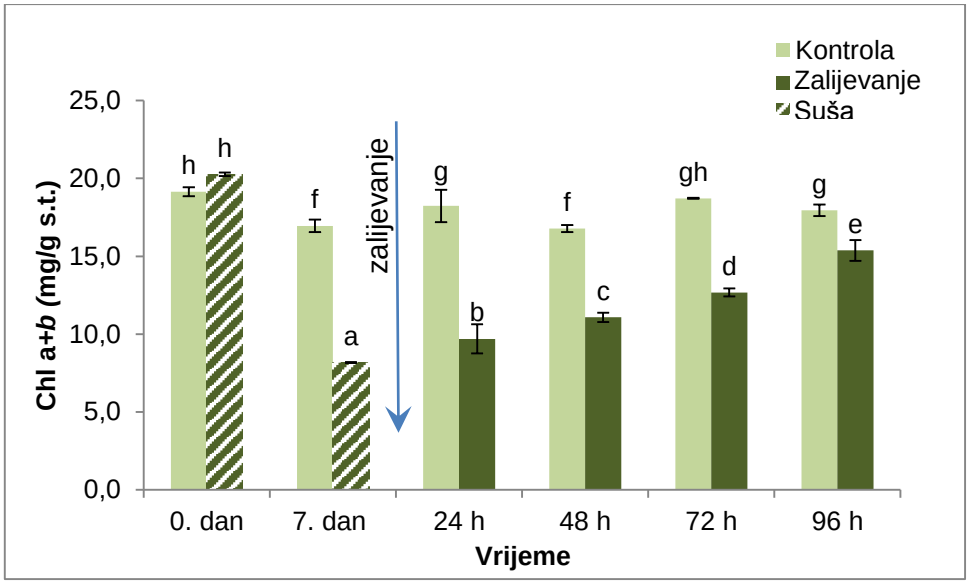
3.4.3. Koncentracija ukupnih klorofila (Chl *a+b*)

Sedmog dana suše (Slika 12 A) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije ukupnih klorofila (8,17 ± 0,03 mg/g s.t.) u odnosu na kontrolne biljke (16,95 ± 0,39 mg/g s.t.) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije koncentracija ukupnih klorofila u tretmanu je značajno porasla (9,69 ± 0,94 mg/g s.t.), u odnosu na 7. dan suše. Trend značajnog porasta koncentracije ukupnog klorofila u tretmanu zabilježen je svaka 24 sata, sve do kraja eksperimenta. Nakon 96 sati koncentracija u tretmanu iznosila je 15,37 ± 0,67 mg/g s.t., što je blizu kontrolnoj vrijednosti (17,94 ± 0,37 mg/g s.t.) ali statistički značajno različito.

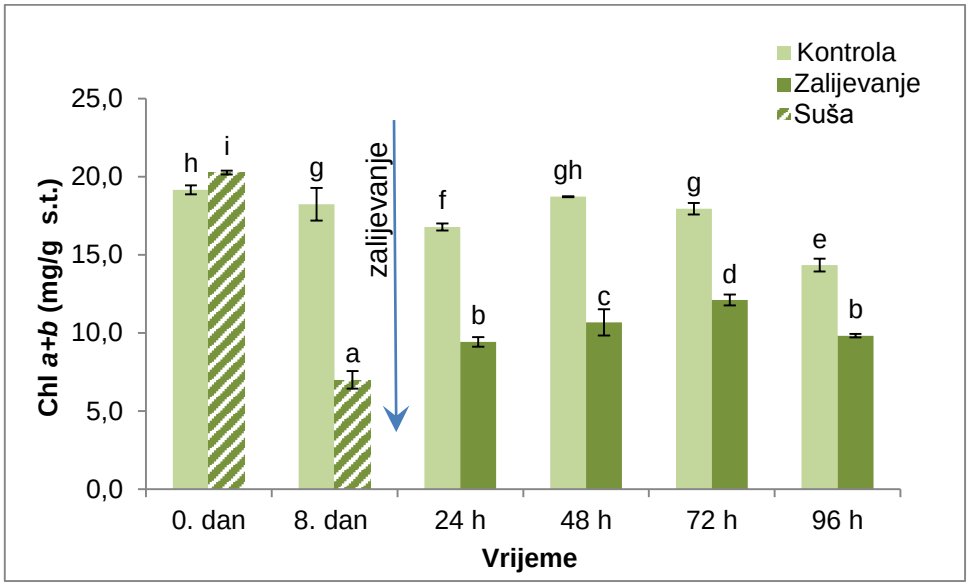
Nakon 8 dana suše (Slika 12 B) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije ukupnih klorofila u listovima (6,99 ± 0,59 mg/g s.t.), u odnosu na kontrolne biljke istoga dana (18,23 ± 1,04 mg/g s.t.). 24 ata nakon početka rehidracije u tretmanu je zabilježen statistički značajan porast koncentracije ukupnih klorofila (9,43 ± 0,31 mg/g s.t.), u odnosu na 8. dan suše. Trend značajnog porasta je nastavljen 48 i 72 sata nakon početka zalijevanja, a na kraju eksperimenta izmjerena vrijednost (9,82 ± 0,11 mg/g s.t.) bila je niža u odnosu na vrijednost nakon 72 sata i statistički značajno različita od kontrole posljednjeg dana eksperimenta (14,34 ± 0,42 mg/g s.t).

Koncentracija ukupnih klorofila *(a+b)* izmjerena u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 12).

A)



B)



Slika 12. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije ukupnih klorofila (*a+b*) u mg/g suhe tvari izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

3.5. Fluorescencija klorofila *a*

Fluorescencija klorofila *a* mjerena je 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), nakon 7. (Slike 13 A i 14 A) i 8. dana (Slike 13 B i 14 B) suše te svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem koji je trajao četiri dana (na grafičkom prikazu označeno kao 24 h, 48 h, 72 h i 96 h), i pripadajućim kontrolama. Svaki tip uzoraka izmjeren je u 25 ponavljanja. Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti (LSD, $p<0,05$) označene su različitim slovima.

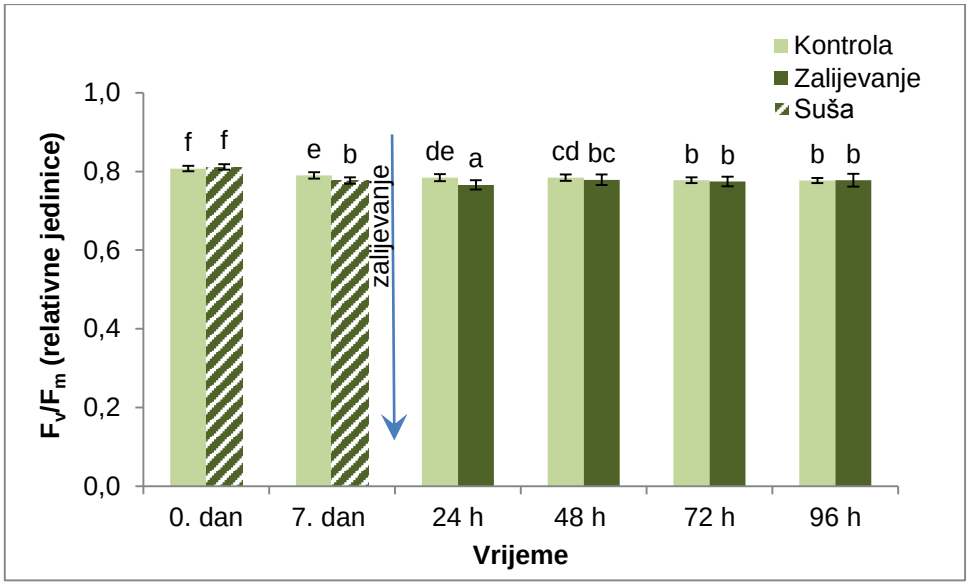
3.5.1. Maksimalni prinos kvanta PSII (F_v/F_m)

Sedmog dana suše (Slika 13 A) zabilježeno je značajno smanjenje maksimalnog prinosa kvanta PSII (F_v/F_m) u listovima (0,78 ± 0,01) u odnosu na kontrolu (0,79 ± 0,01) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije zalijevanjem parametar F_v/F_m u tretmanu statistički se značajno smanjio (0,77 ± 0,01), u odnosu na 7. dan suše. Nakon 48 sati vrijednost ovog parametra (0,78 ± 0,01) značajno se povećala u odnosu na vrijednost izmjerenu u tretmanu nakon 24 sata, a statistički se nije razlikovala od kontrole istog dana (0,78 ± 0,01). Do kraja eksperimenta vrijednosti ovog parametra ostale su nepromijenjene.

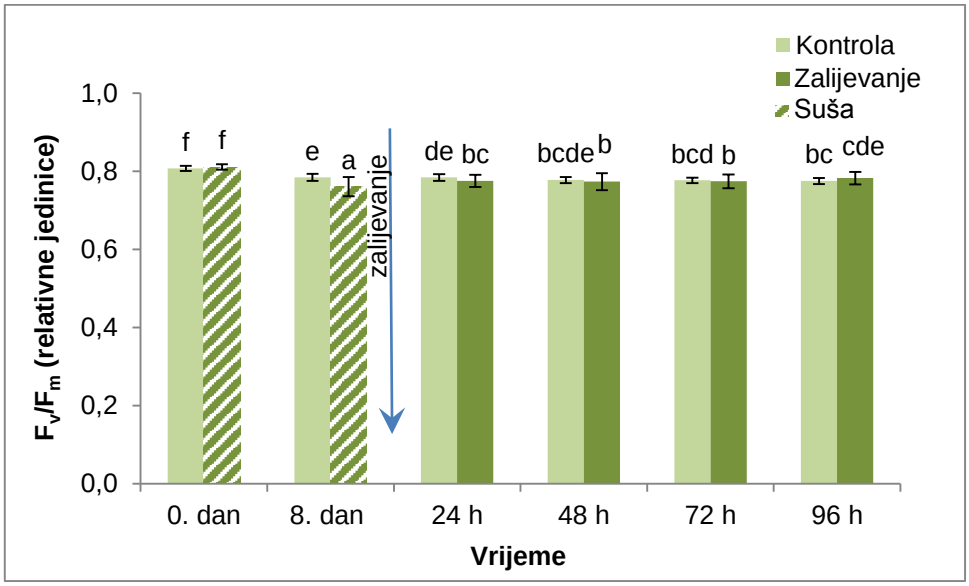
Osmog dana suše (Slika 13 B) zabilježeno je značajno smanjenje vrijednosti parametra F_v/F_m u listovima (0,76 ± 0,02) u odnosu na kontrolu (0,78 ± 0,01) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije, u tretmanu je zabilježena statistički značajno veća vrijednost ovog parametra (0,78 ± 0,02), u odnosu na 8. dan suše. Nakon 48, 72 i 96 sati izmjerene vrijednosti parametra F_v/F_m u tretmanima i pripadajućim kontrolama statistički se nisu značajno razlikovale.

Maksimalni prinos kvanta PSII (F_v/F_m) u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 13).

A)



B)



Slika 13. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra F_v/F_m izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši, svaka 24 sata tijekom tretmana zalijevanjem i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

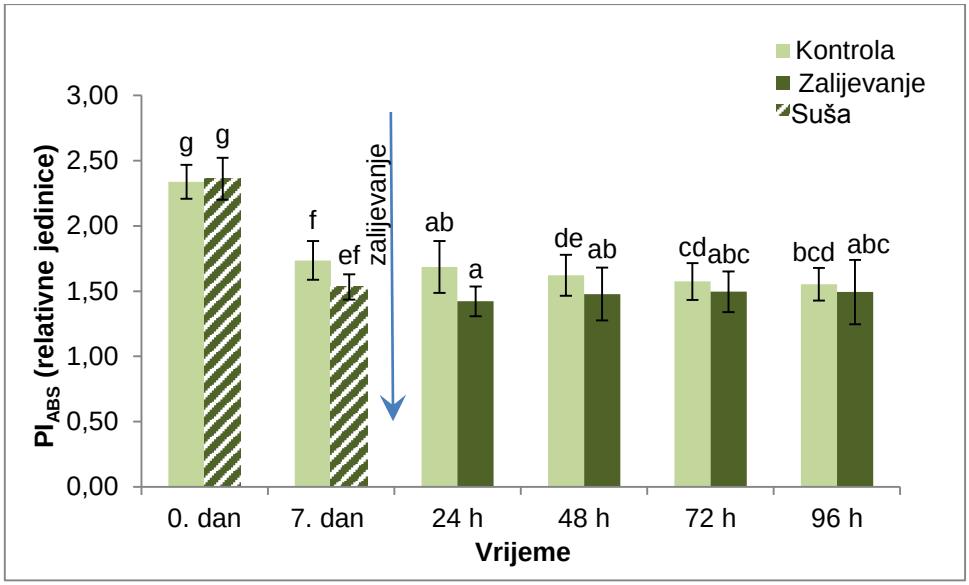
3.5.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})

Sedmog dana suše (Slika 14 A) srednja vrijednost indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u listovima (1,53 ± 0,10) nije se značajno razlikovala od vrijednosti izmjerene u listovima kontrolnih biljaka (1,74 ± 0,15) istoga dana. 24 sata nakon početka rehidracije u tretmanu je zabilježena značajno niža vrijednost ovog parametra (1,42 ± 0,12) u odnosu na 7. dan suše, no nije se razlikovala od kontrole uzorkovane u isto vrijeme (nakon 24 sata). Nakon 48, 72 i 96 sati vrijednosti parametra PI_{ABS} u tretmanu ostale su nepromijenjene, a nakon 72 i 96 sati jednake kao u kontrolama.

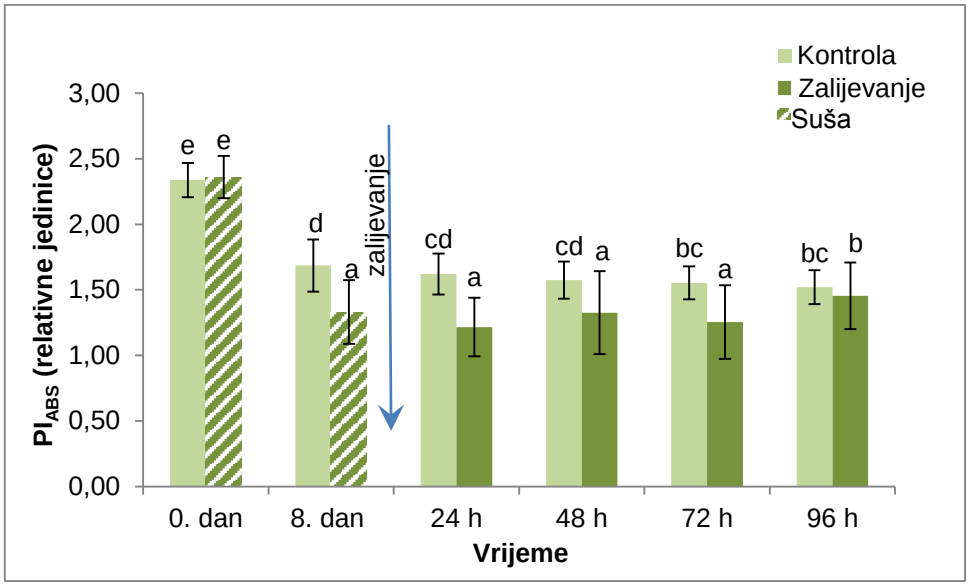
Osmog dana suše (Slika 14 B) zabilježeno je značajno smanjenje vrijednosti parametra PI_{ABS} (1,33 ± 0,24), u odnosu na kontrolu (1,69 ± 0,20) istoga dana. Tijekom perioda rehidracije zalijevanjem značajno povećanje vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti u tretmanu zabilježeno je na kraju eksperimenta. Izmjerena vrijednost nakon 96 sati iznosila je 1,45 ± 0,25 i nije se značajno razlikovala od vrijednosti izmjerene u isto vrijeme u listovima kontrolnih biljaka (1,52 ± 0,13).

Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u listovima biljaka koje su služile kao kontrola i u listovima biljaka uzgojenih za eksperiment sušom prije izlaganja stresu (0. dan) nije se međusobno razlikovala niti u jednom od prikazanih eksperimenata (Slika 14).

A)



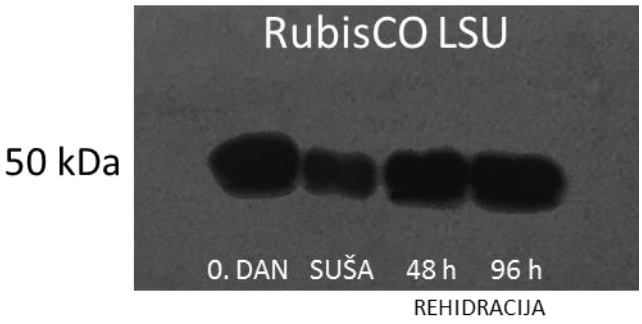
B)



Slika 14. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametra PI_{ABS} izmjerene 0. dan eksperimenta, u suši i svaka 24 sata tijekom perioda zalijevanja, u tretmanima i pripadajućim kontrolama. **A)** Prvi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 7 dana. **B)** Drugi eksperiment u kojemu su biljke bile izložene suši 8 dana. Statistički značajne razlike (LSD, $p<0,05$) između srednjih vrijednosti označene su različitim slovima.

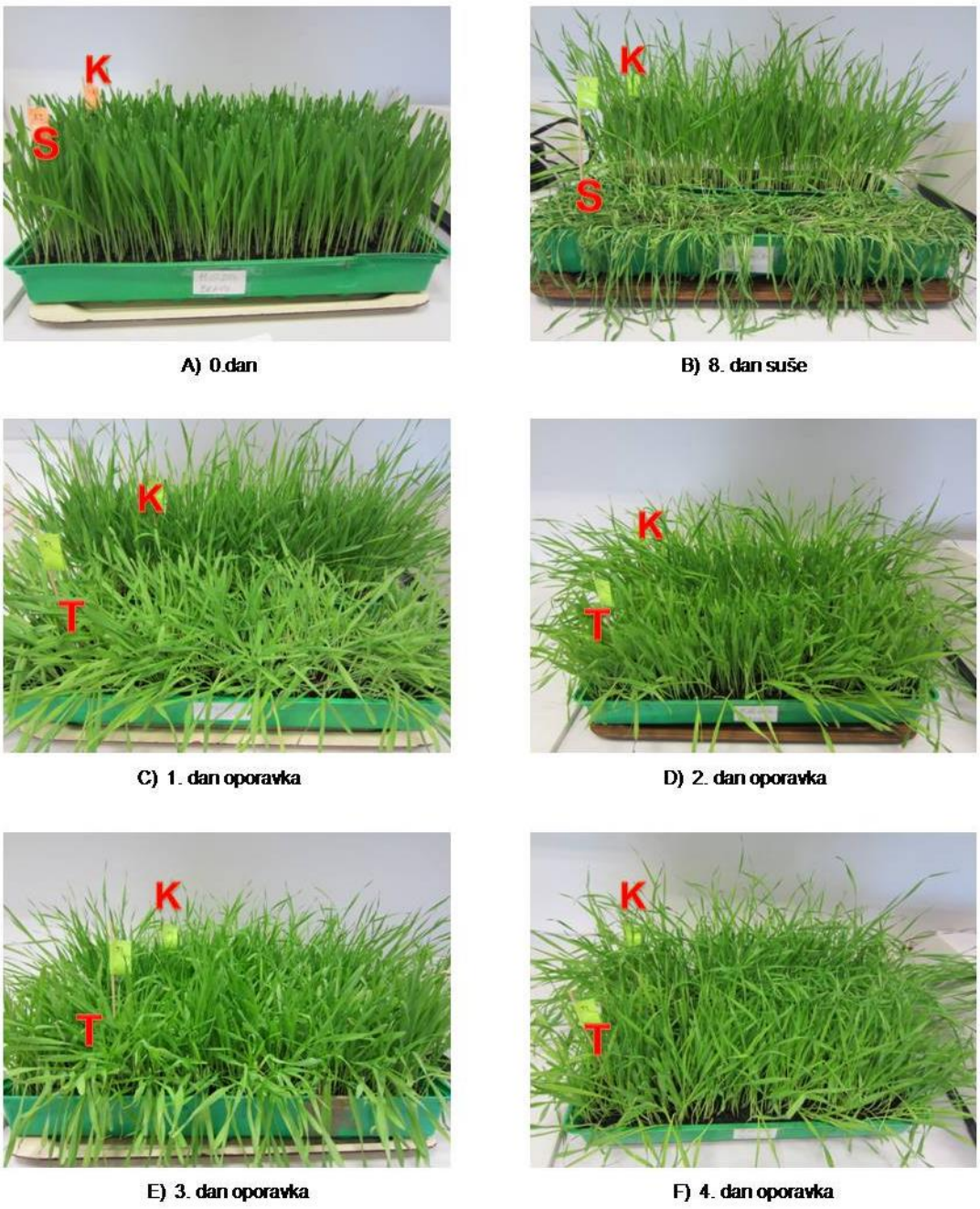
3.6. Imunodetekcija proteina Rubisco LSU

Imunodetekcija velike podjedinice enzima RubisCO (LSU), kao jedne od značajnih komponenata fotosintetskog aparata, izvršena je u listovima klijanaca ječma 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), 8. dan suše te tijekom perioda rehidracije, nakon 48 i 96 sati tretmana zalijevanjem. Slika 15 prikazuje proteinsku vrpcu detektiranu kao velika podjedinica enzima RubisCO (LSU). Razina vrpce osmog dana suše smanjena je u odnosu na razinu vrpce prije izlaganja suši (0. dan). Povećanje vrpce uočava se tijekom oporavka već nakon 48 sati kao i nakon 96 sati tretmana.



Slika 15. Relativne razine velike podjedinice RubisCO-a (LSU) u listovima klijanaca ječma 0. dan eksperimenta (prije izlaganja stresu), 8. dan suše te tijekom perioda rehidracije, nakon 48 i 96 sati tretmana zalijevanjem.

Budući da je ova metoda polu kvantitativna, za uzorkovanje je odabran (uzimajući u obzir definirani cilj istraživanja) ključni trenutak suše u kojemu je zalijevanjem moguć oporavak biljke. Prethodno navedeni rezultati mjerenja fluorescencije klorofila *a* pokazali su da je to 8. dan suše. Klijanci ječma uzorkovani tijekom drugog eksperimenta u kojemu je suša trajala 8 dana prikazani su na Slici 16. Zbog vrlo velike sličnosti između klijanaca prvog (suša - 7 dana) i drugog (suša – 8 dana) eksperimenta u ovo poglavlje uvrštene su samo fotografije drugog eksperimenta.



Slika 16. Klijanci ječma tijekom drugog eksperimenta u kojemu je suša trajala 8 dana.

A) 0. dan - deset dana stari klijanci prije izlaganja stresu. B) kontrola (K) i suša (S). Kontrole (K) i tretmani (T) tijekom perioda oporavka rehidracijom: C) 1. dan (24 h), D) 2. dan (48 h), E) 3. dan (72 h), F) 4. dan (96 h).

4. RASPRAVA

Suša, kao i drugi okolišni stresovi utječu na brojne fiziološke i metaboličke procese u biljkama. U ovom eksperimentu ispitivana je dinamika oporavka dehidriranih i slabo vijabilnih klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L., sorta Bravo). Dehidracija je izazvana prestankom zalijevanja, a čitavi eksperiment je napravljen u kontroliranim uvjetima uzgojne komore kako bi se izbjegao zbirni utjecaj više stresnih čimbenika. Prema rezultatima dobivenim prijašnjim istraživanjima na ovoj sorti ječma (Antunović, 2013), od kojih je dio objavljen u radu Antunović Dunić i sur. (2015), pretpostavljeno je da bi se djelomični ili potpuni oporavak klijanaca nakon snažne dehidracije mogao očekivati sedmog ili osmog dana suše, odnosno u trenutku kada se relativni sadržaj vode u listu (RWC) snizi do maksimalne vrijednosti od oko 20 %.

Tijekom suše prvo dolazi do deficita vode u tlu, a zatim i u samim biljkama u kojima se ta pojava najčešće prati mjerenjem relativnog sadržaja vode (RWC) u listovima. S obzirom da se parametar RWC smatra jednim od primarnih pokazatelja dehidracije (Smart i Bingham, 1974; Yamasaki i Dillenburg, 1999) nije neobično što je opisan kao značajan kriterij za selekciju genotipova tolerantnih na sušu (Jongdee i sur., 2002). U ovom istraživanju relativni sadržaj vode u listovima klijanaca sedmog (24,76 %) i osmog (20,97 %) dana suše značajno se smanjio, u odnosu na kontrole istog dana (Slika 7). Sušu koja toliko snižava RWC Silvestre i sur. (2014) su definirali ekstremnim stresom. Mnoga dosadašnja istraživanja su pokazala da suša u listovima izaziva snažno smanjenje RWC-a i vodnog potencijala (Nayyar i Gupta, 2006; Živčák i sur., 2008; Efeoglu i sur., 2009; Mishra i sur., 2012; Ghotbi-Ravandi i sur., 2014; Foster i sur., 2015). Od ranije je također poznato da je dehidracija najčešće reverzibilan proces, što je u skladu s rezultatima ovog rada. Rehidracija ponovnim zalijevanjem potaknula je značajno povećanje RWC-a u oba eksperimenta, u odnosu na sušu (Slika 7). RWC se 24 sata nakon zalijevanja povisio za 50,57 % u biljkama koje su prethodno bile izložene suši sedam dana i svakodnevno značajno rastao tijekom četverodnevnog perioda rehidracije, na kraju kojega se zabilježena vrijednost RWC-a izjednačila s kontrolom istog dana. Dinamika porasta parametra RWC u klijancima koji su bili u suši osam dana bila je sporija. Nakon 24 sata RWC je porastao za 45,2 % i do kraja eksperimenta se jako približio kontroli. Unatoč činjenici da se RWC nije izjednačio s kontrolom, vrlo

visoka izmjerena vrijednost (92,86 %) pokazuje da su listovi klijanaca bili rehidrirani. Mnogim je sortama ječma u fazi klijanaca (slabije ili jače tolerancije na sušu) izmjerena slična vrijednost RWC-a u normalnim fiziološkim uvjetima (Oukarroum i sur., 2007; Ghotbi-Ravandi i sur., 2014). U prijašnjim istraživanjima zabilježena je slična dinamika oporavka. Marok i sur. (2013) zabilježili su značajan pad RWC-a u listovima dva genotipa ječma (tolerantan i osjetljiv na sušu) nakon osam dana suše te potpuni oporavak nakon tri dana zalijevanja. Zabilježeno je smanjenje RWC-a i kod tri sorte kukuruza, koje su bile izložene suši dvanaest dana, u kojima su se nakon šest dana zalijevanja vrijednosti izjednačile s kontrolama (Efeoğlu i sur., 2009). Međutim, u spomenutim istraživanjima kao i u mnogim drugima, suša prethodno nije uzrokovala toliko nizak RWC kao u našem eksperimentu. Vrijednosti RWC-a su se kretale u prosjeku od oko 40 % pa na više. Istraživanja suše i oporavka provedena su i na dva kultivara livadne vlasnjače (*Poa pratensis*) (Yang i sur., 2013). Unatoč činjenici da je desetodnevna suša u tolerantnom i osjetljivom kultivaru izazvala vrlo slično smanjenje RWC-a (oko 39 %) nakon tri dana rehidracije zabilježen je potpuni oporavak samo tolerantnog kultivara. U našem istraživanju progresivno smanjenje RWC-a osmog dana suše uzrokovalo je venuće i rolanje listova klijanaca čime se ograničava apsorpcija svjetlosti te sprječava gubitak vode transpiracijom. Svakodnevno zalijevanje kroz četiri dana izazvalo je povratak listova u turgescentno stanje (Slika 16).

Smanjenjem RWC-a u uvjetima suše povećala se razina lipidne peroksidacije, određena prema koncentraciji reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS). Izmjerene vrijednosti sedmog i osmog dana suše bile su oko sedam puta već od vrijednosti u kontrolama (Slika 8). Lipidna peroksidacija ukazuje na oštećenje biomembrana u uvjetima oksidacijskog stresa, a inicijacija najčešće započinje odvajanjem vodika od molekule prekurzora (PUFA) u prisutnosti hidroksilnih radikala (·OH) (Gill i Tuteja, 2010). Oštećenje intracelularnih membrana može negativno djelovati na respiratorni lanac u mitohondrijima, kao i na fiksaciju ugljika u kloroplastima te uzrokovati razgradnju klorofila, dok je oštećenje plazmatske membrane povezano sa otpuštanjem elektrolita i staničnom smrti (Scandalios, 2005). Istraživanja su pokazala porast lipidne peroksidacije u listovima različitih biljnih vrsta u uvjetima suše (Nayyar i Gupta,

2006; Cia i sur., 2012). Unatoč jednako jakoj peroksidaciji lipida, dinamika oporavka u biljaka koje su bile u suši sedam dana i onih u suši osam dana bila je potpuno drugačija. Smanjenje razine lipidne peroksidacije u listovima ječma prethodno izloženim sedmodnevnom zasušivanju kontinuirao je teklo tijekom četiri dana rehidracije i u konačni se razina približila kontrolnoj (Slika 8 A), što ukazuje na visoku tendenciju ka oporavku. S obzirom na RWC koji je posljednjeg dana rehidracije bio jednak kontroli, može se pretpostaviti da bi potpuni oporavak (prema lipidnoj peroksidaciji) uslijedio u slučaju da se period rehidracije produžio i pratio još barem jedan dan. Zalijevanjem biljaka koje su osam dana zasušivane, razina lipidne peroksidacije 24 sata nakon usvajanja vode se oko tri i pol puta smanjila, i uz određene oscilacije (prvo značajno smanjenje nakon 72 sata, zatim povećanje nakon 96 sati) na kraju perioda rehidracije ostala ista, gotovo dvostruko veća od kontrolne (Slika 8 B). Vitkauskaité i Venskaityté (2011) istraživali su utjecaj dvotjedne suše na klijance ječma (faza 2 do 3 lista). Zabilježili su porast koncentracije malondialdehida (MDA) u ječmu za 17,1% u odnosu na kontrolu nakon jake suše, koji je nakon sedam dana oporavka ostao nepromijenjen. Blaga suša nije uzrokovala statistički značajne promijene koncentracije MDA, no nakon usvajanja vode se znatno povećala (za oko 50 % kontrolne vrijednosti). Pretpostavili su da se ta pojava dogodila zbog povećane fotorespiracije.

Pojačana sinteza osmolita, među kojima je i aminokiselina prolin, u uvjetima suše regulira osmotski potencijal u stanicama. Prolin sudjeluje u održavanju hidratiziranog stanja proteina što osigurava i stabilnost membrana pri niskom vodnom potencijalu (Hoekstra i sur., 2001). Također, sudjeluje u uklanjanju singletnog kisika ($^1O_2$) i hidroksilnih radikala (·OH) štiteći tako fotosustav II (Hare i Cress, 1997; Szabados i Savouré, 2010). U ovom radu je zabilježena vrlo velika količina akumuliranog slobodnog prolina u uvjetima suše (Slika 9). Suša koja je trajala osam dana uzrokovala je gotovo dvostruko veću akumulaciju prolina (324,03 ± 15,25 μmol/g sv.t.) nego sedmodnevna suša (168,61 ± 13,72 μmol/g sv.t.). Uslijed usvajanja vode nakon sedam dana suše, tijekom perioda rehidracije količina prolina se kontinuirano smanjivala i u konačnici dosegla razinu kontrole. U prethodnom odlomku pretpostavili smo da bi se razina lipidne peroksidacije spustila do kontrolne da se period rehidracije produžio i pratio još barem jedan

dan. U prilog tome ide i podatak o smanjenju sadržaja slobodnog prolina na kraju rehidracijskog perioda. Budući da prolin sudjeluje u uklanjanju hidroksilnih radikala, smatra se da inhibira lipidnu peroksidaciju (Molinari i sur., 2007). Rehidracija nakon osam dana suše znatno je smanjila količinu akumuliranog prolina, no proces je tekao sporije i nije dosegao razinu kontrole, moguće zbog velike količine hidroksilnih radikala na koje je ukazala i lipidna peroksidacija mjerena tijekom rehidracije nakon osam dana suše. Visoku negativnu korelaciju između količine prolina i RWC-a pokazali su Sperdouli i Moustakas (2012) proučavajući utjecaj suše na fiziološke i biokemijske procese u listovima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). Količina akumuliranog prolina pri deset dana dugoj umjerenoj suši (RWC 79,5 ± 1,5 %) povećala se za oko 6,4 puta u odnosu na kontrole. Smatra se da je stresom potaknuta akumulacija prolina, uočena u različitim biljnim vrstama, djelomično povezana sa procesima aklimatizacije uvjetima suše (Hare i Cress, 1997). Verbruggen i Hermans (2008) su pretpostavili da razgradnja prolina može biti i izvor energije, ugljika i dušika za bolji oporavak. U istraživanju suše i oporavka u listovima kukuruza Efeoğlu i sur. (2009) su zabilježili smanjen sadržaj prolina pri RWC-u od oko 40 %, te potpuni oporavak rehidracijom. Oporavak nakon šest dana rehidracije su pokazali i Li i Peng (2012), koji su proučavali utjecaj suše u trajanju od 12 dana na dva genotipa bijele djeteline (*Trifolium repens* L.).

Fiziološki mehanizam regulacije otvaranja i zatvaranja puči usko je povezan sa kapacitetom fotosinteze. Gubitak vode iz stanica kontroliran je zatvaranjem puči, čime se smanjuje i asimilacija CO_2. Ograničavanje CO_2 dovodi do prekomjerne redukcijie komponenata transportnog lanca elektrona, što u konačnici vodi ka smanjenju fotosintetske aktivnosti (Yordanov i sur., 2000; Mahajan i Tuteja, 2005) i povećanoj produkciji ROS-a (Cruz de Carvalho, 2008). Prisutnost reaktivnih kisikovih jedinki i u ovom je eksperimentu u uvjetima suše indirektno pokazana preko povećnja razine lipidne peroksidacije. Koncentracija fotosintetskih pigmenata u listovima ovisi o različitim stresnim čimbenicima okoline pa tako i nedostatku vode (Yordanov i sur., 2000). Klorofil je ključna molekula za odvijanje svjetlosnih reakcija fotosinteze. Smanjenje RWC-a nakon sedam i osam dana suše praćeno je i znatnim smanjenjem koncentracije klorofila (*a*, *b*, *a*+*b*) (Slike 10 - 12). Smanjenje klorofila u uvjetima jače suše odvija se zbog slabije sinteze

ili zbog brze razgradnje, a utvrđeno je u ječmu (Li i sur., 2006; Marok i sur., 2013; Antunović Dunić i sur., 2015), pšenici (Bürling i sur., 2013), suncokretu (Manivannan i sur., 2007) i mnogim drugim vrstama. Dinamika porasta koncentracije klorofila (*a*, *b*, *a*+*b*) rehidracijom razlikovala se nakon sedam i osam dana suše. Stopa oporavka nakon sedmodnevne dehidracije kontinuirano je rasla svaka 24 sata i u konačnici se približila kontrolnim vrijednostima. Isti proces nakon osmodnevne suše tekao je značajno sporije, koncentracija klorofila (*a*, *b*, *a*+*b*) značajno je porasla nakon 24 sata i uz određene oscilacije do kraja eksperimenta ostala ista kao i početkom rehidracije (Slike 10 - 12). Efeoğlu i sur. (2009) koji su istraživali sušu i oporavak kultivara kukuruza zabilježili su značajno smanjenje koncentracije klorofila u suši (pri RWC-u od oko 40 %) i ponovno povećanje do kontrolnih vrijednosti tijekom rehidracije. No, kukuruz je C4 biljka i poznato je da se bolje prilagođava uvjetima nedostatka vode, za razliku od pšenice i ječma (Ward i sur., 1999; Nayyar i Gupta, 2006).

Smanjena koncentracija klorofila *a* ukazuje na gubitak za fotosintezu ključnih reakcijskih središta PSI i PSII, a time i na funkcionalnost fotosintetskog aparata. Procjena fotosintetske učinkovitosti *in vivo* mjerenjem fluorescencije klorofila *a* jedna je od najčešće korištenih nedestruktivnih metoda u ekofiziološkim istraživanjima (Maxwell i Johnson, 2000). Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u ovom eksperimentu je ispitivan utjecaj suše na učinkovitost fotosintetskog aparata u listovima klijanaca te dinamika oporavka tijekom ponovnog usvajanja vode kroz četiri dana. Maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) opisuje primarnu fotokemiju PSII i odgovara učinkovitosti reakcijskih središta da hvataju fotone apsorbirane svjetlosti (Maxwell i Johnson, 2000). Smanjenje RWC-a 7. i 8. dana suše praćeno je i smanjenjem parametra F_v/F_m. Vrijednosti izmjerene 7. dana (0,78 ± 0,01) i 8. dana (0,76 ± 0,02) suše bile su značajno niže od kontrolnih (Slika 13). Smatra se da vrijednost ovog parametra za većinu biljnih vrsta u optimalnim uvjetima iznosi 0,80 do 0,83 (Schreiber i sur., 1994), a granična vrijednost pri kojoj je PSII funkcionalan 0,75 (Bolhàr-Nordenkampf i sur., 1989). Živčák i sur. (2008) te Sperdouli i Moustakas (2012) su svojim istraživanjima pokazali pozitivnu korelaciju između relativnog sadržaja vode u listu uročnjaka i parametra F_v/F_m pri RWC-u od 70 % odnosno 80 %. Silvestre i sur. (2014) su zabilježili smanjenje parametra F_v/F_m tek u uvjetima kada se RWC spusti ispod

50 %. Brojnim drugim istraživanjima pokazano je da suša i rehidracija imaju prilično slab utjecaj na parametar F_v/F_m (Christen i sur., 2007; Oukarroum i sur., 2007; Campos i sur., 2014), stoga se on smatra neosjetljivim na rane fotosintetske promjene izazvane sušom. S obzirom da su vrijednosti F_v/F_m sedmog i osmog dana suše u ovom eksperimentu bile iznad granične, nije neobično što su se već 48 sati nakon početka rehidracije izjednačile s kontrolama. Miyashita i sur. (2005) pokazali su sličan rezultat sedmog i osmog dana suše u listovima graha. Najbrži pomak u oporavku zabilježen je nakon dva dana rehidracije, a do kraja eksperimenta oporavak se odvijao sporije. Nadalje, u uvjetima suše koja je trajala devet i deset dana, a u kojima je RWC iznosio oko 15 %, parametar F_v/F_m bio je ispod granične vrijednosti (0,72 ± 0,06 za 9. dan odnosno 0,70 ± 0,07 za 10. dan suše) te niti tijekom četiri dana rehidracije nije pokazivao tendenciju porasta. Ovi rezultati, koji su prikazani u poglavlju Prilozi (Tablica 2 i 3), pokazuju nepovratno oštećenje fotosustava II, što potvrđuje našu pretpostavku da bi krajnji trenutak za mogući oporavak mogao biti onaj pri RWC-u od oko 20 % (odnosno u ovom eksperimentu sedmi ili osmi dan suše). Ovakvo drastično smanjenje parametra F_v/F_m ukazuje na prisutnost fotoinhibitorne štete (Maxwell i Johnson, 2000) koju nije moguće popraviti normalnim procesima popravka i zamjene reakcijskih središta (Aro i sur., 1993). U ovom istraživanju kao osjetljiviji pokazatelj fiziološkog statusa ječma bio je indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). U eksperimentu u kojemu je suša trajala sedam dana parametar PI_{ABS} nije bio značajno smanjen u odnosu na kontrolu, pa je i tijekom rehidracije vrijednost ostala slična kontrolama (Slika 14 A). Značajno smanjenje ovog parametra zabilježeno je nakon osam dana suše u usporedbi s kontrolama (Slika 14 B). Tijekom perioda rehidracije proces oporavka tekao je vrlo sporo, no nakon 96 sati došlo je do potpunog oporavka fotosintetske učinkovitosti. Pri RWC-u od oko 15 % (9. i 10. dan suše, Tablica 2 i 3 u poglavlju Prilozi) vrijednosti u suši su bile drastično snižene, kao i tijekom perioda rehidracije što ukazuje na potpunu nefunkcionalnost fotosintetskih procesa kada se biljka nađe u uvjetima toliko snažne suše. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) naziva se još i indeksom vitalnosti jer može zabilježiti stres i prije vidljivih simptoma (Christen i sur., 2007). Važnost ovom parametru daje činjenica da osim primarne fotokemije u njegov izračuna ulaze i podatci o transportu elektrona dalje od primarnog akceptora plastokinona, kao i rasipanje viška ekscitacijske energije u obliku

topline (Strasser i sur., 2004). Njegova osjetljivost zabilježena je tijekom istraživanja različitih vrsta žitarica i mnogih drugih gospodarski važnih biljnih kultura u uvjetima suše (Oukarroum i sur., 2007; Živčák i sur., 2008; Lepeduš i sur., 2012; Silvestre i sur., 2014). Silvestre i sur. (2014) su parametar PI_{ABS} istaknuli kao dobar za selekciju genotipova roda *Lathyrus* tolerantnih na deficit vode. Živčák i sur. (2008) su zabilježili gotovo linearnu korelaciju između parametara RWC i PI_{ABS}, te također zaključili da se na temelju indeksa fotosintetske učinkovitosti može vršiti selekcija tolerantnih genotipova pšenice. Lepeduš i sur. (2012) su nakon istraživanja suše na nekoliko linija kukuruza predložili kombinaciju najvažnijih parametara fluorescencije klorofila *a*, PI_{ABS} i $F_V/F_{m,}$ u svrhu selekcije tolerantnih ili osjetljivih linija. Oukarroum i sur. (2007) zaključili su da indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) ovisi o sorti proučavanog ječma. Zabilježili su smanjenje parametra PI_{ABS} kod većine proučavanih sorata te potpuni oporavak nakon sedam dana zalijevanja, no treba istaknuti da njihov RWC nije bio toliko nizak kao u našem istraživanju. U ovom je radu semikvantitativnom metodom praćena količina velike podjedinice enzima RubisCO (LSU), ključnog za fiksaciju CO_2, čija funkcija izravno utječe na transport elektrona. Smanjenjem količina ovog proteina smanjuje se fiksacija CO_2, što direktno utječe i na smanjenje ukupne fotosinteze (van Heerden, 2007). Relativna razina proteina LSU osmog dana suše je bila smanjena, a već 48 sati nakon početka perioda rehidracije prema "zadebljanju" proteinske vrpce je uočen potpuni oporavak. Iako indeks fotosintetske učinkovitosti, koji se češće povezuje sa ovim proteinom, u isto vrijeme nije bio isti kao u kontrolnim biljkama, primarna fotokemija PSII je upravo 48 sati nakon zalijevanja izjednačena s istim procesima u kontroli.

Osim znanstvenog (fundamentalnog) doprinosa, rezultati ovakvog istraživanja mogli bi se koristiti prilikom oplemenjivačkih procesa odnosno selekcije genotipova ječma tolerantnih na sušu. Također, istraživanja ovakvog tipa mogu se primijeniti za određivanje agrotehničkih mjera u uvjetima suše. Pokazano je da mjerenje fluorescencije klorofila *a*, metodom koja pri tome ne oštećuje biljke, na jednostavan i brz način daje podatke o kritičnom trenutku u kojemu je moguć oporavak rehidracijom pa se prema dobivenim rezultatima može procijeniti krajnje vrijeme za navodnjavanje određene kulture u uvjetima nedostatka vode,

koji se zbog globalnog zatopljavanja mogu očekivati u sve većem obimu. Stoga je važno proučavati sušu i različite procese oporavka kako bi se moglo učinkovitije koristiti dostupne vodne resurse.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja oporavka dehidriranih i slabo vijabilnih klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) rehidracijom dobiveni su sljedeći zaključci:

1. Smanjenje relativnog sadržaja vode (RWC) u listovima klijanaca ječma tijekom stresa izazvanog sušom prouzročilo je povećano nakupljanje produkata peroksidacije lipida (TBARS) što ukazuje na prisutnost oksidativnog oštećenja. Oksidativni stres za posljedicu je imao razgradnju fotosintetskih pigmenata, što se pokazalo kroz smanjenje koncentracije klorofila *a* i *b.* Kao prilagodba na vrlo niski RWC sedmog (24,76 %) i osmog dana suše (20,97 %) u stanicama je akumulirana velika količina slobodnog prolina.

2. U uvjetima rehidracije povećava se RWC, što uzrokuje smanjenje razine lipidne peroksidacije i količine akumuliranog prolina različitom dinamikom u klijancima koji su prethodno bili 7 odnosno 8 dana u suši (unatoč maloj razlici u postotku RWC-a). Potpuni oporavak klijanaca, prateći povratak RWC-a i prolina na razinu kontrola, na kraju perioda rehidracije zabilježen je kod onih koji su bili u stresu sedam dana. Tijekom rehidracije nakon osam dana stresa vrijednosti navedenih parametara su se približile kontrolnim.

3. Smanjenjem RWC-a u uvjetima dehidracije smanjen je maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) sedmog i osmog dana suše, te indeks ukupne fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) i količina velike podjedinice enzima RubisCO (LSU) osmog dana suše. Ipak, fotosintetski aparat je bio funkcionalan unatoč visokom stupnju dehidracije ($F_v/F_m > 0,75$) i razgradnji klorofila.

4. Potpuno učinkovit fotosintetski aparat zabilježen je rehidracijom nakon sedam i osam dana suše. Vrijednosti parametara F_v/F_m, koji opisuje primarnu fotokemiju PSII, izjednačile su se s kontrolama već 48 sati nakon početka rehidracije, u klijanaca koji su bili u suši sedam i osam dana. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u klijancima prethodno izloženim

suši osam dana postigao je kontrolne vrijednosti rehidracijom u trajanju od 96 sati, a detektirana je i ponovna akumulacija proteina RubisCO (LSU).

Kao glavni zaključak provedenog istraživanja treba istaknuti da je kritična točka za mogućnost oporavka fotosintetskih procesa rehidracijom osmi dan suše, odnosno RWC od 21 %. Unatoč tome što se ostali mjereni parametri (RWC, razina lipidne peroksidacije i sadržaj slobodnog prolina) nisu u potpunosti izjednačili s kontrolama pokazana je visoka tendencija ka ponovnom uspostavljanju homeostaze koja je prethodno bila narušena snažnom sušom. Metoda mjerenja fluorescencije klorofila *a*, koja pri tome ne oštećuje biljku, pokazala se kao vrlo učinkovita za ranu detekciju procesa oporavka fotosintetskog aparata nakon oksidativnog oštećenja potaknutog sušom. Metoda je primjenjiva za selekciju tolerantnih sorti ječma, kao i različitih kultivara ostalih gospodarski važnih vrsta. Na temelju rezultata dobivenih ovim *in vivo* mjerenjem može se zaključivati o potrebi navodnjavanja u kritičnom trenutku suše.

6. LITERATURA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of Cell*. Gerland Publishing. Inc., New York. 793-807.

Amrhein N, Apel K, Beginsky S, Buchmann N, Geisler M, Keller F, Körne C, Martinoia E, Merbold L, Müller C, Paschke M, Schmid B. 2012. *Plant response to stress.* Zurich-Basel Plant Science Center, 14 pp.

Andersson I, Backlund A. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Bioch* 46:275-291.

Antunović J. 2013. Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri slabom i jakom osvjetljenju. Doktorski rad, Osijek: 177 str.

Antunović Dunić J, Lepeduš H, Šimić D, Lalić A, Mlinarić S, Kovačević J, Cesar V. 2015. Physiological response to different irradiation regimes during barley seedlings growth followed by drought stress under non-photoinhibitory light. *Journal of Agricultural Science* 7(6):69-83.

Aro EM, Virgin I, Andersson B. 1993. Photoinhibiotion of PSII of photosystem II. Inactivation, protein demage and turnover. *Biochim Biophys* Acta 1143:113-134.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci India* 82:1227-1238.

Bates IS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.

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.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Bürling K, Cerovic GZ, Cornic G, Ducruet JM, Noga G. 2013. Fluorescence-based sensing of drought-induced stress in the vegetative phase of four contrasting wheat genotypes. *Environ Exp Bot* 89:51-59.

Campos H, Trejo C, Peña-Valvidia CB, García-Nava R, Martínez VC, Cruz-Ortega MR. 2014. Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery *Environ Exp Bot* 98:56-64.

Campos PS, Semedo JN, Pais IP, Oliveira M, Passarinho J, Santos M, Almeida AS, Costa AR, Pinheiro N, Bagorro C, Coco J, Costa A, Coutinho J, Maçãs B. 2014. Physiological responses to drought in four developed *Triticum aestivum* groups. *Emir J Food Agric* 27(2):178-185.

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.

Cia MC, Guimarães ACR, Medici LO, Chabregas SM, Azevedo RA. 2012. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. *Ann Appl Biol* 161(3):313-324.

Cooper GM, Hausman RE. 2010. *Stanica: Molekularni pristup* (Lauc G, ur. prijevoda na hrvatski jezik), Medicinska naklada, Zagreb.

Cruz de Carvalho MH. 2008. Drought stress and reactive oxygen species; Production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav* 3(3):156-165.

von Denffer D, Ziegler H. 1982. *Botanika: morfologija i fiziologija.* Školska knjiga, Zagreb.

Efeoğlu B, Ekmekçi Y, Çiçek N. 2009. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *S Afr J Bot* 75:34-42.

Foster K, Lambers H, Real D, Ramankutty P, Cawthray GR, Ryan MH. 2015. Drought resistance and recovery in mature *Bituminaria bituminosa* var. *Albomarginata Ann App Biol* 166:154-169.

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.

Ghotbi-Ravandi AA, Shahbazi M, Shariati M, Mulo P. 2014. Effects of mild and severe drought stress on photosynthetic efficiency in tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *J Agr Crop Sci* 200(6):403-415.

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.

Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill SJ. 2002. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiol Bioch* 40(6-8):611-617.

Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signal Behav* 7:1456-1466.

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6(9):431-438.

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.

Keles Y, Öncel I. 2004. Growth and solute composition in two wheat species experiencing combined influence of stress conditions. *Russ J Plant Physiol* 51:203-209.

Kereša S, Barić M, Horvat M, Habuš Jerčić I. 2008. *Sjemenarstvo* 25(1):35-45.

Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol* 188:655-673.

Lalić A, Abičić I, Kovačević J, Šimić G, Drezner G, Novoselović D, Dvojković K, Guberac V. 2010. Procjena sorti ozimog ječma u uvjetima proizvodnje Republike Hrvatske. *47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture.* Opatija. Croatia (289–293).

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lepeduš H, Cesar V. 2010. *Osnove biljne histologije i anatomije vegetativnih organa.* Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek.

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.

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.

Li Z, Peng Y. 2012. Photosynthetic characeristics and variation of osmoregulatry solutes in two white clover (*Trifolium repens* L.) genotypes in response to drought and post-drought recovery. *Australian Journal of Crop Science* 6(12):1696-1702.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148:350-382.

Lichtenthaler HK. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148:4-14.

Mahajan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139-158.

Mahdid M, Kameli A, Ehlert C, Simonneau T. 2011. Rapid changes in leaf elongation, ABA and water status during the recovery phase following application

of water stress in two durum wheat varieties differing in drought tolerance. *Plant Physiol Bioch* 49:1077-1083.

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.

Marok AM, Tarrago L, Ksas B, Henri P, Abrous-Belbachir O, Havaux M, Rey P. 2013. A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety. *J Plant Physiol* 170:633-645.

Martinčić J, Kozumplik V. 1996. *Oplemenjivanje bilja*. Nacionalna i sveučilišna knjižnica, Zagreb.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51(345):659-668.

Mishra AK, Singh VP. 2010. A review of drought concepts. *J Hydrol* 391:202-216.

Mishra KB, Iannacone 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.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9):405-410.

Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, Freitas de Campos MK, Portela de Carvalho JFRP, Filho JCB, Pereira LFP, Vireira LGE. 2007. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (Saccharum spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol Plantarum*130:218-229.

Morgan JM, Tan, MK. 1996. Chromosomal location of a wheat osmoregulation gene using RFLP analysis. *Aust J Plant Physiol* 23:803-806.

Miyashita K, Tanakamaru S, Maitani T, Kimura K. 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration and stomatal conductance in kidney bean. *Environ Exp Bot* 53:205-214.

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.

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. *P Natl Acad Sci USA* 109:3412-3415.

Oukarroum A, El Madidi S, Schansker G, Strasser RJ. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environ Exp Bot* 60:438-446.

Parry MAJ, Andralojc PJ, Parmar PJ, Keys AJ, Habash D,Paul MJ, Alred R, Quick WP, Servaites JC. 1997. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant Cell Environ* 20:528-534.

Pevalek-Kozlina B. 2003. *Fizologija bilja*. Profil, Zagreb.

Reddy RA, Chaitanya KV, Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Plant Physiol* 161:1189-1202.

Scandalios JG. 2005. Oxidative stres: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38(7):995-1014.

Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. *Ecol Stu* 100:49-70.

Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C R Biologies* 331:215-225.

Sicher RC, Timlin D, Bailey B. 2012. Responses of growth and primary metabolism of water-stressed barley roots to rehydration. *J Plant Physiol* 169:686-695.

Silvestre, S., Araújo, S. S., Vaz Patto, M. C., & Marques da Silva, J. 2014. Performance index: An expeditious tool to screen for improved drought resistance in the *Lathyrus* genus. *J Integr Plant Biol* 56:610-621.

Smart RE, Bingham GE. 1974. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiol* 53:258-260.

Sperdouli 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.

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.

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,* Taylor and Francis, London, 445-483 pp.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2004. *Analysis of chlorophill 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.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. 2006. *Biochemistry*. Sixth edition, W.H. Freeman and Company, New York, 541-588 pp.

Szabados L, Kovács H, Zilberstein A, Bouchereau A. 2011. Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance. *Adv in Bot Res* 57:105-150.

Šimić D, Lepeduš H, Jurković V, Antunović J, Cesar V. 2014. Quantitative genetic analysis of chlorophyll *a* fluorescence parameters in maize in the field environments. *J Integr Plant Biol* 56:695-708.

Taiz L, Zeiger E. 2010. *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts U.S.A.

van Heerden PDR, Swanepoel JW, Krüger GHJ. 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrubspecies exhibiting C3-mode CO_2 assimilation. *Environ Exp* Bot 61:124-136.

Verbruggen N, Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* 35:753-759.

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.

Vitkauskaité G, Venskaityté L. 2011. Differences between C3 (*Hordeum vulgare* L.) and C4 (*Panicum miliaceum* L.) plants with respect to their resistance to water deficit. *Zemdirbyste* 98(4):349-356.

Vranova E, Atichartpongkul S, Villarroel R, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W. 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *P Natl Acad Sci USA* 99**:**10870-10875.

Yang Z, Xu L, Yu J, DaCosta M, Huang B. 2013. Changes in Carbohydrate Metabolism in Two Kentucky Bluegrass Cultivars during Drought Stress and Recovery. *J Am Soc Hortic Sci* 138(1):24-30.

Yamasaki S, Dillenburg LR. 1999. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. *Rev Bras Fisiol Veg* 11(2):69-75.

Yordanov I, Velikova V, Tsonev T. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38(1):171-186.

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.

Ward JK, Tissue DT, Thomas RB, Strain BR. 1999. Comparative responses of model C3 and C4 plants to drought in low and elevated CO_2. *Glob Change Biol* 5:857-867.

Weatherley PE. 1950. Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytol* 49:81-97.

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

Živčák M, Brestič M, Olšovská K, Slamka P. 2008. Performance index as a sensitive indicator of water stressin *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ* 54(4):133-139.

Web izvori:

1. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Illustration_Hordeum_vulgare1.jpg, 16.02.2015.
2. http://legacy.hopkinsville.kctcs.edu/instructors/Jason-Arnold/VLI/Module%202/m2cellstructure/m2cellstructure6.html, 10.4.2015.
3. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/18/Thylakoid_membrane.png, 17.2.2015.
4. https://wikispaces.psu.edu/display/Biol230WFall09/Photosynthesis, 10.4.2015.
5. https://www.bioscience.org/2012/v17/af/3947/fulltext.php?bframe=figures.htm, 10.4.2015.

7. PRILOZI

Tablica 2. Srednje vrijednosti i standardne devijacije provedenih analiza na klijancima ječma *Hordeum vulgare* L. u trećem eksperimentu u kojemu su biljke bile izložene suši 9 dana.

				Period oporavka rehidracijom			
		0.dan	**9.dan suše**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
RWC (%)	Kontrola	95.84 ± 1.42 e	95.21 ± 0.98 e	96.62 ± 0.97 e	96.87 ± 1.14 e	96.75 ± 0.99 e	95.49 ± 4.54 e
	Tretman	95,78 ± 1.41 e	15.10 ± 0.61 a	48.53 ± 7.46 b	72.49 ± 10.02 d	70.51 ± 4.25 d	64.13 ± 7.47 c
LIPIDNA PEROKSIDACIJA (nmol/g sv.t.)	Kontrola	3,26 ± 0 18 a	4,80 ± 0,25 a	5,58 ± 0,51 a	5,55 ± 0, 16 a	5,09 ± 0,24 a	4,63 ± 0,19 a
	Tretman	3,23 ± 0,25 a	37,16 ± 5,15 d	13,86 ± 0,63 c	13,52 ± 0,72 c	12,88 ± 0,56 bc	10,54 ± 0,67 b
PROLIN (µmol/g sv.t.**)**	Kontrola	1,22 ± 0,46 a	0,96 ± 0,19 a	0,72 ± 0,01 a	0,89 ± 0,27 a	0,93 ± 0 09 a	0,80 ± 0,12 a
	Tretman	1,15 ± 0,10 a	288,81 ± 18,23 f	76,05 ± 1,82 e	51,41 ± 2,60 d	39,87 ± 1,13 c	29,14 ± 2,60 b
Chl *a* (mg/g s. t.)	Kontrola	14,35 ± 0,56 f	12,86 ± 0,10 e	10,23 ± 0,61 d	12,41 ± 0,42 e	9,83 ± 2,00 d	12,51 ± 0,22 e
	Tretman	14,79 ± 0,70 f	5,33 ± 0,21 a	7,1 ± 0,18 c	6,17 ± 0,17 b	6,82 ± 0,05 c	7,27 ± 0,09 c
Chl *b* (mg/g s. t.)	Kontrola	4,75 ± 0,11 g	4,44 ± 0,16 f	3,54 ± 0,24 e	4,37 ± 0,16 f	3,46 ± ,05 e	4,43 ± 0,08 f
	Tretman	4,82 ± 0,28 g	1,69 ± 0,02 a	2,20 ± 0,08 b	2,18 ± 0,07 b	2,47 ± 0,06 c	2,87 ± 0,14 c
Chl *a+b* (mg/gs. t.)	Kontrola	19,10 ± 0,66 g	17,30 ± 0,17 f	13,77 ± 0,85 e	16,78 ± 0,58 f	13,29 ± 0,25 e	16,94 ± 0,31 f
	Tretman	19,61 ± 0,97 g	7,01 ± 0,22 a	9,30 ± 2,60 c	8,35 ± 0,24 b	9,30 ± 0,10 c	10,14 ± 0,12 d
Fv/Fm (Relativne jedinice)	Kontrola	0,82 ± 0,00 e	0,78 ± 0,01 d	0,78 ± 0,01 d	0,78 ± 0,01 d	0,78 ± 0,01 d	0,78 ± 0,01 d
	Tretman	0,82 ± 0,00 e	0,72 ± 0,06 c	0,61 ± 0,18 ab	0,69 ± 0,09 b	0,62 ± 0,16 ab	0,57 ± 0,14 a
PI_{ABS} (Relativne jedinice)	Kontrola	3,32 ± 0,25 e	1,60 ± 0,24 d	1,59 ± 0,22 d	1,51 ± 0,22 d	1,58 ± 0,20 d	1,49 ± 0,21 d
	Tretman	3,29 ± 0,22 e	0,95 ± 0,33 c	0,54 ± 0,37 b	0,57 ± 0,30 b	0,48 ± 0,39 ab	0,36 ± 0,31 a

Tablica 3. Srednje vrijednosti i standardne devijacije provedenih analiza na klijancima ječma *Hordeum vulgare* L. u četvrtom eksperimentu u kojemu su biljke bile izložene suši 10 dana.

				Period oporavka rehidracijom			
		0.dan	**10. dana suše**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
RWC (%)	Kontrola	95.84 ± 1.42 f	96.62 ± 0.97 f	96.87 ± 1.14 f	96.75 ± 0.99 f	95.49 ± 4.54 f	96,48 ± 1 38 f
	Tretman	95,78 ± 1.41 f	15,38 ± 0,56 a	40,76 ± 2,85 b	44,99 ± 3,72 c	53,22 ± 7,05 d	59,61 ± 5,71 e
LIPIDNA PEROKSIDACIJA (nmol/g sv.t.)	Kontrola	3,26 ± 0 18 a	5,58 ± 0,51 b	5,55 ± 0, 16 b	5,09 ± 0,24 b	4,63 ± 0,19 b	4,70 ± 0,13 b
	Tretman	3,23 ± 0,25 a	48,00 ± 1,59 f	17,40 ± 1,30 e	14,81 ± 1,33 cd	15,58 ± 0,33 d	13,87 ± 0,21 c
PROLIN (µmol/g sv.t.**)**	Kontrola	1,22 ± 0,46 a	0,72 ± 0,01 a	0,89 ± 0,27 a	0,93 ± 0 09 a	0,80 ± 0,12 a	0,87 ± 0,14 a
	Tretman	1,15 ± 0,10 a	325,91 ± 7,72 e	119,33 ± 3,48 d	72,51 ± 6,14 c	67,37 ± 1,81 c	61,82 ± 3,93 b
Chl *a* (mg/g s. t.)	Kontrola	14,35 ± 0,56 g	10,23 ± 0,61 d	12,41 ± 0,42 f	9,83 ± 2,00 d	12,51 ± 0,22 f	10,85 ± 0,27 e
	Tretman	14,79 ± 0,70 g	5,04 ± 0,12 b	0,69 ± 0,02 a	6,61 ± 0,20 c	6,4 ± 0,12 c	6,10 ± 0,14 c
Chl *b* (mg/g s. t.)	Kontrola	4,75 ± 0,11 g	3,54 ± 0,24 d	4,37 ± 0,16 f	3,46 ± ,05 d	4,43 ± 0,08 f	3,95 ± 0,24 e
	Tretman	4,82 ± 0,28 g	1,54 ± 0,04 b	0,23 ± 0,01 a	2,49 ± 0,11 c	2,37 ± 0,04 c	2,39 ± 0,09 c
Chl *a+b* (mg/gs. t.)	Kontrola	19,10 ± 0,66 g	13,77 ± 0,85 d	16,78 ± 0,58 f	13,29 ± 0,25 d	16,94 ± 0,31 f	14,08 ± 0,51 e
	Tretman	19,61 ± 0,97 g	6,58 ± 0,16 a	0,92 ± 0,03 a	9,10 ± 0,31 c	8,73 ± 0,15 c	8,49 ± 0,22 c
Fv/Fm (Relativne jedinice)	Kontrola	0,82 ± 0,00 e	0,78 ± 0,01 de	0,78 ± 0,01 de	0,78 ± 0,01 d	0,78 ± 0,01 d	0,77 ± 0,01 d
	Tretman	0,82 ± 0,00 e	0,70 ± 0,07 c	0,63 ± 0,13 b	0,62 ± 0,12 b	0,52 ± 0,11 a	0,60 ± 0,12 b
PI_{ABS} (Relativne jedinice)	Kontrola	3,32 ± 0,25 e	1,59 ± 0,22 e	1,51 ± 0,22 de	1,58 ± 0,20 e	1,49 ± 0,21 de	1,43 ± 0,18 d
	Tretman	3,29 ± 0,22 e	0,77 ± 0,30 c	0,44 ± 0,27 b	0,42 ± 0,40 b	0,18 ± 0,14 a	0,39 ± 0,35 b