FIZIOLOŠKI ODGOVOR KLIJANACA KRASTAVCA (Cucumis sativus L.) NA TRETMANE SJEMENA DONORIMA SUMPOROVODIKA (H2S)

Galić, Vlatko

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josip Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:370480

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Vlatko Galić, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo-Ishrana bilja i tloznanstvo

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KLIJANACA KRASTAVCA (*Cucumis sativus* L.) NA TRETMANE SJEMENA DONORIMA SUMPOROVODIKA (H_2S)

Diplomski rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Vlatko Galić, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo-Ishrana bilja i tloznanstvo

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KLIJANACA KRASTAVCA (*Cucumis sativus* L.) NA TRETMANE SJEMENA DONORIMA SUMPOROVODIKA (H_2S)

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Prof.dr.sc. Tihana Teklić, predsjednik
2. Doc.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor
3. Prof.dr.sc. Nada Parađiković, član

Osijek, 2014.

Sadržaj

1. UVOD 2
1.1. Morfološka svojstva i uvjeti uzgoja krastavca 2
1.2. H_2S i stanični prijenos signala 4
1.3. Cilj istraživanja 5
2. PREGLED LITERATURE 6
3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. Postavljanje pokusa i korištena oprema 17
3.2. Priprema biljnog materijala i analize 18
3.2.1. Određivanje sadržaja slobodnog prolina 18
3.2.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije 18
3.2.3. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida 19
3.3. Obrada podataka 20
4. REZULTATI 21
5. RASPRAVA 32
6. ZAKLJUČAK 39
7. POPIS LITERATURE 40
8. SAŽETAK 43
9. SUMMARY 44
10. POPIS TABLICA 45
11. POPIS SLIKA 47
12. POPIS GRAFIKONA 48
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 49
BASIC DOCUMENTATION CARD 50

1. UVOD

Krastavac je jednogodišnja biljka iz porodice tikvenjača (*Cucurbitaceae*). Neki autori su mišljenja kako potječe iz Azije dok drugi smatraju da potječe iz tropskih dijelova Afrike. Uzgoj krastavca u staklenicima je počeo u 19. stoljeću, a od tada se uzgaja kako u zatvorenim prostorima, tako i na polju. Uzgaja se kao salatni krastavac za konzumaciju u svježem stanju ili kornišon za industrijsku proizvodnju i preradu (kiseljenje). Za prehranu ljudi se koriste mladi plodovi čije je sjeme u početnoj fazi razvoja. U Hrvatskoj se krastavac uzgaja na površinama od 5500 ha na otvorenom s prinosom od 7,4 t/ha dok se prinosi u zaštićenim prostorima kreću od 25-40 kg/m^2 (Parađiković, 2009.).

Krastavac je jednodomna biljka i razvija muške i ženske cvjetove na istoj vriježi. Ukoliko se na vriježi razvija veći broj muških cvjetova, prinos je niži. Na tržištu postoje hibridi krastavca koji razvijaju isključivo ženske cvjetove ginoecejskog i partenokarpnog tipa (Matotan, 1994.). Cvjetovi partenokarpnog tipa favoriziraju pojavu partenokarpije, odnosno razvoja ploda bez prethodne oplodnje. Ginoecejski hibridi daju omjeru više ženskih cvjetova što znači i stvaranje ploda, ali u ukupnoj količini sjemena nalazi se i mala količina onoga koje će dati više muških cvjetova što uz prisutstvo oprašivača jamči oplodnju.

1.1. Morfološka svojstva i uvjeti uzgoja krastavca

Korijen raste pretežito u širinu, prodirući u dubinu 30-50 cm. Rast korijena ne prati rast nadzemne mase pa tako omjer korijena i nadzemne mase u punoj rodnosti može biti 1:10 do 1:20 ili čak 1:100 kod uzgoja u zaštićenim prostorima (Lešić i sur. 2002.).

Stabljika se grana na više postranih izboja i može biti završenog (s cvati na vrhu) ili nezavršenog (kada raste cijelu vegetaciju) tipa. Stabljika može rasti i preko 8 m u duljinu. Iz pazušaca listova na stabljici se razvijaju sekundarne vriježe a iz njih vriježe nižeg reda. Stabljika se širi po tlu, no u modernim se sustavima uzgoja osigurava potpora za penjanje pomoću vitica.

Listovi krastavca su kao i kod većine predstavnika porodice dlakavi i krupni, nalaze se na dugim peteljkama, a plojka je od trokutastog do peterokutnog oblika (*Slika 1.*). U pazušcima listova razvijaju se duge i spiralno razvijene vitice te cvjetovi. Na istoj se biljci nalaze odvojeno muški i ženski cvjetovi. Muški dolaze u obliku 3-5 združenih grozdastih cvati i uglavnom se nalaze na glavnoj stabljici, dok ženski imaju zadebljalu i izduženu plodnicu iz koje se razvija plod. Kod hibrida bez muških cvjetova, svaki cvijet daje plod.

Plod krastavca je cilindrična i uglavnom savijena boba najčešće bradavičaste ili bodljaste površine, svijetlo do tamno zelene boje. Sjeme je blijedo žute do potpuno bijele boje i glatke površine, a masa 1000 sjemenki ovisi o kultivaru i uglavnom je 20-30 g. Broj sjemenki u plodu također ovisi o sorti i kultivaru. U poludugom salataru, u dobro razvijenom plodu, moguć je broj od 200-350 sjemenki.



Slika 1. Morfologija krastavca (*Cucumis sativus* L.)
Izvor: http://plantelemedicinale.info/a-e/castravete/

Za razvoj na otvorenom, potrebna je srednja dnevna temperatura viša od 15ºC, a optimalna je 25-27ºC. Cvatnja započinje pri 15-17ºC, dok je za oprašivanje idealno 18-21ºC. Od zametanja plodova do berbe potrebno je 30-40 dana. Plodonošenje traje 45-75 dana, a brzina razvoja plodova ovisi o broju plodova na biljci. Biljka je s visokim zahtjevima za vodom i traži visoku relativnu vlažnost zraka. Idealna vlažnost tla je oko 70% maksimalnog kapaciteta tla za vodu.

1.2. H_2S i stanični prijenos signala

Uloga sumporovodika (H_2S) kao signalne molekule kod biljaka već je dugi niz godina predmet raznih istraživanja. Poznate su neke uloge reaktivnih kisikovih (ROS eng. *reactive oxygen species*) i dušikovih (RNS eng. *reactive nitrogen species*) jedinki kod prijenosa signala u biljkama. Neki od najistraživanijih ROS su vodik peroksid (H_2O_2) i superoksidni anion O_2^-, a od RNS je dušik oksid (NO). Da bi neka molekula bila smatrana signalnom komponentom prvo mora zadovoljiti određene kriterije (Hancock i sur., 2011.). Gledano na staničnoj razini, signalne molekule se moraju proizvoditi u slučaju potrebe i kretati prema mjestu gdje će biti prepoznate te izazvati stanični odgovor. Nakon staničnog odgovora, moraju postojati fiziološki putovi kojima će se ukloniti signalne molekule kada prestane potreba za njihovim djelovanjem. Osim toga, signalne komponente su često u međusobnoj interakciji tvoreći tako mrežu unakrsnog provođenja signala.

Istraživanja na biljkama su pokazala kako H_2S ima različite učinke na modulacije nekih fizioloških procesa u uvjetima stresa izazvanog teškim metalima, temperaturnim ekstremima ili povišenim sadržajem soli. Fu i sur. (2013.) navode kako je sadržaj H_2S intenzivo porastao kao odgovor na izlaganje biljke vinove loze (*Vitis vinifera* L.) niskim temperaturama.

H_2S se kod sisavaca proizvodi iz L-cisteina u najmanje četiri različite reakcije koje uključuju enzime liaze i aminotransferaze, te otpuštanje sulfidnog iona s aminokiselinskog ostatka. Homolozi ovih enzima utvrđeni su i u biljnim tkivima te je uočeno njihovo sudjelovanje u proizvodnji H_2S. Potvrđeno je da H_2S sudjeluje u odgovoru biljaka na stres izazvan niskim temperaturama uz značajno smanjenje sadržaja superoksidnog aniona, smanjenje lipidne peroksidacije i permeabilnosti stanične membrane te povećanje aktivnosti SOD enzima.

H_2S je plin te bi direktno tretiranje biljaka bilo moguće samo fumigacijom. Druga je opcija tretiranje sjemena donorima H_2S. Prema Lee i sur. (2011.) tretmani s nedavno sintetiziranim donorom H_2S GYY4137 pokazuju kako produžno djelovanje otpuštanja sumporovodika razgradnjom te molekule može trajati i do tjedan dana, a homolog te molekule bez sumpora ne pokazuje nikakvo biološko djelovanje. NaHS je donor koji čak i u dvostruko višoj koncentraciji nego GYY4137 pokazuje djelovanje tek do jednoga sata kada je sav H_2S otpušten, a supstrat potrošen. Razlog tomu su kemijska svojstva NaHS. Radi se o spoju koji se koristi kao krutina ili vodena otopina, a ima miris na sumporovodik. Porijeklo mirisa je konstantna reakcija hidrolize krutine s vlagom iz zraka.

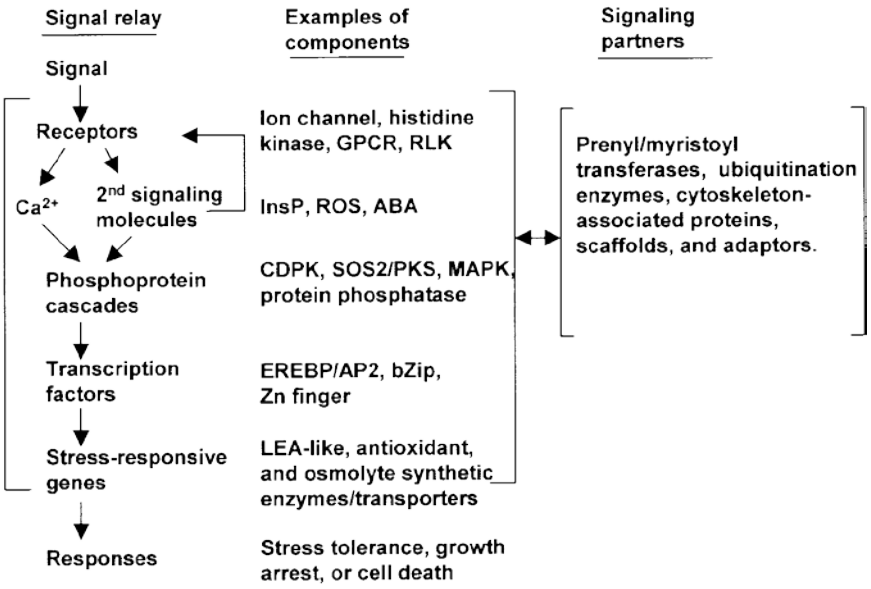
1.3. Cilj istraživanja

1. Analizom nekih molekularnih parametara utvrditi jesu li klijanci krastavca dobiveni iz sjemena različitih proizvodnih godina te naklijavanog u otopini niske koncentracije NaCl bili pod stresom.
2. Utvrditi da li je tretman sjemena donorima H_2S značajno utjecao na fiziološki odgovor u hipokotilima krastavca naklijavanih pri povišenoj razini soli.
3. Utvrditi na koje je molekularne pokazatelje stresa tretman sjemena donorima H_2S značajno utjecao.
4. Utvrditi da li postoji razlika u fiziološkom odgovoru obzirom na primijenjeni donor sumporovodika.
5. Utvrditi da li postoje razlike u fiziološkom odgovoru na tretmane obzirom na starost sjemena.

Osnovna hipoteza istraživanja je bila da H_2S značajno utječe na fiziološki odgovor klijanaca na povišenoj razini soli, te da postoje značajne razlike između primijenjenih donora H_2S; NaHS i GYY4137. Analize biljnog tkiva trebale bi pokazati jesu li pokrenuti fiziološki mehanizmi odgovora na stres. Provedene su analize sadržaja slobodnog prolina, intenziteta lipidne peroksidacije, te utvrđivanje sadržaja vodikovog peroksida u hipokotilu.

2. PREGLED LITERATURE

Xiong i sur. (2002.) objašnjavaju kako generički putevi provođenja staničnog signala kod stresa započinju percepcijom signala praćenom stvaranjem sekundarnih glasnika (inozitol-fosfata i reaktivnih oblika kisika ROS - *eng. reactive oxygen species*). Sekundarni glasnici mogu potaknuti nakupljanje Ca^{2+} iona u citosolu, često izazivajući početak kaskade fosforilacije proteina uključenih u staničnu obranu ili aktivaciju transkripcijskih faktora koji kontroliraju specifične setove gena. Produkti nastali aktivacijom tih gena mogu sudjelovati u sintezi regulatornih molekula poput hormona abscisinske kiseline (ABA), etilena i salicilne kiseline. Regulatorne molekule mogu započeti drugi krug signalizacije koji može pratiti već opisan generički put signala iako često s drugim komponentama (*Slika 3.*). Provođenje signala zahtijeva prikladnu vremensku i prostornu koordinaciju svih signalnih komponenti. Osim komponenti direktno uključenih u prijenos signala, postoje i druge indirektno vezane komponente koje sudjeluju u modifikaciji, transportu ili sintezi signalnih komponenti. Prisutstvo i točnost tih molekula također je od kritične važnosti za pravilan prijenos stresnog signala. Najčešće su to molekule koje mogu modificirati proteine poput enzima za metilaciju, ubikvitaciju, glikozilaciju i lipidaciju proteina, proteina vezanih na citoskelet te manjih molekula adaptera i skeleta.

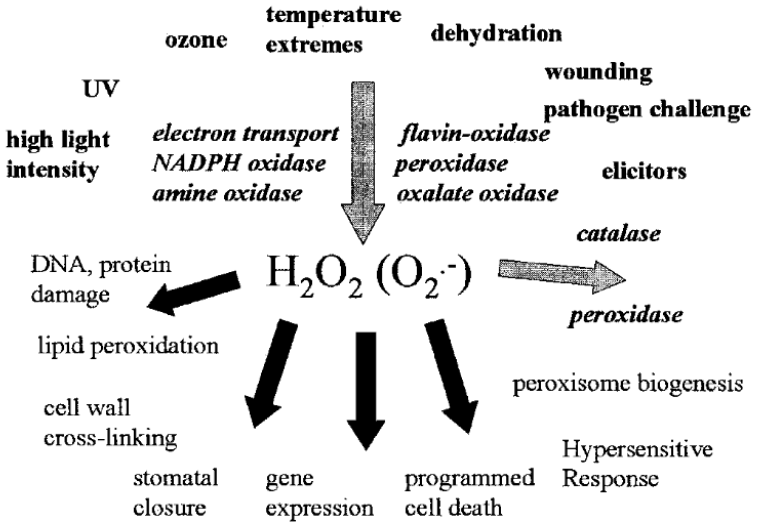


Slika 2. Shema provođenja signala u uvjetima stresa (Xiong i sur. 2002.)

Hancock i sur. (2011.) navode kako postoji nekoliko relativno reaktivnih tvari za koje se smatra da igraju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji kod biljaka. Te tvari uključuju reaktivne jedinke kisika (ROS) u koje između ostalih ubrajamo i vodik peroksid te reaktivne dušikove jedinke (RNS; *eng. reactive nitrogen species*) poput dušikovog oksida (NO). Do nedavno,

sumporovodik (H_2S) je smatran fitotoksinom, ali se pojavljuje sve veći broj znanstvenih dokaza koji upućuju na to da ovaj spoj također sudjeluje u kaskadnim reakcijama prijenosa staničnog signala, te ga uz NO i H_2O_2 znanstvenici smatraju trećim plinovitim spojem uključenim u stanični signaling (*eng. gasotransmitters*). U višim koncentracijama, sumporovodik djeluje toksično inhibirajući enzime poput citokrom c oksidaze, zaustavljajući tako kaskadu prijenosa elektrona u procesu staničnog disanja, međutim u niskim koncentracijama njegov učinak na fiziološke procese može biti pozitivan. Istraživanjima je potvrđen pozitivni utjecaj na rast i razvoj biljaka u fazi formiranja adventivnog korijenja zatim na otvorenost puči kao i na toleranciju biljaka na povišene koncentracija metala poput bakra i aluminija. Također je potvrđen i njegov utjecaj na metabolizam cisteina i glutationa, ali i na neke druge stanične puteve koji su uključeni u odgovor na nepovoljne uvjete okoline, a dokazana je i njegova interferencija sa NO signalnim putevima.

Uloga NO kao signalne komponente u biljkama je primijećena još 1998. godine. Ipak, još je uvijek polemika posjeduju li biljke vlastiti enzim dušik-oksid sintetazu (NOS eng. *nitric oxid synthetase*) poput sisavaca. Osim što je nepoznata reakcija sinteze NO, on zadovoljava sve preduvjete da bi bio smatran signalnom molekulom. Kod ljudi i životinja enzim dušik oksid sintetaza je otkriven 1990-ih te su dobro poznate i opisane njegove forme i funkcija. Poznato je da kao supstrat koristi L-arginin, proizvodi hidroksil-arginin intermedijer te citrulin i NO. Po svojoj fiziološkoj reakciji taj enzim ima najviše sličnosti s enzimom P450 reduktaza kod biljaka. Hancock (2012.) navodi moguću kompleksnost enzima kao prepreku u otkrivanju istog. Premda je cijeli genom biljaka poput uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) poznat već neko vrijeme, iznenađujuće je da NOS enzim kod biljaka još uvijek nije otkriven, ako uopće i postoji. Moguće je da je reakcija koju taj enzim pokreće vrlo kompleksna i zahtijeva uključenost više vezajućih mjesta za kofaktore i prostetske redoks skupine poput flavina ili hema što navodi na zaključak da je enzim multipeptid i da je to uzrok poteškoćama u njegovu otkrivanju. Premda postoji nekoliko teorija o postojanju NOS u stanicama biljaka, neki od dokaza upućuju na enzimatsku aktivnost sličnu NOS koja proizlazi iz reakcija nastanka citrulina iz arginina uz oslobađanje NO. Najviše razmatrana teorija drži se peroksizoma kao mjesta moguće NOS aktivnosti. U uvjetima stresa otkriven je porast razine NO u citoplazmi zajedno s porastom aktivnosti peroksizoma. Koji je god mehanizam nastanka i percepcije NO u biljkama, činjenica je da ta molekula ima ulogu u mnogim fiziološkim događajima poput grananja korijena, otvaranja puči, cvjetanja, funkcioniranja korijenskih nodula i korjenovog geotropnog odgovora.



Slika 3: H_2O_2 signalizacija kod biljaka. Sive strelice pokazuju moguće puteve sinteze i degradacije dok crne predstavljaju potencijalne učinke H_2O_2 (Neil i sur., 2002.).

H_2O_2 kao neradikalni derivat kisika je također oblik ROS te je u bazalnom metabolizmu stalno prisutan, međutim u uvjetima oksidativnog stresa nastaje povećanim intenzitetom. Oksidativni stres nastaje uslijed neravnoteže između proizvodnje ROS i mogućnosti stanice da fiziološkim putovima ukloni njihov višak. H_2O_2 se generira iz superoksidnog aniona u nekontroliranim uvjetima tijekom elektronskog transporta u fotosintezi ili mitohondrijalnoj respiraciji (*Slika 2.*). Proizvodnja H_2O_2 u reakcijama transporta elektrona značajno raste kao odgovor na okolišni stres, poput preintenzivnog osvjetljenja (intenzivna ekscitacija elektrona), suše ili pothlađivanja. H_2O_2 i druge reaktivne jedinke kisika proizvedene njegovim metabolizmom mogu imati razne štetne učinke na organizam poput oštećenja DNA i proteina te lipidne peroksidacije. Međutim, biljke posjeduju enzimatske i neenzimatske antioksidativne mehanizme kojima neutraliziraju štetno djelovanje ROS u stanicama. Iz kojeg god izvora dolazio, poznato je da H_2O_2 djeluje kao signalna molekula i potiče čitav niz molekularnih, biokemijskih i fizioloških odgovora unutar stanice i biljke (Hancock i sur., 2011.).

Lisjak (2012.) navodi istraživanja provedena na uročnjaku (*Arabidopsis thaliana L.*) i paprici (*Capsicum annuum* L.) kao dokaze o utjecaju H_2S na neke fiziološke procese i njegovom signalnom djelovanju u interakciji s NO signalnim putevima. Istraživani su signalni putevi uključeni u regulaciju rada puči, a ispitivan je i utjecaj tretmana biljaka donorima H_2S (NaHS i GYY4137) i NO (donor SNP) pri solnom stresu. Kod obje biljne vrste je zaključeno da oba

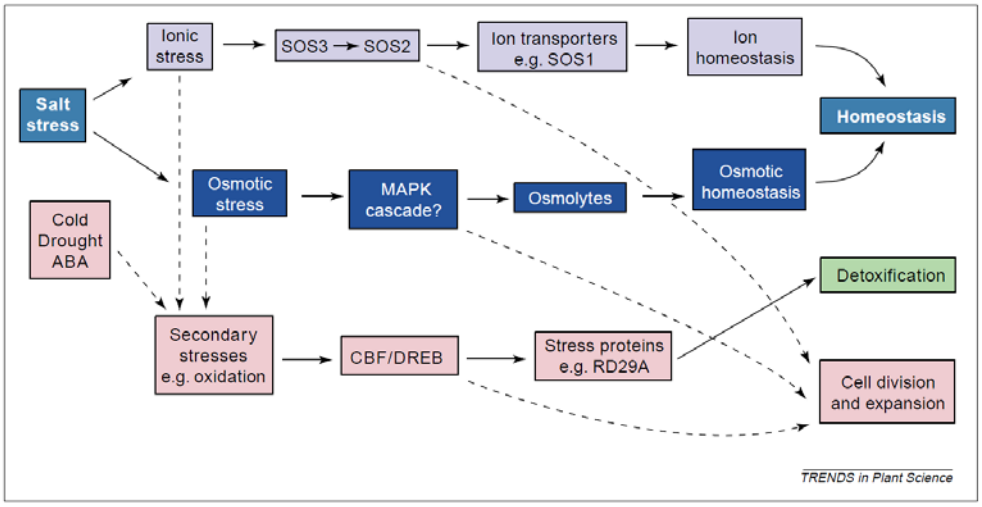
korištena donora H_2S inhibiraju zatvaranje puči regulirano ABA signalnim putevima te smanjuju akumulaciju NO. Dokazano je i različito djelovanje donora NO i H_2S kod reakcije biljaka na solni stres pa je tako u listu biljaka tretiranih s NaHS utvrđena pojačana antioksidativna aktivnost, koja je bila veća nego pri tretmanu sa sporo otpuštajućim donorom sumporovodika GYY4137. Rezultati tog istraživanja su ukazali na interakcije H_2S i NO u staničnom prijenosu signala u normalnim uvjetima kao i kod solnog stresa.

Fu i sur. (2013.) navode H_2S kao važnu signalnu molekulu u nekoliko procesa zaduženih za obranu od sušnog stresa i stresa izazvanog teškim metalima. Malo je poznato o ulozi H_2S kod stresa izazvanog niskim temperaturama. Rezultati istraživanja navedenih autora pokazuju da uslijed stresa izazvanog niskim temperaturama dolazi do povećanja razine H_2S, aktivnosti H_2S sintetaze (L-/D-cistein desulfohidraza, L/DCT) i ekspresije L/DCT gena kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Klijanci su tretirani s NaHS i hipotaurinom (HT - sakupljač H_2S) pri temperaturi od 4˚C kako bi se utvrdio utjecaj egzogenog H_2S na biljke. Biljke tretirane s NaHS pokazale su visoku aktivnost superoksid dismutaze i pojačanu ekspresiju VvICE1 i VvCBF3 gena (geni uključeni u stanični odgovor na nisku temeperaturu), ali i nisku razinu superoksidnog radikala, malondialdehida (MDA) te slabiju propusnost stanične membrane. Biljke tretirane hipotaurinom pokazale su izostanak efekta djelovanja H_2S. Navedena istraživanja ukazuju na vjerojatnost direktne uključenosti H_2S u provođenje signala kod stresa izazvanog niskim temperaturama.

Zhu (2001.) navodi solni stres kao abiotski stres koji na svjetskoj razini predstavlja najveći problem za poljoprivrednu proizvodnju. Transgene biljke otporne na solni stres pokazuju i dobra svojstva otpornosti na druge vrste stresa poput stresa izazvanog niskim, odnosno visokim temperaturama te nedostatkom vode. Idealan genetički model, koji bi bio otporan na višestruki abiotski stres je teško pronaći. Autor kao moguću prekretnicu u istraživanjima navodi novootkrivenu halofitnu biljku *Thellungiella halophilia* koja bi osigurala novi model za ispitivanje tolerancije na stres umjesto uročnjaka (glikofit). Solni stres remeti staničnu homeostazu u vodnom potencijalu i ionskoj distribuciji. Poremećaji u homeostazi se očituju kako na staničnoj razini, tako i na cijeloj biljci te mogu voditi do molekularnih oštećenja, blokiranja rasta ili čak smrti. Kako bi se postigla tolerancija na povećane koncentracije soli, važna su tri aspekta biljne aktivnosti. Prvo, šteta mora biti izbjegnuta ili ublažena. Drugo, homeostatski uvjeti moraju biti ponovno uspostavljeni u novonastalim uvjetima stresa. Treće, rast se mora nastaviti, makar i smanjenim intenzitetom (*Slika 4*).

Reaktivni kisikovi intermedijeri (ROI; *eng. reactive oxygen intermediates*) su dugo godina smatrani toksičnim nusproduktima aerobnih organizama čiji se štetni efekt neutralizira antioksidansima (Mittler, 2002.). U novije se vrijeme pokazalo kako biljke aktivno proizvode ROS kao signalne molekule za kontrolu procesa poput apoptoze, odgovora na abiotski stres ili signalizaciju kod obrane od patogena. Nedavno je započeto kreiranje mutanata u svrhu proučavanja mikrookruženja stanice s promijenjenim ROS sakupljačkim mehanizmima kako bi se utvrdili mehanizmi održavanja stabilne razine ROS u stanici. Također, otkriveni su i ključni koraci u provođenju signala koji reagiraju na prisustvo ROS.

Miller i sur. (2010.) navode kako aklimatizacija biljke na promjene u okolišu zahtijeva postizanje nove razine stanične homeostaze, ustrojavanjem finog balansa između nekoliko molekularnih puteva kod različitih staničnih organela. Takva se precizna koordinacija remeti u tijeku vodnog stresa ili stresa izazvanog visokim razinama soli, a pogotovo kada se biljka izloži naglom padu vodnog potencijala ili kada su u stres uključeni i drugi okolišni čimbenici. Kada fiziološki putevi između organela nisu usklađeni, elektroni visoke energije ioniziraju elementarni kisik (O_2) tvoreći reaktivne kisikove jedinke (ROS).



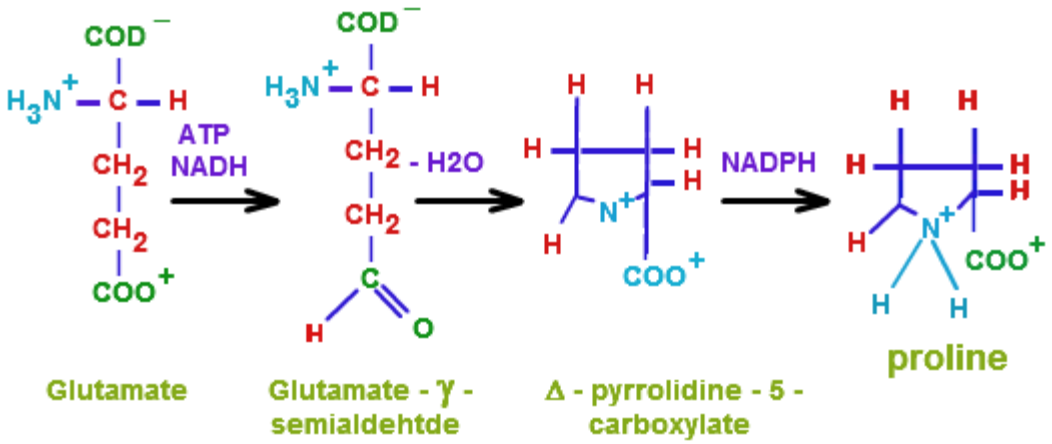
Slika 4. Tri aspekta tolerancije stresa kod biljaka (homeostaza, detoksifikacija i kontrola rasta) i putevi koji ih povezuju. Homeostaza je odvojena na ionsku i osmotsku homeostazu. SOS put posreduje između homeostaze i Na^+ tolerancije. Pretpostavlja se kako na osmotsku homeostazu djeluje kaskada reakcija aktivirana mitogen proteinskim kinazama (MAPK eng. *mitogen-activated-protein kinase*). Dvije vrste primarnog stresa, solni i osmotski, izazivaju direktna oštećenja ili pojavu sekundarnog, oksidativnog stresa. Za proteine poput RD29A se pretpostavlja da imaju veze s detoksifikacijom i umanjivanjem štete nastale stresom. Transkripcijski faktori CBF/DREB posreduju u transkripciji gena zaduženih za stvaranje stresnih proteina kao odgovor na sekundarni stres uzrokovan visokim koncentracijama soli, hladnoćom, sušom ili ABA-om. Ionska i osmotska homeostaza te putevi detoksifikacije su prema pretpostavkama aktivno povezani s staničnom diobom i ekspanzijom, a time i s kontrolom rasta (prema Zhu 2001.)

ROS poput singletnog kisika ($^1O_2$), vodik peroksida (H_2O_2), superoksida ($\bullet O_2^-$) i hidroksil radikala (•OH) su toksične molekule koje su u stanju izazvati oksidativna oštećenja proteina, DNA i lipida. Pri normalnim uvjetima rasta, ROS se proizvode u kloroplastima, mitohondrijima i peroksizomima u vrlo niskim koncentracijama, dok se u uvjetima stresa njihova količina značajno povećava. U kloroplastima se ROS proizvode uslijed nemogućnosti usvajanja CO_2 što dovodi do pojačanih reduktivnih uvjeta zbog elektrona iz elektronskog transportnog lanca. Pretjerana redukcija elektronskog transportnog lanca u mitohondrijima također dovodi do intenziviranja proizvodnje ROS u uvjetima stresa. U peroksizomima se u procesu fotorespiracije, prilikom oksidacije glikolata do glioksilata, stvara H_2O_2. Za detoksikaciju od ROS, vrlo je važan sustav zaštite antioksidansima poput askorbinske kiseline (AsA), glutationa (GSH), te ROS sakupljačkih enzima superoksid dismutaze (SOD), askorbat peroksidaze (APX), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPX), glutation reduktaze (GR), gvajakol peroksidaze (GPOD) i peroksiredoksina (PrxR).

Mostafavi (2012.) vidi riješenje problema solnog stresa u pronalasku tolerantnih genotipova kulturnog bilja. U istraživanjima provedenim na šest genotipova šećerne repe (H30916, H30917, H30918, H30919, H30938 i H30973) i pet razina solnog stresa (destilirana voda kao kontrola, 4, 8, 12 i 16 mS/cm), ispitivani su standardna klijavost, energija klijanja, dužina klijanaca, masa svježe i masa suhe tvari i omjeri duljine od korijena do kotiledona. Rezultati su pokazali kako postoje značajne razlike između genotipova i razina solnog stresa za sve ispitivane parametre osim energije klijanja. Kod svih genotipova je bilo odgođeno postizanje maksimalne klijavosti dok kod najviše razine solnog stresa niti nakon 12 dana nije bilo isklijalog sjemena.

Hare i sur. (1999.) navode kako je akumulacija slobodnog prolina u uvjetima osmotskog stresa kod velikog broja vrsta predmet istraživanja biljnih fiziologa već preko 40 godina. Kod biljaka se dehidracija ne javlja samo kod vodnog deficita i povišenih razina soli nego i kod niskih temperatura. Široko je prihvaćena teorija da slobodni prolin nastaje iz glutamata preko Δ^1-pirolin-5-karboksilata (P5C) kroz dvije sukcesivne redukcije katalizirane P5C sintetazom (P5CS) i P5C reduktazom (P5CR) (*Slika 5*). Geni koji kodiraju ova dva enzima identificirani su kod više biljnih vrsta, a aktiviraju se uslijed nedostatka vode i povišenih razina soli. Kod uročnjaka su utvrđena dva gena koji kodiraju sintezu ova dva enzima - AtP5CS1 i AtP5CS2. Istraživanjima na biljkama lucerne (*Medicago sativa* L.) i rajčice (*Lycopersicon esculentum* L.) uzgajanih pri različitim tipovima stresa, utvrđena je velika raznolikost u funkciji P5CS izoformi. Također je zapažena ekspresija AtP5CS1 gena kod diferenciranih tkiva, no kod

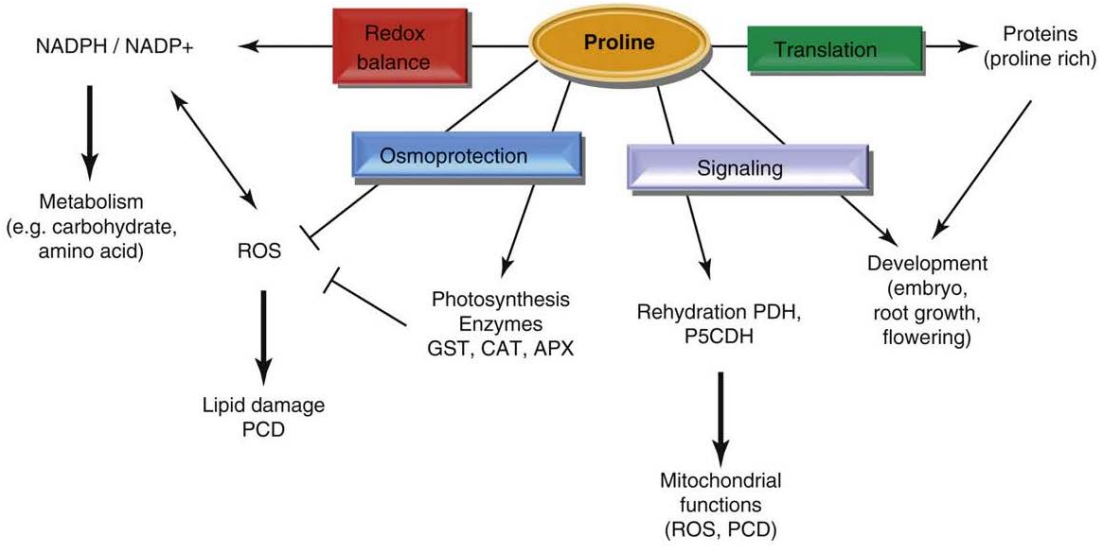
tkiva u fazi diobe i u odsustvu stresnog podražaja, aktivnost ovog gena nije uočena. AtP5CS2 gen je zadužen za sintezu transkripta koji kodira P5CS kod tkiva u fazi ubrzane diobe kod uročnjaka.



Slika 5. Nastanak prolina iz glutamata preko P5C
Izvor: http://imgarcade.com/1/glutamic-acid-structure/

Iako se smatra da osmotski stres ne utječe značajno na akumulaciju prolina, poznato je da smanjuje stopu njegove degradacije. Degradacija prolina se odvija enzimatskim putem u koji su uključeni prolin dehidrogenaza (PDH) i P5C dehidrogenaza (P5CDH). 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 mitohondrijalnu membranu. Nakon prestanka stresa, transkripcija AtPDH se naglo povećava prateći smanjenje u 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. Hare i sur. (1999.) također navode kako postoji vrlo ograničen broj izvora koji povezuju prolin sa staničnim signalnim putevima.

Dugi je niz godina prolin bio smatran inertnim osmolitom pomoću kojega biljke štite unutarstanične strukture i makromolekule od osmotskog stresa (Szabados i Savouré, 2010.). Ipak, akumulacija slobodnog prolina regulira toleranciju na stres na više načina (*Slika 6*).



Slika 6. Višestruka uloga prolina kod biljaka. Prolin se koristi za sintezu proteina, ima zaštitnu ulogu kao osmolit, pridonosi održavanju stabilnosti redoks ravnoteže, može regulirati razvoj i komponenta je metabolitskih signalnih mreža kod kontrole funkcije mitohondrija i ublažavanja stresa. Tumač: APX; askorbat peroksidaza, CAT; katalaza, PCD; apoptoza (eng. *programmed cell death*) (Szabados i Savouré, 2010.).

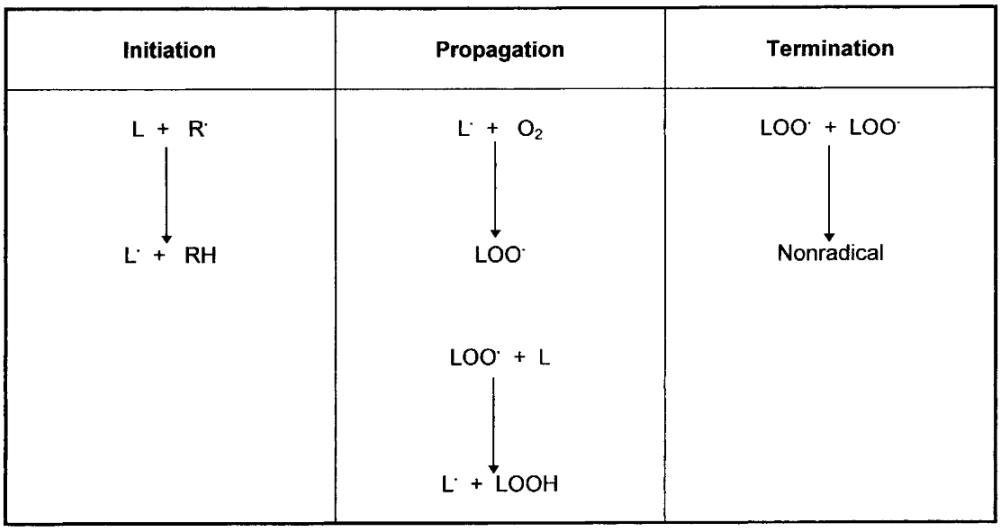
Prolin funkcionira kao molekularni pratitelj koji posjeduje sposobnost da zaštiti integritet nekih proteina te pojača učinak nekih enzima. Primjeri tih uloga su prevencija agregacije M4 laktat dehidrogenaze uslijed ekstremno visokih temperatura, zaštita nitrat reduktaze u uvjetima stresa izazvanog teškim metalima i osmotskog stresa, te stabilizacija ribonukleaze i proteaze uslijed izlaganja organizma arsenu. Neka su istraživanja prolinu pripisala antioksidativnu ulogu sugerirajući ROS sakupljačku aktivnost te mogućnost stabilizacije singletnog kisika. Prolin ima mogućnost smanjiti razinu ROS kod gljiva i kvasaca sprječavajući apoptozu, dok kod algi izloženih stresu izazvanom teškim metalima može smanjiti lipidnu peroksidaciju. Kod ljudi može imati pozitivan učinak u borbi protiv oksidativnog stresa izazvanog karcinogenezom. Kod izoliranih tilakoida, dokazan je pozitivan utjecaj prolina u borbi protiv štetnog utjecaja singletnog kisika i hidroksilnih radikala na fotosistem II (Szabados i Savouré, 2010.).

Kod duhana u uvjetima solnog stresa prolin je pojačao aktivnost detoksificirajućih enzima metilglioksalata, kao i peroksidaze, glutation-S-transferaze, superoksid dizmutaze i katalaze, a pojačan je i redoks kapacitet glutationa (Ribarits i sur. 2007.). Kod pustinjske biljke *Pancratium maritimum* L. prolin je stabilizirao aktivnost katalaze i peroksidaze pri solnom stresu. Mutant uročnjaka Atp5cs1 hipersenzitivan na stres, sa smanjenom mogućnosti sinteze prolina pokazao je nisku aktivnost antioksidativnih enzima iz glutation-askorbatnog ciklusa,

što je dovelo do hiperakumulacije vodikovog peroksida, pojačane lipidne peroksidacije i oštećenja klorofila.

Špoljarević i sur. (2011.) su koristili više hibrida kukuruza uzgajanih na tlima istočne Hrvatske do stadija oprašivanja za ispitivanje dva enzima uključena u metabolizam prolina; P5CS i PDH. Biološki prinos je utvrđen prema ukupnom broju potpuno razvijenih zrna po klipu i po biljci, prosječnoj masi jednog zrna te masi zrna po biljci. Godina u kojoj je kukuruz uzgajan značajno je utjecala na akumulaciju slobodnog prolina u listu i polenu, kao i na aktivnost prethodno navedenih enzima. Pokus je postavljen na dva lokaliteta te je utvrđen njihov značajan utjecaj na sve ispitivane parametre produktivnosti. Značajan je bio i utjecaj genotipa na sadržaj prolina i aktivnost P5CS u listu kao i na sve ispitivane kvantitativne pokazatelje prinosa. Neke korelacije između faktora sugeriraju kako bi aktivnost P5CS i sadržaj prolina mogli pozitivno utjecati na ukupni prinos kukuruza.

Polinezasićene masne kiseline se oksidiraju u procesu zvanom lipidna peroksidacija (*Slika 7*) (Oldham i sur., 1998.) Peroksidacija lipida može prouzročiti direktna oštećenja stanične membrane smanjujući joj fluidnost, permeabilnost i integritet. Osim direktnog oštećenja, produkti koji se oslobađaju razgradnjom stanične membrane također mogu djelovati kao slobodni radikali te napasti i druge stanične strukture i molekule poput DNA i proteina.



Slika 7. Reakcije lipidne peroksidacije. Kod inicijalne faze, radikal (R•) napada polinezasićenu masnu kiselinu (L). Radikal predaje jedan vodikov atom na dvostruku vezu lipida dajući lipidni radikal (L•). U nastavku, lipidni radikal s kisikom tvori peroksilni radikal (LOO•). Peroksilni radikal reagira s drugim lipidom tvoreći još jedan lipidni radikal i lipidni hidroperoksid (LOOH). Ta se lančana reakcija ponavlja do nestanka radikala što je slučaj kada dva peroksilna radikala reagiraju tvoreći neradikal. (Oldham i sur., 1998.)

Lipidni peroksidi mogu tvoriti ciklične perokside koji se raspadaju na citotoksične supstance poput aldehida i alkoksilnih radikala. Te tvari mogu izaći iz stanice i nanijeti štetu u drugim stanicama. Autori navode kako je najčešće korišten protokol za procjenu lipidne peroksidacije određivanje tzv. TBARS (*eng. Tiobarbituric Acid Reactive Substances*), iako je često kritiziran zbog nespecifičnih reakcija drugih produkata metabolizma koje mogu dati lažno pozitivne rezultate.

Bor i sur. (2003.) su istraživali promjene u intenzitetu lipidne peroksidacije i moguću zaštitnu ulogu antioksidativnih mehanizama kod kulturne repe *Beta vulgaris,* osjetljive na solni stres i njene divlje srodnice *Beta maritima* tolerantne na solni stres. Biljke repe stare 40 dana su zalijevane otopinama 0, 150 i 500 mM NaCl tijekom 12 dana. U usporedbi s *B. vulgaris,* kod *B. maritime* je utvrđena niža razina lipidne peroksidacije uz povećanu aktivnost superoksid dismutaze (SOD), peroksidaze (POX), askorbat peroksidaze (APOX), katalaze (CAT) i glutation reduktaze (GR), pri obje razine solnog stresa u usporedbi s kontrolom. Navedeni rezultati navode na zaključak da se prirodna otpornost *B. vulgaris* temelji na izraženim fiziološkim mehanizmima obrane od stresa kroz održavanje visoke temeljne i inducirane aktivnosti antioksidirajućih enzima.

Lipidna peroksidacija se smatra najčešćim uzročnikom opadanja kvalitete sjemena soje (*Glycine max* (L.) Merr.) u periodu skladištenja. Razlog tomu su visoke razine sadržaja lipida i proteina što sjeme soje čini pogodnim za oksidaciju i povezano je s brzim opadanjem vigora sjemena sa starosti (Lisjak i sur., 2009.). Velika količina oborina i brzo usvajanje vode u suho sjeme nakon sjetve mogu rezultirati imbibicijskim stresom, odnosno oštećenjima sjemena uslijed brze hidratacije struktura sjemena Ispitivan je intenzitet lipidne peroksidacije kod tri sorte soje (Podravka 95, Tisa i Vita) iz različitih proizvodnih godina, nakon 3, 6, 12 i 24 sata imbibicije u vodi pri 20˚C. Utvrđeno je značajno povećanje lipidne peroksidacije u tkivu klice, dok su najniže vrijednosti zabilježene u sjemenjači. Najniža lipidna peroksidacija je utvrđena nakon 3 sata imbibicije te je bila manja kod sjemena sorti *Podravka 95* i *Vita*. Također je utvrđena značajno veća lipidna peroksidacija kod starijeg sjemena.

Autori Hernandez i sur. (2009.) su fokusirali svoje istraživanje na biljkama kupusa (*Brassica oleracea* L.) na reakciju biljaka na duljinu trajanja stresa, te aktiviranje antioksidativnih obrambenih mehanizama. Također su ispitivani učinci vodikovog peroksida kao faktora stresa i signalne molekule. Analizirane su dvije zone korijena kupusa; zona elongacije i diferencijacije te potpuno diferencirana zona korijena, kako bi se bolje definirao utjecaj

solnog stresa na korijen. Akumulacija vodikovog peroksida je zabilježena u obje zone pri najvišoj razini soli (80 mM NaCl). Viša koncentracija vodikovog peroksida je zabilježena u kori korijena, a na subcelularnoj razini, mitohondriji su proizveli više navedenog spoja kod biljaka tretiranih s NaCl. Rezultati pokazuju kako je došlo do drastičnog smanjenja antioksidativne aktivnosti kod kratkog trajanja solnog stresa, no aktivnost katalaze i peroksidaze je rasla proporcionalno s dužinom trajanja stresa. Askorbat i glutation su pokazali razlike u trendovima kod tretmana NaCl-om. Askorbat je progresivno akumuliran i zadržao je redoks status dok je akumulacija glutationa naglo povećana u prva 24 sata pri tretmanu s NaCl-om, ali su nakon toga njegova koncentracija i redoks stanje naglo smanjeni. Autori zaključuju kako je pojačana akumulacija askorbata i zadržavanje njegovog redoks statusa ključno za rast i razvoj korijena kupusa u uvjetima solnog stresa.

Sheokand i sur. (2010.) su istraživali utjecaj egzogenog dušik oksida (NO) dodatkom donora natrijeva nitroprusida (SNP, $Na_2[Fe(CN)_5NO]$) u uvjetima oksidativnog stresa izazvanog NaCl-om u listovima boba (*Vicia faba* L.). Biljke stare 50 dana su tretirane kroz 2, 4 i 6 dana s 250 mM NaCl samostalno i u kombinaciji s 0,2 i 1 mM SNP. Porastao je intenzitet lipidne peroksidacije, relativni udjel vode te sadržaj H_2O_2. Dužina trajanja solnog stresa značajno je utjecala na njegove štetne efekte u stanicama. Dodatak SNP je ublažio oštećenja membrana u prva 2 dana trajanja solnog stresa, a kod trajanja solnog stresa 4 i 6 dana uočen je samo parcijalni efekt na prethodno navedene parametre. Kod kontrole, dodatak NaCl je aktivirao enzimatske antioksidativne mehanizme i zapažen je porast aktivnosti SOD, POX, APX i DHAR (*dehidro askorbat reduktaza*) dok za GR i CAT nije zabilježen porast aktivnosti. Kod biljaka u uvjetima solnog stresa, dodatak SNP je rezultirao značajnim pojačanjem aktivnosti SOD, CAT, APX, GR i DHAR u usporedbi s netretiranim biljkama. Tretman s SNP je također povisio razinu reduciranog oblika GSH/GSSG i ASC/DHA i povećao omjer u korist glutationa odnosno askorbata, dok je nasuprot tome, tretman NaCl smanjio razinu reduciranog oblika GSH/GSSG i ASC/DHA. Ovim istraživanjem su autori zaključili kako dodatak egzogenog NO štiti listove boba od oksidativnog stresa uslijed aktivacije staničnih antioksidativnih mehanizama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Postavljanje pokusa i korištena oprema

Sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L.) sorte *"Pariški kornišon"* je prije naklijavanja imbibirano u otopinama donora sumporovodika, NaHS (natrij hidrogen sulfid) i GYYY4137 (morfolin-4-ium 4 metoksifenil (morfolino) fosfinoditioat). Odvagano je po 200 sjemenki, odbrojano u plastične epruvete od 50 mL te su dodani jednaki volumeni otopina GYY4137 odnosno NaHS, u koncentracijama od 300 µM. Sjeme je imbibirano u navedenim otopinama 12 sati, nakon čega je osušeno na filter papiru pri sobnoj temperaturi naredna 24 sata, nakon čega je ponovno odvagano.

Po 50 sjemenki je naklijavano na vlažnom ubrusu navlaženom s 150 mL destilirane vode za varijantu kontrola odnosno 150 mL otopine NaCl, EC vrijednosti podešene na 2,81 mS/cm što je odgovaralo koncentraciji od 25 mM za varijantu u kojoj je ispitivan fiziološki efekt NaCl. Pokus je postavljen u 4 ponavljanja (*Slika 8*).



Slika 8: Postavljanje pokusa

Navlaženi ubrusi su nakon postavljanja sjemenki, nježno smotani u tuljke, prebačeni u najlonske vrećice te zatvoreni zbog sprječavanja gubitka vlage i postavljeni u uspravnom položaju u vertikalnu klima komoru (Frigomat) na temperaturu od 20˚C, u mraku.

3.2. Priprema biljnog materijala i analize

Nakon što je osmi dan utvrđena standardna klijavost, od klijanaca su odvojeni kotiledoni, korijen i hipokotili te pohranjeni na -80˚C. Na dan analize, tkivo hipokotila je izmacerirano tekućim dušikom u tarioniku do finog praha, te su odvagane adekvatne mase macerata biljnog tkiva za pojedinu analizu na vagi s četiri decimale.

Sve molekularne analize obuhvaćale su spektrofotometrijsko određivanje koncentracije određenih metabolita. Mjerenja su obavljena na aparatu Varian Cary 50 UV-VIS Spectrophotometer uz programsku podršku Cary WinUV software (Varian Inc.).

3.2.1. Određivanje sadržaja slobodnog prolina

Koncentracija slobodnog prolina (PRO) u hipokotilu klijanaca krastavca određena je metodom prema Bates i sur. (1973.) uz neke izmjene. Za određivanje njegova sadržaja, odvagano je po 0,5 g macerata u plastične epruvete od 15 mL. Uzorcima je dodano po 10 mL 3%-tne sulfosalicilne kiseline nakon čega su uzorci dobro homogenizirani na vrtložnoj tresilici (vorteks). Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 15 minuta pri brzini 4000 RCF, te je odpipetirano po 2 mL supernatanta. Odpipetiranom je dijelu uzorka dodano 2 mL kiselog ninhidrin reagensa i 2 mL ledene octene kiseline, te su nakon vorteksiranja uzorci 1 h inkubirani u vodenoj kupelji na 100˚C. Nakon inkubacije, reakcija je prekinuta prebacivanjem uzoraka na hladni blok, a zatim je iz uzoraka ekstrahiran prolin dodavanjem po 4 mL toluena i mješanjem 15-20 sekundi na vrtložnoj treskalici. Nakon zagrijavanja na sobnu temperaturu toluenski se sloj zajedno s ekstrahiranim prolinom izdvojio na površinu nakon čega je prebačen automatskom pipetom u kivetu za spektrofotometar. Nula je podešena čistim toluenom, dok su za stupnjevanje transmisije pripremljeni standardi točno poznatih koncentracija prolina. Za pripremu standarda pripremljen je osnovni standard koncentracije 20 µg PRO/mL od kojega su pripremljena razrjeđenja s koncentracijama 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 µg PRO/mL. Standard 0 predstavljao je 100%-tnu transmisiju. Mjerenja su obavljena na 520 nm te je pomoću navedenih standarda izrađena standardna krivulja iz koje je dobivena funkcija za izračun količine prolina prema podacima o apsorbanci uzoraka. Konačan sadržaj slobodnog prolina u biljnom tkivu je izražen u µg/ g svježe mase biljnog tkiva (SV.T.).

3.2.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Kako se zbog vrlo kratkog poluživota nestabilnih kisikovih spojeva (ROS) oni ne mogu direktno mjeriti, analizira se njihov poznati učinak odnosno lipidna peroksidacija. Ovaj

pokazatelj se mjeri posredno određujući u uzorku specifične produkte raspadanja lipida koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) prema metodi Heath i Packer (1968.), uz neke modifikacije.

Tkivo je za analizu pripremljeno maceracijom do finog praha u tekućem dušiku i odvagano 0,1 g po uzorku u Eppendorf epruvete od 2 mL. Uzorcima je dodano po 0,5 mL 0,1% TCA (triklor octena kiselina) pripremljene otapanjem 0,1 g TCA u 100 mL destilirane vode na magnetnoj mješalici. Uzorci su nakon dodavanja TCA centrifugirani 15 minuta pri 10000 RCF i 4˚C. Nakon centrifugiranja supernatant je odvojen u 1,5 mL epruvetu s čepom na navoj i uzorcima je dodano po 0,5 mL ranije pripremljene 0,5% tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20% TCA. 0,5% TBA u 20% TCA je pripremljena u laboratorijskojčaši otapanjem TCA u destiliranoj vodi u omjeru 1:2. U drugoj je čaši otopljeno 0,125 g TBA u 10 mL destilirane vode uz zagrijavanje. Otopine su pomiješane u tikvicu koja je nadopunjena destiliranom vodom do konačnog volumena od 100 mL. Slijepa proba je pripremljena od 1,5 mL 0,5% TBA u 20% TCA i uzorci su dobro promiješani na vrtložnoj treskalici, nakon čega su postavljeni u vodenu kupelj na 30 minuta pri 95˚C. Uzorci su ohlađeni potapanjem u hladnu vodu na 15 minuta i ponovno centrifugirani 15 minuta pri 10000 RCF i 4˚C. Nakon centrifugiranja provedeno je mjerenje apsorbance u plastičnoj kiveti sa suženim dnom. Nula je određena slijepom probom te je mjerena specifična i nespecifična apsorbanca na 532 i 600 nm, dok krajnji rezultat predstavlja njihovu razliku. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) izračunata je pomoću ekstincijskog faktora 155 mM/cm i izražena u nM/g SV.T.

3.2.3. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida

Koncentracija vodikovog peroksida (HP) određena je posredno mjerenjem koncentracije titanovog peroksida koji se taloži kada se ekstraktu tkiva doda titanov oksisulfat u sulfatnoj kiselini i otopina amonijevog hidroksida (Mukherjee i Choudhouri, 1983.).

U Eppendorf epruvete od 2 mL, odvagano je po 0,1 g macerata tkiva hipokotila. Uzorcima je dodano po 1 mL 80%-tnog hladnog acetona, a u posebnu je epruvetu odpipetiran 1 mL hladnog acetona za slijepu probu. Uzorci su dobro promiješani na vrtložnoj treskalici nakon čega je obavljeno centrifugiranje od 10 minuta na 10000 RCF pri 4˚C. Supernatant je odvojen u drugu epruvetu od 2 mL i dodano je 0,4 mL titan-sulfata i 0,5 mL koncentriranog amonijeva hidroksida. Dodavanje kemikalija je obavljeno u hladnom bloku na -20˚C zbog jake egzotermne reakcije. Uzorci su dobro promiješani na vrtložnoj treskalici nakon čega su

ponovno centrifugirani 10 minuta na 15000 RCF pri 4˚C zbog taloženja. Supernatant je dekantiran, a talog otopljen dodatkom 1 mL 2M sulfatne kiseline. Uzorci su ponovo dobro promiješani na vrtložnoj treskalici do izbistrivanja otopine. Ponovno je obavljeno centrifugiranje 10 minuta na 15000 RCF pri 4˚C nakon čega je bistri dio prebačen mikropipetom u kivetu za spektrofotometar sa suženim dnom i izmjerena je apsorbanca na

415 nm. Nula je određena slijepom probom, a koncentracija vodikovog peroksida je izračunata koristeći ekstincijski koeficijent 1,878 mM/cm te su konačni rezultati izraženi u nM HP/g SV.T.

3.3. Obrada podataka

Pokus je postavljen u četiri ponavljanja s po 50 klijanaca po ponavljanju. Ispitivan je utjecaj slijedećih faktora na molekularne pokazatelje stresa: proizvodna godina sjemena (2009./10., 2010./11., 2011./12.), osmoprimiranje sjemena donorima H_2S (NaHS i GYY4137), te solni stres (kontrola - destilirana voda, NaCl - EC otopine podešen na 2,81mS/cm). Svi utvrđeni rezultati su analizirani uobičajenim metodama statističke obrade podataka pomoću SAS

Software 9.1.3, programske podrške (2002.-2003., SAS Institute Inc., Cary, USA) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su sljedeće statističke metode: analiza varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primjenjenih tretmana – F test i Fisher's LSD test (eng. Least Significant Difference) te pojedinačna i multipla linearna korelacijska analiza.

4. REZULTATI

Tablica 1. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137 i 300 µM NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.) te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) u svježem biljnom materijalu.

FAKTOR	VARIJANTA	PRO	TBARS	H_2O_2
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	3,55 C	6,52 B	0,682 A
	2010./2011.	7,30 B	4,88 C	0,150 B
	2011./2012.	8,83 A	7,42 A	0,116 B
	F test	104,71	27,32	175,69
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Osmoprimiranje sjemena	NaHS	6,66 A	6,33	0,281 B
	GYY4137	6,45 A	6,22	0,351 A
	F test	0,47	0,13	6,50
	P	0,4958	0,7158	0,0152
Solni stres u klijanju	Kontrola	7,08 A	6,64 A	0,307
	NaCl	6,04 B	5,90 B	0,325
	F test	11,44	6,76	0,45
	P	0,0017	0,0134	0,5076
(Godina x Osmoprimiranje)	F test	0,94	4,90	5,00
	P	0,4018	0,0131	0,0121
(Godina x Stres)	F test	3,86	0,64	1,77
	P	0,0302	0,5341	0,1848
(Osmoprimiranje x Stres)	F test	0,00	4,90	0,15
	P	0,9894	0,0332	0,7008
(Godina x Osmoprimiranje x Stres)	F test	5,87	11,63	0,35
	P	0,0062	0,0001	0,7081

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$)

Prema F testu, u prosjeku za sve varijante osmoprimiranja sjemena krastavca i solnog stresa tijekom klijanja, godina proizvodnje sjemena je značajno utjecala na količinu slobodnog prolina ($P<0,0001$), lipidnu peroksidaciju ($P<0,0001$), te sadržaj vodikovog peroksida ($P<0,0001$) u svježoj tvari klijanaca (*Tablica 1*).

Prema rezultatima LSD testa, u prosjeku za sve varijante osmoprimiranja i solnog stresa, klijanci dobiveni iz sjemena iz proizvodne godine 2009./10. su imali statistički značajno najnižu razinu slobodnog prolina (3,55 µg/g SV.T.). Klijanci iz sjemena iz proizvodne godine 2010./11. su se značajno razlikovali od klijanaca iz proizvodne godine 2009./10., kao i od onih iz 2011./12. (7,30 µg/g SV.T.), dok je sadržaj slobodnog prolina bio stratistički značajno najviši kod klijanaca najmlađeg sjemena iz proizvodne godine 2011./12. (8,83 µg/g SV.T.).

Lipidna peroksidacija je bila prema LSD testu najniža kod klijanaca iz sjemena proizvedenog2010./11. (4,88 nM/g SV.T.). Klijanci iz proizvodne godine 2011./12. su imali najvišu lipidnu peroksidaciju (7,42 nM/g SV.T.) i značajno se razlikovali od klijanaca sjemena iz druge dvije proizvodne godine 2009./10. (6.52 nM/g SV.T.), 2011./12. (4,88 nM/g SV.T.). Koncentracija vodikovog peroksida u tkivu klijanaca je bila značajno najviša kod najstarijeg sjemena (iz proizvodne godine 2009./10.; 0,682 μg/g SV.T.) dok se koncentracija peroksida kod klijanaca iz proizvodnih godina 2010./11. i 2011./12. nije međusobno značajno razlikovala (0,150 μg/g SV.T. i 0,116 μg/g SV.T.).

Prema F testu, različite varijante osmoprimiranja u prosjeku za sve proizvodne godine i varijante naklijavanja, značajno su utjecale samo na koncentraciju vodikovog peroksida u biljnom materijalu. LSD testom je utvrđeno da je koncentracija vodikovog peroksida u tkivu bila niža kod osmoprimiranja sjemena s NaHS (0,281 μg/g SV.T.) u odnosu na varijantu osmoprimiranja s GYY4137 (0,351 μg/g SV.T.).

U prosjeku za sve proizvodne godine sjemena i varijante osmoprimiranja, uvjeti naklijavanja obzirom na solni stres su prema F testu utjecali na količinu slobodnog prolina (P=0,0017) i lipidnu peroksidaciju (P=0,0134), dok na koncentraciju vodikovog peroksida u hipokotilu klijanaca nije bilo značajnog utjecaja.

Prema LSD testu, koncentracija slobodnog prolina (6,04 μg/g SV.T.) i intenzitet lipidne peroksidacije (5,90 nM/g SV.T.) su bili značajno niži kod naklijavanja na NaCl nego na kontroli (7,08 μg/g SV.T. prolin; 6,64 nM/g SV.T.; TBARS).

Vrednovanjem utjecaja interakcija različitih faktora F testom, utvrđen je značajan utjecaj interakcije godine i osmoprimiranja na lipidnu peroksidaciju (P=0,0131) te koncentraciju vodikovog peroksida (P=0,0121). Interakcija godine i varijante naklijavanja sjemena utjecala je značajno samo na akumulaciju slobodnog prolina (P=0,0302) dok je interakcija osmoprimiranja i naklijavanja utjecala značajno samo na lipidnu peroksidaciju (P=0,0332). Trostruka interakcija godina x osmoprimiranje x stres je značajno utjecala na akumulaciju slobodnog prolina (P=0,0062) i lipidnu peroksidaciju (P=0,0001).

Tablica 2. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihove interakcije pri različitim varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.) te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.).

FAKTOR	VARIJANTA	PRO		TBARS		H_2O_2	
		NaHS	GYY4137	NaHS	GYY4137	NaHS	GYY4137
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	3,63 B	3,47 C	6,04 B	7,01 A	0,585 A	0,779 A
	2010./2011.	7,67 A	6,92 B	5,49 B	4,27 B	0,148 B	0,153 B
	2011./2012.	8,69 A	8,96 A	7,46 A	7,39 A	0,110 B	0,122 B
	F test	49,78	56,00	10,74	19,64	39,13	268,92
	P	<0,0001	<0,0001	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Solni stres u klijanju	Kontrola	7,18 A	6,97 A	7,01 A	6,28	0,266	0,347
	NaCl	6,14 B	5,94 B	5,64 B	6,17	0,295	0,355
	F test	5,65	5,80	14,62	0,06	0,36	0,09
	P	0,0288	0,0270	0,0012	0,8062	0,5564	0,7686
(Godina x Stres)	F test	0,80	9,11	4,30	7,34	0,25	3,88
	P	0,4657	0,0018	0,0297	0,0047	0,7806	0,0398

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$).

U prosjeku za obje varijante naklijavanja sjemena (NaCl i kontrola), F testom je utvrđen značajan utjecaj godine proizvodnje sjemena na sve ispitivane parametre, kod svih varijanti osmoprimiranja. Kod varijante osmoprimiranja s NaHS je utvrđen značajan utjecaj godine na akumulaciju slobodnog prolina ($P<0,0001$), lipidnu peroksidaciju ($P=0,0009$), te koncentraciju vodikovog peroksida ($P<0,0001$). Kod varijante osmoprimiranja s GYY4137 je utvrđen značajan utjecaj godine na akumulaciju prolina ($P<0,0001$), lipidnu peroksidaciju ($P<0,0001$) te koncentraciju vodikovog peroksida ($P<0,0001$) (*Tablica 2*).

LSD testom je utvrđena značajno najniža koncentracija slobodnog prolina kod najstarijeg klijanaca sjemena na obje varijante osmoprimiranja (NaHS 3,63 µg/g SV.T., GYY4137 3,47 µg/g SV.T.). Klijanci iz preostale dvije proizvodne godine sjemena se nisu značajno razlikovali u sadržaju slobodnog prolina pri varijanti osmoprimiranja sjemena s NaHS (2010./11. 7,67 µg/g SV.T., 2011./12. 8,69 µg/g SV.T.), dok je kod varijante osmoprimiranja s GYY4137 zapažena značajna razlika između klijanaca sve tri proizvodne godine sjemena (2011./12. 8,96 µg/g SV.T., 2010./11. 6,92 µg/g SV.T., 2009./10. 3,47 µg/g SV.T.). Lipidna peroksidacija je bila značajno najviša kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2011./12. na varijanti osmoprimiranja s NaHS (7,46 nM /g SV.T.) u odnosu na preostale dvije proizvodne godine, između kojih nisu utvrđene značajne razlike (2009./10. 6,04 nM/g SV.T., 2010./11. 5,49 nM/g SV.T.). Kod varijante osmoprimiranja s GYY4137 je utvrđena značajno najniža lipidna peroksidacija kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2010./11. (4,27 nM/g SV.T.), dok se klijanci iz preostale dvije proizvodne godine nisu međusobno značajno

razlikovali (2009./10. 7,01 nM/g SV.T., 2011./12. 7,39 nM/g SV.T.). Koncentracija vodikovog peroksida je bila značajno najviša kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2009./10. za obje varijante osmoprimiranja (NaHS 0,585 µg/g SV.T., GYY4137 0,779 µg/g SV.T.), dok se klijanci iz preostale dvije proizvodne godine sjemena nisu međusobno razlikovali niti kod varijante osmoprimiranja s NaHS (2010./11. 0,148 µg/g SV.T. 2011./12. 0,110 µg/g SV.T.) niti pri tretmanu s GYY4137 (2010./11. 0,153 µg/g SV.T., 2011./12. 0,122 µg/g SV.T.).

U prosjeku za sve proizvodne godine sjemena F testom je utvrđen značajan utjecaj varijante naklijavanja (stres) na akumuulaciju slobodnog prolina kod obje varijante osmoprimiranja (NaHS P=0,0288, GYY4137 P=0,0270). Također je utvrđen značajan utjecaj varijante naklijavanja na lipidnu peroksidaciju i to kod osmoprimiranja s NaHS (P=0,0012).

Interakcija godina x stres je značajno utjecala na akumulaciju slobodnog prolina (P=0,0018) i koncentraciju vodikovog peroksida (P=0,0398) samo kod varijante osmoprimiranja s GYY4137, dok je na lipidnu peroksidaciju imala značajan utjecaj kod obje varijante osmoprimiranja (NaHS P=0,0297, GYY4137 P= 0,0047).

Tablica 3. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i njihove interakcije pri različitim varijantama solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.) te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.).

FAKTOR	VARIJANTA	PRO		TBARS		H_2O_2	
		NaCl	Kontrola	NaCl	Kontrola	NaCl	Kontrola
Godina proizvodnje sjemena	2009./2010.	3,38 B	3,72 C	6,18 A	6,86 B	0,702 A	0,663 A
	2010./2011.	7,03 A	7,57 B	4,69 B	5,07 C	0,185 B	0,116 B
	2011./2012.	7,71 A	9,94 A	6,84 A	8,00 A	0,090 B	0,143 B
	F test	38,62	69,82	7,26	28,77	67,34	139,17
	P	<0,0001	<0,0001	0,0049	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Osmoprimiranje	NaHS	6,14	7,18	5,64	7,01 A	0,295	0,266 B
	GYY4137	5,93	6,97	6,17	6,28 B	0,355	0,347 A
	F test	0,23	0,24	1,24	5,34	1,66	7,24
	P	0,6383	0,6266	0,2801	0,0330	0,2133	0,0149
(Godina x Osmoprimiranje)	F test	1,09	5,69	3,69	18,36	2,58	2,89
	P	0,3575	0,0121	0,0454	<0,0001	0,1035	0,0813

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$).

U prosjeku za obje varijante osmoprimiranja sjemena, proizvodna godina sjemena je značajno utjecala na sve mjerene parametre kod obje varijante stresa (Prolin: NaCl P<0,0001, kontrola P<0,0001; lipidna peroksidacija: NaCl P=0,0049, kontrola P<0,0001; koncentracija vodikovog peroksida: NaCl P<0,0001, kontrola P<0,0001) (*Tablica 3*).

Prema LSD testu, koncentracija slobodnog prolina u tkivu hipokotila je bila značajno najniža kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2009./10. za obje varijante solnog stresa u klijanju (NaCl 3,38 µg/g SV.T., kontrola 3,72 µg/g SV.T.). Kod varijante naklijavanja uz NaCl, preostale se dvije proizvodne godine nisu međusobno značajno razlikovale (2010/11 7,03 µg/g SV.T., 2011./12. 7,71 µg/g SV.T.), dok se pri naklijavanju u kontroli količina slobodnog prolina 2010./11. (7,57 µg/g SV.T.) značajno razlikovala u odnosu na 2010./11. (7,03 µg/g SV.T.) i 2011./12. (9,94 µg/g SV.T.). Lipidna peroksidacija kod varijante naklijavanja u otopini NaCl je bila značajno najniža kod sjemena iz godine 2010./11. (4,69 nM/g SV.T.), dok se između sjemena proizvedenih 2009./10. (6,18 nM/g SV.T.) i 2011./12. (6,84 nM/g SV.T..) nije značajno razlikovala. Kod sjemena naklijavanog na vodi (kontrola) utvrđene su značajne razlike u lipidnoj peroksidaciji u hipokotilu između sve tri proizvodne godine. Klijanci najmlađeg sjemena (iz proizvodne godine 2011./12.) su imali značajno najviši intenzitet lipidne peroksidacije (8,00 nM/g SV.T.), dok je najniža vrijednost utvrđena kod klijanaca sjemena iz godine 2010./11. (5,07 nM/g SV.T.). Lipidna peroksidacija u klijancima dobivenih iz sjemena proizvedenog 2009./10. se značajno razlikovala od preostale dvije proizvodne godine (6,86 nM/g SV.T.). Sadržaj vodikovog peroksida u hipokotilima, pri obje varijante naklijavanja bio je značajno najviši kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2009./10. (NaCl 0,702 µg/g SV.T., kontrola 0,663 µg/g SV.T.). Između klijanaca sjemena iz preostalih dviju proizvodnih godina nije bila značajna razlika u sadržaju vodikovog peroksida (NaCl: 2010./11. 0,185 µg/g SV.T., 2011./12. 0,090 µg/g SV.T., Kontrola: 2010./11. 0,116 µg/g SV.T., 2011./12. 0,143 µg/g SV.T.).

U prosjeku za sve starosti sjemena (proizvodne godine), F testom je utvrđena značajna razlika između različitih varijanti osmoprimiranja sjemena u intenzitetu lipidne peroksidacije (P=0,0330), te sadržaju vodikovog peroksida (P=0,0149) na varijanti naklijavanja kontrola.

LSD testom je utvrđena značajno niža razina lipidne peroksidacije kod varijante osmoprimiranja s GYY4137 (6,28 nM/g SV.T.) u odnosu na varijantu osmoprimiranja s NaHS (7,01 nM/g SV.T.) kod naklijavanja na varijanti kontrola. Sadržaj vodikovog peroksida bio je značajno niži kod osmoprimiranja sjemena NaHS (0,266 µg/g SV.T.) u odnosu na varijantu GYY4137 (0,347 µg/g SV.T.)

Interakcija Godina x Osmoprimiranje značajno je utjecala na sadržaj slobodnog prolina (P=0,0121) lipidnu peroksidaciju (P<0,0001) kod kontrole. Zapažen je i značajan utjecaj interakcije na lipidnu peroksidaciju kod naklijavanja sjemena u tretmanu s NaCl (P=0,0454).

Tablica 4. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), uvjeta naklijavanja (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija pri različitim godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.)

FAKTOR	VARIJANTA	PRO			TBARS			H_2O_2		
		09./10.	**10./11.**	**11./12.**	**09./10.**	**10./11.**	**11./12.**	**09./10.**	**10./11.**	**11./12.**
Osmopri-miranje	NaHS	3,63	7,67	8,67	6,04	5,49 A	7,46	0,585	0,148	0,110
	GYY4137	3,47	6,92	8,96	7,01	4,27 B	7,39	0,779	0,153	0,122
	F test	0,09	1,57	0,39	4,34	5,39	0,02	6,52	0,04	0,38
	P	0,7708	0,2336	0,5420	0,0594	0,0387	0,8866	0,0253	0,8480	0,5505
Solni stres u klijanju	Kontrola	3,72	7,57	9,94 A	6,86	5,07	8,00 A	0,663	0,116 B	0,142 A
	NaCl	3,38	7,03	7,71 B	6,18	4,69	6,84 B	0,702	0,185 A	0,090 B
	F test	0,38	0,82	25,76	2,11	0,53	5,65	0,27	6,75	7,11
	P	0,5491	0,3839	0,0003	0,1716	0,4790	0,0350	0,6157	0,0233	0,0206
(Osmoprim.x Stres)	F test	0,04	4,32	9,10	3,33	17,59	5,54	0,03	0,02	4,42
	P	0,8517	0,0598	0,0107	0,0931	0,0012	0,0365	0,8619	0,8875	0,0573

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$).

U prosjeku za obje varijante naklijavanja sjemena, F testom su utvrđene značajne razlike između utjecaja dviju varijanti osmoprimiranja sjemena na lipidnu peroksidaciju (P=0,0387) kod proizvodne godine 2010./11. kao i na sadržaj vodikovog peroksida (P=0,0253) kod proizvodne godine sjemena 2009./10. (*Tablica 4*).

LSD testom je utvrđeno da su klijanci sjemena iz proizvodne godine 2010./11. pri varijanti osmoprimiranja s GYY4137 imali značajno nižu lipidnu peroksidaciju (4,27 nM/g SV.T.) u odnosu na varijantu NaHS (5,49 nM/g SV.T.). Kod proizvodne godine sjemena 2009./10. zapažen je značajno niži sadržaj vodikovog peroksida kod varijante osmoprimiranja s NaHS (0,585 µg/g SV.T.) u odnosu na varijantu GYY4137 (0,779 µg/g SV.T.) u klijancima.

U prosjeku za obje varijante osmoprimiranja, F testom je utvrđen značajan utjecaj varijante naklijavanja sjemena na lipidnu peroksidaciju (P=0,0350) kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2011./12. kao i na sadržaj vodikovog peroksida kod klijanaca iz proizvodnih godina sjemena 2010./11. (P=0,0233) i 2011./12. (P=0,0206).

Kod klijanaca iz proizvodne godine sjemena 2011./12., LSD testom je utvrđena značajno niža lipidna peroksidacija pri tretmanu s NaCl (6,84 nM/g SV.T.) u odnosu na kontrolu (8,00 nM/g SV.T.). Sadržaj vodikovog peroksida kod klijanaca iz proizvodne godine sjemena 2010./11. je bio značajno niži kod kontrole (0,116 µg/g SV.T.) u odnosu na varijantu NaCl (0,185 µg/g SV.T.) dok je kod proizvodne godine 2011./12. sadržaj vodikovog peroksida bio značajno niži pri tretmanu s NaCl (0,090 µg/g SV.T.) u odnosu na kontrolu (0,142 µg/g SV.T.).

Interakcija Osmoprimiranje x Naklijavanje značajno je utjecala na akumulaciju slobodnog prolina kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2011./12. (P=0,0107) kao i na lipidnu peroksidaciju kod klijanaca proizvodnih godina sjemena 2010./11. (P=0,0012) i 2011./12. (P= 0,0365).

Tablica 5. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) interakcija pri različitim godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012) i uvjetima naklijavanja sjemena (kontrola i NaCl) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.)

FAKTOR	VARIJA-NTA	PRO			TBARS			H_2O_2		
		09./10.+ NaCl	**10./11.+ NaCl**	**11./12.+ NaCl**	**09./10.+ NaCl**	**10./11.+ NaCl**	**11./12.+ NaCl**	**09./10.+ NaCl**	**10./11.+ NaCl**	**11./12.+ NaCl**
Osmoprimiranje	**NaHS**	3,41	6,78	8,23	5,27	4,20	7,45	0,598	0,184	0,104
	GYY4137	3,35	7,27	7,18	7,09	5,18	6,23	0,806	0,186	0,075
	F test	0,01	0,24	3,11	5,21	0,95	4,10	2,60	0,00	0,79
	P	0,9230	0,6401	0,1285	0,0625	0,3670	0,0893	0,1579	0,9743	0,4074
		09./10.+ KO	**10./11.+ KO**	**11./12.+ KO**	**09./10.+ KO**	**10./11.+ KO**	**11./12.+ KO**	**09./10.+ KO**	**10./11.+ KO**	**11./12.+ KO**
	NaHS	3,85	8,56 A	9,14 B	6,80	6,77 A	7,46	0,572	0,111	0,116 B
	GYY4137	3,59	6,57 B	10,75 A	6,92	3,37 B	8,54	0,753	0,120	0,170 A
	F test	0,08	9,25	6,14	0,06	136,11	1,97	5,00	0,07	6,11
	P	0,7827	0,0227	0,0479	0,8114	<0,0001	0,2104	0,0668	0,8012	0,0484

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$).

Prema rezultatima F testa, utvrđen je značajan utjecaj osmoprimiranja sjemena donorima H_2S kod proizvodne godine sjemena 2010./11. i kontrole, na sadržaj slobodnog prolina (P=0,0227) i lipidnu peroksidaciju (P<0,0001) u klijancima. Kod kontrolnih biljaka iz proizvodne godine sjemena 2011./12. također je zabilježen značajan utjecaj različitih varijanti osmoprimiranja na sadržaj slobodnog prolina (P=0,0479) kao i na sadržaj vodikovog peroksida (P=0,0484) (*Tablica 5*).

Kod kontrolnih klijanaca dobivenih iz sjemena proizvedenog u 2010./11., LSD testom je utvrđena značajna razlika između različitih varijanti osmoprimiranja sjemena u sadržaju slobodnog prolina (NaHS 8,56 µg/g SV.T. GYY4137 6,57 µg/g SV.T.) te intenzitetu lipidne peroksidacije (NaHS 6,77 nM/g SV.T., GYY4137 3,37 nM/g SV.T.). Kod kontrolnih klijanaca dobivenih iz sjemena proizvodne godine 2011./12. utvrđena su značajne razlike između različitih varijanti osmoprimiranja u sadržaju slobodnog prolina (NaHS 9,14 µg/g SV.T., GYY4137 10,75 µg/g SV.T.) i vodikovog peroksida (NaHS 0,116 µg/g SV.T., GYY4137 0,170 µg/g SV.T.).

Tablica 6. Značajnost utjecaja solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) po godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) i varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) u hipokotilu klijanaca.

FAKTOR	VARIJA-NTA	PRO			TBARS			H_2O_2		
		09./10.+ NaHS	**10./11.+ NaHS**	**11./12.+ NaHS**	**09./10.+ NaHS**	**10./11.+ NaHS**	**11./12.+ NaHS**	**09./10.+ NaHS**	**10./11.+ NaHS**	**11./12.+ NaHS**
Solni stres u klijanju	**NaCl**	3,41	6,78 B	8,23	5,27	4,19 B	7,45	0,597	0,184	0,104
	KO	3,85	8,55 A	9,14	6,79	6,77 A	7,46	0,572	0,110	0,115
	F test	0,18	9,07	2,89	3,36	91,16	0,00	0,04	2,80	0,14
	P	0,688	0,0237	0,1398	0,1165	<0,0001	0,9860	0,8569	0,1455	0,7234
		09./10.+ GYY	**10./11.+ GYY**	**11./12.+ GYY**	**09./10.+ GYY**	**10./11.+ GYY**	**11./12.+ GYY**	**09./10.+ GYY**	**10./11.+ GYY**	**11./12.+ GYY**
	NaCl	3,35	7,27	7,18 B	7,09	5,17	6,23 B	0,805	0,185	0,074 B
	KO	3,58	6,57	10,74 A	6,91	3,36	8,54 A	0,752	0,120	0,169 A
	F test	0,58	0,46	25,83	0,17	3,21	9,42	0,61	4,60	13,43
	P	0,4757	0,5244	0,0023	0,6937	0,1233	0,0220	0,4639	0,0756	0,0105

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$).

F testom je utvrđen značajan utjecaj varijante solnog stresa u klijanju kod sjemena proizvodne godine 2010./11. i varijante osmoprimiranja s NaHS na sadržaj slobodnog prolina (P=0,0237) i lipidnu peroksidaciju (P<0,0001). Kod proizvodne godine sjemena 2011./12. i varijante osmoprimiranja s GYY4137 utvrđen je značajan utjecaj solnog stresa na sadržaj slobodnog prolina (P=0,0023), lipidnu peroksidaciju (P=0,0220) i sadržaj vodikovog peroksida (P=0,0105) (*Tablica 6*) u hipokotilu.

Pri osmoprimiranju sjemena iz proizvodne godine 2010./11. s NaHS, LSD testom je utvrđena značajna razlika u sadržaju slobodnog prolina (NaCl 6,78 µg/g SV.T., kontrola 8,55 µg/g SV.T.) te intenzitetu lipidne peroksidacije (NaCl 4,19 nM/g SV.T., kontrola 6,77 nM/g SV.T.) u hipokotilu klijanaca.

Kod klijanaca sjemena iz proizvodne proizvodne godine 2011./12. i varijante osmoprimiranja s GYY4137, LSD testom su utvrđene značajne razlike između varijanti solnog stresa u klijanju, u sva tri mjerena pokazatelja: kod sadržaja slobodnog prolina (NaCl 7,18 µg/g SV.T. kontrola 10,74 µg/g SV.T.), lipidne peroksidacije (NaCl 6,23 nM/g SV.T., Kontrola 8,54 nM/g SV.T.) te sadržaja vodikovog peroksida (NaCl 0,074 µg/g SV.T. Kontrola 0,169 µg/g SV.T.) .

Tablica 7. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) ovisno o varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i solnom stresu u klijanju (kontrola i mS/cm NaCl), na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) u hipokotilu klijanaca.

FAKTOR	VARIJA-NTA	PRO		TBARS		H_2O_2	
		NaHS+NaCl	GYY+NaCl	NaHS+NaCl	GYY+NaCl	NaHS+NaCl	GYY+NaCl
Godina proizvodnje sjemena	**09./10.**	3,41 C	3,53 B	5,27 B	7,09	0,597 A	0,805 A
	10./11.	6,78 B	7,27 A	4,19 B	5,17	0,184 B	0,185 B
	11./12.	8,23 A	7,18 A	7,45 A	6,23	0,104 B	0,074 C
	F test	34,60	13,05	10,65	2,23	11,80	312,40
	P	<0,0001	0,0022	0,0042	0,1633	0,0031	<0,0001
		NaHS+ KO	**GYY+ KO**	**NaHS+ KO**	**GYY+ KO**	**NaHS+ KO**	**GYY+ KO**
	09./10.	3,85 B	3,58 C	6,79	6,91 B	0,572 A	0,752 A
	10./11.	8,55 A	6,57 B	6,77	3,36 C	0,110 B	0,120 B
	11./12.	9,14 A	10,74 A	7,46	8,54 A	0,115 B	0,169 B
	F test	21,14	77,20	1,20	39,80	59,33	79,97
	P	0,0004	<0,0001	0,3452	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Podaci su prosjek četiri ponavljanja; ANOVA, F test; prosjeci označeni različitim slovom se razlikuju prema LSD testu (A,B,C; $P \leq 0,05$).

F testom je utvrđen značajan utjecaj proizvodne godine sjemena kod varijante osmoprimiranja s NaHS i varijante naklijavanja sjemena u otopini NaCl na sadržaj slobodnog prolina ($P<0,0001$), lipidnu peroksidaciju ($P=0,0042$), te sadržaj vodikovog peroksida ($P=0,0031$) u hipokotilu. Značajan utjecaj proizvodne godine na sadržaj slobodnog prolina ($P=0,0022$) i sadržaj vodikovog peroksida ($P<0,0001$) utvrđen je kod klijanaca sjemena osmoprimiranog s GYY4137 i pri klijanju u otopini NaCl. Kod kontrolnih klijanca dobivenih iz sjemena osmoprimiranog s NaHS, dokazan je značajan utjecaj godine na sadržaj slobodnog prolina ($P=0,0004$) i sadržaj vodikovog peroksida ($P<0,0001$). Kod kontrolnih klijanaca iz sjemena osmoprimiranog s GYY4137, zabilježen je značajan utjecaj godine na sadržaj slobodnog prolina ($P<0,0001$), lipidnu peroksidaciju ($P<0,0001$), te sadržaj vodikovog peroksida ($P<0,0001$) (*Tablica 7*).

LSD testom je kod varijante osmoprimiranja sjemena s NaHS i naklijavanog na NaCl utvrđen najniži sadržaj slobodnog prolina kod najstarijeg sjemena (iz proizvodne godine 2009./10.; 3,41 µg/g SV.T.), a značajno najviša vrijednost je zabilježena kod najmlađeg sjemena (iz proizvodne godine 2011./12.; 8,23 µg/g SV.T.). Sadržaj prolina kod klijanaca dobivenih iz sjemena proizvodne godine 2010./11. (6,78 µg/g SV.T.) se značajno razlikovao od sadržaja utvrđenog kod klijanaca iz sjemena preostale dvije proizvodne godine. Kod istih je varijanti osmoprimiranja i solnog stresa u klijanju zabilježena značajno najviša lipidna peroksidacija kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2011./12. (7,45 nM/g SV.T.), dok se klijanci iz

proizvodnih godina 2009./10. (5,27 nM/g SV.T.) i 2010./11. (4,19 nM/g SV.T.) međusobno nisu značajno razlikovali u navedenom parametru. Sadržaj vodikovog peroksida je bio pri istim varijantama naklijavanja najviši kod klijanaca iz najstarijeg sjemena (0,597 µg/g SV.T.), dok se klijanci iz proizvodnih godina sjemena 2010./11. (0,184 µg/g SV.T.) i 2011./12. (0,104 µg/g SV.T.) nisu međusobno značajno razlikovali.

Kod varijante osmoprimiranja s GYY4137 i varijante naklijavanja u otopini NaCl, LSD testom su utvrđene značajne razlike između godina proizvodnje sjemena u sadržaju slobodnog prolina. Najniži sadržaj navedene aminokiseline je utvrđen u hipokotilima klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2009./10. (3,53 µg/g SV.T.), dok se proizvodne godine 2010./11. (7,27 µg/g SV.T.) i 2011./12. (7,18 µg/g SV.T.) nisu međusobno značajno razlikovale. Kod istih je varijanti utvrđen i značajno najviši sadržaj vodikovog peroksida za proizvodnu godinu sjemena 2009./10. (0,805 µg/g SV.T.). Značajno najniži sadržaj vodikovog peroksida je utvrđen kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2011./12. (0,074 µg/g SV.T.) dok su se klijanci dobiveni iz sjemena proizvodne godine 2010./11. (0,185 µg/g SV.T.) značajno razlikovali od klijanaca iz preostale dvije godine u navedenom parametru.

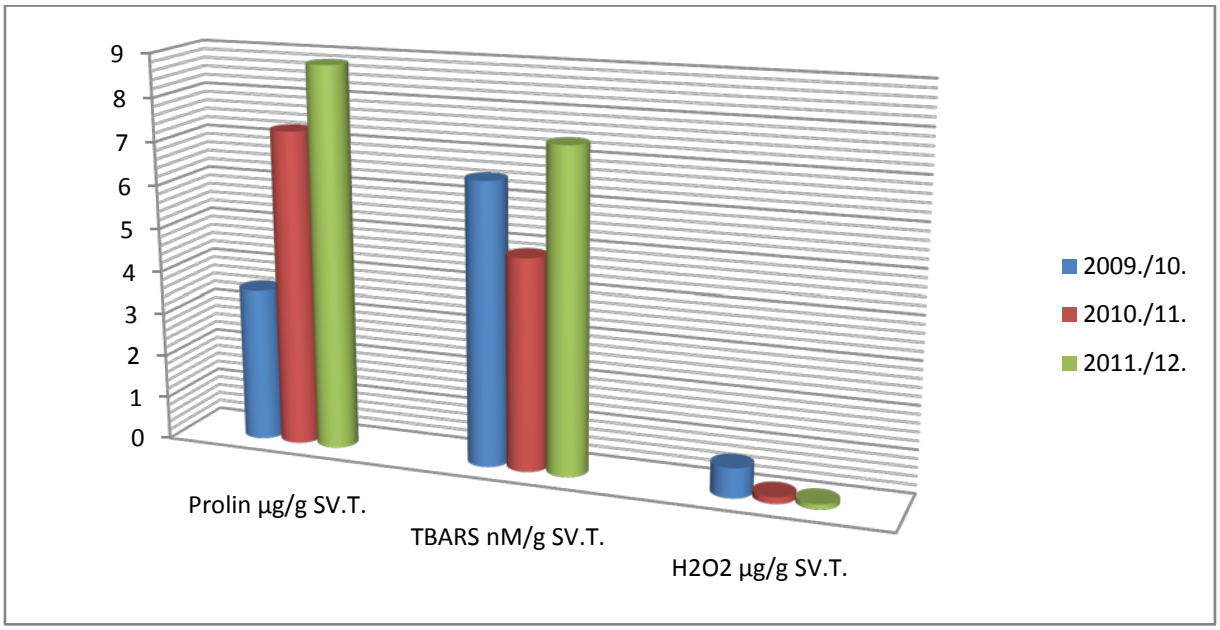
Kod sjemena osmoprimiranog s NaHS te naklijavanog na vodi (kontrola), LSD testom je utvrđen značajno najniži sadržaj slobodnog prolina u hipokotilima klijanaca iz proizvodne godine 2009./10. (3,85 µg/g SV.T.), dok se klijanci iz proizvodnih godina sjemena 2010./11. (8,55 µg/g SV.T.) i 2011./12. (9,14 µg/g SV.T.) nisu međusobno značajno razlikovali. Pri istoj varijanti osmoprimiranja i naklijavanja je utvrđena značajno najviša količina vodikovog peroksida kod klijanca iz sjemena proizvodne godine 2009./10. (0,572 µg/g SV.T.). Klijanci iz sjemena proizvodnih godina 2010./11. (0,110 µg/g SV.T.) i 2011./12. (0,115 µg/g SV.T.) se nisu međusobno značajno razlikovali u navedenom parametru.

Kod klijanaca naklijavanih na vodi te sjemena osmoprimiranog s GYY4137, LSD testom su utvrđene značajne razlike između proizvodnih godina kod svih ispitivanih parametara. Značajno najniži sadržaj slobodnog prolina je utvrđen kod sjemena iz proizvodne godine 2009./10. (3,58 µg/g SV.T.) dok je značajno najviši sadržaj utvrđen kod proizvodne godine 2011./12. (10,74 µg/g SV.T.). Sadržaj prolina kod klijanaca dobivenih iz sjemena proizvodne godine 2010./11. se značajno razlikovao od sadržaja utvrđenog u klijancima iz preostale dvije proizvodne godine (6,57 µg/g SV.T.). Pri istim je tretmanima godina proizvodnje sjemena značajno utjecala i na lipidnu peroksidaciju te je najniža vrijednost utvrđena u hipokotilima klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2010./11. (3,36 nM/g SV.T.). Lipidna peroksidacija je

bila značajno najviša kod klijanaca iz najmlađeg sjemena (8,54 nM/g SV.T.) dok se vrijednost ovog pokazatelja utvrđena kod klijanaca iz najstarijeg sjemena značajno razlikovala od utvrđenih kod sjemena iz preostale dvije proizvodne godine. Sadržaj vodikovog peroksida je prema LSD testu bio najviši kod klijanaca iz najstarijeg sjemena (0,752 µg/g SV.T.) dok se sadržaj istog u hipokotilima klijanaca iz sjemena proizvodnih godina 2010./11. (0,120 µg/g SV.T.) i 2011./12. (0,169 µg/g SV.T.) nije značajno razlikovao.

5. RASPRAVA

Provedenim istraživanjem ispitivan je fiziološki odgovor klijanaca krastavca na osmoprimiranje sjemena iz različitih proizvodnih godina donorima H_2S (NaHS i GYY4137) i naklijavanje na otopini 25 mM NaCl (2,81 mS/cm) odnosno vodi (kontrola).



Grafikon 1: Sadržaj slobodnog prolina, vodikovog peroksida i intenzitet lipidne peroksidacije u hipokotilu klijanaca krastavca ovisno o starosti sjemena.

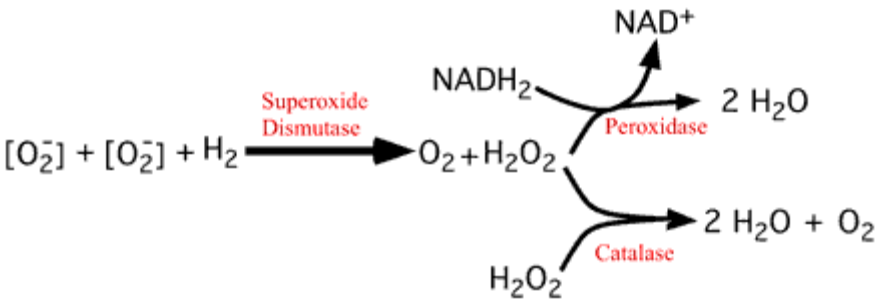
Sadržaj slobodnog prolina je značajno opadao sa starošću sjemena pa je tako najstarije sjeme imalo najniži sadržaj slobodnog prolina u prosjeku za sve varijante osmoprimiranja sjemena kao i za sve varijante naklijavanja (*Grafikon 1*). Autori Szekely i sur. (2008.) u svojim istraživanjima provedenim na mutantima uročnjaka Atp5cs1 koji pokazuje smanjenu sposobnost akumulacije prolina, navode moguću antioksidativnu ulogu ove aminokiseline. U navedenom istraživanju, intenzitet lipidne peroksidacije pratio je porast sadržaja vodikovog peroksida, uz smanjenje sadržaja slobodnog prolina, što može značiti „trošenje“ prolina u procesima zaštite od oksidacijskog stresa ili da manja koncentracija slobodnog prolina rezultira većom koncentracijom peroksida i intenzivnijom peroksidacijom lipida..

Lipidna peroksidacija u ovom istraživanju je bila najviša kod sjemena krastavca iz proizvodne godine 2011./12. kod koje je također sadržaj prolina bio najviši, a sadržaj vodikovog peroksida značajno niži nego kod sjemena iz 2009./10. (*Tablica 1*). Lisjak (2012.) također navodi korelacije između akumulacije slobodnog prolina, lipidne peroksidacije i koncentracije vodikovog peroksida, no u tom istraživanju nije bio uključen faktor starosti sjemena a koji

uvjetuje metabolizam prolina, pa je stoga moguća samo djelomična usporedba sadržaja prolina u biljnom tkivu.

Slično se može konstatirati i kod intenziteta lipidne peroksidacije u klijancima dobivenim iz sjemena različite starosti, osmoprimiranog s donorima H_2S te naklijavanog sa odnosno bez prisustva NaCl. Uzrok disproporcije u intenzitetu lipidne peroksidacije, sadržaja vodik peroksida i prolina pod utjecajem starosti sjemena, mogu biti nepovoljni uvjeti u samoj proizvodnoj godini koji se također negativno odražavaju i na fiziološke mehanizme u fazi formiranja i zriobe sjemena. Stewart i Bewley (1980.) navode kako je kod sjemena soje (*Glycine max* (L.) Merr.) skladištenog pri visokoj temperaturi i visokoj relativnoj vlažnosti zraka zabilježen značajan porast lipidne peroksidacije. Autori navode kako isti parametri nisu bili značajno viši kada je sjeme skladišteno na visokim temperaturama, uz normalnu relativnu vlagu zraka što ukazuje na mogućnost izostanka efekta primjenjenih tretmana u našem istraživanju zbog mogućih nepovoljnih uvjeta prilikom skladištenja sjemena.

Sadržaj vodikovog peroksida je bio značajno najviši kod najstarijeg sjemena u prosjeku za sve varijante osmoprimiranja i naklijavanja. To ukazuje na smanjenu antioksidativnu sposobnost kod najstarijeg sjemena, što bi bilo za očekivati. Metabolizam sjemena sa starošću slabi i sjeme gubi na svojstvima poput standardne klijavosti i energije klijanja, a i pojavnost retardiranih biljaka je učestalija. Uzrok tomu su uznapredovali procesi oksidacije zbog kojih dolazi do narušavanja tehnološke ali i fiziološke kvalitete sjemena, pa se stoga rezultati poklapaju s očekivanjima. Porast sadržaja vodikovog peroksida u biljnom tkivu može ukazati na normalno funkcioniranje enzima superoksid dismutaze (SOD), a smanjenu aktivnost katalaze koja vodik peroksid nastao u reakcijama singletnog kisika i SOD prevodi u kisik i vodu (*Slika 9*).



Slika 9: Djelovanje superoksid dismutaze, katalaze i peroksidaze
Izvor: http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/NutritionGrowth/images/superoxide.gif

Varijanta osmoprimiranja sjemena je utjecala na koncentraciju vodikovog peroksida te je značajno veća akumulacija utvrđena kod klijanaca dobivenih iz sjemena osmoprimiranog s GYY4137 u odnosu na sjeme pri tretmanu s NaHS. Slično djelovanje tretmana listova paprike donorima H_2S utvrdio je Lisjak (2012.), gdje je sadržaj vodik peroksida kod biljaka tretiranih s GYY4137 bio na razini kontrole dok je pri tretmanu listova paprike s NaHS značajno smanjen. Autor uz smanjen sadržaj vodik peroksida navodi i značajno povišene aktivnosti glutation-reduktaze i gvajakol-peroksidaze kod tretmana s NaHS, što ukazuje na porast aktivnosti enzimatskih antioksidativnih komponenti pri navedenom tretmanu.

Varijanta naklijavanja sjemena, odnosno potencijalni solni stres, značajno je utjecala na koncentraciju slobodnog prolina i lipidnu peroksidaciju u prosjeku za sve proizvodne godine i varijante osmoprimiranja. Oba parametra su bila povišena kod klijanaca iz sjemena naklijavanog na vodi, dok je kod naklijavanja sjemena u otopini NaCl u hipokotilima zabilježen značajno niži sadržaj prolina te manji intenzitet lipidne peroksidacije. Ovi podatci upućuju na moguće stimulativno djelovanje niske razine solnog stresa (25 mM otopina NaCl), kroz stimulaciju antioksidativnih mehanizama u klijancima krastavca. U istraživanju Saha i sur. (2010.) utvrđeno je da predtretman sjemena subletalnom dozom (50 mM) NaCl pojačava otpornost biljke na solni stres, te su zapažene značajno niže razine lipidne peroksidacije ali, za razliku od ovog istraživanja, sadržaj slobodnog prolina je bio povećan.

Na sve ispitivane parametre je očekivano, značajno utjecala proizvodna godina sjemena. U prosjeku za obje varijante naklijavanja sjemena (voda i 25 mM NaCl) i obje varijante osmoprimiranja sjemena (NaHS i GYY4137), sadržaj prolina u hipokotilima bio je najviši kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2011./12. (*Tablica 2*). Međutim, u prosjeku za sve ispitivane godine, nije utvrđen značajan učinak osmoprimiranja sjemena donorima H_2S na sadržaj prolina u hipokotilima (*Tablica 3*). Također, u prosjeku za obje varijante naklijavanja, primjenjeni donori H_2S nisu značajno utjecali na akumulaciju navedene aminokiseline niti u jednoj proizvodnoj godini (*Tablica 4*). Ovi rezultati ukazuju da su razlike u nakupljanju slobodnog prolina rezultat proizvodne godine, odnosno starosti sjemena, bez obzira na primjenjeni donor sumporovodika. Dobiveni rezultati ukazuju da sa starošću sjemena opada mogućnost sinteze prolina, a time vjerojatno slabi i sposobnost tolerancije stresnih uvjeta.

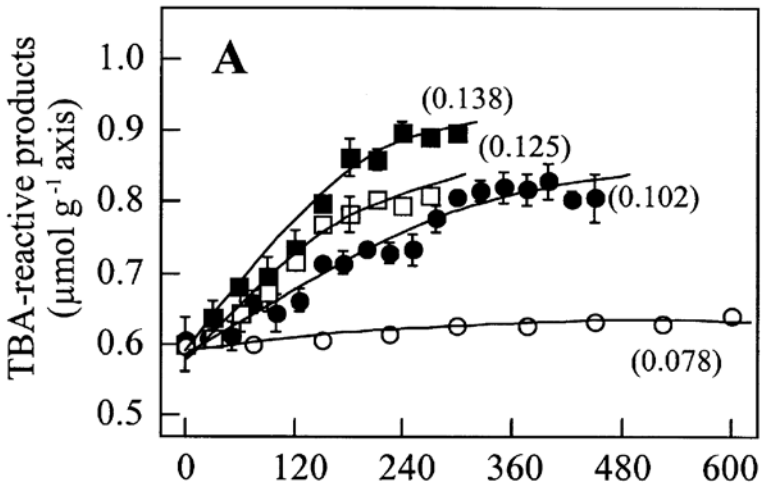
Kod ispitivanja pojedinih varijanti osmoprimiranja sjemena donorima H_2S, godina je značajno utjecala na lipidnu peroksidaciju u hipokotilima kod obje varijante naklijavanja (voda i NaCl) (*Tablica 2*). Kod varijante osmoprimiranja sjemena s NaHS lipidna

peroksidacija je bila značajno najviša (7,46 nM/g SV.T) kod klijanaca iz najmlađeg sjemena dok se intenzitet lipidne peroksidacije u klijancima iz sjemena ostale dvije ispitivane proizvodne godine nije međusobno značajno razlikovao. Pri osmoprimiranju sjemena s GYY4137, najniža lipidna peroksidacija je utvrđena kod klijanca sjemena iz proizvodne godine 2010./11 (4,27 nM/g SV.T.), a intenzitet lipidne peroksidacije u klijancima iz najmlađeg i najstarijeg sjemena se nije međusobno značajno razlikovao. Slični rezultati su dobiveni i kod zasebnog ispitivanja utjecaja varijanti naklijavanja na navedeni pokazatelj (*Tablica 3*). Na varijanti naklijavanja u otopini NaCl u prosjeku za oba primjenjena donora sumporovodika, lipidna peroksidacija je bila značajno najniža kod klijanaca iz sjemena proizvodne godine 2010./11. (4,69 nM/g SV.T.) te se nije značajno razlikovala od one utvrđene kod najstarijeg sjemena. Kod klijanaca iz sjemena naklijavanog na vodovodnoj vodi, lipidna peroksidacija je bila najviša kod najmlađeg sjemena (8,00 nM/g SV.T.).

Kumar i Knowles (1993.) navode kako je sjemenski krumpir (*Solanum tuberosum* L.) ispitivan u razdoblju skladištenja od 7-30 mjeseci pokazivao trend porasta intenziteta lipidne peroksidacije odnosno da je lipidna peroksidacija kod sjemenskog krumpira skladištenog u kontroliranim uvjetima pri 4˚C i 95% relativne vlažnosti zraka rasla proporcionalno starosti sjemena. Lipidna peroksidacija je kod inicijalnih 7 mjeseci skladištenja opala za 65% dok je nakon 30 mjeseci skladištenja porasla za 267%.

Slične rezultate navode i Murthy i sur. (2002.), koji osim utjecaja trajanja skladištenja sjemena zelenog graha (*Vigna radiata* L.) ispituju i utjecaj sadržaja vlage sjemena na intenzitet lipidne peroksidacije uslijed skladištenja. Lipidna peroksidacija u njihovom istraživanju se proporcionalno povećavala s povećanjem vlage sjemena.

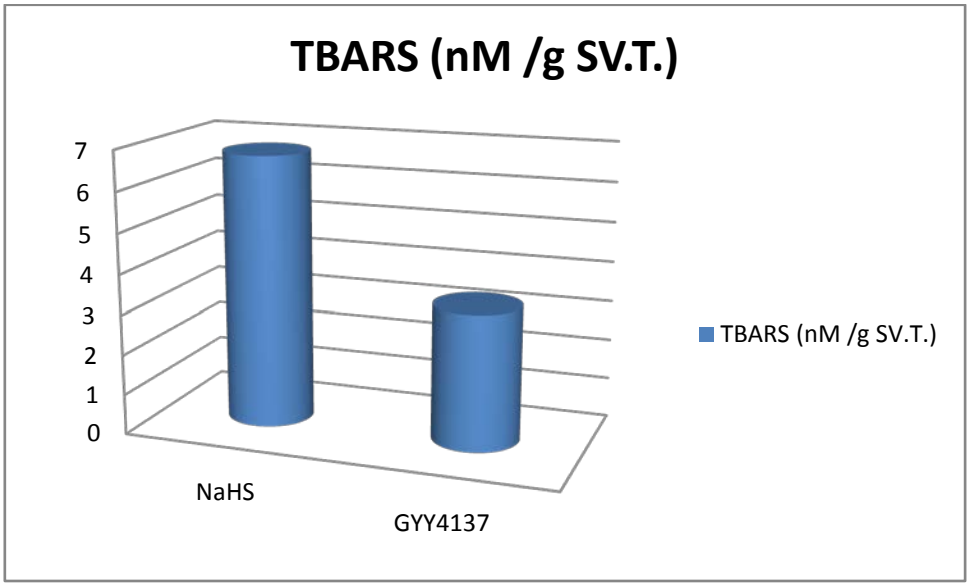
Iz rezultata dobivenog ovim istraživanjem vidljivo je kako lipidna peroksidacija ne prati pretpostavljene trendove s obzirom na starost nego je značajno najviša kod najmlađeg sjemena, a u svim varijantama značajno najniža kod sjemena iz 2010./11. Takvi su rezultati možda posljedica nepovoljnih skladišnih uvjeta tijekom čuvanja sjemena ili pak loše proizvodne godine za krastavac. Stewart i Bewley (1980.) u svojim istraživanjima na sjemenu soje također navode negativan utjecaj povišene temperature i vlažnosti zraka u uvjetima skladištenja na povećanje električnog konduktiviteta, pojačanog ispiranja mineralnih tvari iz sjemena, intenziteta lipidne peroksidacije te aktivnosti SOD, nakon imbibicije.



Slika10*:* Korelacija između dana uskladištenja (x os) i sadržaja TBARS (y os) (Murthy i sur. 2002.)

Ispitivanjem po proizvodnim godinama (*Tablica 4*), u prosjeku za obje varijante naklijavanja, zabilježena je značajno niža lipidna peroksidacija kod klijanaca iz sjemena osmoprimiranog s GYY4137 (4,27 nM/g SV.T.) u odnosu na varijantu s NaHS (5,49 nM/g SV.T.). Lisjak (2012.) navodi kako je lipidna peroksidacija u listu paprike bila značajno manjeg intenziteta kod tretmana biljaka s NaHS u odnosu na GYY4137. Takve razlike između rezultata istraživanja mogu se pripisati načinu tretiranja, fenofazi i specifičnosti biljne vrste, gdje su biljke paprike bile tretirane prskanjem listova, dok je sjeme krastavca bilo imbibirano u otopinama donora sumporovodika, kao i bitnim razlikama u metabolizmu između ispitivanih dijelova tj. organa biljke. Kako je GYY4137 sporootpuštajući donor H_2S te njegova razgradnja može trajati i tjedan dana, dobiveni rezultat se može pripisati i ovome kemijskom svojstvu navedenog spoja. Učinak NaHS kao donora H_2S traje tek oko sat vremena kada se sav supstrat potroši (Lee i sur., 2011.). Iz navedenih razloga moguće da je nakon imbibicije GYY4137 akumuliran između sjemene ovojnice i endosperma, te je postepeno otpuštao H_2S tijekom klijanja. Nasuprot tome možemo pretpostaviti da je kod imbibicije sjemena s NaHS sav supstrat za otpuštanje molekula H_2S bio potrošen jer je NaHS tvar koja konstantno reagira s vlagom iz zraka tvoreći H_2S u reakcijama hidrolize, koji vrlo brzo volatizira. Kako je metabolizam sjemena imbibicijom tek započeo te metabolitski kao ni signalni putevi karakteristični za stanicu u punoj fiziološkoj funkciji vjerojatno još nisu uspostavljeni. Velika je vjerojatnost da tretman sjemena osmoprimiranjem s NaHS nije imao identičan učinak kao kod primjene GYY4137, jer je supstrat mogao biti potrošen volatizacijom H_2S i prije nego li je bilo koja količina H_2S mogla biti usvojena. U prilog ovoj tvrdnji ide i rezultat ispitivanja utjecaja svakog faktora zasebno, gdje je vidljivo kako je kod klijanaca sjemena iz proizvodne

godine 2010./11. naklijavanog na vodi utvrđen značajno niži intenzitet lipidne peroksidacije (3,37 nM/g SV.T.) kod varijante osmoprimiranja s GYY4137 u odnosu na NaHS (6,77 nM/g SV.T.) (*Tablica 5*). U navedenoj varijanti pokusa, kod osmoprimiranja s GYY4137 zabilježeno je smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije za 100,8% u usporedbi s tretmanom sjemena s NaHS (*Grafikon 2*).



Grafikon 2. Prosječan intenzitet lipidne peroksidacije u hipokotilu klijanca krastavca ovisno o varijanti osmoprimiranja sjemena donorima H_2S.

Kod klijanaca iz sjemena proizvedenog 2011./12. godine, u prosjeku za oba donora H_2S, utvrđeno je značajno veće nakupljanje slobodnog prolina, kod sjemena naklijavanog na vodi (9,94 µg/g SV.T.) u odnosu na varijantu NaCl (7,71 µg/g SV.T.) (*Tablica 4*). Kod klijanaca sjemena iz proizvodne godine 2010./11. osmoprimiranog s NaHS, utvrđeno je pojačano nakupljanje prolina u hipokotilima kod kontrole (8,55 µg/g SV.T.) u odnosu na NaCl (6,78 µg/g SV.T.). Kod najmlađeg sjemena zabilježen je značajno viši sadržaj slobodnog prolina kod kontrole (10,74 µg/g SV.T.) u usporedbi s NaCl (7,18 µg/g SV.T.) (*Tablica 6*). Navedeni rezultati analize na sadržaj ove aminokiseline upućuju kako tretman s 25 mM NaCl nije izazvao radikalan stres nego je moguće da je imao upravo suprotan efekt. U većini istraživanja se kao najniža razina NaCl koja izaziva solni stres koristi otopina koncentracije 50 mM (Saha i sur. 2010., Celik i Atak 2011., Lisjak 2012.) dok je u ovom istraživanju podešavana EC vrijednost otopine NaCl na 2,81 mS/cm^2. Vukadinović i Vukadinović (2011.) navode vrijednost od 4 mS/cm kao donju granicu pri kojoj se neko tlo smatra zaslanjenim. Natrijevi ioni u otopini za naklijavanje smanjili su vodni potencijal otopine i povećali

koncentraciju otopljenih tvari u njoj. Zbog izjednačavanja vrijednosti osmotskih tlakova otopine za naklijavanje i sjemena krastavca vjerojatno nije došlo do pucanja slabijih staničnih membrana i ispiranja kationa iz sjemena pa je otopina djelovala slično otopini KNO_3 koja se često koristi za osmoprimiranje sjemena (Batak i sur. 2002., Cetinbas i Koyuncu 2006.). Korištena koncentracija NaCl od 25 mM najvjerojatnije nije izazvala osmotski stres u klijancima krastavca te je time i nakupljanje osmolita poput prolina ostalo na kontrolnoj ili čak i nižoj razini. Moguće je da je izlaganje sjemena blagom stresu, kao i tretman sjemena donorima H_2S, aktivirali signalne puteve prema pokretanju nekih drugih zaštitnih metabolizama, koji u ovom istraživanju nisu bili obuhvaćeni.

Kod klijanaca iz sjemena proizvedenog 2010./11. te osmoprimiranog s NaHS, varijanta naklijavanja značajno je utjecala na razinu lipidne peroksidacije. U hipokotilima klijanaca naklijavanih na vodi, intenzitet lipidne peroksidacije bio je značajno veći (6,77 nM /g SV.T.) u odnosu na varijantu NaCl (4,196 nM/g SV.T.). Sličan je efekt varijante naklijavanja zabilježen i kod najmlađeg sjemena osmoprimiranog s GYY4137 te je kod kontrole lipidna peroksidacija bila 8,54 nM/g SV.T., a kod varijante NaCl 6,23 nM/g SV.T. Kod navedene varijante tretmana zabilježena je i viša koncentracija vodikovog peroksida u hipokotilima klijanaca naklijavanih na vodi (0,169 µg/g SV.T.) u odnosu na NaCl (0,074 µg/g SV.T.).

Navedeni rezultati navode na pretpostavku da je kod primjenjene niske razine NaCl antioksidativna aktivnost bila povišena. Slične rezultate navode Saha i sur. (2010.) koji su u korijenčićima i hipokotilu klijanaca zelenog graha, dobivenog iz sjemena osmoprimiranog s 50 mM NaCl, utvrdili značajno pojačanu antioksidativnu aktivnost, manju lipidnu peroksidaciju te niže koncentracije vodikovog peroksida. U ovom istraživanju varijanta naklijavanja u otopini NaCl je vjerojatno imala stimulativni efekt na mehanizme antioksidativne aktivnosti jer je suho sjeme postavljeno na naklijavanje, a prethodno osmoprimiranje je moglo pokrenuti određene metaboličke mehanizme koji su doveli do bolje adaptacije sjemena na uvjete naklijavanja.

Potencijalne mogućnosti predsjetvenog tretmana sjemena s donorima sumporovodika su još uvijek nedovoljno istraženo područje biljne fiziologije, u kojem treba nastaviti slična istraživanja s ciljem utvrđivanja mogućih praktičnih mjera za povećanje vigora i klijavosti sjemena te poboljšanje kako sjemenske proizvodnje tako i uzgoja kvalitetnih presadnica u povrćarskoj proizvodnji.

6. ZAKLJUČAK

1. Sadržaj slobodnog prolina u hipokotilu klijanaca opadao je sa starosti sjemena, pa je tako kod najstarijeg sjemena zabilježen njegov najniži sadržaj, a kod najmlađeg najviši.
2. Intenzitet lipidne peroksidacije i koncentracija vodikovog peroksida rasli su kako je sadržaj slobodnoga prolina opadao.
3. Kod lipidne peroksidacije je zabilježeno odstupanje od trenda i očekivanih rezultata za sjeme iz proizvodne godine 2011./12. koje je pokazalo najjači intenzitet lipidne peroksidacije. Dobiveni rezultati ukazuju na moguće nepovoljne uvjete kod skladištenja sjemena ili na loše uzgojne uvjete u proizvodnoj godini sjemena.
4. Koncentracija vodikovog peroksida je bila najviša kod najstarijeg sjemena iz godine 2009./10. što ukazuje na moguće smanjenje aktivnosti enzima koji sudjeluju u njegovoj razgradnji ili pak njegovu pojačanu produkciju.
5. Osmoprimiranje sjemena s GYY4137 značajno je smanjilo lipidnu peroksidaciju u odnosu na varijantu NaHS. Mogući razlog tomu je hlapljiva priroda NaHS, odnosno produžni efekt djelovanja GYY4137 kao sporootpuštajućeg donora H_2S.
6. Kod sjemena naklijavanog na vodi, prethodno osmoprimiranje s GYY4137 je pokazalo čak 100,8% slabiji intenzitet lipidne peroksidacije u usporedbi s NaHS.
7. Nakupljanje slobodnog prolina kao osmolita bilo je izraženije kod klijanaca naklijavanih na vodi (kontrola) jer je niska koncentracija NaCl (25 mM), vjerojatno smanjila vodni potencijal otopine za naklijavanje te time spriječila pojavu osmotskog stresa.
8. Lipidna peroksidacija i sadržaj vodikovog peroksida su bili značajno niži u hipokotilima klijanaca naklijavanih uz prisustvo NaCl. Niska koncentracija soli vjerojatno je stimulirajuće djelovala na antioksidativne mehanizme kod klijanaca.
9. Prema analiziranim parametrima, niska koncentracija NaCl (25 mM), odnosno blagi stres, je kod klijanaca krastavca (*Cucumis sativus* L.) djelovao stimulativno.
10. Moguće je da blagi stres kojem je sjeme bilo izloženo tijekom klijanja, kao i tretman sjemena donorima H_2S, aktivira signalne puteve prema pokretanju nekih drugih zaštitnih metabolizama, koji u ovom istraživanju nisu bili obuhvaćeni.

7. POPIS LITERATURE

1. Batak, I., Dević, M., Gibal, A., Grubišić, D., Poff, K.L., Konjević, R. (2007.): The effect of potassium nitrate and NO-donors on phytocrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. Cambridge University Press 12(4), 253-259.
2. Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. (1973.): Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39, 205–207.
3. Bor, M., Özdemir, F., Türkan, I. (2003.): The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant science 164, 77-84.
4. Çelik, Ö., Atak, Ç. (2011.): The effect of salt stress on antioxidatice enzymes and proline content of two Turkish tobaco varieties. Turkish Journal of Biology 36, 339-356.
5. Çetinbas, M., Koyuncu, F. (2006.): Improving germination of *Prunus avium* L. seeds by gibberelic acid, potassium nitrate and thiourea. Horticultural Science Prague 33, 119-123.
6. Fu, P., Wang, W., Hou, L., Liu, X. (2013.): Hydrogen sulfide is involved in chilling stress response in *Vitis vinifera* L. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 82, 295-302.
7. Hancock J.T., Lisjak M., Teklić T., Wilson I.D., Whiteman M. (2011.): Hydrogen sulphide and signalling in plants. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 6(12).
8. Hancock, J.T. (2012.): NO synthase? Generation of nitric oxide in plants. Periodicum Biologorum, 114(1), 19-24.
9. Hare, P.D., Cress, W.A., Staden, J. (1999.): Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. Journal of experimental botany 50(333), 413-434.
10. Heath R.L., Packer L. (1968.): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125, 189-198.
11. Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Diaz-Vivancos, P., Olmos, E. (2009.): A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brasica oleracea* roots. Journal of Experimental Botany 61(2), 521-535.

12. Kumar, G.N.M., Knowles, N.R. (1993.): Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. Plant Physiology 102, 115-124.
13. Lee, Z.W., Zhou, J., Chen, C.Z., Zhao, y., Tan, C.H., Moore, P.K., Deng, L.W.(2011.): The slow releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137 exhibits novel anti cancer effects *In vitro* and *In vivo*. Pone Journal 6(6).
14. Lešić,r., Borošić, J., Butorac,I., Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002.): Povrćarstvo. Zrinski, Čakovec.
15. Lisjak, M., Wilson, I.D., Civale, L., Hancock, J.T., Teklić, T. (2009.): Lipid peroxidation levels in soybean (Glycine max (L.) Merr.) seed parts as a consequence of imbibition stress, Poljoprivreda 15(2), 32-37.
16. Lisjak, M. (2012.): Interakcije H2S i NO u prijenosu signala u listovima uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) i paprike (*Capsicum annuum* L.). Sveučilište J.J. Strossmayera, Doktorski rad.
17. Matotan, Z. (1994.): Proizvodnja povrća. Nakladni zavod Globus, Zagreb.
18. Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010.): Reactive oxigen species homeostasis and signaling during drought and salinity stress. Plant, Cell and Environment 33, 453-467.
19. Mittler, R. (2002.): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7(9), 405-410.
20. Mostafavi, K. (2012.): Effect of salt stress on germination and early seedling growth of sugar beet cultivars. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 6(2), 120-125.
21. Mukherjee S.P., Choudhuri M.A. (1983.): Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. Physiologia Plantarum 58, 166-170.
22. Murthy, U.M.N., Kumar, P.P., Sun, W.Q. (2002.): Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vignia radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolisis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. Journal of Experimental botany 54(383), 1057-1067.
23. Neil, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T. (2002.): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. Journal of Experimental Botany 53(372), 1237-1247.

24. Oldham, K.M., Bowen, P.E. (1998.): Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? Journal of American dietetic association 98(8), 1001-1008.
25. Parađiković, N. (2009.): Opće i specijalno povrćarstvo. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
26. Pevalek-Kozlina,B. (2003.): Fiziologija bilja. Sveučilište u Zagrebu, Profil, Zagreb.
27. Sheokand, S., Bhankar, V., Sawhney, V. (2010.): Ameliorative effect of exogenous nitric oxide on oxidative metabolism in NaCl treated chickpea plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 22(2), 81-90.
28. Saha, P., Chatterjee, p., Biswas, A.K. (2010.): NaCl pretreatment alleviates salt stress by enchacement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vignia radiata* L. Wilczek.). Indian Journal of Experimental Biology 48, 593-600
29. Stewart, R.R.C., Bewley, J.D. (1980.): Lipid peroxidation associated with accelerated agin gof soybean axes. Plant Physiology 65, 245-248.
30. Szabados, L., Savoure´, A. (2010.): Proline: a multifunctional amino acid. Trends in plant science 15(2), 89-98.
31. Szekely, G., Abraham, E, Cseplo, A, Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. (2008.): Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. The Plant Journal 53, 11-28.
32. Špoljarević, M., Agić, D., Lisjak, M., Gumze, A., Wilson, I.D., Hancock J.T., Teklić, T. (2011.): The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. Plant Signaling & Behavior 6(2), 251-257.
33. Vukadinović V., Vukadinović, Vesna (2011.): Ishrana bilja, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek.
34. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002.): Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. The Plant Cell: 165-183.
35. Zhu, J.K. (2001.): Plant salt tolerance. Trends in Plant science 6(2), 66-71.

Internet stranice:

http://imgarcade.com/1/glutamic-acid-structure/ Pristupljeno: 01.06.2014

http://plantelemedicinale.info/a-e/castravete/ Pristupljeno: 04.06.2014.

http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/NutritionGrowth/physicalandenv.html: Todar K. (2000.). Pristupljeno 11.06.2014.

8. SAŽETAK

Sumporovodik (H_2S) je do nedavno bio smatran fitotoksinom, no sve veći broj dokaza potvrđuje da njegova prisutnost u niskim, fiziološkim koncentracijama ima pozitivan učinak na biljke. Istraživanjima na biljkama je dokazana moguća uloga H_2S kao signalne molekule uz vodik peroksid (H_2O_2) i dušik oksid (NO). H_2S utječe na mehanizme regulacije gibanja puči, potiče rast adventivnog korijenja te pojačava otpornost biljaka na stres izazvan visokim koncentracijama soli i teških metala. U ovom istraživanju, sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L.) je osmoprimirano s dva donora H_2S različitih kemijskih svojstava; sintetskim sporootpuštajućim donorom GYY4137 te hlapljivim i brzootpuštajućim donorom NaHS. Sjeme iz različitih proizvodnih godina (2009./10., 2010./11. i 2011./12.) je osmoprimirano u otopinama navedenih donora H_2S te naklijavano na otopini NaCl niske koncentracije (25 mM) i vodi. Analizirani su sljedeći molekularni pokazatelji reakcije na stres u hipokotilima klijanaca; sadržaj slobodnog prolina, intenzitet lipidne peroksidacije te koncentracija vodikovog peroksida. Starost sjemena je značajno utjecala na sve ispitivane parametre kod svih varijanti naklijavanja i osmoprimiranja sjemena. Lipidna peroksidacija je bila značajno smanjena pri tretmanu sjemena s GYY4137 dok je efekt NaHS kao donora sumporovodika vjerojatno izostao zbog hlapljive prirode tog spoja. Svi ispitivani pokazatelji u hipokotilima su pokazali niže vrijednosti nakon klijanja u otopini NaCl. Rezultati ispitivanih pokazatelja ukazuju da je slabi solni stres djelovao stimulativno na pokretanje nekih antioksidativnih mehanizama u biljci. Analizirani parametri su posljedični pokazatelji djelovanja H_2S, međutim, potrebna su daljnja istraživanja koja će na molekularnoj razini rasvijetliti točnu ulogu i funkciju ovog spoja u odgovoru biljke na solni stres.

9. SUMMARY

Until recently, hydrogen sulphide (H_2S) has been thought as a phytotoxine, but there is a growing body of evidence suggesting that in low, physiological concentrations in plants it can act in more positive manner. Researches on plants confirmed a possible role of H_2S as a signalling molecule alongside with hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide (NO) respectively. H_2S is involved in stomatal movement control, encourage of adventurous root growth as well as it enhance tolerance on stress caused by high concentrations of salt or heavy metals. In our research, cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) have been osmoprimed with two H_2S donors differing in chemical properties; synthetic slow releasing donor GYY4137 and fast releasing vaporizing donor NaHS. Seeds of three different production seasons (2009/10, 2010/11 and 2011/12) were osmoprimed with before mentioned H_2S donors and germinated on low concentration NaCl solution (25 mM). Following molecular parameters on plant stress response in seedlings hypocotyls were analysed; free proline content, lipid peroxidation intensity and hydrogen peroxide concentration. All the examined parameters were under significant influence of seed production year in seedlings from seed osmoprimed with both H_2S donors and germinated in presence or without NaCl. Lipid peroxidation was significantly lower in the treatment with GYY4137 while treatment with NaHS didn't show any effect, probably due to vaporizing nature of that compound. All tested parameters in hypocotyls showed lower values after germination in NaCl solution. Considering all the examined parameters, it was found that a mild salt stress stimulated some antioxidative mechanisms in plants. The analysed parameters are consequential indicators of H_2S effect, however further researches on molecular level need to be carried to elucidate the exact role and function of this gasotransmitter in plant stress response.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137 i 300 µM NaHS), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.) te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) u svježem biljnom materijalu.
(Stranica 21.)

Tablica 2. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) i njihove interakcije pri različitim varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.) te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.). (Stranica 23.)

Tablica 3. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.), osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i njihove interakcije pri različitim varijantama solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.) te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.). (Stranica 24.)

Tablica 4. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), uvjeta naklijavanja (kontrola i NaCl) i njihovih interakcija pri različitim godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) . (Stranica 26.)

Tablica 5. Značajnost utjecaja osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) interakcija pri različitim godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012) i uvjetima naklijavanja sjemena (kontrola i NaCl) na koncentraciju slobodnog prolina (PRO µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.). (Stranica 27.)

Tablica 6. Značajnost utjecaja solnog stresa u klijanju (kontrola i NaCl) po godinama proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) i varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS), na koncentraciju slobodnog

prolina (PRO; µg/g SV.T), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) u hipokotilu klijanaca. (Stranica 28.)

Tablica 7. Značajnost utjecaja godine proizvodnje sjemena (2009./2010., 2010./2011., 2011./2012.) ovisno o varijantama osmoprimiranja sjemena donorima H_2S (300 µM GYY4137, 300 µM NaHS) i solnom stresu u klijanju (kontrola i NaCl), na koncentraciju slobodnog prolina (PRO; µg/g SV.T.), lipidnu peroksidaciju (TBARS; nM/g SV.T.), te koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2; µg/g SV.T.) u hipokotilu klijanaca. (Stranica 29.)

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Morfologija krastavca (*Cucumis sativus* L.) (Stranica 3.)

Slika 2: Slika 2. Shema provođenja signala u uvjetima stresa (Stranica 6.)

Slika 3. H2O2 signalizacija kod biljaka. Sive strelice pokazuju moguće puteve sinteze i degradacije dok crne predstavljaju potencijalne učinke H2O2 (Stranica 8.)

Slika 4. Tri aspekta tolerancije stresa kod biljaka (homeostaza, detoksifikacija i kontrola rasta) i putevi koji ih povezuju (Stranica 10.)

Slika 5. Nastanak prolina iz glutamata preko P5C (Stranica 11.)

Slika 6. Višestruka uloga prolina kod biljaka (Stranica 13.)

Slika 7. Reakcije lipidne peroksidacije (Stranica 14.)

Slika 8: Postavljanje pokusa (Stranica 17.)

Slika 9: Djelovanje superoksid dizmutaze, katalaze i peroksidaze (Stranica 33.)

Slika10*:* Korelacija između dana uskladištenja (x os) i sadržaja TBARS (y os) (Stranica 36.)

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1: Sadržaj slobodnog prolina, vodikovog peroksida i intenzitet lipidne peroksidacije u hipokotilu klijanaca krastavca ovisno o starosti sjemena. (Stranica 32.)

Grafikon 2. Prosječan intenzitet lipidne peroksidacije u hipokotilu klijanca krastavca ovisno o varijanti osmoprimiranja sjemena donorima H2S. (Stranica 37.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij, smjer Bilinogojstvo- Ishrana bilja i tloznanstvo

FIZIOLOŠKI ODGOVOR KLIJANACA KRASTAVCA (*Cucumis sativus* L.) NA TRETMANE SJEMENA DONORIMA SUMPOROVODIKA (H_2S)

Vlatko Galić

Sažetak:

Sumporovodik (H_2S) je do nedavno bio smatran fitotoksinom, no rastući broj dokaza potvrđuje da njegova prisutnost u niskim, fiziološkim koncentracijama ima pozitivan učinak na biljke. Istraživanjima na biljkama je dokazano moguća uloga H_2S kao signalne molekule uz vodik peroksid i dušik oksid. H_2S utječe na mehanizme regulacije gibanja puči, potiče rast adventivnog korijenja te pojačava otpornost biljaka na stres izazvan visokim koncentracijama soli i teških metala. Sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L.) je osmoprimirano s dva donora H_2S različitih kemijskih svojstava; GYY4137 i NaHS. Sjeme iz različitih proizvodnih godina je osmoprimirano u otopinama navedenih donora H_2S te naklijavano na otopini NaCl niske koncentracije (25 mM) i vodi. Analiziran je sadržaj slobodnog prolina, intenzitet lipidne peroksidacije te koncentracija vodikovog peroksida u hipokotilima. Lipidna peroksidacija je bila značajno smanjena pri tretmanu sjemena s GYY4137 dok je efekt NaHS kao donora sumporovodika vjerojatno izostao zbog hlapljive prirode tog spoja. Svi ispitivani pokazatelji u hipokotilima su pokazali niže vrijednosti nakon klijanja u otopini NaCl. Rezultati ispitivanih pokazatelja ukazuju da je slabi solni stres djelovao stimulativno na pokretanje nekih antioksidativnih mehanizama u biljci. su daljnja istraživanja koja će na molekularnoj razini rasvijetliti točnu ulogu i funkciju ovog spoja u odgovoru biljke na stres.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: doc.dr.sc. Miroslav Lisjak

Broj stranica: 50
Broj slika i grafikona: 12
Broj tablica: 7
Broj literaturnih navoda: 38
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: H_2S, NaHS, GYY4137, osmoprimiranje, krastavac, sjeme
Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu

1. prof.dr.sc. *Tihana Teklić*, predsjednik
2. doc.dr.sc. *Miroslav Lisjak*, mentor
3. prof.dr.sc. *Nada Parađiković*, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, course Plant production- Plant nutrition and soil sciences

PHYSIOLOGYCAL RESPONSE OF CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) SEEDLINGS ON SEED TREATMENTS WITH H_2S DONORS

Vlatko Galić

Summary:

Until recently, hydrogen sulphide has been thought as a phytotoxine, but there is a growing body of evidence suggesting that in low concentrations in plants it can act in more positive manner. Researches on plants confirmed a possible role of H_2S as a signalling molecule alongside with hydrogen peroxide and nitric oxide respectively. H_2S is involved in stomatal movement control, encourage of adventurous root growth as well as it enhance tolerance on stress caused by high concentrations of salt or heavy metals. In our research, cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) have been osmoprimed with two H_2S donors differing in chemical properties; GYY4137 and NaHS. Seeds of three different production seasons were osmoprimed with before mentioned H_2S donors and germinated on low concentration NaCl solution (25 mM) and water. Free proline content, lipid peroxidation intensity and hydrogen peroxide concentration in hypocotyls were analysed. Lipid peroxidation was significantly lower in the treatment with GYY4137 while treatment with NaHS didn't show any effect. All tested parameters in hypocotyls showed lower values after germination in NaCl solution. Considering all the examined parameters, it was found that a mild stress stimulated some antioxidative mechanisms in plants. Further researches on molecular level need to be carried to elucidate the exact role and function of this gasotransmitter in plant stress response.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: PhD Miroslav Lisjak, assistant professor

Number of pages: 50
Number of figures: 12
Number of tables: 7
Number of references: 38
Number of appendices: 0
Original in: Croatian

Key words: H_2S, NaHS, GYY4137, osmopriming, cucumber, seed
Thesis defended on date:

Reviewers:

1. PhD *Tihana Teklić*, full professor
2. PhD *Miroslav Lisjak*, assistant professor
3. PhD *Nada Parađiković*, full professor

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.