

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

mr Gordana R. Zdjelar

**"FIZIOLOŠKE, BIOHEMIJSKE I MOLEKULARNE
OSNOVE TOLERANTNOSTI NA SUŠU I
OSMOTSKI STRES U RANIM VEGETATIVNIM
FAZAMA RAZVOJA ODABRANIH GENOTIPOVA
RODA *Pisum*"**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE**

MSc Gordana R. Zdjelar

**"PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND
MOLECULAR BASIS OF DROUGHT AND
OSMOTIC STRESS TOLERANCE IN THE EARLY
STAGES OF VEGETATIVE DEVELOPMENT OF
SELECTED *Pisum* GENOTYPES"**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

dr Tomislav Živanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Radmila Stikić, redovni profesor u penziji

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Gordana Šurlan-Momirović, redovni profesor u penziji

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Biljana Vucelić Radović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Vuk Đorđević, naučni saradnik

Institut za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu

Datum odbrane doktorske disertacije

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Laboratoriji za ispitivanje semena Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Laboratoriji Katedre za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem se svim članovima ovih ustanova na podršci i pomoći koju su mi pružili u toku izrade ove disertacije.

Naročitu zahvalnost dugujem mentorima prof. dr Radmili Stikić i prof. dr Tomislavu Živanoviću na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći u interpretaciji rezultata, konsultacijama i podršci tokom izrade disertacije. Takođe se zahvaljujem i prof. dr Gordani Šurlan-Momirović i prof. dr Biljani Vucelić-Radović.

Veliku zahvalnost dugujem dipl. inž. Slaviši Đorđeviću i dipl. biol. Ivani Petrović na pomoći prilikom postavljanja ogleda i analize sadržaja ABA, kao i dr Mileni Marjanović na bezgraničnoj pomoći u svakom trenutku izrade ove disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem dr Vesni Pajić na pomoći pri statističkoj obradi podataka.

Srdačno se zahvaljujem dr Jeleni Samardžić i njenim saradnicima iz IMGGI na nesebičnoj pomoći prilikom biohemijskih i molekularnih istraživanja.

Zahvalnost dugujem i dr Dušici Jovičić i dr Sanji Mikić na pomoći, savetima i predlozima koje su dale prilikom izrade i čitanja disertacije, kao i dipl. inž.-,masteru Branku Miloševiću.

Neizmerno sam zahvalna i porodicama Petrović i Maslač i svim dragim osobama koje su, u različitim fazama izrade ove disertacije, bile uz mene.

Ovu disertaciju posvećujem mom Srđanu, koji bi danas bio neizmerno ponosan na mene, i našoj ćerkici Dunji.

Fiziološke, biohemijske i molekularne osnove tolerantnosti na sušu i osmotski stres u ranim vegetativnim fazama razvoja odabranih genotipova roda *Pisum*

Abstrakt

Suša i osmotski stres, pored efekata na rastenje i razviće biljaka, dovode i do oksidativnog stresa i nastajanja velike količine reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Kako bi neutralisale štetne efekte ROS, biljke su razvile antioksidativne sisteme zaštite. Cilj istraživanja ove disertacije je bio da se detaljno prouče fiziološki i biohemijski procesi koji su u osnovi reakcija biljaka stočnog graška na sušu i osmotski stres. Cilj je bio i da se u ova ispitivanja uključe i molekularna istraživanja, koja bi, uz analizu procesa rastenja i drugih fizioloških procesa (aktivnost antioksidativnih enzima, akumulacije i distribucije stres hormona abscisinske kiseline), značajno doprinela razumevanju efekata, ne samo osmotskog i stresa suše, već i oksidativnog stresa na biljke stočnog graška.

Istraživanja su vršena na 7 odabranih genotipova roda *Pisum* iz kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada. Tretmani su obuhvatili dva eksperimentalna sistema: osmotski stres i sušu. Za indukciju osmotskog stresa su korišćene različite koncentracije rastvora osmotikuma PEG 6000 osmotskog potencijala (od -0,1MPa i -0,2MPa) primenjene u kraćem (10 dana) i dužem vremenskom intervalu (15 dana) kod klijanaca i ponika biljaka. Kao kontrolna varijanta je korišćena voda bez dodatka PEG 6000. Eksperiment suše je obavljen kod biljaka gajenih u kontrolisanim uslovima (u fitotronskoj komori) i to tako da su biljke zalivane optimalno do pojave trećeg para listova, a potom je suša u zemljištu izazvana prekidanjem zalivanja biljaka do 18% (umerena suša) i 9% sadržaja vode u spustratu (jaka suša). Biljke u kontroli su zalivane do optimalnog vodnog režima zamlišta (36% sadržaja vode u supstratu). U ogledu osmotskog stresa u fazi klijanja su obavljena fiziološka ispitivanja uticaja osmotskog stresa na % klijavosti i srednje vreme klijanja ili Mean Germination Time, dok su u fazi ponika obavljena ispitivanja dužine i biomase nadzemnog dela i korena, kao i

odnosa suve mase nadzemnog dela i korena, a izračunat je i indeks tolerantnosti za nadzemni deo i koren. Biohemijska ispitivanja su obuhvatila merenja koncentracije stres hormona abscisinske kiseline (ABA) i aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutation reduktaze), dok su molekularna istraživanja obuhvatila analizu ekspresije gena za antioksidativne enzime (*Cu/ZnSOD*, *cAPx* i *GR*) i 3 gena za enzim aldehidnu oksidazu (*PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3*), koja učestvuje u biosintezi abscisinske kiseline. U eksperimentu suše obavljena su ispitivanja biomase, provodljivosti stominih ćelija, koncentracije ABA, aktivnosti istih enzima i gena kao u ogledu osmotskog stresa.

Dobijeni rezultati su pokazali da je osmotski stres značajno uticao na ispitivane biljke u obe rane vegetativne faze njihovog razvoja (fazi klijanja i fazi ponika), ali i da je taj efekat zavisio od stepena stresa, njegovog trajanja i ispitivanih sorti stočnog graška. Kod svih sorti se sa povećanjem nivoa osmotskog stresa značajno smanjuje procenat klijavosti, produžuje srednje vreme klijanja i usporava ukupno vreme klijanja. Osmotski stres i dužina njegovog trajanja su značajno uticali na rast vegetativnih organa ponika (nadzemni deo i koren) i akumulaciju biomase i taj efekat se više odrazio na rast nadzemnog dela u odnosu na rast korena, a to su potrdile i vrednosti indeksa tolerantnosti koren. Na osnovu ovih vrednosti sve sorte se mogu podeliti na tolerantne (Mraz i Dukat), srednje tolerantnih (Trezor, Pionir i Partner) i osetljive sorte (Junior i Javor). Koncentracija ABA je merena u nadzemnim delovima ponika i kod jedne grupe sorti (Javor, Partner i Junior) je došlo do značajnog povećanja sadržaja ABA, dok je kod drugih došlo do smanjenja koncentracije ABA (Mraz, Dukat, Pionir i Trezor) što ukazuje da ispitivani procesi nisu kod svih sorti pod kontrolom ABA: Aktivnost antioksidativnih enzima je bila povećana pod uticajem osmotskog stresa, ali su se kod različitih sorti uključivali različiti enzimi što može da ukaže i na različiti stepen tolerantnosti ispitivanih sorti. Kod tolerantne sorte Trezor mehanizam uklanjanja ROS bazira na konstantno povećanoj aktivnosti sva tri enzima, dok je kod sorti Junior i Javor, koje su osetljivije na osmotski stres, aktivnost enzima je smanjena.

Ispitivanja efekta suše na sorte graška su pokazala da se sorte razlikuju i u akumulaciji biomase i njenoj distribuciji, kao i u indeksu tolerantnosti ispitivanih organa. Na osnovu ovih parametara biomase, ispitivane sorte graška se mogu podeliti u tri grupe: tolerantne (Dukat, Partner), srednje tolerantne (Trezor, Pionir, Junior) i osetljive (Javor i Mraz). Reakcije stoma su se takođe razlikovale ali samo u uslovima umerene suše, dok su u uslovima jake suše sve sorte reagovalе slično - bržim zatvaranjem stoma. Korelativni odnosi između sadržaja ABA u listovima i promene provodljivosti stominih ćelija su pokazali da je akumulacija ABA u listovima najviše uticala na provodljivost stoma kod sorte Dukat (povećanje 10 puta), kao i da se ovaj tip reakcije može pripisati "hemijskim signalima" suše. Nasuprot tome, najmanja osetljivost stominih ćelija sorte Javor na povećanu koncentraciju ABA (porast 2,5 puta) ukazuje na "hidraulične signale suše". U uslovima suše se povećava aktivnost antioksidativnih enzima i te promene, iako manje izražene u odnosu na uslove osmotskog stresa, mogu da ukažu na različiti stepen osetljivosti ispitivanih sorti. Kod tolerantne sorte Trezor mehanizam uklanjanja ROS se bazira na konstantno povećanoj aktivnosti sva tri enzima, dok je kod osetljive sorte Javor aktivnost ovih enzima je smanjena. Rezultati analize ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime (*Cu/ZnSOD*, *cAPx*, *GR*) ukazuju da je reakcija ispitivanih sorti na ROS, nastalih u osmotskom ili stresu suše, rezultat povećane ekspresije ispitivanih gena kod tolerantnih sorti, odnosno smanjene ekspresije kod osetljivih sorti. Rezultati su kod ispitivanih sorti graška potvrdili ekspresiju tri gena (*PsA01*, *PsA02* i *PsA03*) neophodnih za ključni enzim aldehidnu oksidazu u biosintezi ABA. S obzirom na to da je ekspresija gena *PsA03* bila konstantno povećana pod uticajem i osmotskog stresa i suše, može se zaključiti da je ovaj gen od primarnog značaja za biljke graška izložene delovanju stresa.

Dobijeni rezultati ukazuju da se na osnovu relativno jednostavnih metoda kao što su određivanje procenta klijavosti i porasta ponika, može izvršiti testiranje većeg broja genotipova graška na osmotski stres. Takođe, molekularne analize za antioksidativne enzime (SOD, APx i GR) mogu biti korisne za ocenjivanje tolerantnosti genotipova stočnog graška na osmotski stres i sušu.

Ključne reči: genotip, RNK, ekspresija gena, antioksidativni enzimi, ABA, grašak, suša, osmotski stres, klijavost, indeks tolerantnosti

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Genetika i oplemenjivanje biljaka

UDK broj: 631.527:633.35:632.112(043.3)

Physiological, biochemical and molecular basis of drought and osmotic stress tolerance in the early stages of vegetative development of selected *Pisum* genotypes

Abstract

Drought and osmotic stress, in addition to the effects on plant growth and development, lead to oxidative stress and the production of a large quantity of reactive oxygen species (ROS). Plants have developed antioxidant defense mechanisms in order to neutralise the damaging effects of ROS. The aim of this dissertation was to investigate the physiological and biochemical processes which are in the base of field pea reaction to drought and osmotic stress. The aim was also to include molecular research in the study, along with the analysis of growth and other physiological processes (activity of antioxidant enzymes, accumulation, and distribution of plant stress hormones abscisic acid), which would significantly improve understanding of not only osmotic and drought stresses, but also about the effects of oxidative stress on field pea plants.

Studies were conducted on seven selected genotypes of the genus *Pisum* from the collection of the Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad. Treatments consisted of two experimental systems: osmotic and drought stresses and drought in the environmental test chamber. For induction of osmotic stress different concentrations of osmotic solutions PEG 6000 (-0.1MPa and -0.2MPa) were used in a shorter (10 days) and longer time interval (15 days). Water without PEG 6000 was used as control. The drought experiment was conducted in control conditions (phytotron chamber) in a such waz that the plants were irrigated at the optimal soil water content until the third pair of leaves began emergence, after which soil drought was induced by termination of irrigation up to 18% (moderate drought), and 9% substrate water content (severe drought). Control plants were irrigated at the optimal level of soil water regime (36% substrate water content). In osmotic stress experiment in the germination stage physiological tests included measurements of germination percentage and Mean Germination Time, while in the seedling stage was performed testing of the length and biomass of plant shoot

and root, as well as shoot dry weight and root dry weight ratio (shoot/root ratio) and calculation of the tolerance indexes for the shoots and roots. Biochemical testing included measurements of concentrations of abscisic acid hormone (ABA) and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase), while molecular testing consisted of analysis of gene expression of antioxidant enzymes (*Cu/ZnSOD*, *cAPx* and *GR*), and three genes of aldehyde oxidase (*PsAO1*, *PsAO2* and *PsAO3*) which participates in abscisic acid biosynthesis. In drought experiments measurements of plant biomass, stomatal conductivity, ABA concentration was conducted as well as the activity of the same antioxidant enzymes and expression of genes as in osmotic stress experiment.

The obtained results revealed that osmotic stress significantly affected the tested plants in both early vegetative stages of plant growth (germination and seedling), but also the effect depended on the level of stress, duration of stress, and the tested field pea cultivar. Increase in osmotic stress significantly decreased germination percentage in all the tested cultivars, increased Mean Germination Time, and decreased total germination time. The mentioned changes occurred at the lowest level of stress (-0.1MPa). Osmotic stress exposure and its duration significantly affected the growth of seedlings (shoot and root) and the accumulation of biomass, while its effect was more prominent on the growth of the shoot than on root growth, and this was also confirmed by root tolerance index. Based on these results all cultivars could be divided into tolerant (Mraz, Dukat), medium-tolerant (Trezor, Pionir, Partner) and sensitive to osmotic stress (Junior, Javor). Measurements of ABA concentration in the shoot of seedlings were also conducted and a significant increase in ABA content was noticed in one group of cultivars (Javor, Partner, Junior), while a decrease in ABA concentration in other cultivars (Mraz, Dukat, Pionir, Trezor) pointed out that investigated processes are not in all cultivars under control of ABA. Activity of antioxidant enzymes was increased under osmotic stress. but different enzymes were activated in the different cultivars, which might indicate a different degree of tolerance. In the tolerant cultivar Trezor the mechanism of eliminating ROS was based on the constantly

increased activity of all three enzymes, while in cultivars Junior and Javor, more sensitive to osmotic stress, the activities of enzymes were decreased.

The investigations of drought effects on investigating cultivars showed differences in biomass accumulation and its distribution, as well as in indices of drought tolerance. On the base of these results the tested pea cultivars can be divided into three groups: tolerant (Dukat, Partner), moderately tolerant (Trezor, Pionir, Junior), and sensitive (Javor, Mraz). The stomatal reactions also differed between cultivars, but only under moderate drought conditions, while all cultivars reacted by the faster stomatal closure under severe drought. The correlation between ABA in leaves and changes in stomatal conductance revealed that stomatal conductance in cultivar Dukat was most affected by the accumulation of ABA in leaves (10 x increase) and that this reaction could be explained by "chemical signals" of drought. Contrary to the previous, the lowest stomatal sensitivity to increased concentration of ABA (2,5 x increase) in cultivar Javor indicates the "hydraulic signals" of drought. Drought conditions increase the activity of antioxidant enzymes, but although these changes were less pronounced than in osmotic stress conditions, they also indicate different degree of sensitivity in the tested cultivars. In the tolerant cultivar Trezor, the mechanism of eliminating ROS is based on the constant increase in activity of all three enzymes, while their activity is decreased in the sensitive cultivar Javor. The results of the analysis of gene expression coding for antioxidant enzymes (*Cu/ZnSOD*, *cAPx*, *GR*) showed that the reaction of the tested cultivars to ROS, created under osmotic or drought stress, was the result of increased expression of the tested genes in tolerant cultivars, i.e. decreased expression in sensitive cultivars. Results obtained in the study of pea cultivars confirmed expression of three genes (*PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3*) needed for the synthesis of enzyme aldehyde oxidase key for ABA biosynthesis. As the expression of gene *PsAO3* had constantly been increased under osmotic stress and drought conditions, it could be concluded that the this gene is of primary importance for pea plants exposed to stress.

The obtained results show that, the reaction to osmotic stress can be tested in different pea plants, based on the simple methods such as germination percentage and seedling growth rate. Likewise, molecular analyses for antioxidant enzymes (SOD, AP_x and GR) can be useful for testing tolerance to osmotic stress and drought stress in field pea genotypes.

Keywords: genotype, RNA, gene expression, antioxidant enzymes, ABA, pea, drought, osmotic stress, germination tolerance index.

Scientific field: Biotechnical sciences

Specific scientific field: Genetics and Plant Breeding

UDC number: 631.527:633.35:632.112(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Grašak kao objekat istraživanja	4,
2.2. Suša kao stresni faktor	7
2.3. Osmotski stres	8
2.4. Oksidativni stres	9
2.4.1. Antioksidantni	14.
2.4.1.1. Neenzimski oksidanti	14
2.4.1.2. Enzimski oksidanti	18
2.5. Abscisinska kiselina	22
2.6. Fiziološki i biohemijski efekti suše na biljke	27
2.7. Percepcija i transdukcija signala suše	32
2.8. Molekularni odgovor biljaka na sušu	33
3. NAUČNI CILJ I OSNOVNE HIPOTEZE	35
4. MATERIJAL I METODE	36
4.1. Biljni materijal	36
4.1.1. Karakteristike ispitivanih sorti	37
4.2. Ogljed osmotskog stresa	38
4.3. Ogljed suše	39
4.4. Određivanje fizioloških parametara kod ponika u ogledu osmotskog stresa	41
4.5. Određivanje fizioloških parametara kod biljaka u ogledu suše	42
4.5.1. Merenje osnovnih fizioloških parametara	42
4.5.2. Merenje provodljivosti stoma	42
4.6. Određivanje sadržaja abscisincke kiseline	43
4.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	46
4.7.1. Priprema uzoraka	46
4.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	46

4.7.3. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	47
4.7.4. Određivanje aktivnosti glutathion reduktaze	47
4.8. Analiza promena u ekspresiji gena pod uticajem osmotskog stresa i u ogledu suše	48
4.8.1. Ekstrakcija informacione RNK	48
4.8.2. Sinteza cDNK	49
4.8.3. Amplifikacija kandidat gena	49
4.9. Statistička obrada podataka	51
5. REZULTATI	52
5.1. Osmotski stres	52
5.1.1. Ispitivanja klijavosti semena.	53
5.1.2. Srednje vreme klijanja – Mean Germination Time (MGT)	54
5.1.3. Uticaj osmotskog stresa na dužinu nadzemnog dela ponika	55
5.1.4. Uticaj osmotskog stresa na dužinu korena ponika	59
5.1.5. Uticaj osmotskog stresa na svežu masu nadzemnog dela ponika	63
5.1.6. Uticaj osmotskog stresa na svežu masu korena ponika	65
5.1.7. Uticaj osmotskog stresa na suhu masu nadzemnog dela ponika	67
5.1.8. Uticaj osmotskog stresa na suhu masu korena ponika	70
5.1.9. Uticaj osmotskog stresa na odnos suve mase nadzemnog dela i korena	72
5.1.10. Indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa	74
5.1.11. Indeks tolerantnosti korena ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa	77
5.1.12. Uticaj osmotskog stresa na sadržaj abscisinske kiseline u nadzemnim delovima ponika	79
5.1.13. Uticaj osmotskog stresa na antioksidativni status ponika u ogledu osmotskog stresa	84
5.1.13.1. Uticaj osmotskog stresa na aktivnost enzima superoksid dismutaze	84
5.1.13.2. Uticaj osmotskog stresa na aktivnost enzima	

askorbat peroksidaze	90
5.1.13.3. Uticaj osmotskog stresa na aktivnost enzima glutation reduktaze	97
5.1.14. Ekspresija gena pod uticajem osmotskog stresa	103
5.1.14.1. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za antioksidativne enzime	103
5.14.1.1. Ekspresija gena za enzim superoksid dismutazu	103
5.14.1.2. Ekspresija gena za enzim askorbat peroksidazu	105
5.14.1.3. Ekspresija gena za enzim glutation reduktazu	107
5.14.1.4. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena koji učestvuju u sintezi abscisinske kiseline	109
5.2. Suša	110
5.2.1. Uticaj suše na svežu masu nadzemnog dela biljaka	111
5.2.2. Uticaj suše na svežu masu korena biljaka	112
5.2.3. Uticaj suše na suhu masu nadzemnog dela biljaka	113
5.2.4. Uticaj suše na suhu masu korena biljaka	115
5.2.5. Uticaj suše na odnos suve mase nadzemnog dela i korena biljaka	116
5.2.6. Indeks tolerantnosti na sušu nadzemnog dela biljaka	117
5.2.7. Indeks tolerantnosti na sušu korena biljaka	118
5.2.8. Provodljivost stoma	119
5.2.9. Akumulacija abscisinske kiseline u listovima biljaka	122
5.2.10. Uticaj suše na antioksidativni status odabranih genotipova stočnog graška	124
5.2.10.1. Uticaj suše na aktivnost enzima superoksid dismutase	125
5.2.10.2. Uticaj suše na aktivnost enzima askorbat peroksidaze	127
5.2.10.3. Uticaj suše na aktivnost enzima glutation reduktaze	129
5.2.11. Uticaj suše na ekspresiju gena	131
5.2.11.1. Ekspresija gena za antioksidativne enzime pod uticajem suše	131
5.2.11.1.1. Ekspresija gena za enzim superoksid dismutazu	131
5.2.11.1.2. Ekspresija gena za enzim askorbat peroksidazu	132
5.2.11.1.3. Ekspresija gena za enzim glutation reduktazu	133

5.2.11.2. Uticaj suše na ekspresiju gena koji učestvuju u sintezi abscisinske kiseline	134
6. DISKUSIJA	136
6.1. Osmotski stres	136
6.1.1. Osmotski stres i klijavost semena	136
6.1.2. Osmotski stres i rast nadzemnog dela i korena ponika i akumulacija biomase	138
6.1.3. Osmotski stres i koncentracija abscisinske kiseline	145
6.1.4. Osmotski stres i aktivnost antioksidativnih enzima	146
6.1.5. Ekspresija gena pod uticajem osmotskog stresa	150
6.2. Suša	154
6.2.1. Suša i rast biljaka	154
6.2.2. Suša i reakcije stominih ćelija	157
6.2.3. Suša i koncentracija abscisinske kiseline	159
6.2.4. Suša i aktivnost antioksidativnih enzima	161
6.2.5. Uticaj suše na ekspresiju gena	167
7. ZAKLJUČCI	169
8. LITERATURA	175
9. PRILOZI	218
10. BIOGRAFIJA	230

1. UVOD

Biljke su u toku svog životnog ciklusa konstantno izložene različitim uslovima životne sredine, koji utiču na njihov rast i razvoj. Ukoliko je dejstvo faktora sredine izvan granica optimuma za odvijanje fizioloških procesa određene biljne vrste, a za posledicu ima smanjenu produktivnost i značajno smanjenje prinosa poljoprivredno značajnih kultura, onda se oni označavaju kao *stresni faktori* ili *stresori*.

Stresni faktori mogu biti *abiotički* – koji su u osnovi fizičko-hemijske prirode i *biotički* – koji su biološke prirode, ali i *antropogeni* koji nastaju pod dejstvom čoveka. U *abiotičke* faktore spadaju: temperatura (visoka i niska), voda (deficit – suša i višak – poplava), radijacija (elektromagnetna i jonizujuća), različiti hemijski agensi (soli, joni, organska jedinjenja kao što su herbicidi i insekticidi), kao i različiti faktori od manjeg značaja kao što su npr. vetar, pritisak, zvuk, magnetizam, elektricitet. U grupu *biotičkih* stresnih faktora spadaju različiti biljni patogeni (najviše gljive, bakterije i virusi), insekti, nematode, herbivore, kao i kompetitivni odnosi za prirodne resurse u agrofitocenoza. Pored ovih nabrojanih tzv. *primarnih* stresnih faktora mogu se javiti i *sekundarni* stresni faktori koji su nastali kao rezultat dejstva primarnih stresnih faktora. U sekundarne stresne faktore spada *oksidativni stres* koga mogu da indukuju mnogi primarni faktori (suša, ekstremne temperature, višak svetlosne energije, ozon ili patogeni) tako što dovode do poremećaja u transportu elektrona u fotosintezi i korišćenja redukovanih ekvivalenata u metabolizmu biljaka. Slično je i sa *osmotskim stresom* koga mogu indukovati razni primarni stresni faktori (suša, visoka i niska temperatura, soli u zemljištu i dr.) koji, izazivajući dehidrataciju ćelija, remete osmotski i jonski homeostazis u njima (Stikić i Jovanović, 2012).

Uticaj abiotičkih stresnih faktora na fiziološke procese biljaka je kompleksan i zavisi od intenziteta stresa i vremena njegovog delovanja, od biljne vrste i od stadijuma ontogeneze biljaka u kojima oni deluju. Zbog sve više izraženih

klimatskih promena i smanjenja raspoloživih vodnih resursa i to kako za urbane, tako i za industrijske ili poljoprivredne potrebe, sve više je izražen efekat suše, a smatra se da će u budućnosti uticaj ovog faktora biti još izraženiji (IPCC, 2007).

Suša je u svetu jedan od najznačajnijih abiotičkih stresnih faktora koji ograničava biljnu proizvodnju. Prema procenama, oko 90% obradivog zemljišta je pod uticajem jednog ili više stresova životne sredine (Dita *i sar.*, 2006), od čega je oko 26% ugroženo nedostatkom vode (Blum, 1986). Smatra se da u poređenju sa svim ostalim vrstama abiotičkog stresa kojima su biljke izložene, suša najviše utiče na njihov rast i produktivnost (Shao *i sar.*, 2008), kao i da gubici prinosa u poljoprivrednoj proizvodnji uzrokovani sušom verovatno premašuju gubitke uzrokovane svim ostalim faktorima zajedno (Foolad, 2007). U Srbiji, nedostatak zimskih padavina zajedno sa letnjim sušnim periodima smanjuje proizvodnju i redukuje prinos gajenih biljaka (Eitzinger *i sar.*, 2008). Klimatski modeli i procene Svetske meteorološke organizacije su da će se u regionu Južne Evrope, kome pripada i Republika Srbija, u narednom periodu, pored daljeg trenda porasta temperature vazduha, nastaviti i dalje smanjenje padavina praćeno smanjenjem vlažnosti zemljišta i raspoloživosti vodnih resursa. Takođe se očekuje i porast ekstremnih klimatskih pojava (Kjellström *i sar.*, 2007).

Za prevazilaženje negativnih efekata suše u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji uglavnom se koriste dva pristupa i to: stvaranje otpornih sorti i hibrida na sušu i poboljšanje agrotehničkih mera u oblastima gde biljke mogu biti izložene suši. U osnovi oba pristupa je razumevanje efekata suše na biljke i adaptivnih reakcija koje doprinose tolerantnosti biljaka na sušu.

U poljoprivredne kulture čija proizvodnja može biti ugrožena sušom spada i grašak. U mnogim delovima sveta, suša utiče na kvalitet i na kvantitet prinosa graška (Wood, 2006; Magyar-Tábori *i sar.*, 2011). Grašak (*Pisum sativum* L.) je veoma značajna povrtarsko-krmna vrsta. Nakon soje i pasulja, predstavlja treću najvažniju leguminozu i uzgaja se na preko 6 miliona ha svetu (FAO, 2013), odnosno na preko 35000 ha u Srbiji (Mihailović *i sar.*, 2009). Koristi se u ishrani

ljudi i domaćih životinja. Stočni grašak, pre svega zbog niskog sadržaja antinutritivnih materija i relativno visokog sadržaja proteina u zrnu, nalazi široku primenu, posebno u proizvodnji stočne hrane. Zrno stočnog graška je sastavni deo kvalitetnih krmnih smeša, dok se nadzemni deo može koristiti kao kabasta stočna hrana (zelena krma, silaža) (Karagić *i sar.*, 2007). Zbog simbioze sa azotofiksirajućim bakterijama stočni grašak ima veliku ulogu u obezbeđivanju zemljišta značajnim količinama azota (oko 43 kg/ha) zbog čega se često koristi i kao zelenišno đubrivo (Oelke *i sar.*, 1991). S obzirom na to da zahteva minimalnu primenu azotnih đubriva, pogodan je usev i sa stanovišta proizvodnje zdrave i ekološki bezbedne hrane (Erić *i sar.*, 2002).

Grašak, kao i druge leguminoze, zahteva relativno velike količine vode tokom vegetacije. Imajući u vidu da je voda pokretač metaboličkih procesa neophodnih za klijanje, kao i za sintezu novih jedinjenja, dovoljna količina vode u početnim fazama neophodna je kako bi ponik bio dovoljno razvijen da prevaziđe ostale nepovoljne uslove sredine (loš mehanički sastav zemljišta, neadekvatno pripremljeno zemljište i sl.) i nastavi sa rastenjem i razvićem. Biljke graška su najosetljivije na nedostatak vode u zemljištu od početka butonizacije do cvetanja. Nakon cvetanja, kao i kasnije tokom faze nalivanja zrna, osetljivost graška na nedostatak vode je mnogo manja (Andersen i Aremu, 1991). Ti rezultati ukazuju na potrebu da se ispita dejstvo suše i reakcije različitih genotipova graška u ranim fazama razvića biljaka, a koje su među najosetljivijim na dejstvo suše. Za istraživanja reakcija biljaka u ranim fazama razvića (klijanje i razvoj ponika) se najčešće ne koriste ogledi u polju jer uticaj suše u tim uslovima ne omogućava preciznu fenotipsku karakterizaciju reakcija biljaka. Zato se za fenotipsku karakterizaciju u ranim fazama primenjuju metode u kojima se biljke gaje i ispituju u kontrolisanim uslovima (Annicchiarico i Iannucci, 2008), a često se za indukciju stresa koriste osmotikumi kao što je primenjeno i u ovoj doktorskoj disertaciji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Grašak kao objekat istraživanja

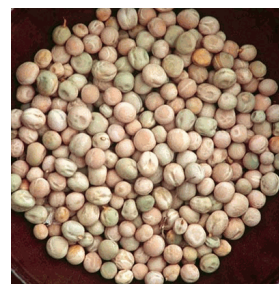
Grašak vodi poreklo iz severozapadnih delova Indije i Avganistana (Vavilov, 1935), odnosno jugoistočne Evrope, severozapadne Azije i severoistočne Afrike (Zeven i Zhukovsky, 1975). Rod *Pisum* L. pripada familiji *Fabaceae* Lindl. (syn. *Leguminosae* Juss.; *Papilionaceae*), podfamiliji *Papilionideae* i kolenu *Vicieae* Bronn., zajedno sa rodovima *Lathyrus* L., *Lens* Mill., *Vavilovia* A. Fedorov i *Vicia* L., od kojih se u najvećoj meri razlikuje po prisustvu krupnih, listolikih zalistaka.

Jedna od najprihvaćenijih klasifikacija (Davis, 1970) raščlanjava rod *Pisum* L. na tri vrste: *Pisum sativum* L., *Pisum abyssinicum* A. Br. i *Pisum fulvum* Sibth. & Sm., pri čemu prva vrsta obuhvata dve podvrste, *sativum* i *elatius* (Bieb.) Aschers. & Graebn. U okviru podvrste *sativum* postoje dva varijeteta, *sativum* i *arvense* (L.) Poiret, dok se podvrsta *elatius* deli na tri: *elatius*, *brevipedunculatum* Davis & Meikle i *pumilio* Meikle (syn. *P. humile* Boiss. & Noë).

a)



b)



Slika 1. a) Mlade biljke stočnog graška; b) seme stočnog graška.

Gajenje graška se uspešno odvijalo hiljadama godina, na prvom mestu zbog niskog sadržaja antinutritivnih materija (Liener, 1982) i relativno visokog sadržaja

proteina u zrnu od oko 25% (Monti, 1983). Grašak uspeva u svim oblastima sa umerenom klimom na obe zemljine polulopte i predstavlja jedan od najvažnijih useva u ishrani ljudi i domaćih životinja (Maxted i Ambrose, 2000). Grašak je značajan sastojak u ishrani stanovništva Evrope, zemalja bivšeg Sovjetskog Saveza, Indije, Kine i Severne Amerike (Roy Davies, 1995). U svetu se godišnje proizvede preko 10 miliona tona za suvo zrno (FAO, 2013), što odgovara površini od preko 6 miliona ha i prosečnom prinosu zrna od oko 17000 kg/ha u 2013. godini (FAO, 2013).

Stočni grašak (slika 1) je dobro prilagođen agroekološkim uslovima Srbije, posebno na one koji preovlađuju u njenom severnom i središnjem delu. Gajenje graška, ozimog i jarog (Đorđević, 1942), ima dugu i uspešnu tradiciju i usmereno je na proizvodnju zelene krme, sena, senaže, silaže, zelenog i suvog zrna. Grašak se koristi i kao sirovina za dehidraciju i za zelenišno đubrenje (Karagić *i sar.*, 2007). Procenjuje se da se površine pod stočnim graškom i grahoricom u Srbiji kreću oko 35000 ha, većinom u severnim i središnjim delovima zemlje (Mihailović *i sar.*, 2009). Grašak za zrno se najviše gaji u severnom delu Republike Srbije, gde su uslovi za proizvodnju soje nepovoljni, zbog suše u julu i avgustu mesecu. Naime, grašak ima relativno kratku vegetaciju i za žetvu dospeva od polovine juna do polovine jula meseca, i tako izbegava kritičan sušni period, a što se pozitivno odražava na stabilnost prinosa.

Prinosi zelene krme stočnog graška kreću se preko 45 t/ha (Mihailović *i sar.*, 2009). Suva materija stočnog graška u fazi punog cvetanja sadrži oko 17,6% sirovih proteina, 21,7% sirove celuloze, 2,0% sirovih masti i 10,1% sirovog pepela (Mišković, 1986). Suvo zrno jarog stočnog graška sadrži 26,1% sirovih proteina, 5,7% sirove celuloze, 1,1% sirovih masti i 3,2% sirovog pepela (Ćupina, 1993). Proteini graška se odlikuju dobrom izbalansiranošću esencijalnih aminokiselina. Njihov sastav je sličan sojinom, ali uz veće učešće lizina (Mihailović *i sar.*, 2003), i sa 75% albumina i 15% globulina (Rapi, 1988). Zrno graška može uspešno da dopuni ili zameni proteine soje i bude osnovni izvor biljnih proteina. Velika

prednost proteinskog graška je što se rano seje i dobro koristi rezerve zimske vlage i prolećne padavine. Pored toga, zrno graška ne mora da prođe termičku obradu, već se direktno melje (krupi) i tako koristi kao jedna od proteinskih komponenti za pripremanje koncentrovanih hraniva. Svarljivost zrna graška je izuzetno visoka, te se grašak ubraja među zrnasta hraniva sa najvećom svarljivošću (Vučković, 1999). Grašak je jedan od najkvalitetnijih postojećih odgovora na globalne potrebe za proteinima u ljudskoj i životinjskoj ishrani (Mihailović i Mišković, 1987) i predstavlja odličnu leguminoznu komponentu u raznim sistemima ratarenja (Ambrose *i sar.*, 1997). Zbog simbioze sa azotofiksirajućim bakterijama grašak zahteva minimalnu primenu azotnih đubriva, te je pogodan usev i sa stanovišta održive poljoprivredne organske proizvodnje (Erić *i sar.*, 2002).

Grašak je odličan predusev za većinu gajenih biljnih vrsta. Seje se u gustom sklopu i dobro pokriva zemljište, te je mogućnost pojave korova smanjena a kao azotofiksator, u zemljištu ostavlja značajne količine azota i organskih materija.

U zavisnosti od vremena sejanja, razlikuju se ozimi i jari grašak. U našim agroekološkim uslovima, ozimi grašak se seje kao ozimi međuusev, krajem septembra, a najkasnije do polovine oktobra (Mihailović *i sar.*, 1997). Mlade biljke graška najveću otpornost pokazuju u fazi 3 ili 4 lista (Giordano *i sar.*, 1991). U slučaju oštećenja glavnog izdanka aktiviraju se novi, koji polaze iz čvora grananja koji se nalazi neposredno ispod površine zemljišta. U tim slučajevima, sazrevanje semenskog useva je neravnomerno, a prinos semena značajno manji. Setva jarog graška treba da se obavi što ranije u proleće, čim se zemljište dovoljno prosuši da može da se obrađuje. U agroekološkim uslovima Srbije optimalni rok za setvu graška je od 20. februara do 15. marta. Neophodno je da temperatura setvenog sloja bude iznad 5 °C i da uslovi na parceli dozvoljavaju predsetvenu pripremu. Optimalna temperatura setvenog sloja je oko 10 °C, pri čemu do nicanja dolazi za 7 dana. Rana setva ubrzava sazrevanje i smanjuje rizik od štetnog dejstva visokih temperatura, što znači veće prinose semena (Slinkard *i sar.*, 1994). Jare sorte

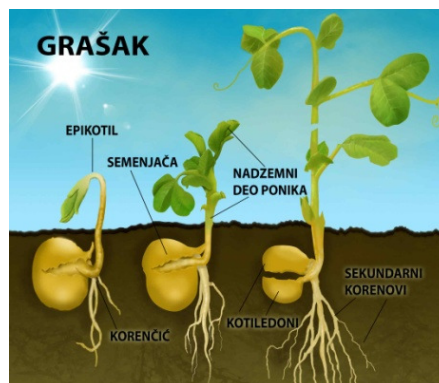
graška u velikom broju godina bivaju izložene ranoprolećnim sušama, što ima ograničavajući uticaj na ostvarenje njihovog genetičkog potencijala za visok i stabilan prinos zrna. Prinosi semena graška, u zavisnosti od sorte i agroekoloških uslova godine, kreću se od 2,0 do 3,0 t/ha kod ozimih i između 3,5 i 5,0 t/ha kod jarih sorti (Miladinović, 2001).

2.2. Suša kao stresni faktor

Vodni deficit, odnosno suša, nastaje kao posledica smanjene količine vode u zemljištu – *zemljišna suša*, ali može nastati i kao rezultat poremećaja u usvajanju vode – *fiziološka suša*. Fiziološka suša može nastati usled niske temperature zemljišta ili povećane koncentracije zemljišnog rastvora, kada voda u zemljištu postaje nedostupna biljci. Vodni stres može biti uslovljen i pojavom *vazdušne suše*, koja nastaje usled smanjenja vlažnosti vazduha, a koja je često praćena povećanjem temperature (temperaturni šok), ili povećanim intenzitetom strujanja vazduha (Stikić i Jovanović, 2012). Efekti suše se mogu javiti i kod drugih abiotičkih stresova, kao što su npr. zaslanjenost, niska i visoka temperatura (Rubio *i sar.*, 2002).

Potrebe graška za vodom su velike i zbog toga su ispitivanja reakcija na sušu graška i njegovih adaptivnih reakcija veoma značajna. Grašak je mezofitna biljka i teško podnosi sušu, ali je njegovo gajenje, zahvaljujući ranoj setvi i dobro razvijenom korenovom sistemu, moguće i u aridnim agroekološkim uslovima. Klijavost semena se definiše kao pojava i razvoj ponika do onog stepena kada izgled njegovih osnovnih struktura pokazuje da li ponik jeste ili nije u stanju da se dalje razvija u normalnu biljku u povoljnim uslovima (ISTA, 2013) (slika 2). Mehanizam klijanja obuhvata nekoliko faza: aktivaciju enzima, razgradnju rezervnih materija, translokaciju i mobilizaciju rastvorljivih materija i zatim deobu ćelija (Kastori, 1998). Da bi seme graška proklijalo, neophodno je da usvoji 114% vode u odnosu na sopstvenu masu (Spasojević *i sar.*, 1984). Osim faze klijanja, sve fenološke faze graška zahtevaju značajne količine vode. Prevelika vlažnost

zemljišta, sa druge strane, je jedan od uzroka poleganja useva graška kod sorti namenjenih za proizvodnju krme. Niska relativna vlažnost vazduha, zajedno sa visokim temperaturama, nepovoljno utiče na biološke procese, naročito na oplodnju i zametanje. Razdoblje kada je grašak najosetljiviji na nedostatak vlage jeste od početka butonizacije do punog cvetanja. Transpiracioni koeficijent graška se kreće između 400 i 450, a šire varira od 300 do 600 jedinica vode po jedinici suve materije, zavisno od sorte i uslova sredine. Najbolji rezultati u proizvodnji graška postižu se pri vlažnosti zemljišta od 60 do 80% poljskog vodnog kapaciteta zemljišta.



Slika 2. Klijanje graška (Modifikovano prema *Raven i sar.*, 1992).

2.3. Osmotski stres

Do dehidratacije ćelija i tkiva i osmotskog stresa dolazi usled poremećaja u vodnom režimu biljaka. Smanjeno usvajanje vode izazvano nedostatkom vode u zemljištu (sušom) ili njenom pristupačnošću za biljke – tzv. fiziološkom sušom (dejstvo soli, niske temperature), kao i promene u procesu transpiracije menjaju gradijent vodnog potencijala ($\Delta\Psi$), koji je neophodan i za usvajanje i kretanje vode.

Eksperimenti u kontrolisanom ogledima gde je primenjen osmotski stres imaju prednost u odnosu na poljske ogledne u slučaju istraživanja uticaja jednog stresnog faktora, jer se na taj način izbegava zbirni uticaj različitih abiotičkih

faktora koji su uvek prisutni u spoljašnjoj sredini u isto vreme (Alexieva *i sar.*, 2003; Fleury *i sar.* 2010). Ovi eksperimenti se zasnivaju na metodama koje se mogu primeniti u ranim fazama selekcije i uglavnom se odnose na ispitivanje klijavosti i porasta ponika i cele biljke u uslovima osmotskog stresa (Annicchiarico i Iannucci, 2008). Osmotski stres se u eksperimentalnim uslovima često indukuje primenom rastvora polietilenglikola 6000 (PEG 6000). PEG 6000, kao osmotikum, vezuje vodu, ali ga, zbog veličine njegovih molekula, biljke ne mogu usvojiti. Praktično, PEG izaziva stanje fiziološke suše, tj. onemogućava biljci da usvoji vodu. Nekoliko istraživanja je sprovedeno u cilju ispitivanja tolerantnosti različitih genotipova graška na osmotski stres izazvan sušom (Singh *i sar.*, 1990; Singh i Singh, 1992; Alexieva *i sar.*, 2001; Sanchez *i sar.*, 2004; Okçu *i sar.*, 2005; Kolbert *i sar.* 2008a; Generozova *i sar.*, 2009). Međutim, do sada postoji relativno malo informacija o razlikama u tolerantnosti na sušu među sortama leguminoza u poređenju sa razlikama koje postoje između vrsta. Ove informacije su neophodne za identifikaciju različitih mehanizama tolerantnosti na sušu između i unutar sorti gajenih biljaka (Grzesiak *i sar.*, 1999).

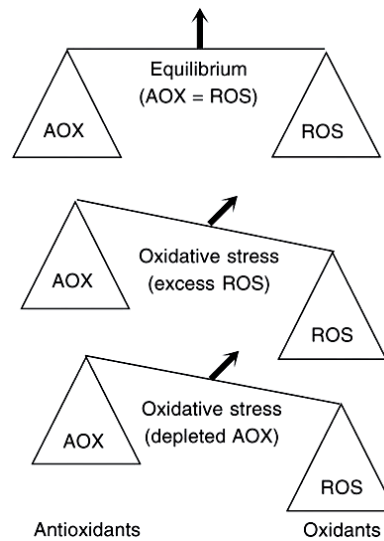
U reakcijama biljaka na sušu je primarna uloga hormona abscisinske kiseline (ABA) čija akumulacija u tim uslovima potpomaže adaptaciji biljaka na sušu kao i na druge abiotičke stresne faktore (Swamy i Smith, 1999). Iako postoje podaci o osmotskim stresom indukovanoj akumulaciji ABA u generativnim organima (Urbez *i sar.*, 2006), njena uloga u adaptivnim reakcijama graška na sušu i sortnim razlikama nije dovoljno ispitivana.

2. 4. Oksidativni stres

Suša, odnosno vodni deficit, kao i drugi faktori stresa, indukuje oksidativni stres i stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), koji izazivaju degradaciju ili inaktivaciju različitih biomolekula. Može se reći da oksidativni stres predstavlja

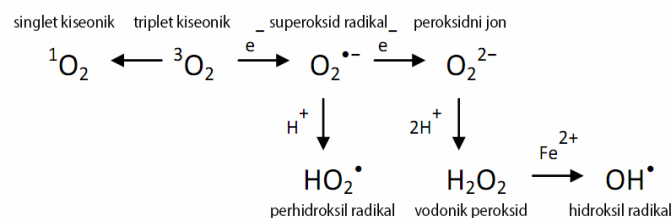
poremećaj ravnoteže koja postoji između prooksidativnih procesa i antioksidativnog sistema organizama.

Na molekularnom i ćelijskom nivou suša, odnosno vodni deficit, izaziva oksidativni stres u biljnom tkivu (Rubio *i sar.*, 2002). Vodni deficit, indukuje stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), koje izazivaju degradaciju ili inaktivaciju različitih biomeolekula. ROS se konstantno proizvode i tokom uobičajenih metaboličkih procesa u biljkama, kao što su reakcije fotosinteze, fotorespiracije, oksidativne fosforilacije, β -oksidacije masnih kiselina, kao i u drugim procesima oksidacija (Karuppanapandian *i sar.*, 2011; Tripathy i Oelmüller, 2012). U ovakvim uslovima (slika 3), u svim ćelijama postoji odgovarajuća ravnoteža između intercelularnog stvaranja i neutralisanja ROS (Dutilleul *i sar.*, 2003). U uslovima stresa njihova koncentracija se značajno povećava pri čemu se narušava balans između njihove eliminacije i produkcije (Mittler, 2002; Matamoros *i sar.*, 2003; Karuppanapandian *i sar.*, 2011). Prema tome, oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže između stvaranja ROS i njihove eliminacije pomoću antioksidativnog sistema organizama (Gill i Tuteja, 2010) (slika 3). Posledice oksidativnog stresa su lipidna peroksidacija, oksidativna modifikacija proteina i DNK (Boguszewska i Zagdanska, 2012; Shahid *i sar.*, 2012; Sharma *i sar.*, 2012), usled čega ćelija polako gubi integritet i podleže nekrozi, ukoliko ne poseduje dovoljno snažne mehanizme antioksidativne zaštite. Kod biljaka, prisustvo ROS takođe dovodi do oštećenja svih ćelijskih komponenti, što izaziva poremećaje u rastu i razvoju, dovodi do smanjenja otpornosti na različite oblike stresa, a za krajnju posledicu ima poleganje i umanjenje prinosa (Grzesiak *i sar.*, 1999).



Slika 3. Šematski prikaz ravnoteže između antioksidativnog sistema i ROS (modifikovano prema Gill i Tuteja, 2010).

Jedan od paradoksa života je da je O_2 , molekul koji je neophodan za život aerobnih organizama, za respiraciju i energetske metabolizam, ujedno i najtoksičniji prirodni polutant. Štetno dejstvo kiseonika je posledica strukture njegovog molekula, koji u elektronskoj konfiguraciji ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova i može da primi elektrone od drugih donora. Vrlo lako može da se pobudi i apsorpcijom energije, pri čemu nastaju njegovi reaktivni oblici (Gill i Tuteja, 2010; Karuppanapandian *i sar.*, 2011). Među najvažnije ROS spadaju (slika 4): jednovalentni (singlet) kiseonik (1O_2), superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal (OH^{\bullet}).

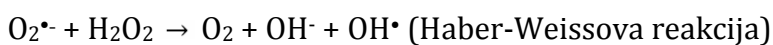
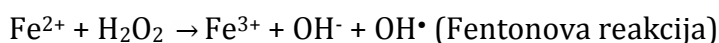
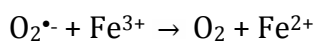


Slika 4. Nastajenje reaktivnih kiseoničnih vrsta (modifikovano prema Gill i Tuteja, 2010).

Jedan od najštetnijih radikala iz ove grupe je superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$). Stvara se u fotosistemu I (PSI) i II (PSII) u hloroplastima, kao i kompleksu I, ubihinonu (koenzimu Q), i kompleksu III lanca transporta elektrona u mitohondrijama (Gill i Tuteja, 2010). Nastaje redukcijom molekulskog kiseonika uz pomoć feredoksina (Fd_{red}) (predstavljeno kao reakcija 1). U kompleksu IV u mitohondrijama dismutacijom superoksid radikala nastaje vodonik-peroksid - H_2O_2 (reakcija 2) (Ajay, 2002).



Superoksid-radikal i vodonik-peroksid sami po sebi ne stvaruju velika oštećenja, ali mogu da stvaraju vrste koje oštećuju osnovne ćelijske komponente kao što je hidroksil radikal. Endogeno, hidroksil radikal nastaje prilikom Haber-Weissove reakcije između superoksid radikala i vodonik peroksida, kao i Fentonovom reakcijom iz H_2O_2 u prisustvu dvovalentnog gvožđa.



Hidroksil radikal je hemijski najreaktivniji radikal kiseonika. Ima izuzetno jak oksidacioni potencijal pa reaguje sa skoro svim biološkim molekulima kiseonika i najodgovorniji je za njegove citotoksične efekte (Dat *i sar.*, 2000). Osim toga, ne postoji enzimaska reakcija koja može direktno da eliminiše ovaj visokoreaktivni radikal (Yokoata *i sar.*, 2002) i zbog toga njegova akumulacija neminovno dovodi do reakcije koja oštećuje membrane tilakoida i ometa fotosintetski aparat (Carvalho, 2008). Pretpostavlja se da bi aminokiselina prolin

mogla imati određenu ulogu u smanjivanju njegovog štetnog djelovanja na biljni metabolizam. Ovaj toksični oblik kiseonika može da pokrene proces lipidne peroksidacije, oštećenja DNK, proteina i drugih manjih molekula. H₂O₂ je jedini oblik ROS koji može da difunduje kroz akvaporine iz ćelijskih organela u citoplazmu i na taj način dospeva do drugih delova ćelije (Faize *i sar.*, 2011; Sofo *i sar.*, 2015). U većim koncentracijama je toksičan za ćelije dok u manjim koncentracijama može da ima ulogu signalnog molekula za razne abiotičke i biotičke stresore (Quan *i sar.*, 2008; Moussa i Mohamed, 2011).

Iako su ROS prvobitno definisane kao toksični nusproizvodi aerobnog metabolizma, u poslednjih nekoliko godina, postalo je jasno da imaju i važnu ulogu u signalnoj transdukciji kod biljaka kontrolišući procese kao što su rast, razvoj, odgovor na biotičke i abiotičke faktore i apoptozu tj. programiranu ćelijsku smrt (Bailey-Serres i Mittler, 2006; Karuppanapandian *i sar.*, 2011).

Umerena akumulacija ROS značajno utiče na nuklearnu ekspresiju gena. Reaktivne kiseonične vrste mogu uticati na gensku ekspresiju na tri različita načina. ROS, preko niza kaskadnih reakcija signalne transdukcije utiču na ekspresiju pojedinih gena. Alternativno, ROS mogu direktno izazvati oksidaciju komponenata signalnih puteva. Konačno, ROS mogu promeniti ekspresiju gena na taj način što utiču na transkripcione faktore i menjaju njihovu aktivnost (Apel i Hirt, 2004). Molekularni odgovor na stres izazvan sušom može uslediti u roku od nekoliko sekundi (kao što su promene u statusu fosforilacije proteina) ili u roku od nekoliko minuta i sati (kao što je promena u ekspresiji gena (Zhu, 2002)). Otkriće mehanizama koje leže u osnovi tolerancije na abiotički stres i na adaptacije na njega predstavlja glavni pravac savremenih istraživanja.

2. 4. 1. Antioksidanti

Da bi se adaptirale na negativni uticaj stresnih faktora na rast i razvoj i zaštitile od oksidativnih oštećenja, biljke su tokom evolucije razvile antioksidativne sisteme zaštite. Antioksidanti deluju tako što se sami oksiduju da bi zaštitili važne ćelijske komponente od oksidacije ili prevode prooksidante u manje reaktivna jedinjenja. Zbog toga je veoma važno da novostvorene sorte imaju dobro razvijene antioksidativne sisteme zaštite, jer je to ključno u prilagođavanju i prevazilaženju stalnih klimatskih promena. Povećana antioksidativna aktivnost može ukazati na povećanu tolerantnost na različite faktore stresa (Ahmad *i sar.*, 2008). Merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima i ostalih parametara antioksidativnog statusa, mogu se utvrditi razlike u tolerantnosti genotipova prema stresnim uslovima.

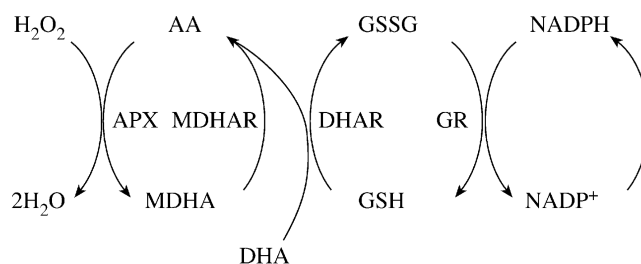
Antioksidanti su supstance prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji oksiduju, i značajno odlažu ili inhibiraju njegovu oksidaciju (Halliwell i Gutteridge, 1990; D 'souza i Devaraj, 2011). Antioksidativni sistemi mogu biti *neenzimske* i *enzimske prirode* (Hossain *i sar.*, 2012). Oni se, prema načinu delovanja, mogu podeliti na: a) primarne ili osnovne antioksidante, koji reaguju direktno sa prooksidantnim vrstama prekidajući slobodno-radikalisku lančanu reakciju doniranjem vodonika ili elektrona slobodnim radikalima i pretvarajući ih u stabilnija jedinjenja i b) sekundarne antioksidante, koji uklanjaju oksidante (Panda, 2012).

2.4.1.1. Neenzimski antioksidanti

Neenzimski antioksidanti su organska jedinjenja male molekulske mase iz grupe sekundarnih biomolekula (askorbinska kiselina, glutation, tokoferoli, karotenoidi, fenoli, prolin i dr.). Služe kao hvatači, sakupljači (eng. scavengers) slobodnih radikala ili kao razlagači (eng. quenchers) aktivnih oblika kiseonika (Blokhina *i sar.*, 2003). "Sakupljači" slobodnih radikala su jedinjenja koja mogu da

predaju elektrone ili atome vodonika i tako usporavaju ili inhibiraju lančanu reakciju slobodnih radikala (Halliwell *i sar.*, 1995). Oni neutrališu ROS i slobodne radikale predajući im elektrone, a sami postaju slabo reaktivni radikali. Prema rastvorljivosti u lipidima neenzimski antioksidanti se dele na lipo- i hidrosolubilne. Ova osobina određuje mesto njihovog delovanja. Liposolubilni deluju u ćelijskim membranama i membrana ćelijskih organela. Hidrosolubilni deluju u vodenoj fazi, ostvarujući interakciju sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrana (Navari-Izzo *i sar.*, 1997).

Askorbinska kiselina ili vitamin C je jedan od najvažnijih antioksidanata, rastvorljiv u vodi i prisutan kod većine biljaka. Prisutan je u hloroplastima, citoplazmi, vakuolama i apoplastičnom prostoru ćelija listova u visokim koncentracijama. Deluje tako što sprečava i svodi na minimum oštećenja izazvana ROS u ćelijama (Athar *i sar.*, 2008). Njegova aktivnost se zasniva na sposobnosti da donira elektrone u različitim enzimskim i neenzimskim reakcijama (Gill i Tuteja, 2010). Direktno reaguje sa slobodnim radikalima (1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}) i redukuje H_2O_2 do H_2O . Ima važnu ulogu u askorbat-glutation ciklusu (ASH-GSH) kao supstrat za askorbat peroksidazu (slika 5). U ovom ciklusu regeneraciju askorbinske kiseline iz oksidovanih formi vrše NADH-semidehidroaskorbat-reduktaza i dehidroaskorbat-reduktaza u prisustvu redukovanog glutationa (Jiménez *i sar.*, 1997a). Posедуje sposobnost regeneracije antioksidanta α -tokoferola iz tokoferoksilnih radikala čime omogućava dobru zaštitu biomembrana od peroksidacije lipida. U hloroplastima askorbinska kiselina deluje kao kofaktor za enzim violaksantin-deepoksidazu i tako posredno učestvuje u ksantofil ciklusu kao jednom od mehanizama zaštite ćelije od fotooksidacije (Stikić i Jovanović, 2012).



Slika 5. Askorbat-glutation ciklus: AA-askorbat, APX-askorbat peroksidaza, MDHA–monodehidroaskorbat, MDHAR–monodehidroaskorbat reduktaza, DHA dehidroaskorbat, DHAR - dehidroaskorbat reduktaza, GR-glutation reduktaza (May *i sar.*, 1998).

Glutation je tripeptid niske molekulske mase sastavljen od cisteina, glutaminske kiseline i glicina (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin). Najzastupljenije je tiolno jedinjenje kod većine biljnih vrste i prisutan je u skoro svim ćelijskim organelama (Labudda i Azam, 2014). U ćelijama se pretežno nalazi u redukovanom obliku GSH, koji u kombinaciji sa oksidovanom formom GSSG, održava redoks ravnotežu u ćeliji (Foyer i Noctor, 2005; Gill *i sar.*, 2013). Održava druge antioksidante (npr. α -tokoferol i β -karoten) u redukovanoj formi. Zahvaljujući centralnom nukleofilnom ostatku cisteina on ima visok redukcionni potencijal koji omogućava uklanjanje H_2O_2 i učestvuje u neenzimskim reakcijama sa ostalim ROS, kao što su 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} (Blokina *i sar.*, 2003). Centralna uloga GSH kao antioksidanta bazirana je na njegovoj sposobnosti da regeneriše askorbinsku kiselinu preko ASH-GSH ciklusa. GSH u ovom ciklusu služi kao donor elektrona pri čemu se askorbat regeneriše iz njegove oksidovane forme u dehidroaskorbat, a GSH prelazi u oksidovanu formu glutacion-disulfid (GSSG) (Noctor i Foyer, 1998). Predstavlja supstrat za funkcionisanje glutacion reduktaze, glutacion peroksidaze i glutacion S-transferaze. Pored toga GSH može da kompleksira toksične jone teških metala i skladišti ih u vakuolama i na taj način ima ulogu u toleranciji biljaka na stres teških metala (Gill *i sar.*, 2013; Anjum *i sar.*, 2014).

Tokoferoli su lipofilni antioksidanti koji se zbog svoje hidrofobnosti nalaze na unutrašnjoj strani membrana ćelija i čine njihove esencijalne komponente. Od četiri izomera tokoferola (α -, β -, γ -, δ -) koji se mogu naći u biljkama, α -tokoferol ili vitamin E ima najveću antioksidativnu aktivnost zbog prisustva trimetil grupe u svojoj molekularnoj strukturi (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Reaguje sa slobodnim radikalima, prvenstveno sa jednovalentnim O_2 , pri čemu nastaje tokoferoksilni radikal čime se zaustavlja proces lipidne peroksidacije. Jedan

molekul α -tokoferola može ukloniti i do 120 molekula $^1\text{O}_2$ (Munné-Bosch, 2005). Nakon reakcije molekul tokoferola se regeneriše vitaminom C. Vitamin E obrazuje i komplekse sa slobodnim masnim kiselinama i lizofosfolipidima i tako štiti membrane od štetnog dejstva slobodnih radikala. Kod graška α -tokoferol čini manje od 6,7%, a δ -tokoferol manje od 8%, dok γ -tokoferol čini preko 85,4% od ukupnih tokoferola i on igra glavnu antioksidativnu ulogu kod ove biljne vrste (Yoshida *i sar.*, 2007).

Karotenoidi, među kojima je najpoznatiji β -karoten, su lipofilne organske komponente koje pored uloge pomoćnih pigmenata u fotosintezi imaju i važnu ulogu u detoksikaciji ROS. Tri su glavne funkcije karotenoida u biljnim organizmima: a) apsorpcija svetlosti na talasnoj dužini od 400 i 550 nm i prenos do hlorofila (Niyogi *i sar.*, 2001), b) antioksidativna aktivnost, odnosno gašenje tripletnog stanja hlorofila (3Chl^*), pri čemu se energija oslobađa u obliku toplote, kao i uklanjanje $^1\text{O}_2$ i drugih slobodnih radikala nastalih unutar fotosintetskog aparata reakcijama sa ekscitiranim molekulom hlorofila (Chl^*) (Collins, 2001), i c) održavanje stabilnosti tilakoidnih membrana (Botella-Pavia i Rodriguez-Concepcion, 2006). β -karoten je jedini oblik karotenoida prisutan kod graška i predstavlja 2,6-3,2% od ukupnih pigmenata prisutnih u biljci (Edelenbos *i sar.*, 2001).

Jedinjenja klase biljnih *fenola* su prirodni proizvodi antioksidativnih svojstava, široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Raznovrsnost i veliki broj fenolnih jedinjenja su posledica mogućih brojnih modifikacija njihove osnovne strukture, kao što su dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata. Najvažniji predstavnici su flavonoidi, fenil-propanoidi i fenolne kiseline. Pokazuju antioksidativne osobine zahvaljujući visokoj reaktivnosti kao donori elektrona. Takođe imaju sposobnost heliranja prooksidativnih metalnih jona, čime zaustavljaju Fentonovu reakciju, koja se smatra najvažnijim putem nastanka toksičnih kiseoničnih radikala. Pored toga polifenolne komponente kao što su flavonoidi uklanjaju ROS lokalizacijom i

neutralizacijom radikala pre nego što oni oštete ćeliju i utiču na proces preoksidacije lipida modifikujući tako sastav membrane i njenu provodljivost (Cle i sar., 2008).

Prolin (Pro) je aminokiselina uključena u niz metaboličkih procesa u biljkama, osmotikum je, stabilizator proteina, helator metala, inhibitor lipidne peroksidacije, a učestvuje i u antioksidativnom odgovoru kao jedan od neenzimskih antioksidanata uklanjajući 1O_2 i OH^\bullet . Prolin je aminokiselina koja se praktično akumulira kod svih biljaka pod dejstvom različitih stresnih faktora (temperature, suše, soli, teških metala ili herbicida), tako da se njegova akumulacija može smatrati indikatorom stresa (Stikić i Jovanović, 2012). U normalnim fiziološkim uslovima prolin čini manje od 3% ukupnog pula slobodnih aminokiselina u biljci, dok ta količina za vreme stresa može porasti i preko 80%. Moussa i Moahmed (2011) su utvrdili da se sadržaj prolina kod graška pod uticajem vodnog deficita, izazvanog rastvorom PEG, povećao skoro tri puta. Prolin, pored svog dejstva kao osmotikuma, predstavlja i značajan izvor rastvorljivog azota u stresnim uslovima (Trovato i sar., 2008; Mattioli i sar., 2009).

2.4.1.2. Enzimski antioksidanti

Enzimski antioksidanti predstavljaju prvu liniju antioksidativne zaštite (Ahmad i sar., 2008; Gill i Tuteja, 2010; D 'souza i Devaraj, 2011). Oni direktnom enzimskom katalizom reaguju sa ROS i na taj način ih eliminišu iz ćelije.

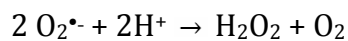
Mogu se podeliti na:

- primarne, koji reaguju direktno sa prooksidativnim vrstama - superoksid dismutaza i katalaza i

- sekundarne, koji regenerišu molekule antioksidanata malih molekulskih masa - askorbat peroksidaza i glutathion reduktaza.

Superoksid dismutaza (SOD) (EC 1.15.1.1)

Superoksid dismutaza predstavlja prvu liniju odbrane biljke od štetnog dejstva povišenog nivoa toksičnih oblika kiseonika (Gill i Tuteja, 2010). Jedna je od najefikasnijih enzimatskih antioksidansa koji neutrališe $O_2^{\bullet-}$ reakcijom dismutacije superoksid radikala, pri čemu se jedan $O_2^{\bullet-}$ oksiduje u O_2 , a drugi redukuje u H_2O_2 :



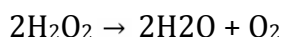
U fiziološkim uslovima ova reakcija se odvija i bez enzimске katalize veoma brzo, dok je SOD ubrzava do 2×10^9 mol/sek (Chaudiere i Ferrari-Iliou, 1999). Zatim se vodonik peroksid uklanja pomoću katalaze i glutathion peroksidaze.

Svi SOD enzimi su metaloproteini koji su, prema metalu kojeg sadrže u aktivnom centru, klasifikovani na: FeSOD, MnSOD i Cu/ZnSOD. Sva tri oblika imaju istu funkciju, a to je otklanjanje superoksid-radikala. Međutim, navedeni oblici se razlikuju po strukturi, svojstvima, lokaciji unutar ćelije, distribuciji u tkivima, kao i mehanizmima kojima utiču na ekspresiju ovih enzima. Biljke uobičajeno sadrže Cu/ZnSOD u citoplazmi, FeSOD i/ili Cu/ZnSOD u hloroplastima i MnSOD u mitohondrijama (Pilon *i sar.*, 2011). Kod graška se MnSOD može naći i u različitim oblicima peroksizoma (Sandalio *i sar.*, 2001).

Katalaza (CAT) (EC 1.11.1.6)

Katalaza je jedan od najrasprostranjenijih enzima u prirodi i nalazi se u svim aerobnim živim organizmima. Katalaza je enzim koji je uglavnom lociran u

peroksizomima i katališe reakciju razlaganja vodonik peroksida na vodu i molekularni kiseonik:

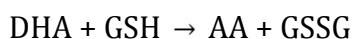
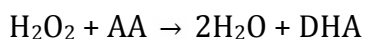


Glavnu ulogu u neutralisanju malih količina H_2O_2 ima glutation peroksidaza (GSH-Px), dok se katalaza aktivira tek pri većim koncentracijama H_2O_2 . Prema tome, katalaza je neophodna za detoksikaciju ROS u stresnim uslovima (Garg i Manchanda, 2009). Katalaza je enzim vrlo velike aktivnosti, jedan molekul katalaze može da redukuje ≈ 6 miliona molekula H_2O_2 do vode i kiseonika, u jednoj minuti. Ovaj enzim je posebno važan u uklanjanju H_2O_2 stvorenog u procesima oksidacije masnih kiselina, fotorespiracije i katabolizma purina (Gill i Tuteja, 2010). S druge strane, katalaza u uslovima spore produkcije vodonik peroksida ispoljava tzv "peroksidaznu" aktivnost, tj, oksiduje H^+ donore uz utrošak jednog molekula H_2O_2 .

Katalaza po strukturi pripada hemoproteidima. Sastavljena je od četiri identične podjedinice u čijem se središtu nalazi atom gvožđa koji predstavlja aktivno mesto enzima (Vainsthein *i sar.*, 1981). Corpas *i sar.* (1999) su iz listova graška izolovali pet izoformi katalaze CAT1-5.

Askorbat peroksidaza (APx) (EC 1.11.1.11)

Aslorbat peroksidaza katališe oksidaciju askorbata (AA) do dehidroaskorbata (DHA) u prisustvu vodonik peroksida:



Kao i katalaza učestvuje u uklanjanju H_2O_2 na mestu njegovog nastanka u hloroplastima. Deo je glutation-askorbatnog ciklusa koji uklanja višak H_2O_2 koristeći askorbat kao donor elektrona (Gill *i sar.*, 2013). Ima znatno veći afinitet

prema H₂O₂ od katalaze i glutation peroksidaze i njena uloga je presudna tokom stresa (Asada, 2006).

Nalazi se u citosolu, peroksizomima i plastidima gde može biti i vezana za ćelijsku membranu. Postoji najmanje pet izoformi APx uključujući tilakoidnu (tAP_x), formu membrana glikozoma (gmAP_x), rastvorljivu formu strome hloroplasta (sAP_x) i citosolnu formu (cAP_x) (Gill i Tuteja, 2010).

Glutation reduktaza (GR) (EC 1.6.4.2)

Glutation reduktaza katalizuje transformaciju oksidativnog glutaciona (GSSG) u redukovanu (GSH) u prisustvu NADPH kao koenzima:



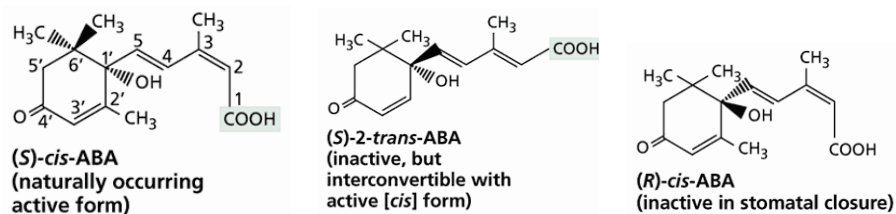
Ključan je enzim askorbat-glutation ciklusa održavajući pul glutaciona uglavnom u redukovanom stanju tako da ima značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji. Takođe, ima ulogu i u održavanju visokog nivoa GSH/GSSG neophodnog za regeneraciju askorbata (Foyer i Noctor, 2005; Gill *i sar.*, 2013). Izuzetno je značajna u sistemu antioksidativne odbrane ćelije zato što obezbeđuje potrebnu količinu GSH za delovanje glutation peroksidaze i glutation S-transferaze. Lokalizovana je u hloroplastima, ali određene, male količine enzima su pronađene i u mitohondrijima i citoplazmi (Noctor i Foyer, 1998; Gill i Tuteja 2010). Po strukturi je homodimerni flavoprotein koji u aktivnom centru ima redoks aktivan disulfid. Svaka subjedinica ima molekulsku masu od oko 55 kDa i sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). Dimerna priroda enzima neophodna je za njegovu funkciju, jer obe subjedinice učestvuju u formiranju aktivnog centra enzima (Tandoğan i Ulusu, 2006).

2.5. Abscisinska kiselina

Akumulacija hormona abscisinske kiseline (ABA) u uslovima suše potpomaže adaptaciji biljaka na sušu kao i na druge abiotičke stresne faktore (Swamy i Smith, 1999; Tuteja 2007).

Abscisinska kiselina je biljni hormon. Stalno prisustvo ABA u niskim koncentracijama neophodno je za normalan rast i diferencijaciju ćelija. Povišena koncentracija ABA neophodna je za zatvaranje stoma, dormaciju semena i starenje (Sakata *i sar.*, 2014). ABA se danas u svetu veoma intenzivno proučava, jer je utvrđeno da predstavlja univerzalni "stresni hormon" čija akumulacija, posebno u korenu, pomaže adaptaciji biljaka na stresne faktore spoljašnje sredine kao što su npr. suša, visoka i niska temperatura, stres soli ili jona (Nakashima i Yamaguchi-Shinozaki, 2013).

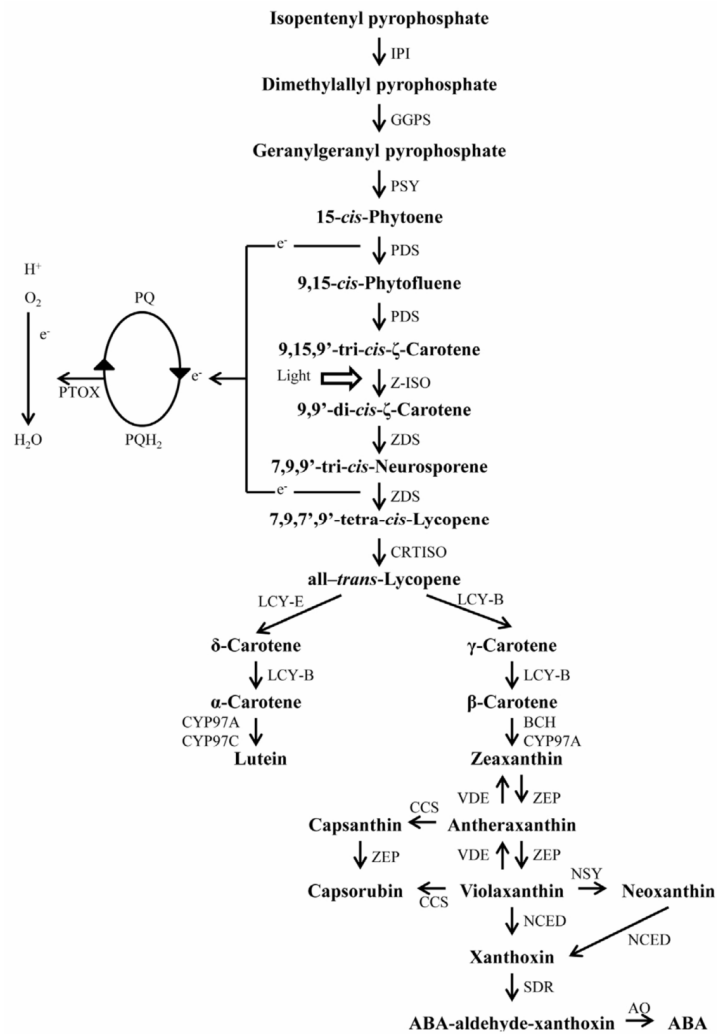
ABA je po hemijskoj prirodi seskviterpenoid ($C_{15}H_{20}O_4$) (Xiong, 2007). Orijentacija karboksilne grupe na drugom ugljeniku određuje *cis* i *trans* izomere abscisinske kiseline. Naziv abscisinska kiselina se odnosi na *cis* formu koja preovlađuje u prirodi. Zahvaljujući asimetričnom ugljenikovom atomu na poziciji 1' unutar prstena postoje dva enantiomera abscisinske kiseline: S, odnosno + i R, odnosno - enantiomer. Samo S enantiomer je aktivan u izazivanju brzih odgovora na ABA, kao što je stomalno zatvaranje. U dugotrajnim odgovorima kao što su sazrevanje semena, oba enantiomera su aktivna (Finkelstein i Rock, 2002; Taiz i Zeiger, 2002) (slika 6).



Slika 6. Izomerne strukture abscisinske kiseline (Taiz i Zeiger, 2002).

U različitim biljnim tkivima i organima intenzitet biosinteze i koncentracija ABA mogu drastično da variraju tokom različitih faza razvoja, u zavisnosti od promenjivih uslova životne sredine (Xiong i Zhu, 2003). Biosinteza ABA se dešava najvećim delom u hloroplastima, kao i u drugim plastidima (slika 7). Metabolički put počinje sa izopentenil-difosfatom (IPP), izoprenskom jedinicom, i vodi ka sintezi C₄₀ ksantofila (oksidovanog karotenoida), violaksantina, preko zeaksantina. Sintaza violaksantina od zeaksantina je katalizovana zeaksantin epoksidazom (ZEP). Violaksantin se prevodi do C₄₀ jedinjenja 9-cis-neoksantina. Ovaj molekul se deli i formira C₁₅ jedinjenje - ksantoksal, prethodno nazvano ksantoksin, koji je neutralni inhibitor rasta sa sličnim fiziološkim svojstvima kao i ABA. Cepanje C₄₀ jedinjenja je katalizovano 9-cis-epoksi-karotenoid dioksigenazom (NCED), koja je nazvana tako jer može da vrši cepanje i 9-cis-neoksantina i 9-cis-violaksantina. U uslovima vodnog stresa i suše dolazi do brze indukcije biosinteze enzima NCED, što ukazuje da je reakcija koju ovaj enzim katalizuje regulatorni korak u sintezi ABA. NCED je lokalizovan na tilakoidima, gde se nalaze i visoke koncentracije karotena kao supstrat. Uz pomoć ksantin dehidrogenaze, koja se kod *Arabidopsis*-a sintetiše na *ABA2* genu, od ksantoksina nastaje prekursor abscisinske kiseline ABA - aldehyd (AE). U poslednjem koraku biosinteze ABA od AE učestvuje enzim aldehyd oksidaza (AO; EC 1.2.3.1). AO predstavlja enzim dobijen sa *ABA3* gena i spada u familiju molibdo-flavoenzima koji zahtevaju molibden kao kofaktor (MoCo) za svoju katalitičku aktivnost (Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013). U MoCo se ugrađuje sumpor delovanjem sulfuraze sa *ABA3* gena (Wasulewska i sar., 2008). MoCo je, takođe, neophodan i za aktivnost ksantin dehidrogenaze. Mutanti raznih biljnih vrsta kojima nedostaje funkcionalni molibden kao kofaktor su nesposobni da sintetišu abscisinsku kiselinu (Seo i sar., 2000; Sagi i sar., 2002; Finkelstein i Rock, 2002; Ozfidan i sar., 2013). Utvrđeno je da su geni koji kontrolišu poslednji korak biosinteze ABA, u kome učestvuje enzim AO, najvažniji i njihova ekspresija je povećana za vreme vodnog deficita ukazujući na važnu ulogu ABA kao odgovora na stres (Seo i sar., 2000; Arve i sar., 2011). Iz listova i korena graška izolovane su tri izoforme AO:

PsA01, PsA02 i PsA03 (Zdunek-Zastocka *i sar.*, 2004; Zdunek-Zastocka, 2008) od koji je PsA03 najvažniji pri odgovoru biljke na razne stresne uslove (Zdunek-Zastocka, 2010).



Slika 7. Biosintetski put abscisinske kiseline (Gómez-García i Ochoa-Alejo, 2013).

Koncentracija slobodne ABA u citosolu je regulisana degradacijom, konjugacijom, i transportom. Na primer, citosolna ABA raste tokom suše, kao rezultat sinteze u listu, redistribucije unutar ćelija mezofila, transportu iz korena i recirkulacijom iz drugih listova. Koncentracija ABA opada nakon ponovnog

zalivanja vodom usled degradacije i smanjenja brzine sinteze, ali i zbog transporta iz listova u druge organe (Zdunek i Lips, 2001).

Poznato je da biljni hormon ABA ima značajnu ulogu u reakciji biljaka na različite abiotičke i biotičke faktore stresa, pa se zbog toga i naziva "hormon stresa". Ovaj hormon predstavlja neku vrstu univerzalnog hemijskog signala stresa koji se transportuje na većim rastojanjima. U prvim fazama suše kada zemljište tek počinje da gubi vodu i kada potencijal listova još uvek nije pretrpeo značajnije promene, počinje da se akumulira ABA u korenu. Iz korena ona prelazi u ksilemske elemente i transportuje se kroz nadzemni deo stabla do listova i stoma (Davies i Zhang, 1991). Mnoga istraživanja govore o povećanju koncentracije ABA u ksilemskom soku prilikom delovanja suše (Wilkinson i Davies, 2002; Davies *i sar.*, 2005). To povećanje je najverovatnije posledica razlike između količine ABA u spoljašnjoj sredini, tj. zemljištu, gde dospeva kao produkt mikroorganizama, ali i zbog eksudacije iz korena, i one unutar same biljke gde nastaje procesom sinteze (Jiang i Hartung, 2007). Pretpostavlja se da povećanje koncentracije ABA u ksilemskom soku nastaje zbog: povećane sinteze ABA u korenu i translokacije, povećane recirkulacije ABA floemom, sinteze ABA iz prekursora ABA i redukcije katabolizma ABA. Povećana koncentracija ABA u ksilemu dovodi do povećanja rasta korenovog sistema, a takođe, može uticati na povećanje hidraulične provodljivosti korena (Hose *i sar.*, 2002; Aroca *i sar.*, 2003), što može imati veliki uticaj na brzinu usvajanja vode u uslovima suše (Kang *i sar.*, 1998; Kang *i sar.*, 2002). ABA ima i direktnu ulogu u regulaciji rasta listova pod uticajem suše. ABA može uticati na mehaničke osobine ćelijskog zida i tako uticati na smanjenje ekstenzibilnosti zida (Van Volkenburgh i Davies, 1983). Takođe učestvuje i u aktivnom zatvaranju stoma (Arve *i sar.*, 2011) i odgovoru biljaka na oksidativni stres i sintezu ROS (Jiang i Zhang, 2001).

2.6. Fiziološki i biohemijski efekti suše na biljke

Značaj vode za biljke je višestruk, jer je ona najznačajnija strukturna komponenta građe biljaka, neophodna je za sve metaboličke procese, procese transporta, regulacije temperature, procese oplodjenja, rasejavanje semena i plodova itd. (Stikić i Jovanović, 2012). Snabdevenost biljaka vodom je jedan od najvažnijih faktora koji utiče na rast i razviće biljaka, njihovu produktivnost i geografsku distribuciju. Nedostatak vode, suša, je jedan od najvažnijih abiotičkih faktora stresa i utiče na promene na nivou kompletne biljke, na nivou tkiva i ćelija, tako što deluje na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou (Yordanov *i sar.*, 2000; Farooq *i sar.*, 2009; Karim *i sar.*, 2015). Efekat suše na biljke, kao i reakcije biljaka, zavise ne samo od intenziteta već i od dužine trajanja suše. Ukoliko stres suše duže traje njeni negativni efekti sve više dolaze do izražaja, dok se mogućnost oporavka biljke sve više smanjuje.

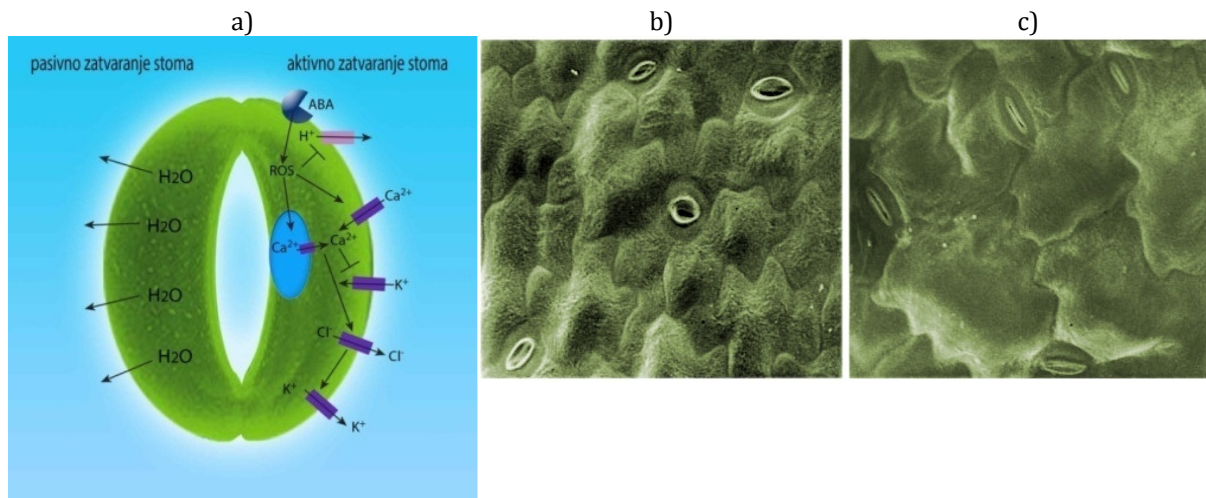
Od svih fizioloških procesa, razvoj listova je najosetljiviji na nedostatak vode u zemljištu. Rast listova je rezultat procesa deobe i stvaranja novih ćelija i povećanja njihove veličine ekspanzijom (dvo- ili trodimenzionalnim povećanjem) ili elongacijom (izduživanjem u jednom pravcu). Rast ćelije prati i rast ćelijskog zida i to sve dovodi do povećanja površine i zapremine ćelije, povećava se usvajanje vode i održava se turgor koji je neophodan za procese rasta. Suša utiče na rast preko redukcije broja i/ili veličine ćelija. Generalno, suša utiče na proces deobe tako da se obrazuje manji broj ćelija čije su i dimenzije manje. To za posledicu ima redukciju lisne površine čime se smanjuje transpiracija (Stikić i Jovanović, 2012). Jak efekat suše dovodi i do uvijanja listova, kao i poznatog fenomena abscisije, odnosno odbacivanja starijih listova (Xu *i sar.*, 2012). Efekat umerene suše na rast ćelija je rezultat biofizičkih i biohemijskih promena, prvenstveno na nivou ćelijskog zida. Biofizičke promene su vezane za hidrauličke i mehaničke osobine ćelijskog zida, dok su biohemijske uslovljene aktivnošću nekoliko enzima ćelijskog zida (ksiloglukan-endotransglikozilaze – XET, peroksidaze, ekspanzina), akvaporina, kao i dejstvom hormona (abscisinske

kiseline i auksina) i pH vrednosti apoplasta. Opadanje potencijala turgora u ćelijama redukuje plastičnost (ekstenzibilnost) ćelijskog zida, i povećava aktivnost enzima koji inhibiraju rast ćelijskog zida (Anjum *i sar.*, 2011; Jovanović i Stikić, 2012).

U uslovima suše dolazi do povećanja dužine korena, kao i njegove gustine, pojačanog razvića lateralnih korenova, kao i mnoštva korenskih dlaka koje omogućavaju, sa jedne strane usvajanje pristupačne vode sa većih dubina, kao i one površinske kod biljaka koje imaju plitak korenov sistem. Takođe, za vreme suše dolazi i do elongacije korena (Riaz *i sar.*, 2013). Dobro razvijen korenov sistem povećava efikasnost usvajanja i iskorišćavanja vode, a time i sposobnost boljeg podnošenja nedostatka vode.

Ukoliko su biljke izložene dejstvu suše, za nastavak njihovog rastenja i odvijanje metaboličkih procesa je neophodno da se održi vodni režim tkiva i turgor blizak vrednostima u optimalnim uslovima. Održavanje vodnog režima na optimalnom nivou se postiže tako što se smanjuje odavanje vode ili se povećava usvajanje vode (Chaves *i sar.*, 2003). Prva reakcija biljke je da u uslovima suše dolazi do zatvaranja stoma (Mansfield *i sar.*, 1990) kako bi se sačuvala neophodna voda za nesmetano odvijanje fizioloških procesa (Taiz i Zeiger, 2002; Arve *i sar.*, 2011). Razlikujemo hidropasivno zatvaranje stominog aparata, usled direktnog gubitka vode iz ćelija zatvaračica i posledičnim smanjenjem turgora, i aktivno zatvaranje (slika 8a) koje se javlja kod viših biljaka i regulisano je od strane biljnog hormona ABA i složenih metaboličkih i procesa na nivou jona (Arve *i sar.*, 2011). Koren je prvi biljni organ koji se susreće sa nedostatkom vode u zemljištu. Informacija o nedostatku vode se zatim, putem tzv. "hemijskih signala suše" (prvenstveno biljnih hormona i to abscisinske kiseline) transportuje kroz ksilem korena do nadzemnih delova biljke i do listova (Xu *i sar.*, 2012). Stomine ćelije imaju specifična mesta za vezivanje ABA i ona su označena kao receptori. Receptori mogu biti smešteni na površini ćelijske membrane (ekstracelularni) ili u unutrašnjosti ćelija zatvarčica (intracelularni) (Hornberg i Weiler, 1984; Andesro *i*

sar., 1994; Wang i Zhang, 2008). Ekstracelularni receptori su uključeni u proces zatvaranja stoma, a intracelularni u inhibiciju otvaranja stoma (Schwartz *i sar.*, 1994). Postoji i pretpostavka da su ekstraćelijski receptori neophodni u brzom, a intraćelijski u sporom odgovoru na ABA. Vezivanje ABA za receptore dovodi do akumulacije i brze difuzije intracelularnih signala (sekundarnih glasnika) kao što su inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) i joni Ca^{2+} , koji dalje u ćeliju prenose informaciju (Stikić i Jovanović, 2012). Dolazi do povećanja koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi, koja je rezultat aktivacije kanala za ovaj jon i njegovog oslobađanja iz različitih ćelijskih vezikula, kompartmenata ili organela (vakuola endoplazmatičnog retikuluma, plastida, mitohondrija) u citoplazmu. Ca^{2+} joni, vezivanjem za kalmodulin, aktiviraju mnoge enzime, u prvom redu kinaze i fosfataze, koji kasnije fosforiluju druge enzime, što na kraju dovodi do zatvaranja stoma (Mengel i Kirkby 2001). Osim toga, povećana koncentracija Ca^{2+} jona u citoplazmi dovodi i do depolarizacije ćelijske membrane. Zatvaranjem stoma smanjuje se transpiracija i usvajanje CO_2 (Chaves, 1991) i smanjuje se intenzitet fotosinteze usled promene u aktivnosti enzima ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze oksigenaze - RubisCO (De Carvalho, 2008; Carmo-Silva, 2012; Ashraf i Harris, 2013). Nedostatak vode dovodi do inhibicije rasta, deobe i ekspanzije ćelija (Farooq *i sar.*, 2009). Usled smanjenja transpiracije ograničeno je i usvajanje nutrijenata, a poremećaj u aktivnom transportu jona kao i u permeabilnosti membrana ima za posledicu i redukciju apsorpcione moći korena (Le Gall *i sar.*, 2015). Usporavanje osnovnih metaboličkih procesa dovodi do smanjenja akumulacije suve materije, usporava se rast nadzemnog dela i korena, smanjuje se masa biljke i sadržaj azota u biljci, što za posledicu ima smanjenje prinosa (Holbrook *i sar.*, 2002).



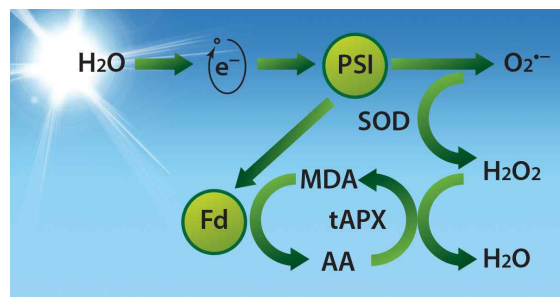
Slika 8. a) Hidro pasivno i aktivno zatvaranje stominog aparata (Modifikovano prema Arve *i sar.*, 2011), b) otvorene stome kod graška, c) zatvorene stome kod graška (Sandalio *i sar.*, 2001).

Međutim, delimična redukcija otvorenosti stominih ćelija ne utiče u značajnoj meri na fotosintezu, a smanjuje se odavanje vode (Liu *i sar.*, 2006; Savić *i sar.*, 2008). U transpiraciji biljka "gubi" oko 97% od usvojene vode, a ostatak koristi za potrebe fizioloških procesa (Barbieri *i sar.*, 2012). U trenutku kada proces transpiracije postane intenzivniji od procesa apsorpcije, kao posledica gubitka vode opada turgor, smanjuje se volumen ćelije i povećava koncentracija rastvorenih materija u ćeliji (Lawlor i Cornic, 2002). Prema tome, regulacijom otvorenosti stoma, biljke u suši održavaju fotosintezu na maksimalnom mogućem nivou uz minimalnu transpiraciju, u datim uslovima. Zahvaljujući specifičnosti svoje građe, metaboličkih i molekularnih procesa, stome su u stanju da aktivno reaguju na tzv. signale stresa suše (ali takođe i ostalih stresnih faktora) i da u skladu sa njima integrišu i kontrolišu stepen svoje otvorenosti, što može da utiče na fiziološke odgovore biljaka. Koliko su reakcije stoma složene, pokazuju rezultati da i povećana transpiracija može da predstavlja poželjnu adaptivnu reakciju

biljaka jer doprinosi njihovom hlađenju, što je od posebnog značaja za uslove gajenja biljaka gde je visoka temperatura praćena sušom (Morison *i sar.*, 2008; Reynolds-Henne *i sar.*, 2010). Takođe, od reakcija stoma zavise i transport jona i translokacija asimilata. Na kompleksnost reakcija stominih ćelija ukazuju i rezultati Prokić *i sar.* (2005, 2006), koji su pokazali da je otvorenost stominih ćelija rezultat složene interakcije Ca^{2+} , ABA i pH, kao i to da ti odnosi zavise i od biljne vrste.

Kao jedan od nespecifićnih odgovora na abiotićki stres je i produkcija i akumulacija reaktivnih kiseonićnih vrsta ćija povećana koncentracija takođe predstavlja oblik stresa tzv. oksidativni stres (Boguszewska i Zagdanska, 2012). U uslovima vodnog deficita produkcija ROS je povećana s obzirom na to da limitirana fiksacija CO_2 redukuje regeneraciju NADP^+ u Kalvinovom ciklusu, što remeti lanac transporta elektrona. Tok elektrona se preusmerava na alternativne akceptore od kojih je najznaćajnji kiseonik pri ćemu nastaje $\text{O}_2^{\bullet-}$, a zatim i ostali oblici ROS-a (Taiz i Zeiger, 2002). Takođe, u uslovima vodnog deficita maksimalna je oksigenacije RuBP (ribulozo-1,5-bisfosfat), kao posledica ogranićene fiksacije CO_2 , pri ćemu se kao krajnji proizvod stvara H_2O_2 (Bota *i sar.*, 2004; Wituszyńska i Karpiński, 2013). Pored citotoksićnosti, ROS imaju vaćnu ulogu u reakciji biljne ćelije na različite oblike stresa igrajući ulogu signalnih molekula. Do sada je uglavnom izućavana signalna uloga H_2O_2 . U fizioloćkim uslovima u biljnoj ćeliji H_2O_2 nastaje kao sporedni proizvod u elektronskom transportu u mitohondrijama, pri fotorespiraciji u peroksizomima, kao i u Mehler-ovoj reakciji u hloroplastima. Mehler-ova reakcija redukuje O_2 do $\text{O}_2^{\bullet-}$ donacijom elektrona u fotosistemu I (PSI). SOD prevodi $\text{O}_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 , koji se zatim, pomoću APx, prevodi u H_2O (slika 9). U uslovima biotićkog i abiotićkog stresa H_2O_2 nastaje ekstracelularno u vanćelijskom prostoru aktivnošću enzima NADPH-oksidade (RBOH), (Sagi i Flihr, 2001) ili peroksidade ćelijskog zida (Bolwell *i sar.*, 2002), a preko peroksporinskih kanala lako prodire u unutrašnjost ćelije. Relativno dug polućivot H_2O_2 od oko 1 ms i umerena reaktivnost omogućuje difuziju ovog signalnog molekula kroz ćelijske

membrane, ekstracelularni prenos signala i odgovarajuće aktivnosti van ćelije gde je primarno nastao (Dat *i sar.*, 2000). H_2O_2 u stresnim uslovima, u niskim koncentracijama, deluje kao signalni molekul i učestvuje u aktivaciji mehanizama zaštite (Quan *i sar.*, 2008), dok u visokim koncentracijama dovodi do oksidacije drugih molekula, što na kraju može dovesti do programirane ćelijske smrti (Bailey-Serres i Mittler, 2006; Karuppanapandian *i sar.*, 2011). U biohemijske odgovore na abiotički stres spada i smanjenje osmotskog potencijala ćelija kroz akumulaciju osmolita, kao što je, na primer, prolin (Mattioli *i sar.*, 2009).



Slika 9. Nastanak H_2O_2 u Mehler-ovoj reakciji (De Carvalho, 2008).

Stvaranjem ROS-a aktiviraju se antioksidativni enzimi i akumuliraju neenzimske komponente koji sinergički doprinose adaptivnoj reakciji. Kao posledica narušavanja ravnoteže između stvaranja i akumulacije ROS i mehanizama njihovog neutralisanja (enzimskih i neenzimskih) dolazi do oštećenja makromolekula - proteina, lipida, DNK. Lipidna peroksidacija je jedna od najčešće istraživanih posledica delovanja ROS na strukturu i funkciju lipida membrane (Gill i Tuteja, 2010; Mirzaee *i sar.*, 2013). ROS reaguju sa polinezasićenim masnim kiselinama ćelijskih membrana (polyunsaturated fatty acid - PUFA) i formiraju konjugovane diene, lipidne peroksi radikale i hidroksiperokside (Gill i Tuteja, 2010; Repetto *i sar.*, 2012). Dolazi do stvaranja i propagacije lipidnih radikala, promena u dvostrukim vezama nezasićenih masnih kiselina i oštećenja lipidnih membrana, pri čemu se stvaraju različiti toksični proizvodi, kao što su alkoholi, ketoni, alkani, aldehidi i etri (Dianzani i Barrera, 2008). Repetto *i sar.* (2012) su identifikovali 32 aldehida, kao produkte lipidne peroksidacije, među kojima je

malondialdehid (MDA) najznačajniji. Merenje količine produkovanog MDA, kao posrednog pokazatelja lipidne peroksidacije, često se upotrebljava kao pokazatelj stepena senzitivnosti, odnosno tolerantnosti biljaka na oštećenja uzrokovana ROS (Blokhina *i sar.*, 2003). Jednom započeta reakcija lipidne peroksidacije se nastavlja autokatalitički i ima progresivni tok. Oštećenja membrane dovode do povećanja propustljivosti ćelije, brze desikacije i smrti ćelije (Repetto *i sar.*, 2012).

2.7. Percepcija i transdukcija signala suše

Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno kako biljke prepoznaju stres suše i kako se vrši transdukcija signala između ćelija, tkiva i celog organizma. Promena sadržaja vode u zemljištu, koju koren registruje preko rizosfere, indukuje odgovor tzv. signala suše, koji mogu biti hidraulični (Sailendra *i sar.*, 1995; Comstock, 2002) ili hemijski (Wilkinson i Davies, 2002) i koji se prenose do nadzemnog dela biljke, odnosno do listova i stominih ćelija, gde indukuju različite reakcije. Prema klasičnom konceptu, efekti suše se razmatraju kao rezultat dejstva *hidrauličnih signala*, koji nastaju kao rezultat smanjenog usvajanja vode od strane ćelija korena i opadanja turgora u ćelijama. Prema drugom konceptu, koren je veoma značajan "senzor" promena u zemljištu (ne samo nedostatka vode već i promena u mehaničkom sastavu) o kojima "obaveštava" izdanak putem tzv. "*hemijskih signala suše*" (prvenstveno biljnih hormona i to abscisinske kiseline) koji se transportuju do listova gde dovode do redukcije rasta ćelija i smanjenja provodljivosti stominih ćelija (Dodd, 2007). Iako je ABA najčešće ispitivani hemijski signal, postoje i drugi kao što je, na primer, redukcija sadržaja citokinina do koje dolazi pri niskom sadržaju vode (Bano *i sar.*, 1993, 1994; Kudoyarova *i sar.*, 2006; Jia i Zhang, 2008). Hemijski signal može biti i promena pH ksilema ili apoplasta koja, takođe, utiče na redukciju provodljivosti stoma (Wilkinson *i sar.*, 1998; Wilkinson, 1999; Wilkinson i Davies, 2002) ili rast ćelija (Bacon *i sar.*, 1998; Davies *i sar.*, 2002), kao i joni kalcijuma (Shang *i sar.*, 2005; Guo *i sar.*, 2008).

2.8. Molekularni odgovor biljaka na stres

Pretpostavlja se da je senzor suše na nivou ćelije transmembranski vezana dvokomponentna histidin kinaza koju aktivira porast u osmolarnosti ćelije, a koji je izazvan opadanjem turgora u ćeliji (ćelijskom dehidratacijom). Zato se ova kinaza naziva "osmosenzor" i ona indukuje kaskadu reakcija (transdukcija signala) koje vode ka ekspresiji gena indukovanih dehidratacijom. Takođe je moguće i da razvoj stresa utiče na fizičke osobine membrane, odnosno protein-lipidne interakcije. To može da izazove promene propustljivosti membrana i reorganizaciju citoskeleta, što utiče na kanale za vodu (akvaporine) i jone (Stikić i Jovanović, 2012). Nakon percepcije signala, signalna transdukcija, preko sinteze sekundarnih prenosioca i oslobađanja Ca^{2+} , dovodi do ekspresije gena indukovanih sušom. Produkti aktivnosti ovih gena mogu se podeliti na dve grupe (Shinozaki *i sar.*, 2003): prvu grupu čine funkcionalni molekuli koji su direktno uključeni u tolerantnost na stres kao što su različiti antioksidanti, antioksidativni enzimi (SOD, CAT, GR, APx), osmoprotektanti (na pr. enzimi uključeni u biosintezu prolina), proteini koji štite makromolekule (šaperoni, LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteini), a drugu grupu regulatori ekspresije gena i signalnih puteva (protein kinaze, fosfataze, transkripcioni faktori - TF, enzimi metabolizma fosfolipida).

Proučavanja transkripcione regulacije dehidratacije i zaslanjenosti dovela su do otkrića tzv. *ABA-zavisnog* i *ABA-nezavisnog puta* (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Dehidratacija ćelije u uslovima ograničenog priliva vode, dovodi do povećanja endogenog sadržaja ABA u ćeliji, što uslovljava ekspresiju ciljnih gena koji kodiraju transkripcione faktore, signalne komponente, enzime i dr. (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006; Ciarmiello *i sar.*, 2011). Geni koji odgovaraju na ABA, uglavnom su regulisani transkripcionim faktorima tipa bZIP (ABRE/ABF), koji se vezuju za ABRE cis-elemente u promotorima (Fujita *i sar.*, 2005). Kod ABA-nezavisnog puta ciljni geni imaju u promotorima cis-sekvencu DRE/CRT za koju se vezuju transkripcioni faktori ERF/AP2 tipa, kao što su familije DREB1/CBF i DREB2. DREB1 tip transkripcionih faktora je uključen u odgovor na

niske temperature, a DREB2 u odgovor na dehidraciju i povišenu temperaturu u spoljašnjoj sredini (Maruyama *i sar.*, 2004; Sakuma *i sar.*, 2006). Jovanović *i sar.* (2013) utvrdili su da ekspresiju gena DREB2 indukuju suša, soli, ali i ABA nakon dužeg perioda delovanja. Oni, takođe, ukazuju na moguću interakciju ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta (eng."cross talk"). Neki od transkripcionih faktora, koji su uključeni u odgovor na stres, regulisani su na posttranslacionom nivou putem posttranslacionih modifikacija i obično su uključeni u brze i rane odgovore na stres. Od posttranslacionih modifikacija najzastupljenije su fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija.

Različiti geni aktivirani pod uticajem stresa mogu se podeliti u dve grupe: *geni brzog* i *geni sporog odgovora*. Geni brzog odgovora se aktiviraju vrlo brzo nakon izlaganja stresu (za nekoliko minuta) i često je to povećanje ekspresije prolaznog karaktera. Njihova indukcija ne zahteva sintezu novih proteina, jer su sve signalne komponente već prisutne. Tipični primer su geni čija se ekspresija povećava u uslovima suše (na pr. DREB/CBF), soli, stresu niske temperature i u prisustvu ABA. Mnogi drugi geni se aktiviraju tek nakon nekoliko sati i njihova ekspresija je često kontinuirana, odnosno održava se na određenom nivou tokom stresa. Ovoj grupi pripadaju geni uključeni u odgovor na stres kao što su geni osetljivi na dehidraciju (RD - responsive to dehydration,), aktivirani hladnoćom (KIN - cold induced), osetljivi na hladnoću (COR - cold responsive), itd. Navedeni geni kodiraju sintezu na primer LEA proteina, antioksidanata, osmolita i drugih proteina važnih u procesu stabilizacije biomembrana i učestvuju u regulaciji njihove aktivnosti (Wang *i sar.* 2003, Mahajan i Tuteja, 2005).

3. NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA I OSNOVNE HIPOTEZE

Naučni cilj ovog istraživanja je karakterizacija pojedinih fizioloških i biohemijskih procesa koji su u osnovi reakcija biljaka stočnog graška na sušu i osmotski stres. Molekularna istraživanja bi, uz analizu fizioloških parametara rasta biljaka, akumulaciju hormona abscisinske kiseline ispitivanja antioksidativnih mehanizama odbrane biljaka od osmotskog i stresa suše, značajno doprinela razumevanju adaptivnih reakcija i toleranciji stočnog graška na sušu. Takav multidisciplinarni pristup bi omogućio i teorijsku osnovu za identifikaciju genotipova stočnog graška koji pokazuju najveću tolerantnost na oksidativni stres izazvan vodnim deficitom, i mogao bi da ima svoju praktičnu primenu za potrebe selekcije i stvaranje genotipova tolerantnih na sušu.

U istraživanjima se polazi od osnovne hipoteze da će ispitivani genotipovi roda *Pisum* pokazati razlike u klijavosti i osnovnim parametrima porasta ponika, kao i u dinamici porasta ponika u uslovima suše indukovane polietilenglikolom 6000 (PEG 6000) i porasta listova u u uslovima suše. Očekuje se da će se ispoljiti genotipske razlike u osmotskom i stresom suše indukovanoj akumulaciji hormona abscisinske kiseline. S obzirom na činjenicu da suša i osmotski stres izazivaju oksidativni stres, kao sekundarni stresni faktor, očekuje se i da će se u tim uslovima promeniti i aktivnost antioksidativnih enzima i da će se ispoljiti genotipske razlike. Takođe se očekuje da će doći do promena u genskoj ekspresiji antioksidativnih enzima u različitim uslovima vodnog deficita.

4. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni deo istraživanja izveden je u Laboratoriji za ispitivanje semena Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Laboratoriji Katedre za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su obuhvatala 2 nezavisna eksperimenta i to:

1. Ispitivanje uticaja osmotskog stresa (Ogled osmotskog stresa)
2. Ispitivanja efekata suše (Ogled suše).

Ogled osmotskog stresa je imao za cilj da se ispitaju reakcije različitih sorti graška u fazi ponika, dok su ispitivanja efekata suše imala za cilj da se kod istih sorti, ali u kasnijim fazama ontogeneze ispitaju reakcije na sušu.

4.1. Biljni materijal

Za istraživanja je korišćeno 7 genotipova stočnog graška selekcionisanih u Odeljenju za krmno bilje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Genotipovi su odabrani na osnovu komercijalnog značaja, zastupljenosti u proizvodnji kao i po preporuci oplemenjivača. Međusobno se razlikuju po vremenu setve i načinu korišćenja.

4.1.1. Karakteristike ispitivanih sorti

NS Junior je sorta jarog graška za kombinovano iskorišćavanje, odnosno za krmu i zrno. Biljke su visine između 125 i 145 cm, indeterminantnog porasta, sa visokim udelom lista u ukupnoj masi biljke i belim cvetom. Kosidba u toku cvetanja i obrazovanja prvih mahuna obezbeđuje između 40 i 50 t/ha zelene mase sa 16-18% suve materije i udelom sirovih proteina između 19 i 24%. Posедуje genetski potencijal za prinos zrna od 5 t/ha, uz sadržaj sirovih proteina i do 28%. Zbog niskog sadržaja antinutritivnih materija nije potrebna termička obrada zrna, pa se koristi neposredno u ishrani svinja i živine. Najrasprostranjenija je sorta jarog graška na površinama u Srbiji.

Dukat je srednje rana, visokorodna sorta jarog proteinskog graška. Determinantnog je porasta visine 50-75 cm. Manje je osetljiva na poleganje. U gornjoj polovini biljke obrazuje 8-12 mahuna sa po 5-7 krupnih zrna. Prinos zrna je 4-5 t/ha. Masa 1000 zrna se kreće između 235-250 g. Prosečan sadržaj proteina u zrnu je oko 25%.

Javor je sorta jarog proteinskog graška namenjena isključivo za proizvodnju suvog zrna. Biljke su visine između 50 i 70 cm, ograničenog (determinantnog) rasta, sa zbijenim nodusima u donjem delu stabla, što povećava tolerantnost na poleganje. Mahune su skupljene u vršnom delom stabljike, što značajno smanjuje gubitke prilikom mehanizovane žetve. Masa 1000 zrna je oko 250 g. Setvom najmanje 110 klijavih zrna po kvadratnom metru omogućuje se ravnomeran rast i razviće useva. Poseduje genetski potencijal za prinos zrna od preko 5 t/ha, a ostvaruje redovne prinose od 3,5 do 4,5 t/ha, sa oko 25 % sirovih proteina u zrnu. Veoma je rasprostranjena u proizvodnji.

Partner je sorta jarog proteinskog graška za proizvodnju zrna. Dužina vegetacije kod ove sorte je 80-85 dana. Pokazuje minimalnu sklonost ka poleganju, visine stabla 50-70 cm, afila tipa lista i bele boje cveta. Prinos zrna u proizvodnim uslovima 4,5-5,5 t/ha sa 25% sirovih proteina.

Pionir je sorta ozimog krmnog graška. Veoma je otporna na niske temperature i tolerantna na preovlađujuće bolesti. Koristi se kao zelena krma i seno u ishrani preživara, u smeši sa strninama ili kao čist usev, kao i za zelenišno đubrenje u voćnjacima i vinogradima. Odlikuje se visinom između 105 i 170 cm, indeterminantnog porasta, sa visokim učešćem lista u prinosu krme i ljubičastim cvetom. Postiže prinose od oko 40 t/ha zelene krme i 8 t/ha sena, sa oko 20% sirovih proteina.

Trezor je sorta ozimog krmnog graška koja se koristi se kao zelena krma i seno u ishrani preživara, u smeši sa strninama ili kao čist usev, kao i za zelenišno đubrenje u voćnjacima i vinogradima. Odlikuje se visinom između 90 i 110 cm, indeterminantnog porasta, sa visokim učešćem lista u prinosu krme i ljubičastim cvetom. Postiže prinose od oko 35 t/ha zelene krme i 7,5 t/ha sena, prinos zrna u proizvodnim uslovima 3-3,5 t/ha.

NS Mraz je vrlo rana sorta ozimog proteinskog graška za proizvodnju zrna. Ima zadovoljavajuću otpornost na jačinu i dužinu delovanja niskih temperatura. Sorta je determinantnog porasta, dužine stabla 60-80cm, afile tipa lista i bele boje cveta. Ima izraženu ranostasnost i ujednačenost sazrevanja sa visokom otpornošću prema poleganju. Prinos zrna u proizvodnim uslovima 4,5-5,5 t/ha, uz sadržaj sirovih proteina preko 27%.

4.2. Oglad osmotskog stresa

Oglad uticaja osmotskog stresa obavljen je u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Za indukciju osmotskog stresa korišćene su 3 različite koncentracije rastvora osmotikuma PEG 6000 (Singh *i sar.*, 1990) čiji su osmotski potencijali iznosili: -0,1MPa, -0,2MPa i -0,3MPa. Rastvori PEG 6000 pripremani su prema Michel i Kaufmann (1973).

Ispitivanja su obavljena u dve rane vegetativne faze biljaka: fazi klijanja i fazi ponika. Ogljed za ispitivanje klijavosti i razvoja ponika je postavljen tako što je 4x100 semena naklijavano u posudama napunjenim sterilnim peskom navlaženim odgovarajućim rastvorom različite koncentracije i osmotskog potencijala PEG 6000, odnosno vodom kao kontrolom. Inkubacioni period za ispitivanje klijavosti iznosio je 10 dana na 20 °C u mraku. Za ispitivanje ostalih fizioloških, biohemijjskih i molekularnih parametara inkubacioni period je iznosio 10 dana na 20 °C u mraku, nakon čega je porast ponika nastavljen na 20 °C u režimu dan/noć do 15. dana.

Nakon završetka inkubacionog perioda od 10, odnosno 15 dana prikupljeni biljni materijali nadzemnog dela i korena ponika čuvani su na -69 °C, za kasnije određivanje akumulacije ABA, aktivnosti antioksidativnih enzima i ekspresije gena.

4.3. Ogljed suše

Za ova ispitivanja biljke su gajene u komori Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu u kontrolisanim uslovima sa fotoperiodom od 14h, osvetljenošću (PAR) 300 $\mu\text{mol/m}^2$, temperaturom 25/18°C i relativnom vlažnošću vazduha od 70% (slika 10.)

Biljke su se razvijale iz semena u komercijalnom supstratu (Potground H proizvođača Klasmann-Deilmann, Germany).

Mlade biljke su zalivane optimalno do pojave trećeg para listova. Količina vode u supstratu je merena pomoću Theta probe (ThetaProbe, type ML2x, Delta-T Devices Ltd., England) (slika 11). Zatim su primenjivana tri različita tretmana zalivanja:

1. Optimalno zalivanje (36% vlažnost supstrata);
2. Tretman suše od 18% vlažnosti supstrata (T1) i
3. Tretman suše od 9% vlažnosti supstrata (T2).



Slika 10. Ogled u klima komori.

Kod kontrolnih biljaka nastavljeno je sa navodnjavanjem do optimalnog vodnog kapaciteta, odnosno, sadržaja vode u supstratu od 36%. Prvi tretman suše je izazvan prekidanjem zalivanja sve dok se sadržaj vode u supstratu nije spustio na 50% od optimalnog vodnog kapaciteta (oko 18%), odnosno drugi tretman suše dok se sadržaj vode nije spustio na 25% od optimalnog kapaciteta (oko 9%).



Slika 11. Merenje sadržaja vode u supstratu.

Merena je provodljivost stoma u oba tretmana suše (T1 i T2), a na kraju eksperimenta (T2) izmereni su osnovni fiziološki parametri i prikupljeni biljni materijali listova za kasnije određivanje akumulacije ABA, aktivnosti antioksidativnih enzima i ekspresije gena. Biljni materijal je čuvan na -69 °C.

4.4. Određivanje fizioloških parametara kod ponika u ogledu osmotskog stresa

Od fizioloških parametara kod semena izloženih osmotskom stresu praćena je klijavost koja je izražena u %. Seme se smatrao klijalim ukoliko mu je korenčić bio dužine 2 mm (Kaya *i sar.*, 2006; Kim *i sar.*, 2006; Wu *i sar.*, 2011). Svakodnevnim brojanjem iskljalih semena je određeno i srednje vreme klijanja (Mean Germination Time – MGT) prema formuli (Kandil *i sar.*, 2012) :

$$\text{MGT} = \frac{\sum dn}{\sum n},$$

gde je n – broj klijalih semena na dan d, a d – broj dana računato od početka klijanja.

Kod ponika izloženih osmotskom stresu praćeni su sledeći parametri: dužina nadzemnog dela i korena (mm), sveža masa nadzemnog dela i korena (g) i suva masa nadzemnog dela i korena (g) nakon završetka inkubacionog perioda od 10, odnosno 15 dana. Dužina nadzemnog dela i korena određena je pomoću lenjira na 40 slučajno odabranih ponika. Izmerena je njihova sveža masa nadzemnog dela i korena, a zatim je izmerena i masa suvih ponika nakon sušenja u termostatu na temperaturi od 80 °C u trajanju od 24 časa. Na osnovu dobijenih rezultata je izračunat odnos suve mase nadzemnog dela i korena. Indeks tolerantnosti na sušu nadzemnog dela i indeks tolerantnosti na sušu korena izračunati su prema Maiti *i sar.* (1994):

$$\text{Indeks tolerantnosti (IT)} = \frac{\text{Suva masa biljaka u tretiranoj grupi (g)}}{\text{Suva masa biljaka u kontrolnoj grupi (g)}}$$

4.5. Određivanje fizioloških parametara kod biljaka u ogledu suše

4.5.1. Merenje osnovnih fizioloških parametara

Određivani su osnovni fiziološki parametri kod biljaka u kontroli i kod biljaka izloženih tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata (T2). Izmerena je masa nadzemnog dela i korena u svežem stanju (g). Posle sušenja biljnog materijala na 80 °C u sušnici izmerena je suva masa nadzemnog dela i korena (g). Na osnovu dobijenih rezultata izračunat je odnos suve mase nadzemnog dela i korena. Indeks tolerantnosti na sušu nadzemnog dela i korena izračunat je prema Maiti *i sar.* (1994).

4.5.2. Merenje provodljivosti stoma

Provodljivost stoma (g_s) je merena na abaksijalnoj strani trećeg para listova pomoću porometra (SC-1 Leaf Porometer, Decagon Devices Inc., USA) na ukupno 5 biljaka po tretmanu (slika 12). Merenja su vršena kod svake sorte u kontroli, kao i pri dva različita tretmana suše (T1 i T2). Vrednosti su izražene u $mmol/m^2s$.

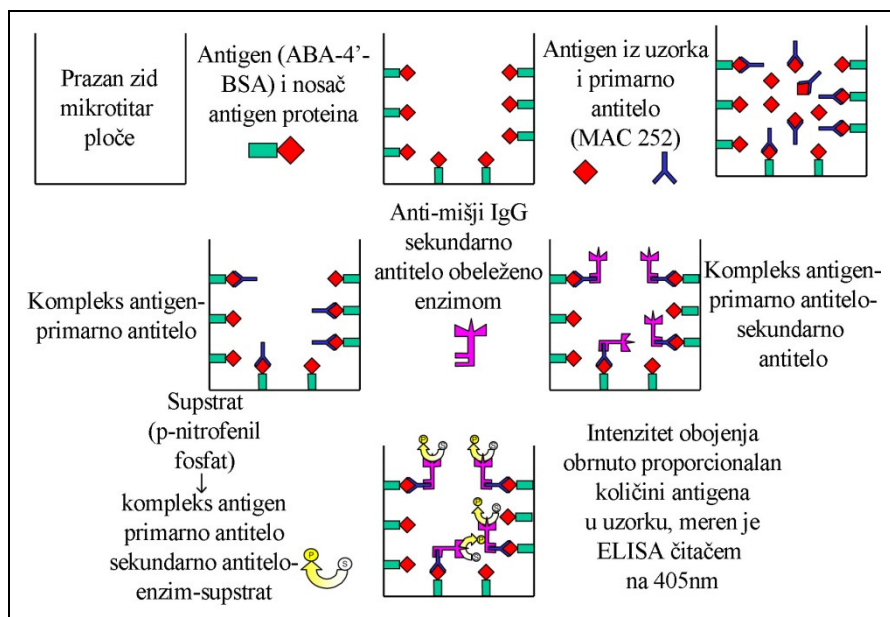


Slika 12. Merenje provodljivosti stoma.

4.6. Određivanje sadržaja abscisinske kiseline

Određivanje sadržaja ABA je izvršeno u Laboratoriji Katedre za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

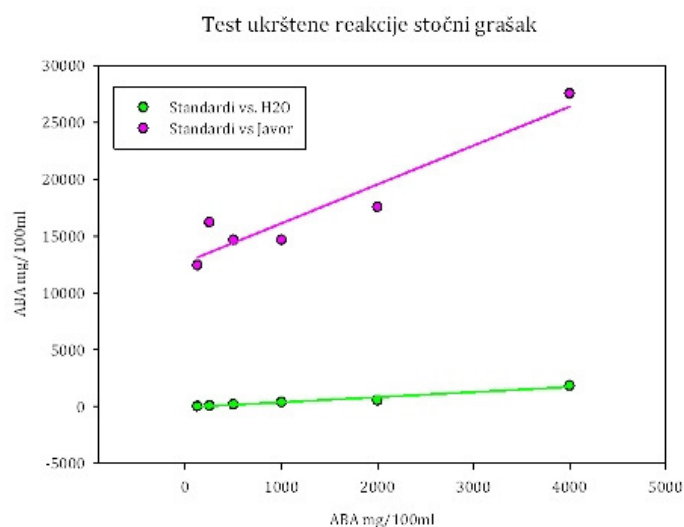
Sadržaj abscisinske kiseline je analiziran ELISA testom (Asch, 2000). Princip ELISA testa zasniva se na kompetitivnoj imunološkoj reakciji visoko specifičnog monoklalnog antitela (MAC 252) sa ABA (slika 13). Pri tome ne dolazi do ukrštene reakcije između antitela i drugih supstanci (Quarrie *i sar.*, 1988). Posle imunološke reakcije, vrši se bojenje rastvora uz dodatak supstrata (p-nitrofenil fosfata), pri čemu se apsorpcija rastvora očitava na ELISA čitaču (Sunrise, Tecan) na 405 nm. Ova očitana vrednost obrnuto je proporcionalna koncentraciji ABA koja se izračunava preko kalibracione krive dobijene sa poznatim koncentracijama standardne (\pm) ABA.



Slika 14. Shematski prikaz ELISA testa (Asch, 2000).

Nadzemni deo i koren ponika iz oglada uticaja osmotskog stresa u kontrolisanim uslovima, kao i listovi iz oglada uticaja suše su uzimani na kraju oglada i čuvani na -69°C za određivanje sadržaja abscisinske kiseline.

Pre analize je testom ukrštene reakcije potvrđeno da ekstrakt izolovane ABA ne sadrži druge supstance koje reaguju sa antitelom, a da nisu antigeni, tj. abscisinska kiselina (slika 14).



Slika 14. Test ukrštene reakcije.

Neposredno pred analizu izvršena je ekstrakcija ABA iz zamrznutog biljnog materijala. Uzorci su samleveni u analitičkom mlinu (A-11 basic, IKA) uz prisustvo tečnog azota. U eppendorf tube je odmereno 0,5 g biljnog tkiva i pomešano sa 1,5 ml destilovane vode i 2% PVP40. Tube su potopljene u ključalo vodeno kupatilo 5-10 sec. Nakon toga, uzorci su mučkani 16h u mraku, na 4 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf). Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta, na 4 °C, pri brzini od 14000 x g (Sigma 2-16K, Germany). Dobijeni supernatant je korišćen za dalju analizu.

Procedura ELISA testa sastojala se u sledećem: 200 µl ABA-konjugata (ABA-4'-BSA) sa proteinskim nosačima, u mikro-titar ploči, inkubirano je tokom noći na 4 °C. Nakon tri ispiranja puferom 2 za ispiranje (TRIZMA, MgCl₂ i NaCl i bovine serum albumine-BSA rastvoreni u H₂O, pH 7,8) (poslednji put pufer je držan 20 minuta na 37°C kako bi se neobloženi zidovi saturisali sa BSA), mikro-titar ploča je sušena upijajućim papirom. Posle sušenja, dodato je 100 µl uzorka i 100 µl primarnog antitela MAC 252. Mikro-titar ploča je mučkana konstantno 1 minut, a zatim inkubirana na 4 °C pri čemu je došlo do reakcije između antigena i antitela. Mikro-titar ploča je, ponovo, ispirana tri puta i sušena upijajućim papirom, nakon čega je dodato 200 µl sekundarnog antitela, Anti-Rat IgG, obeleženog sa alkalnom fosfatazom, rastvorenog u puferu 1 (TRIZMA, MgCl₂ i NaCl rastvoreni u H₂O, pH 7,8). Mikro-titar ploča je inkubirana 1 sat na 37 °C u vlažnim plastičnim boksevima. U tom periodu došlo je do vezivanja sekundarnog antitela za primarno antitelo. Mikro-titar ploča je, ponovo, ispirana pet puta i sušena upijajućim papirom, a zatim je dodato 200 µl rastvora supstrata. Rastvor supstrata dobijen je rastvaranjem 20 mg p-nitrofenil fosfata u 20 ml natrijum-hidrogen-karbonata (NaHCO₃). Supstrat je reagovao sa enzimom vezanim za sekundarno antitelo pri čemu je došlo do bojenja rastvora. Intenzitet obojenja je bio obrnuto proporcionalan količini antigena (ABA). Apsorpcija je očitavana na ELISA čitaču (Sunrise, Tecan) na 405 nm. Za određivanje koncentracije ABA napravljena je kalibraciona kriva (4000, 2000, 1000, 500, 250 i 100 pg/100 µl) razblaživanjem osnovnog (±) ABA standarda (80000 pg/100 µl. Za proračun rezultata korišćen je program napravljen u Excel-u

(www.asch-online.eu/downloads/hormones/ABA-Standard.xls). Rezultati su predstavljeni u ng po g sveže mase (ng/g FW).

4.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima obavljeno je u Laboratoriji za ispitivanje semena Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu i Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu.

4.7.1. Priprema uzoraka

Zamrznuti biljni materijal iz ogleda osmotskog stresa i ogleda suše je pomoću tučka i avana usitnjen u tečnom N₂. Biljni materijal je zatim pomešan sa ekstrakcionim puferom u odnosu 1:2. Ekstrakcioni pufer je sadržavao 50 mM kalijum fosfat, pH 7,0 i 0,1 mM EDTA sa dodatkom 5% (w/v) polivinil pirolidona (PVP).

Bakon toga uzorci su centrifugirani 20 minuta na 15000 x g. Supernatanti su, kao sirovi ekstrakt, korišćeni za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima. Svi koraci su rađeni na 4 °C (Stanisavljević *i sar.*, 2012).

Koncentracija proteina u ekstraktima je određena prema Bredfordu (1976) upotrebom Bio Rad assay kit-a i BSA kao standarda.

4.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost enzima superoksid dismutaze određena je po metodi Giannopolites i Ries (1977), koja je zasnovana na sposobnosti superoksid-radikala da redukuje nitro grupu supstituisanih aromatičnih jedinjenja kao što je nitroblu-tetrazolium (NBT) u kojoj nastaje formazan plave boje. Redukcija žuto obojenog

NBT do plavog formazana se koristi kao mera stvaranja superoksid-radikala u hemijskim i biološkim sistemima.

Sirovi ekstrakt (10 μ l) je dodat u reakcionu smešu (0,96 ml) koja je sadržavala 50 mM kalijum fosfatni pufer (pH 7,8), 2 mM EDTA, 9,9 mM metionin, 55 μ M nitro blue tetrazolium (NBT) i 0,025% Triton-X100. Na kraju je dodato 10 μ l 1mM riboflavina i tube su promešane. Reakcija je započeta izlaganjem smeše hladnom belom fluorescentnom svetlu jačine 15W. Nakon 15 min svetlo je ugašeno, tube su promešane i merena je apsorbance na 560 nm. SOD aktivnost je izražena kao U/mg proteina. 1U je količina enzimske aktivnosti koja inhibira reakciju u kojoj nastaje formazan za 50%.

4.7.3. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost askorbat peroksidaze je određena prema Jiménez (1997b) primenom reakcije smeše koja je sadržavala 50 mM kalijum fosfatni pufer, pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM askorbat, 10 mM H₂O₂ i 20 μ l sirovog ekstrakta. H₂O₂ zavisna oksidacija je praćena smanjenjem apsorbance na 290 nm. Aktivnost askorbat peroksidaze je izražena kao nmol/min/mg proteina. Aktivnost je računata prema formuli:

$$A \text{ (nmol/min/mg}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A_{290\text{nm}}}{\epsilon t v C_{\text{prot}}} \times 1000$$

gde ϵ - predstavlja molarni ekstinkcioni koeficijent askorbinske kiseline na 290 nm i iznosi 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹, t - vreme za koje je praćena promena apsorbancije, v - zapremina enzimskog preparata (ml) i C_{prot} - koncentracija proteina u enzimskom preparatu (mg/ml).

4.7.4. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze

Glutacion reduktaza katališe redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) pri čemu je NADPH donor redukcionih ekvivalenata. Aktivnost glutacion reduktaze se

određuje spektrofotometrijski, indirektno, preko određivanja brzine oksidacije NADPH, čiji se maksimum apsorpcije meri na 340 nm.

Aktivnost glutation reduktaze je određena je po metodi Jiménez (1997b). Reakciona smeša je sadržavala 0,025 mM fosfatni pufer pH 7,8, 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH- Na_4 i 50 μl ekstrakta. Oksidacija NADPH je određena na 340 nm. Aktivnost enzima je izražena kao nmol/min/mg proteina Aktivnost je računata prema formuli:

$$A \text{ (nmol/min/mg)} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\epsilon t v C_{\text{prot}}} \times 1000$$

gde ϵ - predstavlja molarni ekstinkcioni koeficijent NADPH na 340 nm koji iznosi 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, t - vreme za koje je praćena promena apsorpcije, v - zapremina enzimskog preparata (ml) i C_{prot} - koncentracija proteina u enzimskom preparatu (mg/ml).

4.8. Analiza promena u ekspresiji gena pod uticajem osmotskog stresa i u ogledu suše

Analiza promene u ekspresiji gena za antioksidativne enzime (*Cu/ZnSOD*, *cAPx* i *GR*) i gena koji kodiraju enzim aldehid oksidazu – AO: *PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3* izvršena je primenom tehnike obrnute transkripcije lančanom reakcijom polimeraze (RT-PCR) u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu.

4.8.1. Ekstrakcija informacione RNK

Informaciona RNK je ekstrahovana iz 100 mg biljnog materijala iz ogleda osmotskog stresa i ogleda suše. Korišćen je Qiagen kit za ekstrakciju RNK iz biljnih tkiva (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Nemačka). Ekstrakcija iRNK je izvedena prema uputstvu proizvođača. Kvalitet iRNK i koncentracija su određeni

spektrofotometrijski merenjem optičke gustine na 260, 280 i 230 nm (Beckman, USA Duferies 60 spektrfotometar).

4.8.2. Sinteza cDNK

Sinteza cDNK je urađena korišćenjem kita za reverznu transkripciju (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD), prema uputstvima proizvođača. Dobijena cDNK je korišćena kao matrica u PCR reakciji.

4.8.3. Amplifikacija kandidat gena

PCR reakcije su izvedene primenom 2X master miksa (DreamTaq™ PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, SAD), specifičnih prajmera i 50ng cDNK, u volumenu od 25 µl reakcione smeše. Sastav PCR reakcione smeše je prikazan u tabeli 1. Nazivi i sekvence prajmera koji su korišćeni dati su u tabeli 2. Kao referentni gen je korišćen *Arabidopsis* 18S rRNK (Rivera-Becerril i sar., 2005). Temperaturni profil PCR reakcije je prikazan u tabeli 3.

Tabela 1. Komponente PCR reakcione smeše

Komponenta PCR smeše	Finalna koncentracija	1 PCR reakcija
PCR Master Mix (2 X)	1 X	12,5 µl
Prajmer 1 (10 µM)	0,1 µM	1 µl
Prajmer 2 (10 µM)	0,1 µM	1 µl
cDNK (25 ng/µl)	50 ng	2 µl
dH ₂ O	do 25 µl	8,5 µl

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama

Gen	Sekvenca prajmera (5'-3')	Temperatura anilinga (°C)	Referenca
<i>18S rRNK</i>	F: CCAGGTCCAGACATAGTAAG R: GTACAAAAGGCAGGGACGTA	55	Zdunek-Zastocka, 2008
<i>Cu/ZnSOD</i>	F: GAACAATGGTGAAGGCTGTG R: GTGACCACCTTTCCCAAGAT	57	Rodríguez-Serrano <i>i sar.</i> , 2006
<i>cAPx</i>	F: TCCTTTCCGAACAATTAAGC R: TCCTTCTCACCAGTCAACAA	53	Vanacker <i>i sar.</i> , 2006
<i>GR</i>	F: TCGCAGCACTCTCTTCTTCA R: CTCCATCCAAAACCATTGCT	55	Rodríguez-Serrano <i>i sar.</i> , 2006
<i>PsAO1</i>	F: GACAGTTCTGCAAGAAAACCAGTGG R: CAGCACCAGCTATAGATTTTCATGCTC	57	Zdunek-Zastocka, 2008
<i>PsAO2</i>	F: GTCAAGGCCCTGAGTTTGACA R: GGAGTTGGTTTTAGATGCATCTCTTG	57	Zdunek-Zastocka, 2008
<i>PsAO3</i>	F: CAGCTGGATGGAGTAAGAGATG R: GTGCTGTAACCTATGTTATGTGG	55	Zdunek-Zastocka, 2008

Tabela 3. Temperaturni profil PCR reakcije

Korak	Temperatura (°C)	Vreme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	30 sec	} 30
Aniling	53-57*	30 sec	
Ekstenzija	72	1 min	
Finalna ekstenzija	72	10 min	1

* temperature anilinga za specifične prajmere su predstavljene u tabeli 2.

Razdvajanje produkata PCR reakcije izvršeno je na 1% agaroznom gelu u prisustvu etidijum bromida. Gelovi su slikani pomoću DOC PRINT II sistema (Vilber Lourmat, USA).

4.9. Statistička obrada podataka

Svi dobijeni podaci obrađeni su uz pomoć softverskog paketa Statistica 10. Za analizu fizioloških parametara korišćen je Studentov t-test, sa nivoom značajnosti $<0,05$. Za potrebe poređenja ispitivanih genotipova i tretmana, urađena je dvofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA), sa nivoima značajnosti od $*p<0,05$, $**p<0,01$ i $***p<0,001$. U slučaju kada su F vrednosti bile statistički značajne ($p<0,05$) poređenje genotipova i tretmana je vršeno pomoću Tukey testa. Između pojedinih parametara određeni su korelacioni odnosi uz pomoć softverskog paketa Sigma-Plot (verzija 11.0).

5. REZULTATI

5.1. Osmotski stres

Ogled uticaja osmotskog stresa obavljen je u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Za indukciju osmotskog stresa korišćene su 3 različite koncentracije rastvora osmotikuma PEG 6000 čiji su osmotski potencijali iznosili: -0,1MPa, -0,2MPa i -0,3MPa. Treba istaći da su testiranja osmotskog stresa od -0,3MPa pokazala da je u uslovima ovog osmotskog stresa klijavost svih ispitivanih sorti bila vema niska (ispod 10%), dok je kod nekoliko ponika koji su klijali došlo do nekroze i nadzemnih organa i korena. Stoga je u okviru ove teze ispitivan osmotski stres indukovan rastvorima PEG od -0,1MPa i -0,2MPa. Istraživanja su obavljena u toku dve rane vegetativne faze biljaka:

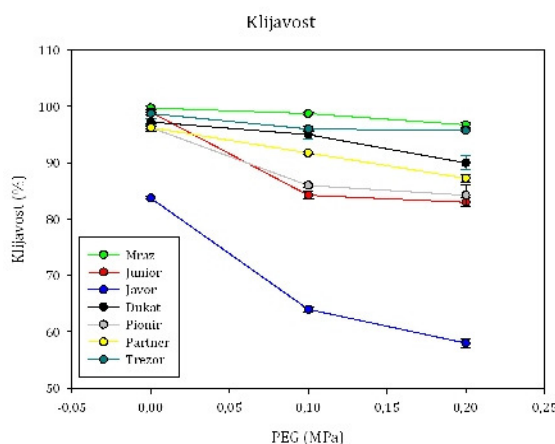
1. Fazi klijanja i
2. Fazi ponika.

U fazi klijanja su obavljena fiziološka ispitivanja uticaja osmotskog stresa na % klijavosti i srednje vreme klijanja ili Mean Germination Time. U fazi ponika su obavljena ispitivanja dužine i biomase nadzemnog dela i korena, kao i odnos suve mase nadzemnog dela i korena i izračunat je indeks tolerantnosti za nadzemni deo i koren.

Biohemijska ispitivanja su obuhvatila merenja koncentracije stres hormona abscisinske kiseline i aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutation reduktaze), dok su molekularna istraživanja obuhvatila analizu ekspresije gena za antioksidativne enzime (Cu/Zn SOD, cAPx i GR) i 3 gena za aldehid oksidazu - AO (*PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3*), koja učestvuje u biosintezi abscisinske kiseline.

5.1.1 Ispitivanja kljivosti semena

Klijavost semena je određena na 400 semena (4 x 100 semena) i izražena je u procentima (Prilog 1, tabela 1). Na slici 15. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja rastvora osmotikuma PEG 6000, čiji su osmotski potencijali iznosili: -0,1MPa i -0,2MPa.



Slika 15. Uticaj različitih koncentracija osmotikuma PEG 6000 na kljivost semena odabranih genotipova stočnog graška.

Klijavost u kontrolama se kod većine sorti kretala između 96,25% (Partner) i 99,75% (Mraz), osim kod sorte Javor kod koje je iznosila 83,75%. Kod svih sorti je uočeno smanjenje kljivosti u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti. Već iz samog grafičkog prikaza može se uočiti da su sorte Dukat, Mraz, Partner i Trezor imale sličan trend smanjenja kljivosti, kao i Pionir i Junior, dok je kod sorte Javor smanjenje kljivosti bilo daleko veće. Najmanje smanjenje procenta kljivosti je imala sorta Mraz (Kontrola 100%, -0,1MPa 99%; -0,2MPa 97%), a najveće smanjenje je imala sorta Javor (Kontrola 84%; -0,1MPa 64; -0,2MPa 58%).

Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje kljivosti u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri najnižem stepenu osmotskog stresa (-0,1MPa) kod sorti Trezor (97%), Partner (96%), Pionir (90%),

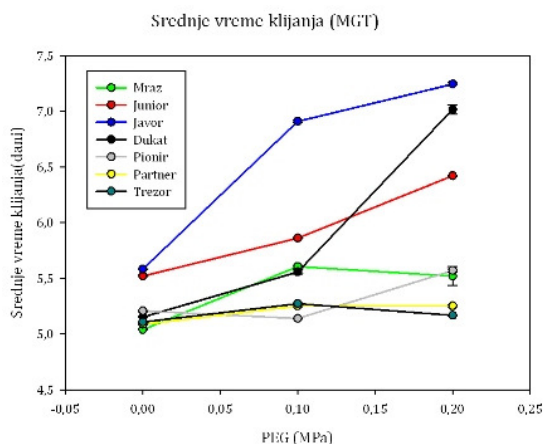
Junior (85%) i Javor (76%), dok kod sorti Mraz (99%) i Dukat (98%) to smanjenje nije bilo statistički značajno. Kod ovih sorti se statistički značajna razlika javlja pri jačem osmotskom stresu od -0,2MPa (Mraz 97%, $p < 0,001$; Dukat 93%, $p < 0,01$).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na klijavost značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 1a). Naknadne analize Tukey testom pokazale su da u rastvoru od -0,1MPa nisu utvrđene značajne razlike između sorti Mraz, Dukat i Trezor, kao i između sorti Pionir i Junior. Pri izlaganju ponika rastvoru od -0,2MPa su se izdvojile i 3 homogene grupe u okviru kojih nije bilo statistički značajnih razlika: Mraz i Trezor, Dukat i Partner i Pionir Junior.

5.1.2. Srednje vreme klijanja – Mean Germination Time (MGT)

Svakodnevnim brojanjem iskljalih semena je određeno i srednje vreme klijanja semena (Prilog 1, tabela 1).

MGT u kontroli se kretao između 5,04 (Mraz) i 5,58 (Javor) dana, u rastvoru PEG-a od -0,1MPa između 5,14 (Pionir) i 6,91 (Javor) dana, dok su u uslovima od -0,2MPa vrednosti iznosile između 5,17 (Trezor) i 7,24 (Javor) dana. Na slici 16. se uočava trend povećanja MGT, odnosno usporavanje klijanja semena, kod svih sorti sa povećanjem nivoa stresa, osim kod sorti Mraz i Trezor u rastvoru od -0,2MPa kada se vreme klijanja skraćuje u odnosu na -0,1MPa. Porast MGT u uslovima osmotskog stresa je bio naročito izražen kod sorte Javor, kod koje i kasnije dolazi do klijanja u odnosu na ostale sorte.



Slika 16. Uticaj različitih koncentracija osmotikuma PEG 6000 na srednje vreme klijanja (MGT) semena odabranih genotipova stočnog graška.

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na MGT značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 1b). Naknadne analize Tukey testom pokazale su da su se u okviru kontrolne grupe sorte grupisale u dve homogene grupe: Javor i Junior, kao i Mraz, Dukat, Pionir, Partner i Trezor. U okviru grupa nije bilo značajnih razlika u MGT. Pri nivou osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ jedino između sorti Mraz i Dukat, i sorti Trezor i Partner nije bilo razlika, a pri $-0,2\text{MPa}$ između sorti Mraz, Pionir i Partner.

Uzimajući u obzir rezultate merenja procenta klijavosti i srednjeg vremena klijanja uočava se da je sorta Javor znatno osetljivija od ostalih sorti na svim nivoima osmotskog stresa. Nasuprot tome najmanja osetljivost i klijanja i MGT je utvrđena kod sorti Mraz i Trezor.

5.1.3 Uticaj osmotskog stresa na dužinu nadzemnog dela ponika

Merene su promene u dužini nadzemnog dela ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana (slika 17).

a)



b)



c)

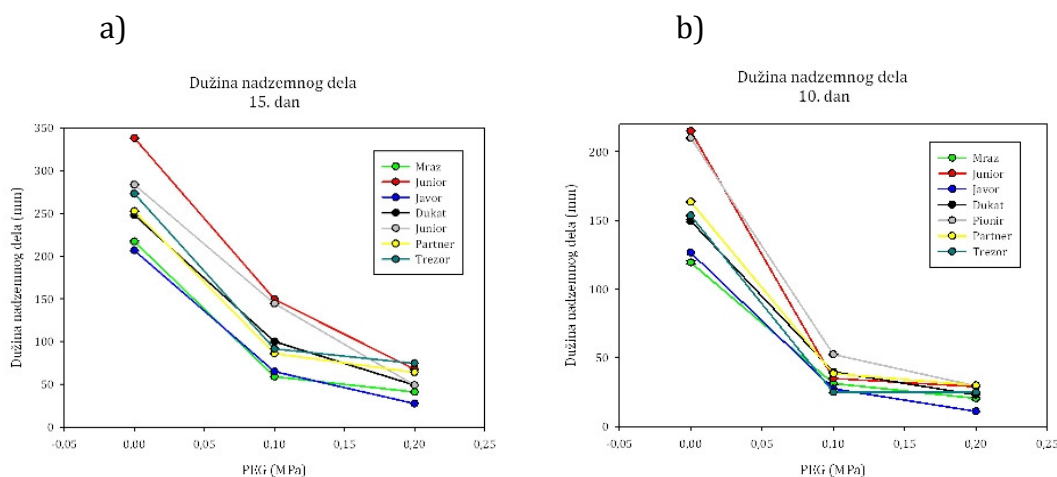


d)



Slika 17. Uticaj osmotskog stresa na sortu Pioneer. a) 10. dan, b) 15. dan, c) ponici 10. dan, d) ponici 15. dan.

Prosečna vrednost dužine nadzemnog dela ponika 10. dana u kontroli se kretala između 119,4 mm (Mraz) i 215 mm (Junior) (prilog 2, tabela 1), dok je brzina rasta bila u opsegu od 21,5 mm/dan (Junior) do 11,9 mm/dan (Mraz).



Slika 18. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na dužinu nadzemnog dela ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Kod svih sorti je 10. dana eksperimenta uočeno smanjenje dužine nadzemnog dela ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 18a). Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje dužine u odnosu na kontrolu bilo statistički veoma značajno ($p < 0,001$) već pri najmanjem stepenu osmotskog stresa ($-0,1\text{MPa}$) kod svih sorti.

Analiza efekata osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ kod pojedinačnih sorti je pokazala da je najmanje smanjenje dužine nadzemnog dela u odnosu na kontrolu bilo kod sorte Dukat (od $149,52\text{ mm}$ u kontroli na $39,75\text{ mm}$, odnosno $73,4\%$). Kod ove sorte je smanjenje brzine rastenja bilo u opsegu od $14,95\text{ mm/dan}$ (kontrola) do $3,98\text{ mm/dan}$ ($-0,1\text{MPa}$). Nasuprot tome najveće smanjenje od 215 mm (kontrola) na 35 mm u rastvoru PEG od $-0,1\text{MPa}$ ($83,7\%$) je utvrđeno za sortu Junior, kod koje se brzina rastenja u kontrolnim uslovima smanjila sa $21,5\text{ mm/dan}$ na $3,50\text{ mm/dan}$ ($-0,1\text{MPa}$).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na dužinu nadzemnog dela ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 2a). Naknadne analize Tukey testom pokazale su da su se sve sorte, osim

sorti Dukat i Partner, međusobno značajno razlikovale u rastvoru od -0,1MPa. Pri izlaganju ponika rastvoru od -0,2MPa izdvojile su se i dve homogene grupe u okviru kojih nije bilo statistički značajnih razlika. Prvu su činile sorte Partner, Pionir i Junior, a drugu Dukat i Trezor.

U kontroli 15. dana eksperimenta prosečna vrednost dužine nadzemnog dela ponika kretala se od 206,5 mm (Javor) i 338 mm (Junior) (Prilog 3, tabela 1). Ova vrednost je u uslovima osmotskog stresa od -0,1MPa bila od 59,0 mm (Mraz) do 149,6 mm (Junior), dok su pri stresu od -0,2MPa izmerene vrednosti bile od 27,5 mm (Javor) do 74,5 mm (Trezor).

Trend smanjenja dužine nadzemnog dela ponika kod svih sorti u zavisnosti od nivoa stresa uočava se i 15. dana eksperimenta (slika 18b) kada je t-test pokazao da je smanjenje dužine u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa). Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na dužinu nadzemnog dela ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 2b).

Analiza uticaja tretmana na pojedinačne sorte je pokazala da je najmanje smanjenje u odnosu na kontrolu u -0,1MPa uslovima utvrđeno za sortu Pionir (49%), dok je najveće smanjenje od 73% utvrđeno za sortu Mraz, a što je rezultat značajne razlike u brzini rasta nadzemnog dela (kod sorte Pionir 9,63 mm/dan i 3,96 mm/dan kod sorte Mraz). Za razliku od ispitivanja u intervalu od 10 dana, u uslovima dejstva stresa u trajanju od 15 dana značajne razlike između sorti Dukat i Junior nisu utvrđene. Slično kao i posle 10 dana, značajne razlike u reakcijama ispitivanih sorti na osmotski stres od -0,2MPa nisu bile toliko izražene (Prilog 3, tabela 1; slika 18b).

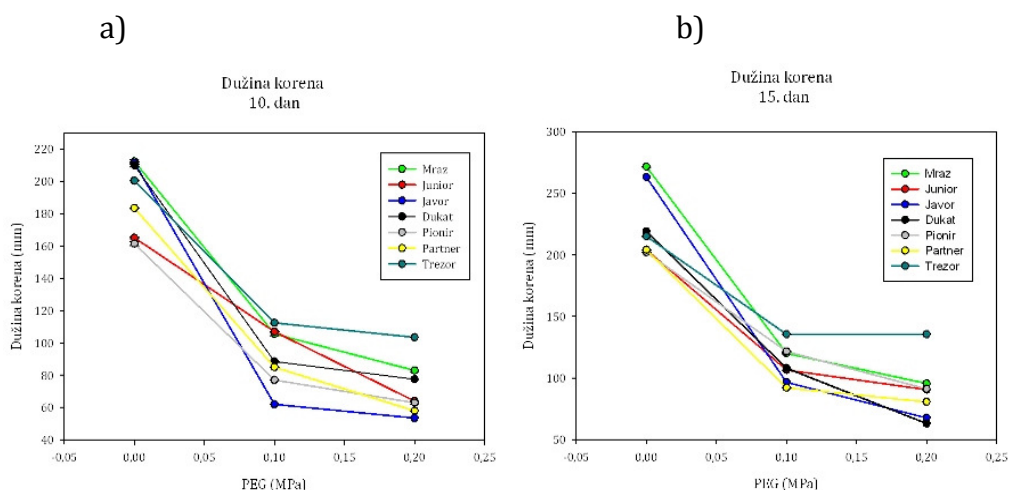
Kod svih sorti je uočeno povećanje dužine nadzemnog dela ponika 15. dana eksperimenta u odnosu na 10. dan, odnosno povećanje tolerantnosti u toku vremena. To se može ilustrovati i promenama brzine kod svih sorti koja je posle 10

dana u rastvoru od $-0,1\text{MPa}$ iznosila prosečno $3,56\text{ mm/dan}$, a posle 15 dana u istom osmotikumu $6,62\text{ mm/dan}$. Sličan trend povećanja brzine rasta sa vremenom izlaganja osmotskom stresu je utvrđen i u rastvoru od $-0,2\text{MPa}$ ($2,04\text{ mm/dan}$ posle 10 dana i $3,64\text{ mm/dan}$ posle 15 dana). Generalno, to ukazuje da se sa dužinom izlaganja ponika osmotskom stresu povećava tolerantnost nadzemnog dela na osmotski stres.

Poređenje rezultata izmerenih posle 10 i 15 dana delovanja tretmana kod pojedinačnih sorti pokazuje da je najmanja razlika u brzini rastenja izmerena između 10. i 15. dana u kontrolnim uslovima ($11,94$ i $14,46\text{ mm/dan}$), kao i u osmotskim tretmanima od $-0,1\text{MPa}$ ($3,14$ i $3,96\text{ mm/dan}$) i u uslovima od $-0,2\text{MPa}$ ($2,05$ i $2,73\text{ mm/dan}$), bila kod sorte Mraz. Ti rezultati ukazuju da kod sorte Mraz vreme izlaganja biljaka različitom stepenu osmotskog stresa nema velikog uticaja na promenu osetljivosti sorte na osmotski stres. Nasuprot tome, najveća razlika u brzini rastenja je utvrđena kod sorte Trezor i ona je u kontroli iznosila $15,35\text{ mm/dan}$ (10 dana merenja) i $18,20\text{ mm/dan}$ (15 dana), u $-0,1\text{MPa}$ ($2,49$ i $6,10\text{ mm/dan}$) i u $-0,2\text{MPa}$ ($2,30$ i $4,97\text{ mm/dan}$). Takva promena brzine rastenja je dovela do toga i da je dužina nadzemnog dela bila 15. dana veća u svim tretmanima (273 mm , $91,50\text{ mm}$ i $74,50\text{ mm}$) u odnosu na merenja 10. dana ($153,52\text{ mm}$, $24,92\text{ mm}$ i $22,98\text{ mm}$), što ukazuje da se kod ove sorte javlja značajno povećanje tolerantnosti na osmotski stres nadzemnog dela sa dužinom izlaganja biljaka njegovom delovanju.

5.1.4. Uticaj osmotskog stresa na dužinu korena ponika

Promene u dužini korena ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su na slici 19.



Slika 19. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na dužinu korena ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Prosečna vrednost dužine korena ponika 10. dana u kontroli se kretala između 161,5 mm (Pionir) i 212,4 mm (Mraz) (Prilog 2, tabela 1) dok je brzina rasta bila u opsegu od 21,24 mm/dan (Mraz) do 16,15 mm/dan (Pionir). Dužina korena se u rastvoru PEG od -0,1MPa kretala u opsegu od 62 mm (Javor) do 112,5 mm (Trezor), sa brzinom rasta od 6,2mm/dan, odnosno 11,25mm/dan, a u rastvoru od -0,2MPa u opsegu od 53,5 mm (Javor) do 103,5 mm (Trezor), sa brzinom 5,35 mm/dan i 10,35 mm/dan.

Kod svih sorti je 10. dana eksperimenta uočeno smanjenje dužine korena ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 19a). Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje dužine u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri najnižem stepenu stresa (-0,1MPa) kod svih sorti. Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na dužinu korena ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (prilog 5, tabela 3a). Tukey-evim testom je dalje utvrđeno da Junior i Mraz u rastvoru od -0,1MPa, a Junior i Pionir u rastvoru od -0,2MPa ne pokazuju statistički značajne razlike u smanjenju dužine korena.

Analiza efekata osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ kod pojedinačnih sorti je pokazala da je najveće smanjenje dužine korena u odnosu na kontrolu bilo kod sorte Javor (70,7%, odnosno sa 211,50 mm u kontroli na 62 mm pri osmotskom stresu). Kod sorte Trezor ta razlika je bila najmanja (od 200,48 mm u kontroli do 112,48 mm pri osmotskom stresu, odnosno 43,9% smanjenja). Smanjenje dužine korena sorte Javor je nastalo kao rezultat sporijeg rasta u uslovima osmotskog stresa jer su se vrednosti brzine rasta kretale od 21,15 mm/dan (kontrola) do 9,65 mm/dan ($-0,1\text{MPa}$). Poređenje između ovih sorti pokazuje da je u istim uslovima brzina rasta korena kod sorte Trezor bila u kontrolnim uslovima 20,05 mm/dan, a pri $-0,1\text{MPa}$ 7,50 mm/dan. Rezultati su takođe pokazali i da je u uslovima osmotskog stresa od $-0,2\text{MPa}$ trend opadanja dužine korena manje izražen nego u uslovima stresa od $-0,1\text{MPa}$ kod svih sorti, sa izuzetkom sorte Junior.

Kod svih sorti je 15. dana eksperimenta uočeno je značajno smanjenje dužine korena ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 19b). U kontrolnim uslovima prosečna vrednost dužine korena ponika se kretala od najmanje od 202 mm (Pionir) do najveće od 271,5 mm (Mraz) (prilog 3, tabela 2). Osmotski stres je i u ovom vremenskom periodu doveo do redukcije dužine korena koja se u uslovima osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ kretala u opsegu od 92 mm (Partner) do 240 mm (Mraz), odnosno 45,1% i 44,2% od vrednosti izmerenih u kontroli, dok su pri stresu od $-0,2\text{MPa}$ izmerene vrednosti bile od 62,98 mm (Dukat) do 156 mm (Trezor), što predstavlja 29,45% i 49,78% od vrednosti izmerenih u kontroli. Najveća promena dužine korena u uslovima stresa od $-0,1\text{MPa}$ i od $-0,2\text{MPa}$ u odnosu na kontrolne uslove je utvrđena kod sorte Javor ($-0,1\text{MPa}$ 63,32%, $-0,2\text{MPa}$ 74,3%), a najmanja kod sorte Trezor ($-0,1\text{MPa}$ 37,00%, $-0,2\text{MPa}$ 27,4%).

Dužina korena se kod svih sorti smanjuje sa povećanjem nivoa stresa sa $-0,1\text{MPa}$ na $-0,2\text{MPa}$, osim kod sorte Trezor kod koje je kao rezultat porasta brzine rasta (sa 9,03 mm/dan na 10,4 mm/dan) došlo do porasta dužine korena sa 135,48 mm ($-0,1\text{MPa}$) na 156,00 mm ($-0,2\text{MPa}$).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na dužinu korena ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 3b). Naknadne analize Tukey testom pokazale su da su se sve sorte međusobno značajno razlikovale na svim nivoima stresa, osim sorti Junior i Partner kod kojih ne postoji razlika u kontrolnoj grupi i Pionir i Junior pri $-0,2\text{MPa}$.

Analiza rezultata dobijenih u oba perioda izlaganja biljaka ispitivanim tretmanima je pokazala razlike između ispitivanih sorti. Rezultati merenja 10. i 15. dana pokazuju da se dužina korena ponika povećala kod svih sorti nakon 15 dana merenja. Brzina rastenja korena kod sorte Pionir konstantno se povećavala od $16,1\text{ mm/dnevno}$ (u periodu merenja od 10 dana u optimalnim uslovima) na $20,2\text{ mm/dnevno}$ (period merenja 15 dana). Nasuprot tome, u istim uslovima je kod sorte Mraz utvrđeno usporavanje rasta u periodu od 15 dana ($18,1\text{ mm/dnevno}$) u odnosu na period merenja od 10 dana ($21,2\text{ mm/dnevno}$). Ovi rezultati ukazuju i da duže vreme izlaganja istim stresnim uslovima može dovesti do adaptacije biljaka na osmotski stres povećanjem dužine korena. To se kod sorte Javor može objasniti, sa povećanjem brzine rasta korena u rastvoru $-0,1\text{MPa}$ sa $6,2\text{ mm/dan}$ (10 dana) na $6,43\text{ mm/dan}$ (15 dana). Slična promena je utvrđena i kod Pionira i Trezora, kod kojih se rast korena ubrzava pri najjačem delovanju stresa ($-0,2\text{MPa}$), nakon 15 dana, i to sa $7,70\text{ mm/dan}$ na $8,1\text{ mm/dan}$ (Pionir) i $10,35\text{ mm/dan}$ na $10,40\text{ mm/dan}$ (Trezor). Izuzetak je sorta Dukat kod koje se u $-0,2\text{MPa}$ uslovima dužina korena smanjuje sa $77,5\text{ mm}$ (10. dana tretmana) na $62,98\text{ mm}$ (15. dana tretmana). Ta promena je rezultat smanjenja brzine rasta korena od $7,75\text{ mm/dan}$ na $4,20\text{ mm/dan}$.

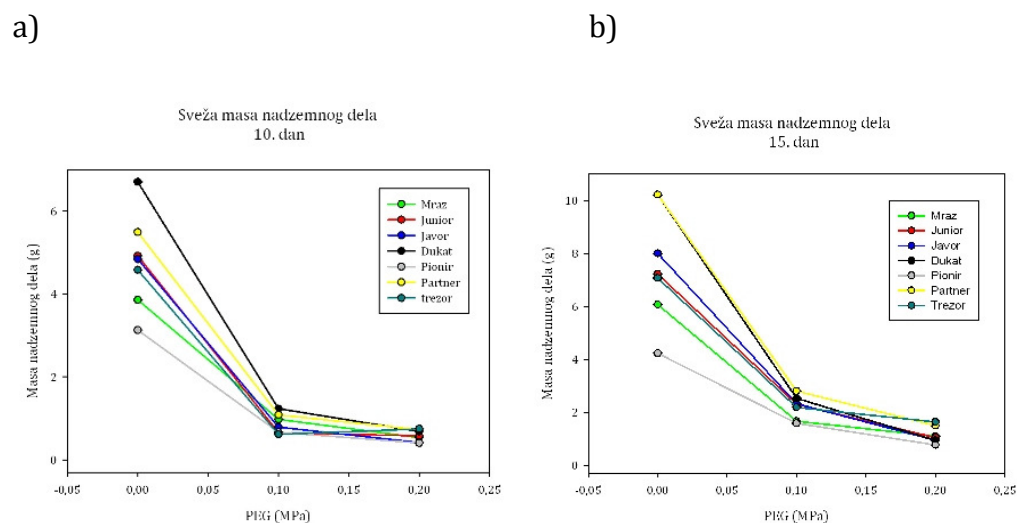
Prema tome, najmanja razlika u brzini rastenja korena izmerena između 10. i 15. dana bila je kod sorte Dukat i to u kontrolnim uslovima ($21,05$ i $21,90\text{ mm/dan}$) i u osmotskom tretmanu od $-0,1\text{MPa}$ ($8,85$ i $7,2\text{ mm/dan}$), dok je u uslovima od $-0,2\text{MPa}$ došlo do smanjenja brzine rasta ($7,75$ i $4,20\text{ mm/dan}$). Ti rezultati ukazuju da kod sorte Dukat vreme izlaganja biljaka različitom stepenu osmotskog stresa nema velikog uticaja na promenu osetljivosti sorte na osmotski

stres, osim pri najjačem osmotskom stresu gde se rast korena usporava. Nasuprot tome, najveća razlika u brzini rastenja je utvrđena kod sorte Pionir i ona je u kontroli iznosila 16,15 mm/dan (10. dana merenja) i 13,47 mm/dan (15. dana), u -0,1MPa (7,70 i 8,10 mm/dan) i u -0,2MPa (6,30 i 6,07 mm/dan). Takva promena brzine rastenja je dovela do toga i da je dužina korena, bila 15. dana veća u svim tretmanima (201 mm, 121,52 mm i 91 mm) u odnosu na merenja 10. dana (161,50 mm, 77,02 mm i 63,00 mm), što ukazuje da se kod ove sorte javlja značajno povećanje tolerantnosti na osmotski stres korena sa dužinom izlaganja biljaka njegovom delovanju.

Oba parametra, i dužina nadzemnog dela i dužina korena, kod većine sorti pokazuju povećane vrednosti nakon 15 dana testiranja u odnosu na kraće vreme izlaganja osmotskom stresu (10. dana) što ukazuje na povećanje tolerantnosti na osmotski stres sa dužinom izlaganja biljaka njegovom delovanju. Izuzetak je sorta Dukat sa smanjenjem dužine korena u -0,2MPa, nakon dužeg vremena izlaganja.

5.1.5. Uticaj osmotskog stresa na svežu masu nadzemnog dela ponika

Promene u svežoj masi nadzemnog dela ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su na slici 20.



Slika 20. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na svežu masu nadzemnog dela ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Prosečna vrednost sveže mase nadzemnog dela ponika 10. dana u kontroli se kretala između 3,1 g (Pionir) i 6,7 g (Dukat), u rastvoru PEG od -0,1MPa između 0,62 g (Trezor) i 1,24 g (Dukat) i u rastvoru -0,2MPa između 0,41 g (Pionir) i 0,75 g (Trezor) (Prilog 2, tabela 1).

Kod svih sorti je 10. dana eksperimenta uočeno smanjenje sveže mase nadzemnog dela ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 20a). Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje sveže mase u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri najnižem stepenu osmotskog stresa (-0,1MPa) kod svih sorti. Najveće smanjenje sveže mase nadzemnog dela ponika u odnosu na kontrolu javlja se kod sorte Trezor i iznosi 86,5%, a najmanje kod sorte Mraz 74,6%. Rezultati za -0,2MPa pokazuju da je najveće smanjenje utvrđeno kod sorte Javor i iznosi 91,6%, dok je kod sorte Trezor smanjenje bilo veoma slično (84%) onome u uslovima osmotskog stresa od -0,1MPa.

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su svežu masu nadzemnog dela ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 4a). Tukey test je pokazao da se pri stresu od -0,1MPa međusobno ne razlikuju sorte Pionir i Junior, a pri -0,2MPa Pionir i Javor.

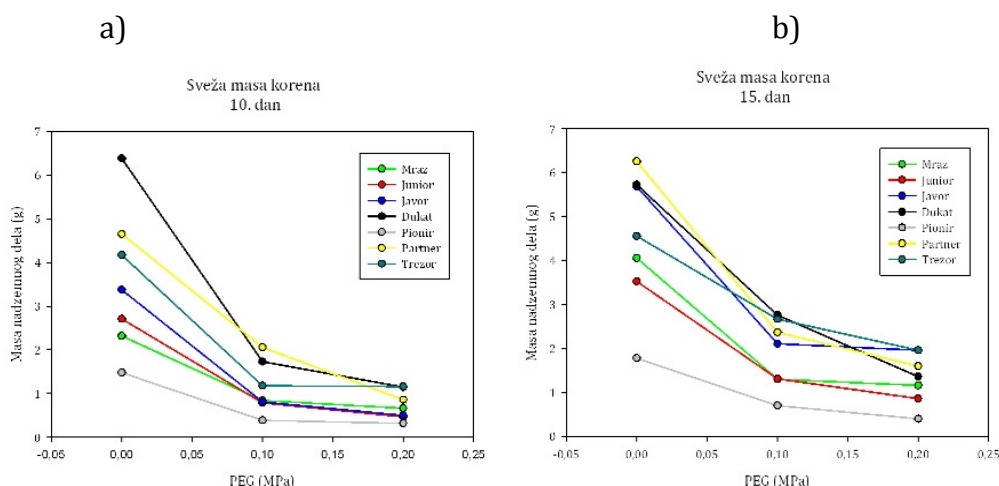
Prosečna vrednost sveže mase nadzemnog dela ponika 15. dana u kontroli se kretala između 4,23 g (Pionir) i 10,22 g (Dukat, Partner), u osmotskim uslovima od -0,1MPa između 1,58 g (Pionir) i 2,8 g (Partner), a pri većem stepenu osmotskog stresa (-0,2MPa) između 0,76 g (Pionir) i 1,63 g (Trezor) (Prilog 3, tabela 1).

Kod svih sorti je 15. dana eksperimenta uočeno smanjenje sveže mase nadzemnog dela ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 20b). Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje sveže mase u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri prvom stepenu stresa ($-0,1\text{MPa}$) kod svih sorti. Najveće smanjenje sveže mase nadzemnog dela ponika u odnosu na kontrolu javlja se kod sorte Dukat (75,3%), a najmanje kod sorte Pionir (62,6%). Rezultati za jači osmotski stres od $-0,2\text{MPa}$ su pokazali da je kod sorte Javor najveće smanjenje sveže mase nadzemnog dela (89%), a najmanje kod sorte Trezor (72%).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na svežu masu nadzemnog dela ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 4b). Naknadne analize Tukey testom pokazale su da su se sve sorte međusobno značajno razlikovale na svim nivoima stresa, osim sorti Partner i Dukat u kontrolnoj grupi i sorti Javor i Junior pri $-0,1\text{MPa}$.

5.1.6. Uticaj osmotskog stresa na svežu masu korena ponika

Promene u svežoj masi korena ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su na slici 21.



Slika 21. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na svežu masu korena ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Prosečna vrednost sveže mase korena ponika 10. dana u kontroli se kretala od 1,48 g (Pionir) do 6,38 g (Dukat). U rastvorima od -0,1MPa vrednosti sveže mase korena su bile od 0,39 g (Pionir) do 2,06 g (Partner), a u osmotikumu od -0,2MPa u opsegu od 0,32 g (Pionir) do 1,16 g (Trezor) (Prilog 2, tabela 1).

Kod svih sorti je 10. dana eksperimenta uočeno smanjenje sveže mase korena ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 20a). Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje sveže mase u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa) kod svih sorti. Najveće smanjenje sveže mase korena ponika u odnosu na kontrolu javlja se kod sorte Javor (76%), a najmanje kod sorte Partner (55,7%). Vrednosti za PEG od -0,2MPa su pokazale da je najveća promena opet utvrđena kod sorte Javor (86%), a najmanja kod sorte Trezor (72%).

Urađena je dvofaktorijalna analiza varijanse koja je pokazala značajan uticaj genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 5a). Tukey-ev test je pokazao da se

sve sorte međusobno značajno razlikuju, osim sorti Trezor i Dukat pri delovanju osmotskog stresa od -0,2MPa.

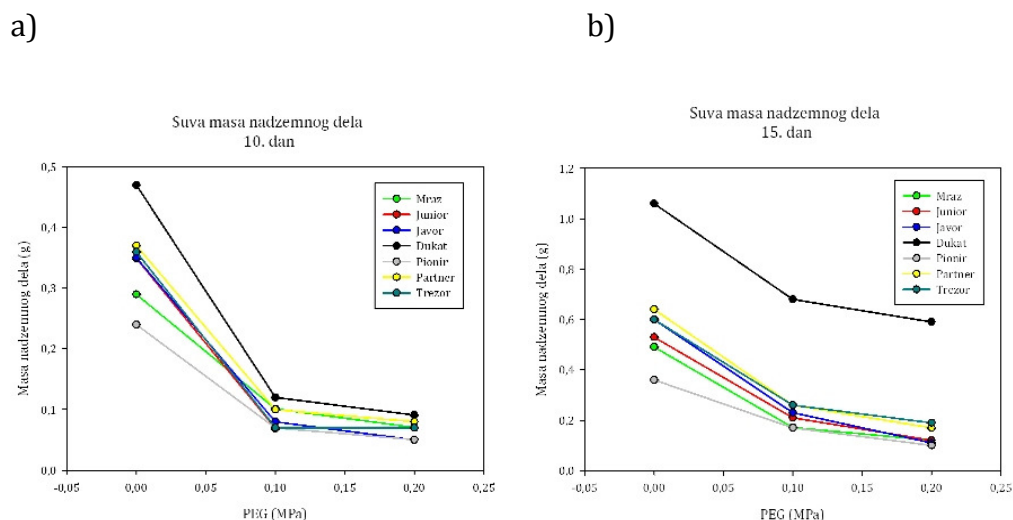
U kontroli 15. dana eksperimenta prosečna vrednost sveže mase korena ponika kretala se od 1,78 g (Pionir) do 6,26 g (Partner), dok su ove vrednosti u rastvoru -0,1MPa bile od 0,70 g (Pionir) do 2,76 g (Dukat), a u rastvoru -0,2MPa od 0,40 g (Pionir) do 1,96 g (Javor, Trezor) (prilog 3, tabela 1). Uočljivo je da je Pionir u svim grupama imao najnižu vrednost sveže mase korena.

U toku 15. dana eksperimenta nastavljen je trend smanjenja sveže mase korena u odnosu na kontrolnu grupu, u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 21b). Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje sveže mase u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa) kod svih sorti. Najveće smanjenje sveže mase korena ponika u odnosu na kontrolu 15. dana eksperimenta pri -0,1MPa javlja se kod sorte Mraz (68%), najmanje kod sorte Trezor (41,4%), a pri -0,2MPa najveće smanjenje je kod sorte Pionir (77,5%), a najmanje, kao i pri -0,1MPa, kod sorte Trezor (57%).

Urađena je dvofaktorijalna analiza varijanse koja je pokazala značajan uticaj genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 5b). Tukey-ev test je pokazao da su se sve sorte međusobno značajno razlikovale na svim nivoima stresa, osim sorti Trezor i Javor koje nisu pokazale značajne razlike u rastvoru PEG od -0,2MPa.

5.1.7. Uticaj osmotskog stresa na suhu masu nadzemnog dela ponika

Promene u suvoj masi nadzemnog dela ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su na slici 22.



Slika 22. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na suhu masu nadzemnog dela ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Prosečna vrednost suve mase nadzemnog dela ponika 10. dana u kontroli se kretala od 0,24 g (Pionir) do 0,47 g (Dukat). Sorte Junior, Pionir i Trezor su imale najmanju suhu masu nadzemnog dela u rastvoru -0,1MPa od 0,07 g dok je Dukat imao najveću od 0,12 g. Na -0,2MPa Javor i Pionir su imali najmanju suhu masu (0,05 g), a Dukat je imao 0,09 g (Prilog 2, tabela 1). Uočljivo je da je sorta Dukat imala najveću vrednost suve mase nadzemnog dela u svim ispitivanim grupama.

Uočeno je smanjenje suve mase nadzemnog dela ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 22a). Statistička značajnost smanjenja suve mase nadzemnog dela kod svih sorti već pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa) potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,001$). Smanjenje u odnosu na kontrolu je bilo najveće kod sorte Junior (80,6%), a najmanje kod sorte Mraz (65,1%), dok je pri jačem stresu (-0,2MPa) najveće smanjenje bilo kod sorte Javor (85,7%) i najmanje kod sorte Mraz (75,7%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala značajan uticaj genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 6a). Tukey-evim testom je naknadno utvrđeno

da kod sorti Junior i Trezor ne postoji značajna razlika pri tretmanu od -0,1MPa i -0,2MPa. Razlika u kontrolnoj grupi između sorti Javor i Junior takođe nije bila statistički značajna. U rastvoru PEG od -0,1MPa slično reaguju sorte Mraz, Partner, Trezor, Junior i Pionir, a u -0,2MPa sorte Mraz, Junior, Trezor, Pionir i Javor. Sorta Dukat je u svim ispitivanim grupama pokazala značajnu razliku u odnosu na ostale sorte.

U kontrolnoj grupi 15. dana eksperimenta prosečne vrednosti suve mase nadzemnog dela ponika su se kretale od 0,36 g (Pionir) do 1,06 g (Dukat). Pri -0,1MPa minimalna vrednost suve mase nadzemnog dela iznosila je 0,17 g (Mraz, Pionir), a maksimalna 0,68 g (Dukat). U rastvoru od -0,2MPa ove vrednosti su se kretale od 0,1 g (Pionir) do 0,59 g (Dukat) (Prilog 3, tabela 1). Kao i u slučaju 10. dana, sorta Dukat je imala najveću vrednost suve mase nadzemnog dela u svim ispitivanim grupama.

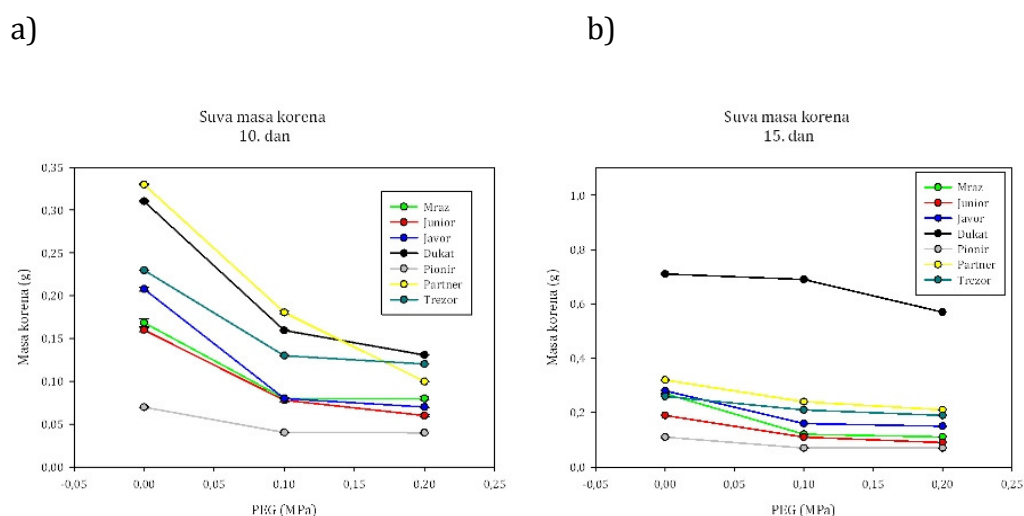
Uočeno je smanjenje suve mase nadzemnog dela ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 22b). Statistička značajnost smanjenja suve mase nadzemnog dela kod svih sorti već pri prvom nivou stresa (-0,1MPa) potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,001$). Smanjenje u odnosu na kontrolu je bilo najveće kod sorte Mraz (65,1%), a najmanje kod sorte Dukat (35,8%). Rezultati pri stresu od -0,2MPa pokazali su da je najveće smanjenje suve mase nadzemnog dela ponika bilo kod sorte Javor (81,7%), a najmanje kod sorte Dukat (44,3%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala značajan uticaj genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 6b). Naknadna analiza Tukey testom pokazala je da u kontrolnoj grupi sorte Javor i Trezor nisu pokazale značajnije razlike. U PEG rastvoru od -0,1MPa sorte Mraz i Pionir nisu pokazale značajne razlike, kao ni Partner i Trezor. Pionir i Junior su slično reagovala u rastvoru od -0,2MPa. Sorta Dukat je, kao i 10. dana eksperimenta, u svim ispitivanim grupama pokazala

značajnu razliku u suvoj masi u odnosu na ostale sorte, slično kao i pri merenju sveže mase) (Prilog 3, tabela 1).

5.1.8. Uticaj osmotskog stresa na suhu masu korena ponika

Promene u suvoj masi korena ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su na slici 23.



Slika 23. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na suhu masu korena ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Prosečna vrednost suve mase korena ponika 10. dana u kontroli se kretala od 0,07 g (Pionir) do 0,33 g (Partner), pri -0,1MPa od 0,04 g (Pionir) do 0,18 g (Partner), a u -0,2MPa rastvoru od 0,04 g (Pionir) do 0,13 g (Dukat) (Prilog 2, tabela 1).

Desetog dana eksperimenta je uočeno smanjenje suve mase korena ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 23a). Statistička značajnost smanjenja suve mase korena kod svih sorti već na prvom nivou stresa (-0,1MPa) potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,001$, Javor $p < 0,05$). Smanjenje u odnosu na kontrolu je bilo najveće kod sorte Javor

(61,6%), a najmanje kod sorte Trezor (43,5%). Pri stresu od -0,2MPa najveće smanjenje u odnosu na kontrolu bilo je kod sorte Partner (69,8%) dok je najmanje smanjenje bilo kod sorte Pionir (57%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala značajan uticaj genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 7a). Naknadna analiza je pokazala da su se u okviru tretmana sa rastvorom PEG od -0,1MPa grupisale sorte Mraz, Junior i Javor.

Petnaestog dana eksperimenta prosečna vrednost suve mase korena je bila između 0,11 g (Pionir) i 0,71 g (Dukat). U rastvoru PEG od -0,1MPa suva masa se kretala od 0,07 g (Pionir) do 0,69 g (Dukat), a u -0,2MPa rastvoru od 0,07 g (Pionir) do 0,70 g (Dukat) (Prilog 3, tabela 1).

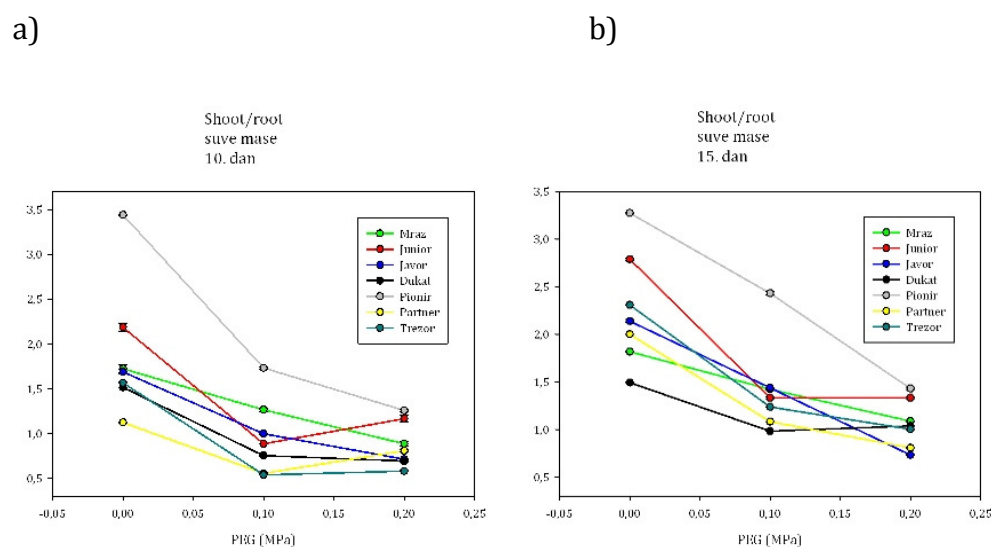
Uočeno je smanjenje suve mase korena ponika u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti. Primenom t-testa utvrđeno je da je smanjenje suve mase korena u odnosu na kontrolu bilo veoma statistički značajno ($p < 0,001$) već pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa) kod svih sorti. Najveće smanjenje u odnosu na kontrolu na oba nivoa stresa pokazala je sorta Mraz (-0,1MPa 55,4%; -0,2MPa 59%), dok je najmanje pokazala sorta Dukat (-0,1MPa 2,8%; -0,2MPa 19,7%). Na grafiku (slika 23b) se jasno uočava da je sorta Pionir imala najniže vrednosti suve mase korena na svim nivoima stresa, dok je Dukat imao značajno više vrednosti suve mase u odnosu na druge sorte.

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala značajan uticaj genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 7b).

Sorta Pionir je imala najniže vrednosti suve mase korena ponika u odnosu na ostale sorte i 10. i 15. dana eksperimenta (Prilog 2, tabela 1 i Prilog 3, tabela 1), što ukazuje na to da kod ove sorte dužina trajanja osmotskog stresa nema velikog uticaja na promenu suve mase.

5.1.9. Uticaj osmotskog stresa na odnos suve mase nadzemnog dela i korena

Promene u odnosu suve mase nadzemnog dela i korena ponika pod uticajem različitih nivoa osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su na slici 24.



Slika 24. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na odnos suve mase nadzemnog dela i korena ponika odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Desetog dana eksperimenta uočava se trend opadanja vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena, što ukazuje na manji efekat osmotskog stresa na koren u odnosu na nadzemni deo. Kod sorti Junior i Partner dolazi do porasta vrednosti u rastvoru PEG od -0,2MPa u odnosu na -0,1MPa (slika 23a). Vrednosti unutar kontrole su se kretale od 1,12 (Partner) do 3,44 (Pionir), u -0,1MPa rastvoru od 0,71 (Trezor) do 1,73 (Pionir), a u -0,2MPa rastvoru od 0,58 (Trezor) do 1,26 (Pionir) (Prilog 2, tabela 1). Pionir pokazuje najviše vrednosti u svim grupama što ukazuje na najmanji efekat ispitivanih tretmana na nadzemni deo ove sorte.

Statistička značajnost smanjenja odnosa suve mase nadzemnog dela i korena kod svih sorti pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa) potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,001$; Pionir $p < 0,05$).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da su na odnos suve mase nadzemnog dela i korena ponika značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 8a). Dalja analiza je pokazala da kod sorte Trezor, kao i kod sorte Dukat, ne postoji značajna razlika između tretmana u rastvorima PEG od -0,1MPa i -0,2MPa. Unutar kontrola ne postoji značajna razlika između sorti Mraz i Javor, pri -0,1MPa između sorti Partner i Trezor, a pri -0,2MPa između sorti Javor i Dukat.

Trend opadanja vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena nastavlja se i 15. dana eksperimenta. U kontroli su se vrednosti kretale od 1,49 (Dukat) do 3,27 (Pionir), pri -0,1MPa od 0,98 (Dukat) do 2,43 (Pionir) i pri -0,2MPa od 0,73 (Javor) do 1,43 (Pionir) (Slika 24b) (prilog 2, tabela 2).

Statistička značajnost smanjenja odnosa suve mase nadzemnog dela i korena kod svih sorti na prvom nivou stresa (-0,1MPa) potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,001$; Dukat, Trezor $p < 0,05$).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na odnos suve mase nadzemnog dela i korena ponika 15. dana značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 8b). U rastvoru od -0,1MPa nije postojala statistički značajna razlika kod sorti Javor i Mraz, a pri -0,2MPa između sorti Dukat i Trezor.

Poređenjem rezultata 10. i 15. dana eksperimenta (Prilog 2, tabela 1; Prilog 3 tabela 1) uočava se da je sorta Pionir imala manju vrednost odnosa suve mase nadzemnog dela i korena 15. dana (3,27) u odnosu na 10. dan (3,44) i ta razlika se pokazala kao statistički značajna ($p < 0,001$). Osim toga, sorta Pionir pokazuje najviše vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena ponika u svim ispitivanim grupama u odnosu na ostale sorte i 10. i 15. dan eksperimenta. Desetog

dana eksperimenta najmanju vrednost odnosa suve mase nadzemnog dela i korena u kontroli je imala sorta Partner, dok je na oba nivoa stresa najmanju vrednost imala sorta Trezor. Petnaestog dana je najmanju vrednost odnosa suve mase nadzemnog dela i korena u kontroli i pri prvom stepenu stresa imao Dukat, a pri osmotskom potencijalu od -0,1MPa Javor.

5.1.10. Indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa

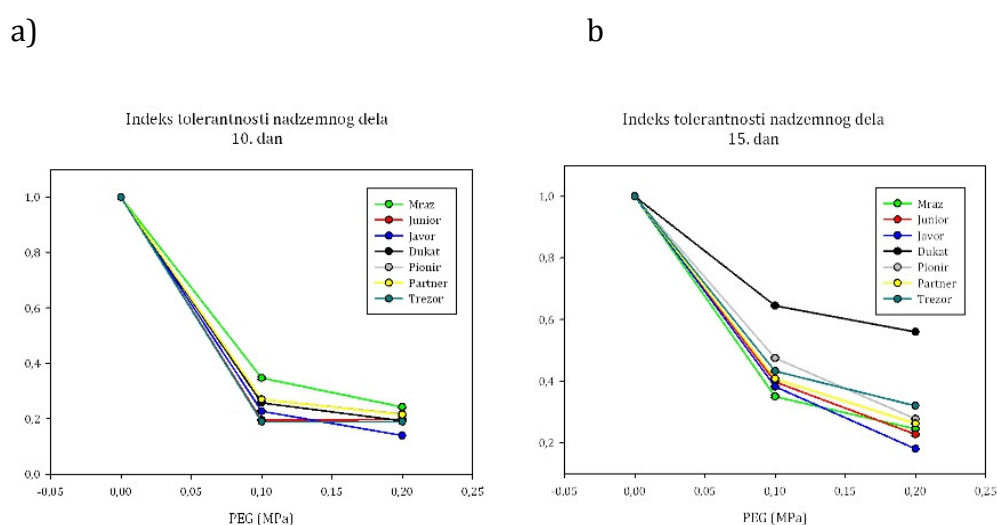
Vrednosti indeksa tolerantnosti nadzemnog dela ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su u tabeli 4 i na slici 24.

Tabela 4. Indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika i korena stočnog graška pri različitim nivoima osmotskog stresa.

Sorta	Tretman	IT nadzemnog dela		IT korena	
		10. dan	15. dan	10. dan	15. dan
Mraz	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,35*	0,35*	0,47*	0,44*
	PEG -0,2MPa	0,24*	0,24*	0,47*	0,41*
Junior	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,20*	0,40*	0,49*	0,60*
	PEG -0,2MPa	0,20*	0,23*	0,38*	0,47*
Javor	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,23*	0,38*	0,38*	0,57*
	PEG -0,2MPa	0,14*	0,18*	0,33*	0,54*
Dukat	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,26*	0,64*	0,52*	0,97*
	PEG -0,2MPa	0,19*	0,56*	0,42*	0,80*
Pionir	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,29*	0,48*	0,57*	0,64*
	PEG -0,2MPa	0,21*	0,28*	0,57*	0,64*
Partner	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,27*	0,54*	0,41*	0,75*
	PEG -0,2MPa	0,22*	0,30*	0,26*	0,66*
Trezor	Kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00
	PEG -0,1MPa	0,19*	0,56*	0,43*	0,81*
	PEG -0,2MPa	0,19*	0,52*	0,32*	0,73*

* - $p < 0,05$

Desetog dana eksperimenta uočava se trend opadanja vrednosti indeksa tolerantnosti nadzemnog dela ponika (slika 25a). Indeks tolerantnosti pri najnižem nivou osmotskog stresa iznosio je od 0,56 (Trezor) do 0,47 (Mráz). U uslovima stresa od -0,2MPa vrednosti indeksa tolerantnosti su bile između 0,14 (Javor) i 0,24 (Mráz) (tabela 4).



Slika 25. Indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa kod odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Statistička značajnost smanjenja indeksa tolerantnosti nadzemnog dela 10. dana kod svih sorti pri prvom nivou stresa (-0,1MPa) u odnosu na kontrolu potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,05$). Pri osmotskom stresu od -0,1MPa najveće smanjenje indeksa tolerantnosti nadzemnog dela je bilo kod sorte Trezor (81%), a najmanje kod sorte Mráz (65,2%). Rezultati za osmotski stres od -0,2MPa pokazali su da je najveće smanjenje indeksa tolerantnosti bilo kod sorte Javor (86%), dok je najmanje bilo kod sorte Mráz i iznosilo je 75,8%.

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika 10. dana značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman

($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 9a). Sorte Pionir i Partner, kao i Junior, Trezor i Javor su pokazale slične reakcije na svim nivoima stresa. Sorte Junior i Trezor nisu pokazale značajne razlike pri tretmanima od $-0,1\text{MPa}$ i $-0,2\text{MPa}$. Sorte Pionir i Partner nisu pokazale razlike pri $-0,1\text{MPa}$.

Indeks tolerantnosti nadzemnog dela je pokazao smanjenje i 15. dana eksperimenta, sa povećanjem nivoa stresa (slika 25b). Kretao se između 0,35 (Mraz) i 0,64 (Dukat) pri $-0,1\text{MPa}$, odnosno između 0,18 (Javor) i 0,56 (Dukat) pri $-0,2\text{MPa}$ (tabela 3).

Statistička značajnost smanjenja indeksa tolerantnosti nadzemnog dela 15. dana kod svih sorti pri $-0,1\text{MPa}$ u odnosu na kontrolu potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,05$). Najveće smanjenje indeksa tolerantnosti nadzemnog dela pri delovanju osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ bilo je kod sorte Mraz (65%), a najmanje kod sorte Dukat (35,5%). Pri stresu od $-0,2\text{MPa}$ najveće smanjenje je bilo kod sorte Javor (82%) i najmanje kod sorte Dukat (44%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika 15. dana značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 9b). Uočene su statistički značajne razlike među sortama u svim ispitivanim grupama.

Poređenjem indeksa tolerantnosti nadzemnog dela ponika 10. i 15. dela eksperimenta (tabela 4) uočava se da je indeks tolerantnosti nadzemnog dela kod svih sorti bio viši 15. dana eksperimenta. Sorte Mraz jedina nije pokazala značajne razlike u rastvorima $-0,1\text{MPa}$ i $-0,2\text{MPa}$. Sorte Junior i Javor su pokazale sličan trend promene indeksa tolerantnosti i kod njih se značajne razlike javljaju u $-0,1\text{MPa}$ ($p < 0,001$) i $-0,2\text{MPa}$ ($p < 0,05$) rastvorima. Sorte Dukat, Partner i Trezor pokazuju sličan trend: statistički značajno veći indeks tolerantnosti 15. dana u $-0,1\text{MPa}$ rastvoru ($p < 0,001$, Trezor $p < 0,05$) i u $-0,2\text{MPa}$ ($p < 0,05$, Partner $p < 0,001$).

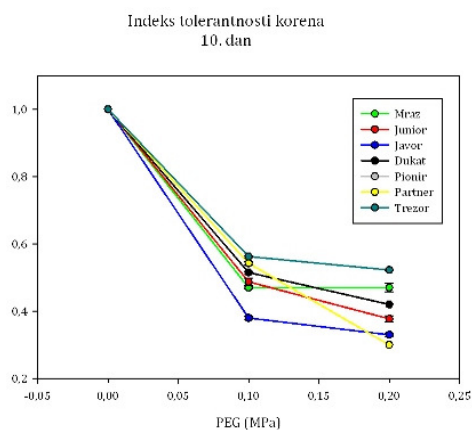
Jedino je sorta Pionir pokazala značajno veće vrednosti 15. dana eksperimenta na svim nivoima stresa ($p < 0,001$ -0,1MPa, $p < 0,05$ -0,2MPa).

Indeks tolerantnosti nadzemnog dela pokazao je trend smanjenja sa povećanjem nivoa stresa kod svih sorti i 10. i 15. dana eksperimenta što ukazuje na smanjenje tolerantnosti ispitivanih sorti na pojačano i produženo delovanje osmotskog stresa. Uočava se da je sorta Javor najmanje tolerantna na osmotski stres od -0,2MPa u oba ispitivana vremenska perioda. U rastvoru PEG od -0,2MPa 10. dana je najtolerantnija bila sorta Mraz, dok je 15. dana to bila sorta Dukat.

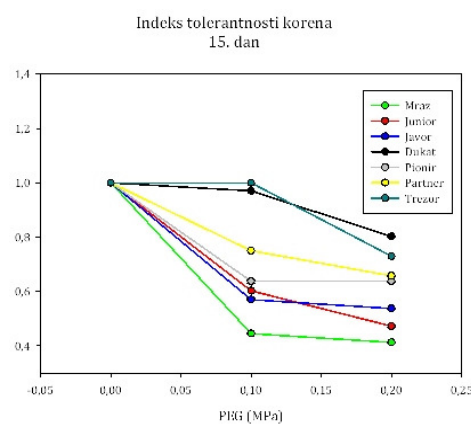
5.1.1. Indeks tolerantnosti korena ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa

Vrednosti indeksa tolerantnosti korena ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa 10. i 15. dana tretmana predstavljene su u tabeli 4 i na slici 26.

a)



b)



Slika 26. Indeks tolerantnosti korena ponika pri različitim nivoima osmotskog stresa kod odabranih genotipova stočnog graška: a) 10. dan eksperimenta, b) 15. dan eksperimenta.

Posle 10 dana eksperimenta uočava se trend opadanja vrednosti indeksa tolerantnosti korena ponika (slika 26a). U -0,1MPa rastvoru indeks tolerantnosti je bio između 0,38 (Javor) i 0,56 (Trezor), dok je pri osmotskom stresu bio od -0,2MPa između 0,30 (Partner) i 0,57 (Pionir) (tabela 3).

Statistička značajnost smanjenja indeksa tolerantnosti korena 10. dana kod svih sorti na prvom nivou stresa (-0,1MPa) u odnosu na kontrolu potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,05$). Najveće smanjenje indeksa tolerantnosti korena ponika pri delovanju osmotskog stresa od -0,1MPa bilo je kod sorte Javor (62%), a najmanje kod sorte Trezor (43,8%). Pri stresu od -0,2MPa najveće smanjenje je bilo kod sorti Pionir i Partner (70%) i najmanje kod sorte Trezor (47,8%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na indeks tolerantnosti korena ponika 10. dana značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 10a). U okviru sorti nije bilo značajnih razlika između sorti Mraz i Dukat, Junior, Pionir i Partner. Pri stresu od -0,1MPa sličnost su pokazale sorte Trezor, Partner i Pionir, kao i Junior i Mraz, dok su pri -0,2MPa slične bile sorte Pionir i Partner.

Trend opadanja indeksa tolerantnosti korena se javlja i 15. dana (slika 26b). Prosečne vrednosti indeksa tolerantnosti korena kretale su se od 0,44 (Mraz) do 0,97 (Dukat) na -0,1MPa i od 0,47 (Mraz) do 0,80 (Dukat) na -0,2MPa (Tabela 3).

Statistička značajnost smanjenja indeksa tolerantnosti korena 15. dana kod svih sorti pri -0,1MPa u odnosu na kontrolu potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,05$). Rezultati delovanja oba tretmana osmotskog stresa pokazala su da je najveće smanjenje indeksa tolerantnosti korena bilo kod sorte Mraz (-0,1MPa 55,5%; -0,2MPa 58,8%), dok je najmanje smanjenje bilo kod sorte Dukat (-0,1MPa 3%; -0,2MPa 19,75%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na indeks tolerantnosti korena ponika 15. značajan uticaj pokazali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$),

kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 10b). Pri svim nivoima stresa slično su reagovale sorte Javor i Junior. Pri tretmanima od $-0,1\text{MPa}$ i $-0,2\text{MPa}$ sve sorte su se značajno razlikovale, osim sorti Partner i Pionir pri $-0,2\text{MPa}$.

Poređenjem indeksa tolerantnosti korena ponika 10. i 15. dela eksperimenta (tabela 4), uočava se da je indeks tolerantnosti nadzemnog dela kod svih sorti bio viši 15. dana eksperimenta, osim kod sorte Mraz kod koje je u svim ispitivanim grupama bio niži ($p < 0,01$). Sorte Javor, Pionir, Partner i Trezor su pokazale sličan trend promene indeksa tolerantnosti sa statistički značajnim razlikama na svim nivoima stresa ($-0,1\text{MPa}$ $p < 0,001$, Partner $p < 0,05$; $-0,2\text{MPa}$ $p < 0,05$, Javor $p < 0,001$).

Indeks tolerantnosti korena ponika pokazao je trend smanjenja sa povećanjem nivoa stresa kod svih sorti i 10. i 15. dana eksperimenta što ukazuje na smanjenje tolerantnosti ispitivanih sorti na pojačano i produženo delovanje osmotskog stresa. Vrednosti indeksa tolerantnosti korena i 10. i 15. dana su bile veće u odnosu na indeks tolerantnosti nadzemnog dela kod svih sorti (tabela 4), što ukazuje na to da stresni uslovi imaju veći uticaj na nadzemni deo biljke nego na korenov sistem.

5.1.12. Uticaj različitih nivoa osmotskog stresa na sadržaj abscisinske kiseline u nadzemnim delovima ponika

Analiza sadržaja ABA u nadzemnim delovima ponika vršena je u kontroli, kao i kod ponika izloženih tretmanima osmotskog stresa izazvanih sa 2 različite koncentracije rastvora osmotikuma PEG 6000 (osmotskih potencijala $-0,1\text{MPa}$ i $-0,2\text{MPa}$). Merenja su vršena nakon 10 i 15 dana tretmana (tabela 5, slika 27).

Tabela 5. Vrednosti ABA (ng/g sveže mase) u nadzemnim delovima ponika pod uticajem tretmana osmotskog stresa.

Sorta	Tretman	Sadržaj ABA (ng/g FW)	
		10. dan	15. dan
Mraz	Kontrola	69,00 ± 3,8442	219,00 ± 5,1962
	PEG -0,1MPa	56,00* ± 2,0817	204,00 ± 2,6034
	PEG -0,2MPa	61,00 ± 1,2019	147,33** ± 7,5351
Junior	Kontrola	49,00 ± 0,8819	414,00 ± 8,6667
	PEG -0,1MPa	53,33* ± 0,8819	151,67*** ± 9,5975
	PEG -0,2MPa	63,67*** ± 0,3333	138,67*** ± 4,4096
Javor	Kontrola	25,00 ± 5,2068	46,00 ± 2,4037
	PEG -0,1MPa	34,00 ± 0,3333	134,33*** ± 3,8442
	PEG -0,2MPa	38,00 ± 1,4530	123,67*** ± 4,4096
Dukat	Kontrola	117,00 ± 3,5277	131,00 ± 2,3333
	PEG -0,1MPa	63,33*** ± 2,6034	74,33*** ± 1,4530
	PEG -0,2MPa	54,00*** ± 2,0817	66,33*** ± 1,3333
Pionir	Kontrola	168,00 ± 10,7290	255,00 ± 13,8604
	PEG -0,1MPa	158,00 ± 4,8419	239,00 ± 13,6910
	PEG -0,2MPa	198,00 ± 2,0276	217,00 ± 3,1798
Partner	Kontrola	50,00 ± 0,5774	68,00 ± 0,8819
	PEG -0,1MPa	57,67** ± 1,4530	43,00*** ± 1,5275
	PEG -0,2MPa	82,67*** ± 2,0276	34,67*** ± 0,8819
Trezor	Kontrola	111,00 ± 3,8442	180,00 ± 7,0000
	PEG -0,1MPa	93,00* ± 2,6458	114,67** ± 5,7831
	PEG -0,2MPa	61,67*** ± 1,7638	79,67*** ± 2,4037

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Prosečna vrednost sadržaja ABA 10. dana u kontroli se kretala od 25 ng/g sveže mase (Javor) do 168,00 ng/g sveže mase (Pionir). U rastvorima od -0,1MPa vrednosti ABA su bile od 34,00 ng/g sveže mase (Javor) do 158,00 ng/g sveže mase (Pionir), a u osmotikumu od -0,2MPa u opsegu od 38,00 ng/g sveže mase (Javor) do 198,00 ng/g sveže mase (Pionir) (tabela 5). Pri -0,1MPa je primenom t-testa utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu kod većine sorti (Dukat p<0,001; Partner p<0,01; Mraz, Junior, Trezor p<0,05), dok osmotski stres (-0,1MPa, -0,2MPa) kod sorti Javor i Pionir nije imao nikakvog uticaja na sadržaja ABA. Značajnu razliku u odnosu na kontrolu u rastvoru PEG 6000 potencijala -0,2MPa su pokazale sorte Junior, Dukat, Partner i Trezor (p<0,001), dok kod sorti Mraz, Javor i Pionir nije bilo značajnih razlika.

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na sadržaj ABA u nadzemnom delu ponika 10. dana značajan uticaj pokazali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 16a). Tukey testom je utvrđeno da su slične reakcije na svim nivoima stresa pokazale sorte Dukat i Trezor, kao i Partner i Junior. Pri prvom stepenu stresa (-0,1MPa) između sorti Dukat, Junior, Mraz i Partner nije bilo razlika, dok je pri -0,2MPa, takođe, nije bilo razlika između sorti Dukat, Junior i Mraz, ali i Trezor.

Prosečna vrednost sadržaja ABA 15. dana u kontroli se kretala od 46,00 ng/g sveže mase (Javor) do 414,00 ng/g sveže mase (Junior). U rastvorima od -0,1MPa vrednosti ABA su bile od 43,00 ng/g sveže mase (Partner) do 239,00 ng/g sveže mase (Pionir), a u osmotikumu od -0,2MPa u opsegu od 34,67 ng/g sveže mase (Partner) do 217,00 ng/g sveže mase (Pionir) (tabela 5). Pri -0,1MPa je primenom t-testa utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu kod većine sorti (Junior, Javor, Dukat, Partner $p < 0,001$; Trezor $p < 0,01$), dok kod sorti Mraz i Pionir nije bilo značajnih razlika. Pri -0,2MPa značajne razlike su pokazale sorte Junior, Javor, Dukat, Partner, Trezor ($p < 0,001$) i Mraz ($p < 0,01$), dok kod sorte Pionir nije bilo značajnih razlika.

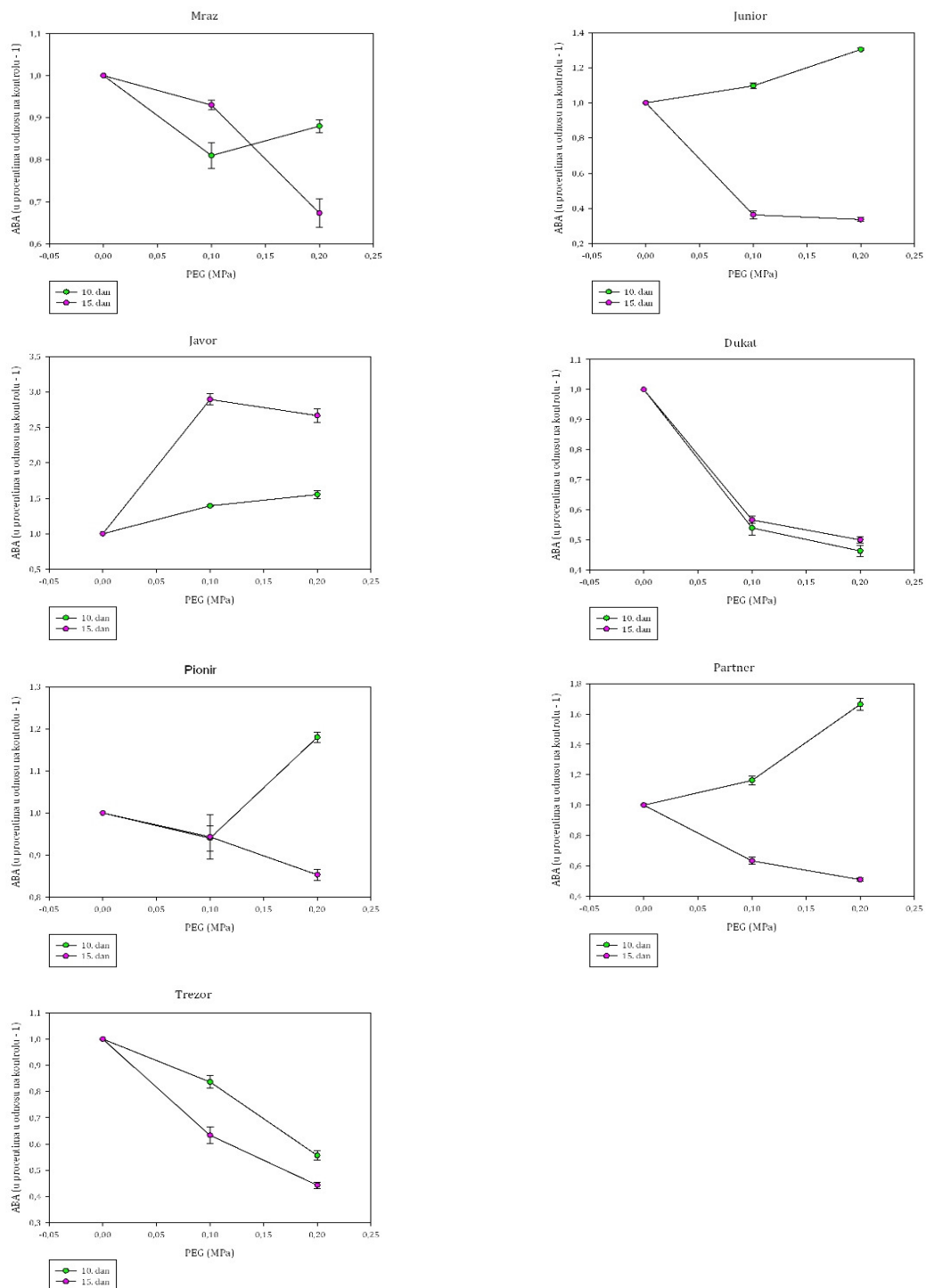
Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na sadržaj ABA u nadzemnom delu ponika 10. dana značajan uticaj pokazali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 16b). Naknadna analiza Tukey testom pokazala je sličnost među sortama Pionir i Junior i Javor i Dukat. U okviru kontrola nije bilo razlika između sorti Partner i Javor. Junior, Javor i Trezor su izdvojile od ostalih sorti pri -0,1MPa bez značajnijih razlika u okviru grupe. Pri najvišem nivou stresa od ostalih sorti se izdvojila sorta Pionir, kao i sorta Partner. Mraz, Junior i Javor čine jednu, a Trezor i Dukat drugu homogenu grupu.

Promene koncentracije ABA u poncima biljaka 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa, izražene u procentima u odnosu na kontrolu, predstavljene su

na grafikonima (slika 27). Ovi rezultati pokazuju da je koncentracija ABA kod većine ponika u uslovima osmotskog stresa pretrpela povećanje ili smanjenje koncentracije. Kod nekih sorti, kao što su Javor i Pionir, posle 10 dana ispitivanja nije došlo do statistički značajne razlike u sadržaju ABA između tretmana stresa i optimalnih uslova. Ta razlika u rastvoru od -0,1MPa je statistički značajna kod sorti Mraz i Trezor ($p < 0,05$) i došlo je do opadanja koncentracije ABA za 18,84% (Mraz), odnosno 16,22% (Trezor) u odnosu na kontrolu. Kod sorte Dukat je došlo do opadanja koncentracije za 45,87% u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$), a kod sorti Partner i Javor je došlo do porasta (Partner 16%, $p < 0,001$; Javor 39,33%, $p < 0,001$). Trend opadanja koncentracije ABA uočen je kod sorti Dukat i Trezor, dok je kod sorti Junior i Javor uočen trend porasta. Kod sorti Mraz i Pionir uočava se opadanje u rastvoru od -0,1MPa, a zatim porast u -0,2MPa.

Petnaestog dana tretmana uočava se trend opadanja koncentracije ABA, osim kod sorte Javor kod koje se javlja nagli porast pri -0,1MPa (189% u odnosu na kontrolu, $p < 0,001$), a zatim blago opadanje pri -0,2MPa. Opadanje koncentracije ABA u rastvoru PEG od -0,1MPa u odnosu na kontrolu je naročito izraženo kod sorte Junior i iznosi 64% u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

Upoređenjem vrednosti za 10. i 15. dan (tabela 5) uočeno je značajno opadanje koncentracije ABA 15. dana, osim kod sorte Javor kod koje se 15. dana javlja veća koncentracija ABA, kao i sorte Dukat, pri čemu kod sorte Dukat razlika između 10. i 15. dana nije bila statistički značajna. Sorta Mraz pokazuje povećanu akumulaciju ABA 15. dana pri -0,1MPa, a zatim sledi opadanje u odnosu na 10. dan. Sorta Pionir ne pokazuje statistički značajne razlike u sadržaju ABA 10. i 15. dana ispitivanja. Već sa grafikona (slika 27) se može uočiti da je kod sorti Junior, Partner i Trezor, kao i Javor veoma izražena razlika u sadržaju ABA 10. i 15. dana merenja u svim kontrolnim tačkama. Utvrđeno je da je kod sorte Pionir izmerena najveća koncentracije ABA pri svim nivoima stresa u odnosu na ostale sorte u oba vremenska perioda.



Slika 27. Sadržaj ABA u nadzemnim delovima ponika pojedinačnih sorti 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražen u odnosu na kontrolu (k=1).

5.1.13. Uticaj osmotskog stresa na antioksidativni status ponika u ogledu osmotskog stresa

U ovim istraživanjima su obavljena merenja aktivnosti sledećih antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutathion reduktaze. Merenja su vršena u nadzemnim delovima i korenu ponika u kontroli, kao i kod ponika izloženih tretmanu osmotskog stresa izazvanog sa rastvorom osmotikuma PEG 6000 osmotskog potencijala od -0,1MPa. Merenja su vršena nakon 10 i 15 dana tretmana.

5.1.13.1. Uticaj osmotskog stresa na aktivnost enzima superoksid dismutaze

Prosečne vrednosti aktivnosti superoksid dismutaze u nadzemnom delu ponika su predstavljene u tabeli 6. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 28.

Tabela 6. Aktivnost superoksid dismutaze u nadzemnom delu ponika genotipova stočnog graška.

Sorta	Superoksid dismutaza (SOD) (U/mg prot)			
	10. dan		15. dan	
	Kontrola	-0,1MPa	Kontrola	-0,1MPa
Mraz	5,90 ± 0,2254	10,90** ± 1,6879	8,15 ± 0,5087	6,10** ± 0,5144
Junior	10,90 ± 1,2832	6,40*** ± 0,6705	7,10 ± 0,2254	6,20** ± 0,3931
Javor	13,90 ± 1,3468	9,60*** ± 0,3642	9,50 ± 0,8786	8,20 ^{nz} ± 0,4566
Dukat	6,40 ± 1,1561	8,15 ^{nz} ± 0,7746	6,10 ± 0,3930	5,50 ^{nz} ± 0,2948
Pionir	8,50 ± 0,2832	10,80* ± 1,1445	6,20 ± 0,5260	5,80 ^{nz} ± 0,2428
Partner	7,60 ± 0,7514	12,30** ± 1,9364	9,05 ± 0,4740	7,80* ± 0,4335
Trezor	7,80 ± 0,8902	11,50*** ± 0,6936	6,80 ± 0,1040	10,40** ± 1,110

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz – nema značajnosti

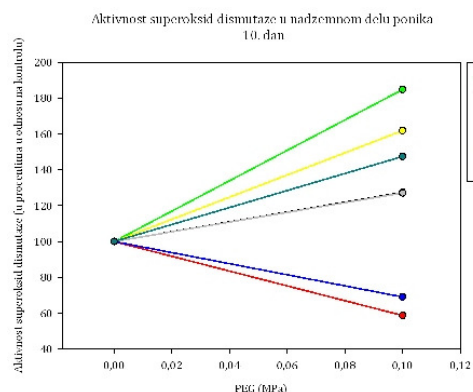
Prosečna vrednost aktivnosti SOD, izražena u U/mg proteina, merena u nadzemnom delu ponika 10. dana u kontroli se kretala između 5,90 (Mraz) i 13,90 (Javor), a vrednosti u tretiranoj grupi (-0,1MPa) su se kretale između 6,40 (Junior) i 12,30 (Partner) (tabela 6).

Rezultati su pokazali da je došlo je do povećanja aktivnosti SOD kod većine sorti, pri čemu je to povećanje bilo statistički značajno ($p < 0,001$) kod sorti Mraz, Partner i Trezor, dok kod sorti Dukat i Pionir nije bilo statistički značajno. Kod sorti Junior i Javor je došlo do značajnog smanjenja ($p < 0,001$) prosečnih vrednosti aktivnosti SOD u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana tretmana. U kontrolnoj grupi značajno veću aktivnost SOD u odnosu na ostale sorte je imala sorta Javor (13,90 U/mg prot) i ona se izdvojila od ostalih sorti. Između sorti Junior i Mraz postoji statistički značajna razlika (10,90 i 5,90 U/mg prot), dok su ostale sorte u kontroli pokazale slične vrednosti aktivnosti SOD. U tretiranoj grupi značajnu razliku je pokazala samo sorta Junior (6,40 U/mg prot) u odnosu na sortu Partner (12,30 U/mg prot), odnosno sortu Trezor (11,50 U/mg prot), dok ostale sorte nisu pokazale statistički značajne razlike.

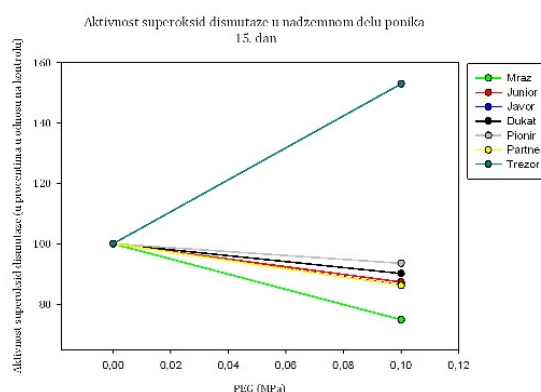
Promene u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 28a. Najveće povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu bilo je kod sorte Mraz i iznosilo je 184,74% u odnosu na kontrolu, a najveće smanjenje aktivnosti kod sorte Junior (58,72% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala značajan doprinos tretmana ($p < 0,05$), kao i visoko značajan doprinos interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$), dok genotip nije imao značajan uticaj na aktivnost SOD u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 18). Prema Tukey testu okviru kontrole se od svih sorti izdvojila samo sorta Javor, a sorta Junior je pokazala značajnu razliku jedino u odnosu na sortu Mraz. Pri -0,1MPa nije bilo razlika među sortama, osim između sorti Partner i Junior, kao i Trezor i Junior.

a)



b)



Slika 28. Aktivnost SOD u nadzemnom delu ponika genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Prosečna vrednost aktivnosti SOD, izražena u U/mg proteina, merena u nadzemnom delu ponika 15. dana u kontroli se kretala između 6,10 (Dukat) i 9,50 (Javor), dok su se vrednosti u tretiranoj grupi kretale između 5,50 (Dukat) i 10,40 (Trezor) (tabela 6).

Uočava se smanjenje aktivnosti SOD kod većine sorti, pri čemu je to smanjenje bilo statistički značajno kod sorti Mraz, Junior ($p<0,01$) i Partner ($p<0,05$), dok kod sorti Javor, Dukat i Pionir nije bilo značajnog smanjenja. Samo kod sorte Trezor se javilo povećanje aktivnosti SOD i ono je bilo statistički značajno ($p<0,01$). Sorte Dukat i Pionir su imale slične vrednosti aktivnosti SOD u kontroli (6,10 i 6,20 U/mg prot), kao i Trezor i Junior (6,80 i 7,10 U/mg prot), dok su ostale sorte pokazale značajne razlike u odnosu na navedene sorte. U tretiranoj grupi se sorta Trezor izdvojila od ostalih sorti i pokazala je najveću vrednost aktivnosti SOD (10,40 U/mg prot). Takođe, je i sorta Javor (8,20 U/mg prot) pokazala značajne razlike u odnosu na sorte Dukat i Pionir, koje su imale slične vrednosti (5,50 i 5,80 U/mg prot), dok u odnosu na sortu Partner (7,80 U/mg prot) nije pokazala značajne razlike.

Promene u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 28b. Najveće povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu bilo je kod sorte Trezor (152,94%), a najveće smanjenje kod sorte Mraz (74,85% od kontrolnih vrednosti).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i interakcije genotip i tretman ($p < 0,001$), dok uticaj tretmana nije imao velikog značaja na aktivnost SOD u nadzemnom delu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 18b). Naknadnom analizom je utvrđeno da se unutar kontrola jedino sorte Mraz i Partner ne razlikuju značajno, dok se pri $-0,1\text{MPa}$ jedino sorta Trezor značajno razlikuje od ostalih sorti.

Poređenjem vrednosti aktivnosti SOD u nadzemnom delu ponika u kontroli 15. dana u odnosu na 10. dan uočava se da je kod većine sorti došlo do smanjenja aktivnosti SOD, osim kod sorti Mraz i Partner, kod kojih je došlo do povećanja. Pri delovanju osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ sve sorte su pokazale smanjenje aktivnosti SOD u nadzemnom delu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (tabela 6).

Prosečne vrednosti aktivnosti superoksid dismutaze u korenu ponika su predstavljene u tabeli 7. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 29.

Tabela 7. Aktivnost superoksid dismutaze u korenu ponika genotipova stočnog graška.

Sorta	Superoksid dismutaza (SOD) (U/mg prot)			
	10. dan		15. dan	
	Kontrola	-0,1MPa	Kontrola	-0,1MPa
Mraz	6,95 ± 0,2254	9,25*** ± 0,5665	7,65 ± 0,2081	5,20*** ± 0,5954
Junior	9,95 ± 0,2254	11,80*** ± 0,3121	7,90 ± 0,3815	6,50** ± 0,3410
Javor	11,85 ± 0,6590	8,10*** ± 0,9075	7,00 ± 0,6474	5,60 ^{nz} ± 0,7977
Dukat	7,20 ± 0,5954	8,40 ^{nz} ± 0,8670	7,35 ± 0,3931	6,20** ± 0,2659
Pionir	7,15 ± 1,2023	12,10** ± 1,9942	6,90 ± 0,6353	7,10 ^{nz} ± 0,5087
Partner	6,50 ± 0,4220	9,20*** ± 0,3468	10,80 ± 0,3237	6,00*** ± 0,6532
Trezor	6,65 ± 0,7168	10,80*** ± 0,3757	7,00 ± 0,2601	9,70*** ± 0,8150

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz – nema značajnosti

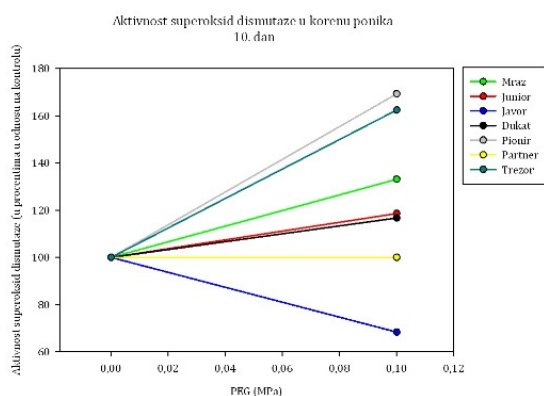
Prosečna vrednost aktivnosti SOD, izražena u U/mg proteina, merena u korenu ponika 10. dana u kontroli se kretala između 6,50 (Partner) i 11,85 (Javor), dok su se vrednosti u tretiranoj grupi kretale između 8,10 (Javor) i 12,10 (Pionir) (tabela 7).

Došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD kod većine sorti (p<0,001; Pionir p<0,01), dok kod sorte Dukat to povećanje nije pokazalo značajnost. Samo kod sorte Javor se javilo smanjenje aktivnosti i ono je bilo statistički značajno (p<0,001). U kontrolnoj grupi značajno veću aktivnost SOD u odnosu na ostale sorte je imala sorta Javor (11,85 U/mg prot), dok se kod ostalih sorti uočava slična aktivnost. U rastvoru PEG 6000 osmotskog potencijala od -0,1MPa značajno su se razlikovale samo sorte Pionir i Javor (12,10 i 8,10 U/mg prot).

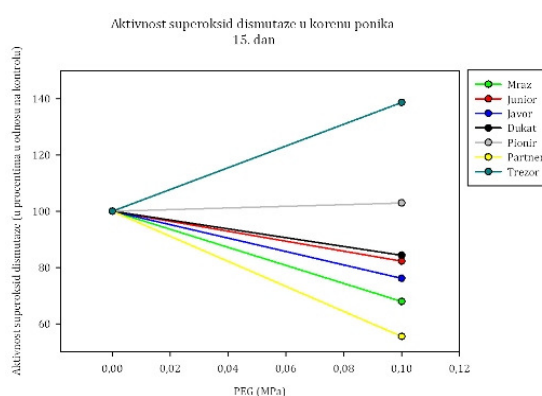
Promene u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu predstavljene su na alici 29a. Najveće povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu je bilo kod sorte

Pionir (169,23%), a najveće smanjenje aktivnosti enzima, koje je činilo 68,35% od kontrolnih vrednosti, se javilo kod sorte Javor.

a)



b)



Slika 29. Aktivnost SOD u korenu ponika genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos tretmana ($p<0,001$), kao i visoko značajan doprinos interakcije genotipa i tretmana ($p<0,001$), dok genotip nije imao značajan uticaj na aktivnost SOD u korenu ponika nakon 10 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 19a). Naknadna analiza je pokazala da se sorta Javor razlikovala od drugih sorti, osim od sorte Junior, u kontrolnoj grupi, dok je u tretiranoj grupi značajna razlika postojala samo između sorti Javor i Pionir.

Prosečna vrednost aktivnosti SOD, izražena u U/mg proteina, merena u korenu ponika 15. dana u kontroli se kretala između 6,90 (Pionir) i 10,80 (Partner), dok se u tretiranoj grupi kretala između 5,20 (Mraz) i 9,70 (Trezor) (tabela 7).

Došlo je do smanjenja aktivnosti SOD kod većine sorti, pri čemu je to povećanje bilo statistički značajno kod sorti Mraz, Junior, Partner ($p<0,001$) i Dukat ($p<0,01$), dok kod sorte Javor nije bilo statistički značajno. Kod sorti Pionir i Trezor sa javilo povećanje aktivnosti SOD u korenu ponika nakon 10 dana

tretmana, ali je to povećanje bilo značajno samo kod sorte Trezor ($p < 0,001$), dok kod sorte Pionir nije imalo značajnost. U kontroli se jedino sorta Partner izdvojila od ostalih sorti (10,80 U/mg prot), dok su ostale sorte pokazale sličnu aktivnost SOD koja se kretala oko 7,00 U/mg prot. U grupi koja je bila pod uticajem osmotskog stresa potencijala -0,1MPa sorta Trezor je pokazala značajno veću vrednost aktivnosti SOD (9,70 U/mg prot) od ostalih sorti koje su pokazale aktivnost od oko 6,00 U/mg prot.

Promene u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 29b. Najveće povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu se javilo kod sorte Trezor (138,57%), a najveće smanjenje aktivnosti kod sorte Partner (55,56% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđen je visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihove interakcije ($p < 0,001$) na aktivnost SOD u korenu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 19b). Tukey testom je utvrđeno da se u kontrolnoj grupi Partner razlikovao od drugih sorti, dok je u tretiranoj grupi to bio slučaj sa sortom Mraz.

Upoređenjem vrednosti aktivnosti SOD u korenu ponika 15. dana u odnosu na 10. dan (tabela 7) uočava se da je kod sorti Mraz, Dukat, Partner i Trezor došlo do povećanja aktivnosti, dok je kod sorti Junior, Javor i Pionir došlo do smanjenja aktivnosti u kontroli. U grupi biljaka izloženih delovanju osmotskog stresa uočeno je smanjenje aktivnosti SOD 15. dana u odnosu na 10. kod svih sorti.

5.1.13.2. Uticaj osmotskog stresa na aktivnost enzima askorbat peroksidaze

Dobijeni rezultati su pokazali da se ispitivane sorte značajno razlikuju u aktivnosti ispitivanog enzima i to kako u kontrolnim, tako i u uslovima osmotskog stresa. Prosečne vrednosti aktivnosti askorbat peroksidaze u nadzemnom delu

ponika su predstavljene u tabeli 8. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 30.

Tabela 8. Aktivnost askorbat peroksidaze u nadzemnom delu ponika genotipova stočnog graška.

Sorta	Askorbat peroksidaza (APx) (nmol/min/mg prot)			
	10. dan		15. dan	
	Kontrola	-0,1MPa	Kontrola	-0,1MPa
Mraz	32,00 ± 0,8960	263,00** ± 4,6243	70,60 ± 1,5260	7,10** ± 0,0765
Junior	231,70 ± 6,3006	28,70** ± 0,4624	45,60 ± 0,7968	15,56*** ± 1,4798
Javor	159,60 ± 7,4855	118,69** ± 0,1850	20,60 ± 2,8208	13,90* ± 1,4220
Dukat	37,49 ± 0,9306	50,00*** ± 1,4451	23,90 ± 1,4335	14,90*** ± 0,8324
Pionir	36,00 ± 1,1676	74,70** ± 0,2312	14,30 ± 1,4046	16,10nz ± 1,7919
Partner	27,54 ± 0,6359	61,79*** ± 0,9711	50,70 ± 1,5261	31,60*** ± 1,8844
Trezor	27,60 ± 0,7688	42,9** ± 0,7167	8,10 ± 0,7052	8,80nz ± 0,1040

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz - nema značajnosti

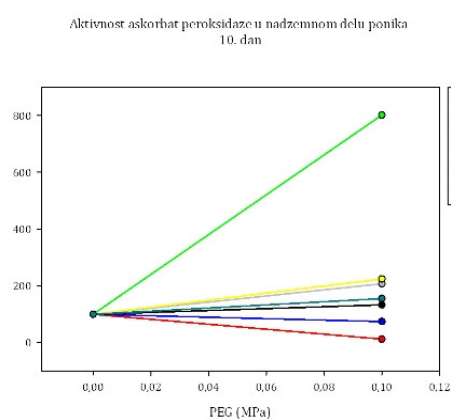
Prosečna vrednost aktivnosti APx, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u nadzemnom delu ponika 10. dana u kontroli se kretala između 27,54 (Partner) i 231,70 (Junior), a pri osmotskom stresu od -0,1MPa između 28,7 (Junior) i 263,00 (Mraz) (tabela 8).

Uočava se statistički značajno povećanje aktivnosti APx (Mraz, Pionir, Trezor p<0,01; Dukat, Partner p<0,001), osim kod sorti Junior i Javor, kod kojih je došlo do značajnog smanjenja aktivnosti (p<0,01). U kontrolnoj grupi značajno veću aktivnost APx u odnosu na ostale sorte su imale sorte Junior (231,70 nmol/min/mg prot) i Javor (159,60 nmol/min/mg prot), dok se kod ostalih sorti uočava slična aktivnost. Između sorti Dukat i Trezor nisu postojale značajne razlike

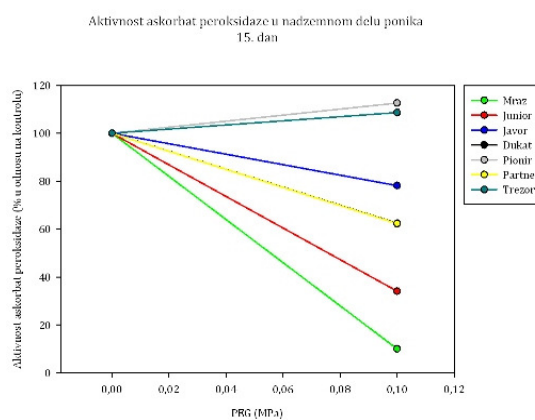
u aktivnosti APx pri delovanju osmotskog stresa (Dukat 50,00 nmol/min/mg prot, Trezor 42,90 nmol/min/mg prot).

Promene u aktivnosti APx u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 30a.

a)



b)



Slika 30. Aktivnost APx u nadzemnim delovima ponika genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Najizrazitija promena u odnosu na kontrolu izmerena je kod sorte Mraz (povećanje od 801,80%) i ona se izdvojila od ostalih sorti. Najveće smanjenje je izmereno kod sorte Junior (12,39%).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđen je visoko značajan doprinos genotipa ($p<0,001$) i tretmana ($p<0,001$), kao i njihove interakcije ($p<0,001$) na aktivnost APx u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 19a). Naknadni test je pokazao da se u kontrolnoj grupi međusobno ne razlikuju samo sorte Junior i Javor, dok je pri-0,1MPa prisutna statistički značajna razlika između svih sorti, osim Dukat i Trezor.

Prosečna vrednost aktivnosti APx, izražena nmol/min/mg proteina, merena u nadzemnom delu ponika 15. dana u kontroli se kretala između 8,10 (Trezor) i 70,60 (Mraz), a pri osmotskom stresu od -0,1MPa između 7,10 (Mraz) i 31,60 (Partner) (tabela 8).

Uočava se statistički značajno smanjenje aktivnosti APx kod svih sorti (Javor $p < 0,05$; Mraz $p < 0,01$; Junior, Dukat, Partner $p < 0,001$), osim kod sorti Pionir i Trezor kod kojih je došlo do povećanja aktivnosti, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. U kontrolnoj grupi jedino između sorti Dukat i Javor nije postojala značajna razlika u aktivnosti APx (Dukat 23,90 nmol/min/mg prot, Javor 20,60 nmol/min/mg prot). U tretiranoj grupi sorta Partner se izdvojila od ostalih sorti (31,60 nmol/min/mg prot), dok su se ostale sorte podelile u dve grupe : Mraz i Trezor (7,10 i 8,80 nmol/min/mg prot), i Junior, Javor, Dukat i Pionir kod kojih su se prosečne vrednosti aktivnosti APx kretale između 13,90 i 16,10 nmol/min/mg prot.

Promene u aktivnosti APx u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 30b. Najveće smanjenje aktivnosti APx u odnosu na kontrolu bilo je kod sorte Mraz (10,6% u odnosu na kontrolu), dok je najveće povećanje aktivnosti izmereno kod sorte Pionir (112,59% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđen je visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihove interakcije ($p < 0,001$) na aktivnost APx u nadzemnom delu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 19b). Utvrđeno je da se sorte Dukat i Pionir ne razlikuju značajno ni u kontroli ni pri tretmanu osmotskim stresom. Mraz i Trezor takođe nisu pokazali razlike u kontroli.

Uočava se značajno smanjenje aktivnosti APx u nadzemnom delu ponika u kontroli 15. dana u odnosu na 10. dan kod svih sorti ($p < 0,01$), osim kod sorti Mraz i Partner kod kojih je došlo do značajnog povećanja ($p < 0,01$), dok je u tretiranoj grupi došlo do smanjenja aktivnosti enzima kod svih sorti ($p < 0,001$) (tabela 8).

Prosečne vrednosti aktivnosti askorbat peroksidaze (APx) u korenu ponika su predstavljene u tabeli 9. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 31.

Tabela 9. Aktivnost askorbat peroksidaze u korenu ponika genotipova stočnog graška.

Sorta	Askorbat peroksidaza (APx) (nmol/min/mg prot)			
	10. dan		15. dan	
	Kontrola	-0,1MPa	Kontrola	-0,1MPa
Mraz	39,20 ± 1,5029	187,80*** ± 0,7514	63,40 ± 1,3757	36,00** ± 1,1792
Junior	75,00 ± 0,6358	91,80*** ± 2,0809	37,90 ± 0,3175	53,80** ± 1,7341
Javor	182,00 ± 0,8092	28,50*** ± 0,6358	70,00 ± 3,5896	13,90*** ± 1,6647
Dukat	13,16 ± 1,1792	39,20*** ± 1,5029	33,20 ± 1,9017	19,30** ± 2,1387
Pionir	48,60 ± 0,8266	35,80*** ± 1,0000	16,90 ± 0,7688	40,60** ± 0,6705
Partner	35,70 ± 1,3410	31,50* ± 1,5029	53,30 ± 1,6936	10,10*** ± 1,1156
Trezor	79,80 ± 0,8902	154,30*** ± 1,5838	302,50 ± 2,1561	535,70*** ± 4,5434

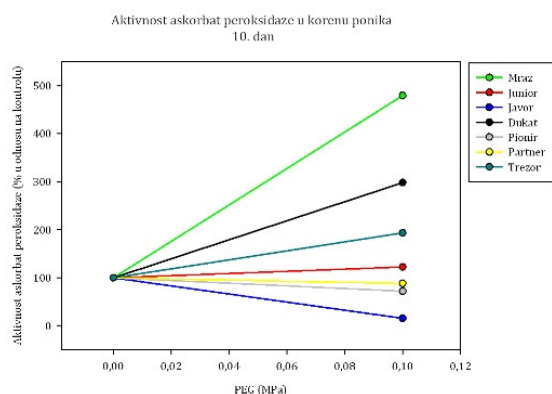
* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz – nema značajnosti

Prosečna vrednost aktivnosti APx, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u korenu ponika 10. dana u kontroli se kretala između 13,16 (Dukat) i 182,00 (Javor), a pri osmotskom stresu od -0,1MPa između 28,50 (Javor) i 187,80 (Mraz) (tabela 9).

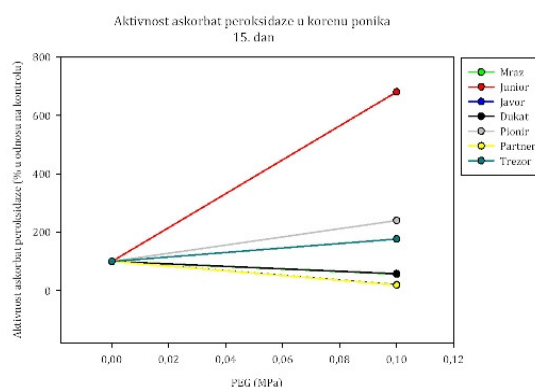
Uočava se statistički značajno povećanje aktivnosti APx kod sorti Mraz, Junior, Dukat i Trezor (p<0,001), odnosno statistički značajno smanjenje kod sorti Javor, Pionir (p<0,001) i Partner (p<0,05). U kontrolnoj grupi su postojale statistički značajne razlike među sortama (p<0,001), osim između sorti Mraz i Partner kod kojih nije bilo statistički značajnih razlika (Mraz 39,20 nmol/min/mg proteina, Partner 35,70 nmol/min/mg proteina). Značajno veću aktivnost APx u odnosu na ostale sorte je imala sorta Javor (182,00 nmol/min/mg proteina) i ona se izdvojila od ostalih sorti. U tretiranoj grupi sorte Dukat, Pionir, Partner i Javor su

imale slične vrednosti aktivnosti APx, dok su se sorte Mraz, Trezor i Junior značajno razlikovale kako međusobno tako i od ostalih sorti (187,80, 154,30 i 91, nmol/min/mg prot).

a)



b)



Slika 31. Aktivnost APx u korenu ponika genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražena u odnosu na kontrolu (k=100%).

Promene u aktivnosti APx u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 31a. Najveće povećanje aktivnosti APx u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorte Mraz (479,08%), dok je najveće smanjenje pokazala sorta Javor (15,66% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijskom analizom varijanse utvrđen je visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihove interakcije ($p < 0,001$) na aktivnost APx u korenu ponika nakon 10 dana delovanja tretmana (Prilog 5, 19a). Samo sorte Mraz i trezor su pokazale slične vrednosti u kontroli, a u rastvoru PEG 6000 od -0,1MPa slične su bile sorte Pionir, Partner, Dukat i Javor.

Prosečna vrednost aktivnosti APx, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u korenu ponika 15. dana u kontroli se kretala između 16,90 (Pionir) i 302,50 (Trezor), dok su se vrednosti u tretiranoj grupi (-0,1MPa) kretale od 10,10 (Partner) do 535,70 (Trezor) (tabela 9).

Pod uticajem osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ je došlo do statistički značajnog povećanja aktivnosti APx kod sorti Junior, Pionir ($p<0,01$), Partner i Trezor ($p<0,001$), odnosno smanjenja kod sorti Mraz, Dukat, Partner ($p<0,01$) i Javor ($p<0,001$). Sorta Trezor se izdvojila od ostalih sorti i u kontrolnoj i u tretiranoj grupi ($p<0,001$) sa najvišim prosečnim vrednostima aktivnosti APx. Postojala je značajna razlika između svih sorti u kontroli, dok pri delovanju osmotskog stresa sorte Dukat, Javor i Partner, odnosno Pionir i Mraz nisu pokazale značajne međusobne razlike u aktivnosti APx.

Promene u aktivnosti APx u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 31b. Najveća promena u odnosu na kontrolu bilo je povećanje aktivnosti APx od 681,01% kod sorte Junior, dok je najveće smanjenje aktivnosti bilo kod sorte Partner (18,95% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđen je visoko značajan doprinos genotipa ($p<0,001$) i tretmana ($p<0,001$), kao i njihove interakcije ($p<0,001$) na aktivnost APx u korenu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 20b). Pri $-0,1\text{MPa}$ značajno su se razlikovale od drugih sorti jedino sorte Trezor i Junior.

Uočava se značajno povećanje aktivnosti APx u korenu ponika u kontroli 15. dana u odnosu na 10. dan kod sorti Mraz, Dukat, Partner i Trezor, dok je kod sorti Junior, Javor i Pionir došlo do smanjenja aktivnosti enzima. U grupi izloženoj delovanju osmotskog stresa osmotskog potencijala od $-0,1\text{MPa}$ došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti APx kod većine sorti, osim kod sorti Pionir i Trezor kod kojih je došlo do značajnog povećanja aktivnosti enzima 15. dana u odnosu na 10. dan. Uočljivo je da je kod sorte Trezor došlo do značajnog povećanja aktivnosti APx u korenu 15. dana u odnosu na 10. dan i u kontroli i pri delovanju osmotskog stresa (tabela 9).

5.1.13.3. Uticaj osmotskog stresa na aktivnost enzima glutation reduktaze

Prosečne vrednosti aktivnosti glutation reduktaze u nadzemnom delu ponika su predstavljene u tabeli 10. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 32.

Tabela 10. Aktivnost glutation reduktaze u nadzemnom delu ponika genotipova stočnog graška.

Sorta	Glutation reduktaza (GR) (nmol/min/mg prot)			
	10. dan		15. dan	
	Kontrola	-0,1MPa	Kontrola	-0,1MPa
Mraz	14,00 ± 0,5144	78,10*** ± 1,0925	65,05 ± 1,5491	13,70*** ± 0,6012
Junior	43,74 ± 2,0173	12,90** ± 1,9133	38,28 ± 0,9653	20,80** ± 1,1503
Javor	50,16 ± 1,5491	29,60*** ± 1,0116	34,80 ± 1,4046	19,40** ± 1,1850
Dukat	22,70 ± 1,7457	42,80*** ± 1,4393	14,70 ± 0,6821	6,7*** ± 0,8670
Pionir	12,00 ± 0,7746	46,20*** ± 1,1792	30,50 ± 1,2543	15,30** ± 1,1561
Partner	20,30 ± 1,9884	22,25 ^{nz} ± 1,5607	44,70 ± 1,2428	18,70*** ± 0,6936
Trezor	29,70 ± 1,7572	33,80** ± 0,5434	10,40 ± 1,6647	25,20*** ± 0,4566

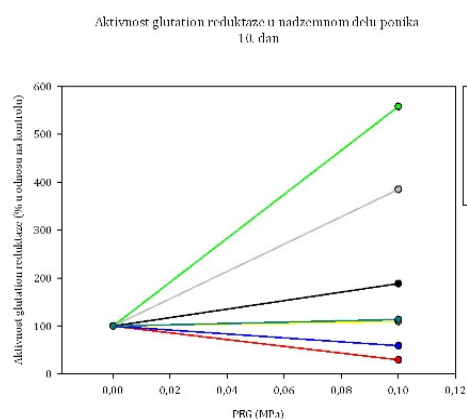
* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz - nema značajnosti

Prosečna vrednost aktivnosti GR, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u nadzemnom delu ponika 10. dana u kontroli se kretala između 12,00 (Pionir) i 50,16 (Javor), a vrednosti u tretiranoj grupi (-0,1MPa) su se kretale između 12,90 (Junior) i 78,10 Mraz (tabela 10).

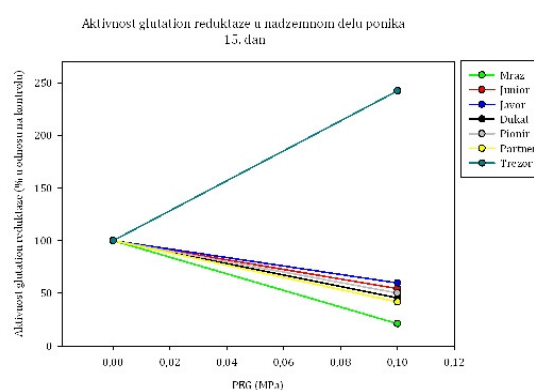
Kod većine sorti (Mraz, Dukat, Pionir p<0,001; Trezor p<0,01) je došlo do povećanja aktivnosti GR pod uticajem osmotskog stresa od -0,1MPa, ali to povećanje nije bilo statistički značajno kod sorte Partner. Kod sorti Junior (p<0,01) i Javor (p<0,001) je došlo do smanjenja aktivnosti GR. Nije postojala statistički značajna razlika u kontroli između sorti Dukat i Partner, odnosno Mraz i Pionir. U tretiranoj grupi se od svih sorti izdvojila sorta Mraz sa najvećom prosečnom

vrednosti aktivnosti GR (78,10 nmol/min/mg prot), dok nije bilo značajnih razlika između sorti Trezor i Javor (33,80 i 29,60 nmol/min/mg prot), odnosno Pionir i Dukat (46,20 i 42,80 nmol/min/mg prot).

a)



b)



Slika 32. Aktivnost GR u nadzemnom delu ponika genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Promene u aktivnosti GR u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 32a. Najveća promena u odnosu na kontrolu bilo je povećanje aktivnosti GR kod sorte Mraz (557,86%), dok je najveće smanjenje od 29,49% u odnos na kontrolu uočeno kod sorte Junior.

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p<0,001$) i tretmana ($p<0,001$), kao i njihove interakcije ($p<0,001$) na aktivnost GR u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 22a). Dukat i Partner, kao i Mraz i Pionir su imali sličnu aktivnost GR u nadzemnom delu ponika u kontroli, dok su pri -0,1MPa slične vrednosti imali Trezor i Javor i Pionir i Dukat. Kod ostalih sorti su razlike statistički značajne.

Prosečna vrednost aktivnosti GR, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u nadzemnom delu ponika 15. dana u kontroli se kretala između 10,40

(Trezor) i 65,05 (Mraz), a u tretiranoj grupi (-0,1MPa) između 6,7 (Dukat) i 25,20 (Trezor) (tabela 10).

Uočava se smanjenje aktivnosti GR kod većine sorti (Mraz, Dukat, Partner $p < 0,001$; Junior, Javor, Pionir $p < 0,01$), osim kod sorte Trezor kod koje se javlja statistički značajno povećanje aktivnosti ($p < 0,001$). Postojale su značajne razlike između kontrola svih ispitivanih sorti stočnog graška. U grupi izloženoj delovanju osmotskog stresa od drugih sorti su se izdvojile sorta Trezor, sa najvećom prosečnom aktivnosti GR od 25,20 nmol/min/mg prot, i sorta sa najmanjom aktivnosti enzima od 6,7 nmol/min/mg prot. Sorte Junior, Javor i Partner (20,80, 19,40 i 18,70 nmol/min/mg prot), kao i Pionir i Mraz (15,30 i 13,70 nmol/min/mg prot) nisu pokazale značajne razlike u aktivnosti GR nakon 10 dana u rastvoru PEG 6000 od -0,1MPa.

Promene u aktivnosti GR u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 32b. Najveća promena u odnosu na kontrolu bilo je povećanje aktivnosti kod sorte Trezor od 242,31% u odnosu na kontrolu, dok je najveće smanjenje od 21,60% bilo kod sorte Mraz.

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihove interakcije ($p < 0,001$) na aktivnost GR u nadzemnom delu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 22b). Dalja analiza je pokazala statistički značajnu razliku pri osmotskom stresu sorte Dukat u odnosu na ostale sorte.

Uočava se značajno smanjenje aktivnosti GR u nadzemnom delu ponika u kontroli 15. dana u odnosu na 10. dan kod sorti Junior, Javor, Dukat i Trezor, dok je kod sorti Mraz, Pionir i Partner došlo do povećanja aktivnosti enzima. U tretiranoj grupi je došlo do značajnog smanjenja aktivnosti GR kod svih sorti, osim kod sorte Trezor kod koje je aktivnost značajno povećana (tabela 10).

Prosečne vrednosti aktivnosti glutation reduktaze u korenu ponika su predstavljene u tabeli 11. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 33.

Tabela 11. Aktivnost glutation reduktaze u korenu ponika genotipova stočnog graška.

Sorta	Glutation reduktaza (GR) (nmol/min/mg prot)			
	10. dan		15. dan	
	Kontrola	-0,1MPa	Kontrola	-0,1MPa
Mraz	45,60 ± 1,5087	93,75*** ± 1,2023	53,55 ± 2,0636	16,20*** ± 1,0347
Junior	23,20 ± 1,4509	44,40*** ± 0,9017	10,20 ± 1,9826	21,97*** ± 0,9510
Javor	94,2 ± 0,8266	32,40** ± 0,9075	52,3 ± 0,9133	47,00** ± 0,9017
Dukat	17,40 ± 0,1040	17,60 ^{nz} ± 0,3642	42,55 ± 1,5376	31,10*** ± 2,2659
Pionir	17,30 ± 0,9711	18,07 ^{nz} ± 1,7284	18,50 ± 0,6127	10,00** ± 0,5780
Partner	62,00 ± 0,8439	37,10*** ± 1,4046	51,40 ± 0,6127	18,54** ± 0,6416
Trezor	49,00 ± 1,6416	66,25*** ± 0,7746	32,80 ± 0,5549	34,90 ^{nz} ± 1,9248

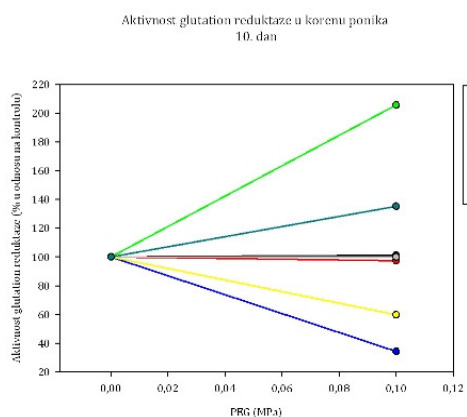
* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz – nema značajnosti

Prosečna vrednost aktivnosti GR, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u korenu ponika 10. dana u kontroli se kretala između 17,30 (Pionir) i 94,2 (Javor), a pri osmotskom stresu od -0,1MPa se kretala između 17,60 (Dukat) i 93,75 (Mraz).

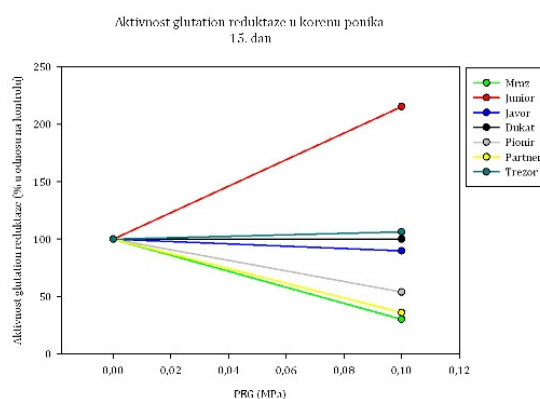
Došlo je do povećanja aktivnosti GR kod većine sorti, pri čemu je to povećanje bilo statistički značajno (p<0,001) kod sorti Mraz, Junior i Trezor, dok kod sorti Dukat i Pionir nije bilo statistički značajno. Kod sorti Javor i Partner je došlo do značajnog smanjenja (p<0,001) prosečnih vrednosti aktivnosti GR u korenu ponika nakon 10 dana tretmana. Sorte Dukat i Pionir su pokazale slične vrednosti i u kontrolnoj i u tretiranoj grupi (Kontrola Dukat 17,40, Pionir 17,30 nmol/min/mg prot; -0,1MPa Dukat 17,60, Pionir 18,07 nmol/min/mg prot) dok su ostale sorte bile značajno različite u obe ispitivane grupe.

Promene u aktivnosti GR u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 33a. Najveća promena u odnosu na kontrolu bilo je povećanje aktivnosti kod sorte Mraz (205,59% u odnosu na kontrolu), a najveće smanjenje aktivnosti od 34,39% u odnosu na kontrolu bilo je kod sorte Javor.

a)



b)



Slika 33. Aktivnost GR u korenu ponika genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana osmotskog stresa izražena u odnosu na kontrolu (k=100%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i interakcije genotip i tretman ($p < 0,001$), dok uticaj tretmana nije imao velikog značaja na aktivnost GR u korenu ponika nakon 10 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 23a). Trezor i Mraz, kao i Dukat i Pionir su pokazali sličnu aktivnost GR u kontrolnoj grupi, dok su pri delovanju stresa samo Pionir i Dukat imali sličnu reakciju dok su sve ostale sorte reagovale značajno različito.

Prosečna vrednost aktivnosti GR, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u korenu ponika 15. dana u kontroli se kretala između 10,20 (Junior) i 53,55 (Mraz), a u tretiranoj grupi (-0,1MPa) između 10,00 (Pionir) i 47 (Javor).

Uočava se statistički značajno smanjenje smanjenje aktivnosti kod većine sorti: Mraz, Dukat ($p < 0,001$), Javor, Pionir, Partner ($p < 0,01$). Kod sorti Junior i

Trezor je došlo do povećanja aktivnosti GR pri čemu je to povećanje bilo značajno samo kod sorte Junior ($p < 0,001$), dok kod sorte Trezor nije imalo značaja. U kontrolnoj grupi nije bilo značajnih razlika između sorti Mraz, Partner i Javor (prosečne vredosti aktivnosti GR oko 50 nmol/min/mg prot). U rastvoru PEG 6000 osmotskog potencijala od -0,1MPa nisu pokazale značajne razlike sorte Junior, Partner i Mraz (prosečne vredosti aktivnosti GR oko nmol/min/mg prot), odnosno Dukat i Trezor (prosečne vredosti aktivnosti GR oko nmol/min/mg prot). Od ostalih sorti su se izdvojile sorta Pionir, sa najmanjim vrednostima od 10,00 nmol/min/mg prot, i sorta Javor, sa najvećim prosečnim vrednostima GR u korenu ponika 15. dana ispitivanja – 34,90 nmol/min/mg prot.

Promene u aktivnosti GR u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 33b. Najveće povećanje u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorte Junior (215,39%), a najveće smanjenje je pokazala sorta Mraz (30,25% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihove interakcije ($p < 0,001$) na aktivnost GR u korenu ponika nakon 15 dana delovanja tretmana (Prilog 5, tabela 23b). Tukey test je pokazao da su se sorte Mraz, Javor i Partner izdvojile od ostalih sorti između njih nije bilo značajnih razlika u kontrolnoj grupi. Pri delovanju osmotskog stresa su se pored ostalih, izdvojile dve homogene grupe unutar kojih nije bilo značajnih razlika: Trezor i Dukat, i Junior, Partner i Mraz.

Upoređenjem vrednosti aktivnosti GR u korenu ponika 15. dana u odnosu na 10. dan uočava se da je kod sorti Junior, Javor, Partner i Trezor došlo do smanjenja aktivnosti, dok je kod sorti Mraz, Dukat i Pionir došlo do povećanja aktivnosti u kontroli. Kod biljaka izloženih delovanju osmotskog stresa kod većine sorti (Mraz, Junior, Pionir, Partner i Trezor) je došlo do smanjenja aktivnosti, dok je kod sorti Javor i Dukat došlo do povećanja aktivnosti GR. Uočljivo je da je kod sorte Dukat došlo do značajnog povećanja aktivnosti GR u korenu 15. dana u odnosu na 10. dan i u kontroli i pri delovanju osmotskog stresa (tabela 11).

5.1.14 Ekspresija gena pod uticajem osmotskog stresa

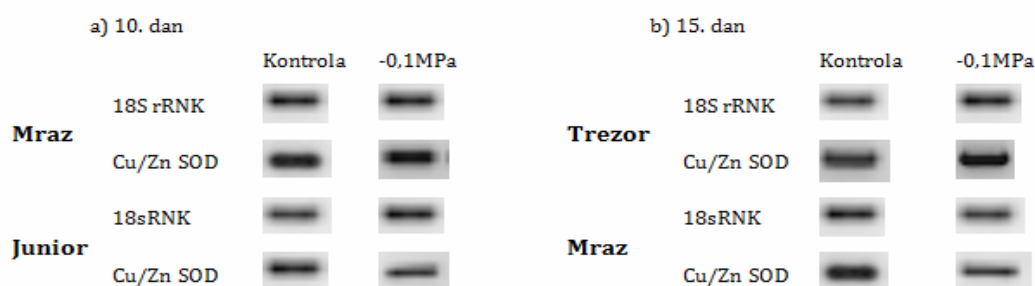
U okviru molekularnih istraživanja uticaja osmotskog stresa praćena je ekspresija gena koji kodiraju 3 antioksidativna enzima (Cu/ZnSOD, cAPx i GR), kao i 3 gena (*PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3*), koji kodiraju enzim aldehid oksidazu (učestvuje u poslednjem koraku biosinteze ABA od ABA - aldehida).

5.1.14.1. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za antioksidativne enzime

Analiza ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime je vršena kod genotipova stočnog graška, kod kojih su uočene najveće promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na kontrolu. Promene u ekspresiji gena su analizirane u nadzemnim delovima i korenu ponika u kontroli, kao i kod ponika izloženih tretmanu osmotskog stresa izazvanog sa rastvorom osmotikuma PEG 6000 osmotskog potencijala -0,1MPa i to nakon 10 i 15 dana tretmana. *Arabidopsis* 18S rRNK gen je korišćen kao referentni gen.

5.1.14.1.1. Ekspresija gena za enzim superoksid dismutazu

Izmene u nivoima ekspresije transkripta Cu/ZnSOD u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 34.

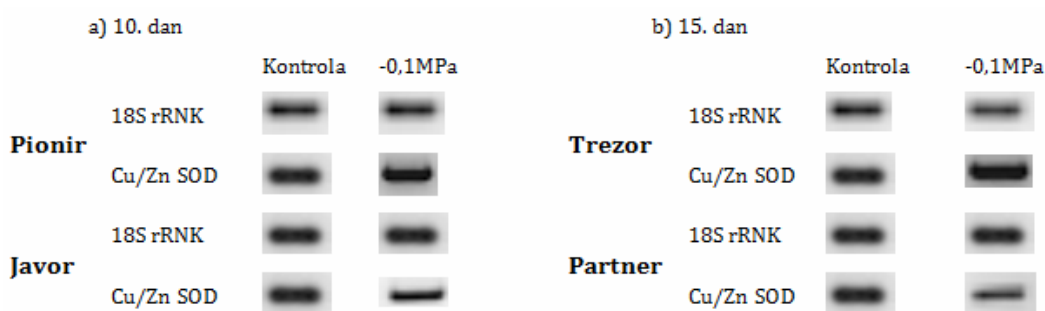


Slika 34. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za Cu/ZnSOD u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

Najveće povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu u nadzemnom delu ponika, 10. dana eksperimenta, pri delovanju osmotskog stresa, izmereno kod sorte Mraz (184,74% u odnosu na kontrolu) (slika 28a), verovatno je nastalo kao posledica pojačane ekspresije gena za SOD, prvenstveno Cu/ZnSOD (slika 34a). Kod sorte Junior je došlo do smanjenja ekspresije gena (slika 34a), što je za posledicu imalo smanjenje aktivnosti SOD u nadzemnom delu ponika (58,72% u odnosu na kontrolu) (slika 28a).

Delovanje osmotskog stresa osmotskog potencijala od -0,1MPa, nakon 15 dana, je dovelo do maksimalno pojačane ekspresije gena kod sorte Trezor (slika 34b), kod koje je i došlo do povećanja aktivnosti ispitivanog enzima od 152,94% (slika 28b), odnosno do smanjenja ekspresije gena kod sorte Mraz (slika 34b), pri čemu je i aktivnost SOD kod ove sorte smanjena na 74,85% od kontrolnih vrednosti (slika 28b).

Izmene u nivoima ekspresije transkripta Cu/ZnSOD u korenu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 35.



Slika 35. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za Cu/ZnSOD u korenu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

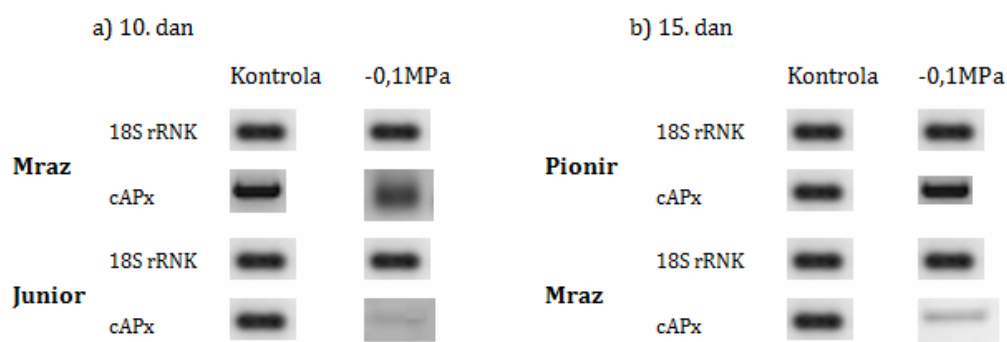
Osmotski stres je 10. dana tretmana doveo do pojačane ekspresije gena za Cu/ZnSOD u korenu ponika kod sorte Pionir (slika 35a), kod koje je uočena i

najveća aktivnost SOD u odnosu na kontrolu (slika 29a). Najveće smanjenje aktivnosti enzima, koje je činilo 68,35% od kontrolnih vrednosti, se javilo kod sorte Javor (slika 29a), a uočena je i smanjena ekspresija gena za Cu/ZnSOD (slika 35a).

Nakon 15 dana delovanja osmotskog stresa najveće povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu se javilo kod sorte Trezor (138,57%), a najveće smanjenje aktivnosti kod sorte Partner (55,56% u odnosu na kontrolu) (slika 29b), što je posledica promena u ekspresiji gena pod uticajem stresa (slika 35).

5.1.14.1.2. Ekspresija gena za enzim askorbat peroksidazu

Izmene u nivoima ekspresije transkripta cAPx u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 36.

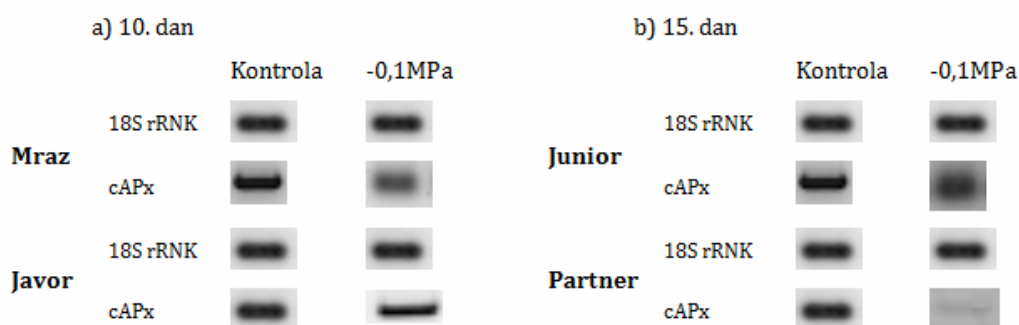


Slika 36. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za cAPx u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

Ekspresija gena za cAPx se, nakon 10 dana u nadzemnom delu ponika, višestruko pojačala kod sorte Mraz, a smanjila kod sorte Junior (slika 36a), što je rezultovalo izrazitim povećanjem aktivnosti APX kod sorte Mraz (801,80%), odnosno smanjenjem kod sorte Junior (12,39%) (slika 30a).

Za razliku od 10. dana, 15. dana delovanja osmotskog stresa je dovelo do smanjene ekspresije gena za cAPx kod sorte Mraz (slika 36b), odnosno smanjene aktivnosti enzima od samo 10,6% u odnosu na kontrolu (slika 30b). Kod sorte Pionir je uočena neznatno pojačana ekspresija gena za cAPx (slika 36b), koja je dovela do povećanja aktivnosti ovog enzima (112,59% u odnosu na kontrolu) (slika 30b).

Izmene u nivoima ekspresije transkripta cAPx u korenu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 37.



Slika 37. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za cAPx u korenu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

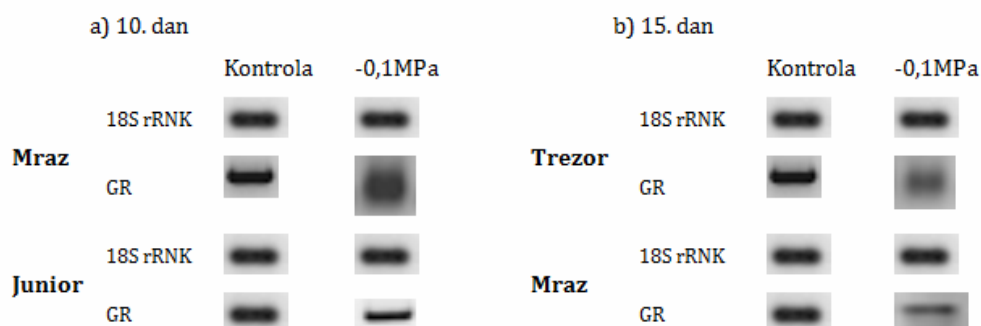
Nakon 10 dana tretmana u korenu ponika kod sorte Mraz je uočljivo je višestruko povećanje ekspresije gena za cAPx kod ponika izloženih osmotskom stresu, dok je kod sorte Javor došlo do smanjenja ekspresije gena (slika 37a). Kao posledica promene u ekspresiji gena najveće povećanje aktivnosti cAPx u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorte Mraz (479,08%), dok je najveće smanjenje pokazala sorta Javor (15,66% u odnosu na kontrolu) (slika 31a).

Delovanje osmotskog stresa osmotskog potencijala od -0,1MPa dovelo je do maksimalno pojačane ekspresije gena kod sorte Junior (slika 37b), kao i povećanja aktivnosti APx od 681,01% u odnosu na kontrolu (slika 31b). Najveće smanjenje

aktivnosti APx, koje je činilo 18,95% u odnosu na kontrolu izmereno je kod sorte Partner i verovatno je posledica smanjenja ekspresije cAPx u korenu ponika ispitivane sorte nakon 15 dana delovanja tretmana (slika 37b).

5.1.14.1.3. Ekspresija gena za enzim glutation reduktazu

Izmene u nivoima ekspresije transkripta GR u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 38.



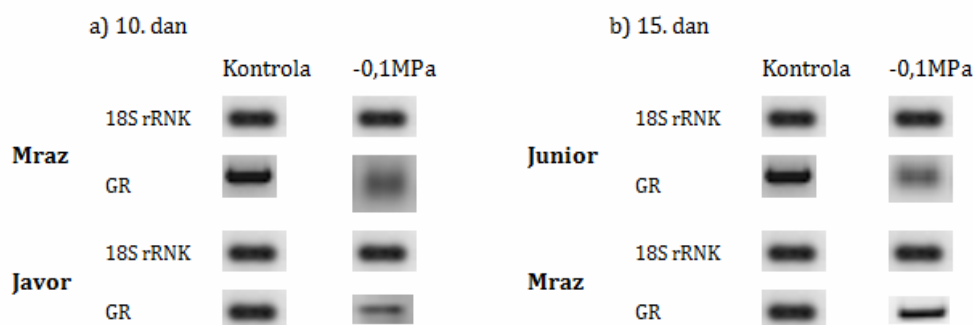
Slika 38. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za GR u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

10. dana tretmana osmotski stres je doveo do povećanja aktivnosti GR u nadzemnom delu ponika kod sorte Mraz (557,86%) (slika 32a), što je potvrđeno i analizom ekspresije gena koji kodira GR, a koja je pokazala primetno veću ekspresiju gena kod sorte Mraz u odnosu na kontrolu (slika 38a). Kod sorte Junior je došlo do smanjenja ekspresije gena (slika 38a), odnosno smanjenja od 29,49% u odnosu na kontrolu (slika 32a).

Nakon 15 dana tretmana, u odnosu na 10. dan, ekspresija gena za GR u nadzemnom delu ponika se pojačava kod sorte Trezor (slika 38b) i dovodi do

povećanja aktivnosti enzima od 242,31%, dok se kod sorte Mraz ekspresija gena smanjuje, kao i aktivnost enzima (21,60% u odnosu na kontrolu) (slika 32b).

Izmene u nivoima ekspresije transkripta GR u korenu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 39.



Slika 39. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena za GR u korenu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

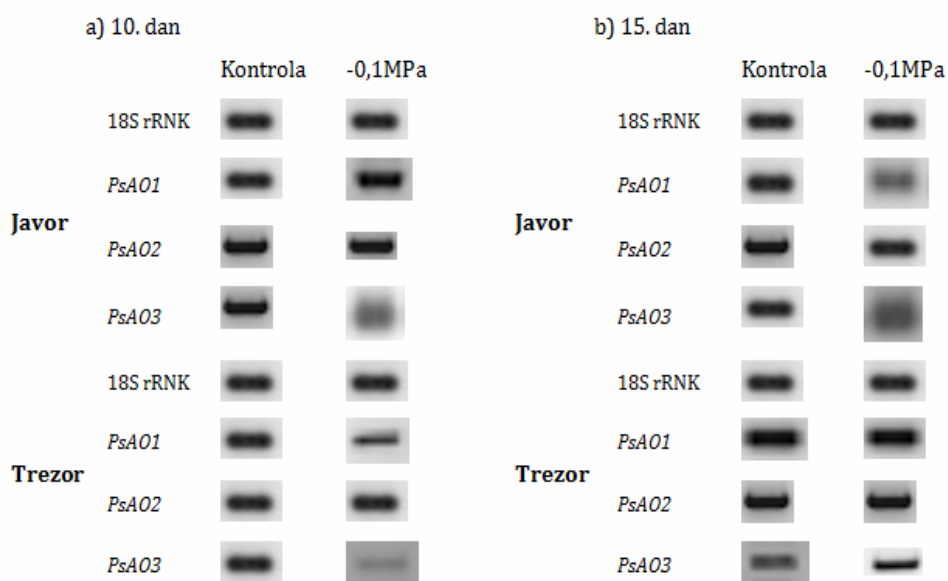
Ekspresija gena za GR se, nakon 10 dana u korenu ponika, višestruko pojačala kod sorte Mraz (slika 39a) i dovela do povećanja aktivnosti ispitivanog enzima (205,59% u odnosu na kontrolu) (slika 33a), a smanjila kod sorte Javor (slika 39a), kod koje je i aktivnost enzima smanjena na 34,39% u odnosu na kontrolu (slika 33a).

Petnaestog dana tretmana kod sorte Junior uočena pojačana, a kod sorte Mraz smanjena ekspresija gena (slika 39b). Promena u ekspresiji gena pod uticajem stresa dovela je i do povećanja aktivnosti GR od 215,39% kod sorte Junior, odnosno do smanjenja od 30,25% u odnosu na kontrolu kod sorte Mraz (slika 33b).

5.1.14.2. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena koji učestvuju u sintezi abscisinske kiseline

Analiza ekspresije 3 gena: *PsA01*, *PsA02* i *PsA03* je vršena kod odabranih genotipova stočnog graška, kod kojih je došlo do povećanja (Javor), odnosno smanjenja (Trezor) sadržaja ABA u odnosu na kontrolu pod uticajem osmotskog stresa. Promene u ekspresiji gena su analizirane u nadzemnim delovima ponika u kontroli, kao i kod ponika izloženih tretmanu osmotskog stresa izazvanog sa rastvorom osmotikuma PEG 6000 osmotskog potencijala -0,1MPa i to nakon 10 i 15 dana tretmana. *Arabidopsis* 18S rRNK gen je korišćen kao referentni gen.

Izmene u nivoima ekspresije transkripta tri gena za AO u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem osmotskog stresa predstavljene su na slici 40.



Slika 40. Uticaj osmotskog stresa na ekspresiju gena *PsA01*, *PsA02* i *PsA03* u nadzemnom delu ponika odabranih genotipova stočnog graška 10. i 15. dana tretmana.

Kod sorte Javor, nakon 10 i nakon 15 dana delovanja osmotskog stresa potencijala $-0,1\text{MPa}$, uočena je pojačana ekspresija gena *PsA01* i *PsA03*, dok je ekspresija gena *PsA02* bila slična ekspresiji u kontrolnoj grupi (slika 40). 10. dana delovanja stresa se kod ove sorte sadržaj ABA povećao u odnosu na kontrolu za 36% (sa 25 ng/g na 34 ng/g), dok se 15. dana povećao za 192% (sa 46 ng/g na 143,3 ng/g) (tabela 5), a što je verovatno posledica pojačane ekspresije *PsA01* i naročito *PsA03*. Kod sorte Trezor je ekspresija gena *PsA02* kod biljaka pod uticajem stresa, bila nešto niža od ekspresije gena u kontrolnoj grupi. Ekspresija *PsA01* i *PsA03* je kod ove sorte bila smanjena u oba vremenska perioda ispitivanja, pod uticajem osmotskog stresa (slika 40), a što je verovatno dovelo do smanjene akumulacije ABA u nadzemnom delu ponika ove sorte i 10. i 15. dana eksperimenta (sa 111 ng/g na 93 ng/g, odnosno 83,78% od kontrole; sa 180 ng/g na 114,67 ng/g, odnosno 56,97% od kontrole) (tabela 5).

Uočava se da pod uticajem osmotskog stresa ekspresija gena *PsA02* nije pokazala značajnije razlike u odnosu na kontrolu, dok se ekspresija gena *PsA01* i *PsA03* povećavala kod sorte kod koje je došlo do akumulacije ABA, odnosno smanjivala kod sorte kod koje je došlo do smanjene akumulacije ABA. Prema tome, može se pretpostaviti da u sintezi ABA u nadzemnom delu ponika, pod uticajem osmotskog stresa, veću ulogu imaju geni *PsA01* i *PsA03* u odnosu na *PsA02*.

5.2. Suša

Ispitivanja uticaja suše na biljke stočnog graška su obavljena tako što su za zalivanje biljaka primenjena tri različita tretmana i to:

1. Optimalno navodnjavanje (36% vlažnost supstrata);
2. Tretman suše od 18% vlažnosti supstrata (T1) i
3. Tretman suše od 9% vlažnosti supstrata (T2).

Efekti primenjenih tretmana na različite genotipove su ispitivani na osnovu praćenja:

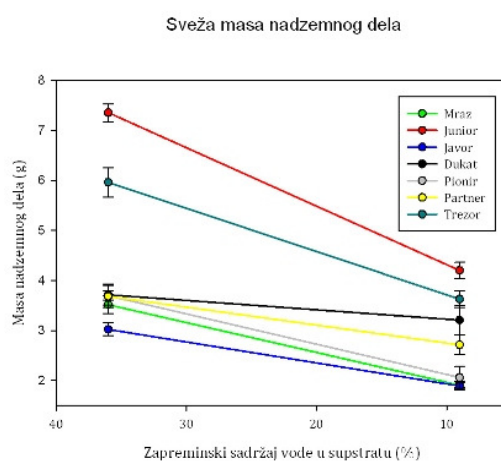
1. **Fizioloških pokazatelja** (biomase nadzemnog dela i korena i odnos suve mase nadzemnog dela i korena, provodljivosti stominih ćelija);

2. **Biohemijskih pokazatelja** (akumulacije hormona abscisinske kiseline, aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutation reduktaze)

3. **Analize ekspresije gena** (geni za antioksidativne enzime: Cu/Zn SOD, cAPx i GR i geni za aldehid oksidazu (*PsA01*, *PsA02* i *PsA03*), koja učestvuje u biosintezi abscisinske kiseline).

5.2.1 Uticaj suše na svežu masu nadzemnog dela biljaka

Uticaj suše na svežu masu nadzemnog dela biljaka ispitivan je pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata i predstavljen je na slici 34.



Slika 34. Sveža masa nadzemnog dela biljaka stočnog graška pod uticajem suše od 9% vlažnosti supstrata.

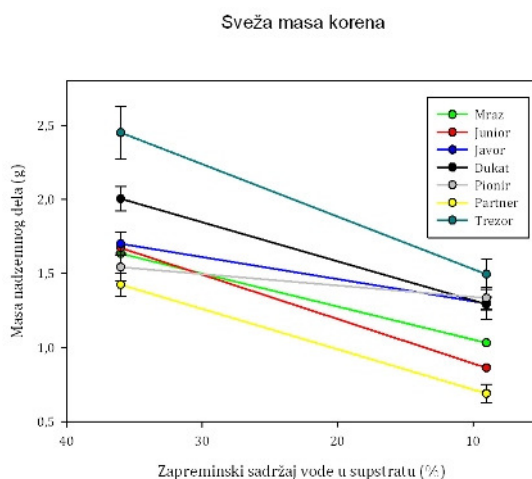
Najniže vrednosti i u kontrolnoj grupi i kod biljaka izloženih suši utvrđene su kod sorte Javor (kontrola 3,02 g, tretman 1,89 g), dok su najviše vrednosti utvrđene kod sorte Junior (kontrola 7,35 g, tretman 4,2 0g) (Prilog 4, tabela 1).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na svežu masu nadzemnog dela biljaka značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 11a). Nije bilo značajnih razlika između sorti u kontrolnoj grupi i tretiranoj grupi. Izdvojila se jedino sorta Junior (kontrola $p < 0,001$; tretman $p < 0,01$).

Takođe se uočava smanjenje vrednosti sveže mase nadzemnog dela pod uticajem suše kod svih sorti i t-testom je utvrđena statistička značajnost smanjenja ovih vrednosti ($p < 0,001$), osim kod sorte Dukat kod koje tretman suše nije uticao na smanjenje biomase (Prilog 4, tabela 1). Najveća promena sveže mase je utvrđena kod sorte Mraz kod koje je došlo do značajne redukcije sveže mase (smanjenje za 46 % od kontrolnih vrednosti).

5.2.2. Uticaj suše na svežu masu korena biljaka

Uticaj suše na svežu masu korena ispitivan je pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata i predstavljen je na slici 35.



Slika 35. Sveža masa korena biljaka stočnog graška pod uticajem suše od 9% vlažnosti supstrata.

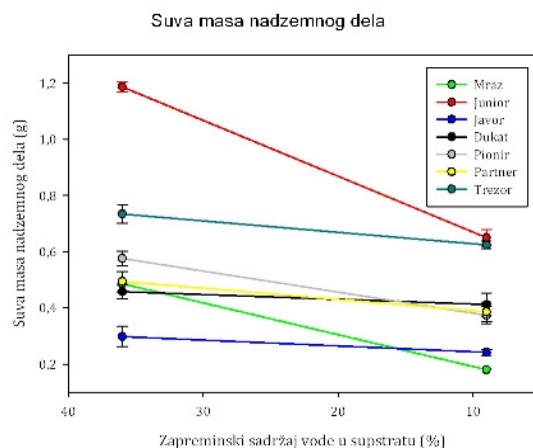
Najniže vrednosti i u kontrolnoj grupi i kod biljaka izloženih suši utvrđene su kod sorte Partner (kontrola 1,42 g, tretman 0,69 g), dok su najviše vrednosti utvrđene kod sorte Trezor (kontrola 2,45 g, tretman 1,49 g) (Prilog 4, tabela 1).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na svežu masu korena biljaka značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,01$) (Prilog 5, tabela 11b). Analiza statističke značajnosti podataka i razlike između sorti u tretmanima je pokazala da se po vrednostima sveže mase korena u kontrolnoj grupi izdvojila sorta Trezor ($p < 0,01$), dok ostale sorte nisu pokazale razlike. U tretiranoj grupi sorta Trezor se razlikuje od sorti Mraz, Junior i Partner ($p < 0,01$), dok sa sortama Dukat, Pionir i Javor čini istu homogenu grupu. Uočavaju se još jedna homogena grupa unutar koje nije bilo razlika između sorti, a čine je Pionir, Mraz, Dukat, Junior i Javor.

Analiza efekata suše na sveže masu korena kod pojedinačnih sorti i t-test su pokazali statističku značajnost smanjenja ovih vrednosti u suši kod svih sorti ($p < 0,001$), i to najviše kod sorte Partner (smanjenje za 51%). Nasuprot tome, kod sorte Pionir nije utvrđen statistički značajan efekat suše (prilog 4, tabela 1).

5.2.3. Uticaj suše na suhu masu nadzemnog dela biljaka

Uticaj suše na suhu masu nadzemnog dela biljaka ispitivan je pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata i predstavljen je na slici 36.



Slika 36. Suva masa nadzemnog dela biljaka stočnog graška pod uticajem suše od 9% vlažnosti supstrata.

Najniže vrednosti u kontrolnoj grupi se javljaju kod sorte Javor (0,30 g), a najviše kod sorte Junior (1,19 g). Kod biljaka izloženih jakoj suši najniže vrednosti su kod sorte Mraz (0,18 g), a najviše kod sorte Junior (0,65 g) (Prilog 4, tabela 1).

Uočava se smanjenje vrednosti suve mase nadzemnog dela pod uticajem suše u različitom stepenu kod svih sorti. Sorte Junior, Mraz i Pionir su pokazale značajne razlike u odnosu na kontrolu (Mraz, Pionir $p < 0,001$, Junior $p < 0,01$), koje su utvrđene primenom t-testa (Prilog 4, tabela 1).

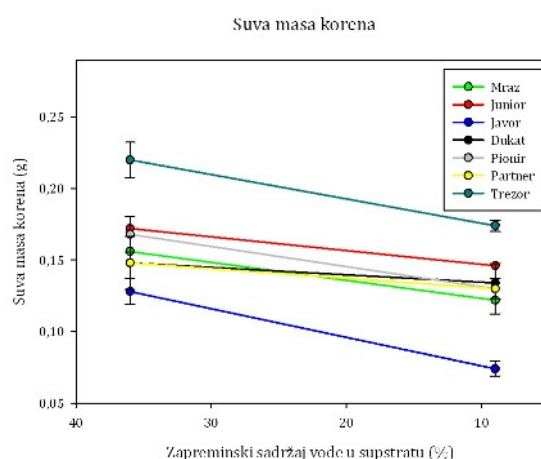
Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na suhu masu nadzemnog dela biljaka značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 12a). Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala da u kontrolnoj grupi sorte Pionir, Mraz, Partner i Dukat ne pokazuju značajne razlike. Pri tretmanu suše grupisale su se sorte Dukat, Partner i Pionir, kao i Junior i Trezor, kao i Javor i Mraz bez značajnijih razlika.

Analiza promene ovog parametra u suši u odnosu na uslove kontrole kod pojedinačnih genotipova pokazuje sličnosti sa promenom sveže mase jer je najveća

redukcija utvrđena kod sorte Junior (smanjenje za 37% u odnosu na kontrolne vrednosti), a nije se značajno promenila kod sorte Dukat i Javor.

5.2.4. Uticaj suše na suhu masu korena biljaka

Uticaj suše na suhu masu korena biljaka ispitan je pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata i predstavljen je na slici 37.



Slika 37. Suva masa korena biljaka stočnog graška pod uticajem suše od 9% vlažnosti supstrata.

Najniže vrednosti i u kontrolnoj grupi i kod biljaka izloženih suši utvrđene su kod sorte Javor (kontrola 0,13 g, tretman 0,07 g), dok su najviše vrednosti u obe grupe utvrđene kod sorte Trezor (kontrola 0,22 g, tretman 0,17 g) (Prilog 4, tabela 1).

Već na grafičkom prikazu (slika 37) se vidi smanjenje vrednosti suve mase korena pod uticajem suše kod svih sorti, ali u različitom stepenu. Ovo smanjenje nije statistički značajno kod sorti Mraz, Junior, Dukat i Partner. t-test je pokazao značajne razlike u odnosu na kontrolu kod sorti Javor ($p < 0,001$), Pionir ($p < 0,05$) i Trezor ($p < 0,01$) (Prilog 4, tabela 1).

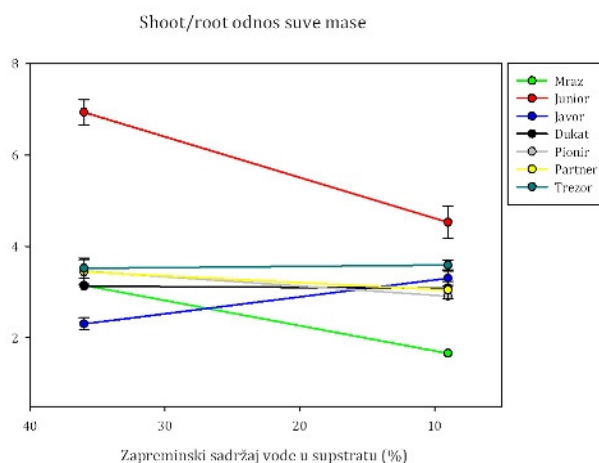
Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na suhu masu korena biljaka značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), dok efekat

interakcije genotipa i tretmana nije bio značajan (Prilog 5, tabela 12b). U kontrolnoj grupi se izdvojila sorta Trezor, a u tretiranoj su se izdvojili Trezor, koji je imao najviše i Javor, koji je imao najniže vrednosti.

Poređenje efekata suše i optimalnih uslova vodnog režima je pokazalo da je kod sorti Mraz i Javor, Dukat i Partner najmanje izražen efekat redukcije suve mase korena (za 24%, odnosno 43%), za razliku od sorti Trezor i Dukat (za 21% i 10%).

5.2.5. Uticaj suše na odnos suve mase nadzemnog dela i korena biljaka

Uticaj suše na odnos suve mase nadzemnog dela i korena biljaka ispitivan je pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata i predstavljen je na slici 38.



Slika 38. Odnos suve mase nadzemnog dela i korena biljaka stočnog graška pod uticajem suše od 9% vlažnosti supstrata.

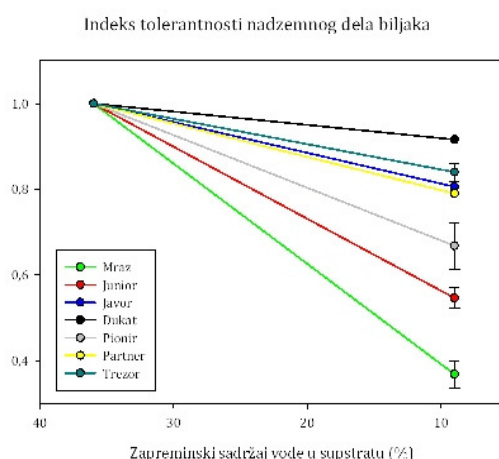
Odnos suve mase nadzemnog dela i korena biljaka je bio najniži kod sorte Javor (2,30) u kontrolnoj grupi, a kod sorte Mraz (1,66) u tretiranoj grupi. Najviše vrednosti u obe grupe su bile kod sorte Junior (kontrola 6,94, tretman 4,53) (Prilog 4, tabela 1).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na odnos suve mase ispitivanih organa značajno uticali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 13). Tukey test je pokazao da se sorta Junior izdvojila od svih drugih sorti i u kontrolnoj i u tretiranoj grupi. U kontrolnoj grupi se, pored sorte Junior, izdvojila i sorta Javor, a u tretiranoj sorta Mraz.

Grafički prikaz odnosa suve mase nadzemnog dela i korena biljaka (slika 38) pokazuje da su sorte Trezor i Javor pokazale povećanje, dok su ostale sorte pokazale trend smanjenja vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena biljaka. Promene u odnosu suve mase nadzemnog dela i korena biljaka bile su značajne kod sorti Mraz ($p < 0,001$), Junior ($p < 0,001$) i Javor ($p < 0,01$) (Prilog 4, tabela 1). Ti rezultati ukazuju da je suša kod sorti Mraz i Junior više uticala na rastenje nadzemnog dela nego na koren, dok je kod sorte Javor bilo obrnuto (veći uticaj na koren). Uočava se i da kod sorte Dukat nije došlo do značajnih promena.

5.2.6. Indeks tolerantnosti na sušu nadzemnog dela biljaka

Vrednosti indeksa tolerantnosti na sušu nadzemnog dela biljaka pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata predstavljene su na slici 39.



Slika 39. Indeks tolerantnosti nadzemnog dela biljaka stočnog graška na sušu od 9% vlažnosti supstrata.

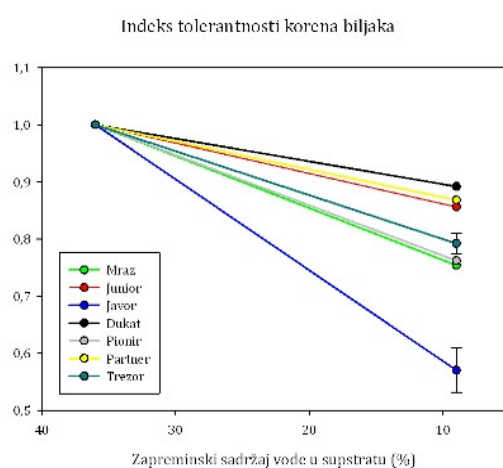
Uočava se trend opadanja vrednosti indeksa tolerantnosti nadzemnog dela biljaka kod svih ispitivanih sorti stočnog graška. Vrednosti indeksa tolerantnosti su se kretale od 0,37 kod sorte Mraz do 0,92 kod sorte Dukat (Prilog 4, tabela 1).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na indeks tolerantnosti nadzemnog dela biljaka značajan uticaj pokazali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 14a). Mraz, Junior i Pionir su se značajno razlikovali kako međusobno tako i od ostalih sorti.

Statistička značajnost smanjenja indeksa tolerantnosti nadzemnog dela biljaka kod svih sorti u odnosu na kontrolu potvrđena je primenom t-testa ($p < 0,001$), osim kod sorte Dukat kod koje nije postojala značajna razlika (Prilog 4, tabela 1). Rezultati su pokazali da je kod sorte Mraz utvrđeno najveće smanjenje indeksa tolerantnosti na sušu nadzemnog dela (0,37), dok je kod sorte Dukat utvrđeno najmanje smanjenje (0,92).

5.2.7. Indeks tolerantnosti na sušu korena biljaka

Vrednosti indeksa tolerantnosti na sušu korena biljaka pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata predstavljene su na slici 40.



Slika 40. Indeks tolerantnosti korena biljaka stočnog graška na sušu od 9% vlažnosti supstrata.

Uočava se trend opadanja vrednosti indeksa tolerantnosti korena biljaka kod svih ispitivanih sorti stočnog graška. Vrednosti indeksa tolerantnosti su se kretale od 0,57 kod sorte Javor do 0,90 kod sorte Dukat (Prilog 4, tabela 1).

Statistička značajnost smanjenja indeksa tolerantnosti korena biljaka kod svih sorti u odnosu na kontrolu potvrđena je primenom t-testa. Samo sorte Dukat i Partner nisu pokazale značajne razlike u odnosu na kontrolu, dok su one bile značajne kod sorti Mraz ($p < 0,05$), Trezor ($p < 0,01$), Pionir ($p < 0,001$), Junior ($p < 0,05$) i Javor ($p < 0,001$).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da je na indeks tolerantnosti korena značajan uticaj pokazao tretman ($p < 0,001$), dok sorte i interakcija sorte i tretmana nije imala uticaja (Prilog 5, tabela 14b). Među sortama značajno su se razlikovale samo sorte Dukat, koja je imala najviši indeks tolerantnosti i Javor, koja je imala najniži indeks tolerantnosti ($p < 0,01$). U okviru tretirane grupe sorte Pionir, Mraz i Trezor su se izdvojile u posebnu grupu i između njih nema značajnih razlika, kao i Partner i Junior. Dukat i Javor su statistički značajno različito reagovale na sušu: Javor najvećim, a Dukat najmanjim smanjenjem u odnosu na kontrolu.

Pokazalo se da je sorta Dukat pokazala najmanje smanjenje indeksa tolerantnosti i nadzemnog dela i korena u odnosu na kontrolu te ona pokazuje najveću tolerantnost na jak stepen suše. Najveće smanjenje indeksa nadzemnog dela je utvrđeno kod sorte Mraz, a najveće smanjenje indeksa tolerantnosti korena je utvrđeno kod sorte Javor.

5.2.8. Provodljivost stoma

Provodljivost stoma je merena za svaku sortu u kontroli kao i pri dva različita tretmana suše (T1 i T2) (tabela 12).

Uočava se da postoji razlika između tretmana i da su sve sorte imale značajno nižu provodljivost stoma pri jakoj suši (T2), ali i da su se razlikovale u otvorenosti stominih ćelija u optimalnim uslovima.

Tabela 12. Srednje vrednosti provodljivosti stoma po sortama u kontroli i tretmanima suše.

Sorta	Tretman	g_s (mmol/s ²)
Mraz	Kontrola	124,13 ± 2,04
	T1	60,86*** ± 1,10
	T2	25,08*** ± 0,57
Junior	Kontrola	143,61 ± 2,57
	T1	76,08*** ± 0,94
	T2	16,08*** ± 0,87
Javor	Kontrola	166,57 ± 6,74
	T1	64,70*** ± 1,22
	T2	30,66*** ± 0,74
Dukat	Kontrola	194,00 ± 14,96
	T1	64,06*** ± 3,94
	T2	37,96*** ± 1,31
Pionir	Kontrola	147,17 ± 5,46
	T1	50,04** ± 0,74
	T2	22,62*** ± 0,86
Partner	Kontrola	131,80 ± 4,98
	T1	66,48** ± 1,26
	T2	36,64** ± 1,61
Trezor	Kontrola	189,33 ± 10,07
	T1	80,64** ± 1,44
	T2	28,54** ± 1,34

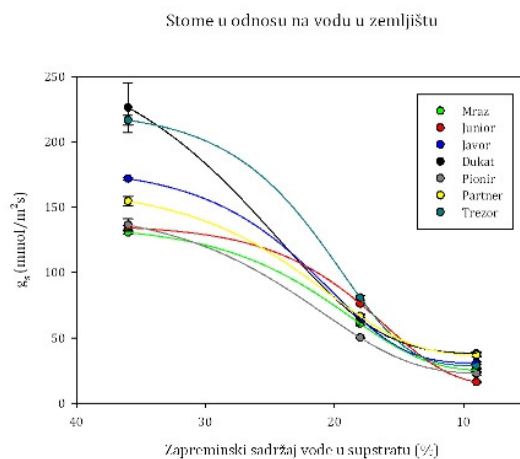
*** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$

Dvofaktorska analiza varijanse razlika u srednjim vrednostima, u odnosu na faktore sredine i tretmana, pokazala je statistički značajan uticaj sorte ($p < 0,001$) i uticaj tretmana ($p < 0,001$), ali i uticaj njihove interakcije ($p < 0,001$), te su se tako različite sorte različito ponašale u različitim tretmanima (Prilog 5, tabela 15). U kontrolnoj grupi su se, prema Tukey testu, od ostalih sorti izdvojile sorte Dukat i Trezor, zatim Javor, Partner i Mraz, kao i Pionir i Junior. Pri tretmanu T1 nije bilo značajnih razlika između sorti Trezor, Pionir i Junior, dok pri tretmanu T2 razlike nisu pokazali Dukat, Partner i Junior.

Sorta Pionir je imala najmanju provodljivost stoma u suši od 18% vode (T1) u supstratu ($50,04 \text{ mmol/s}^2$), dok je sorta Trezor imala najveću provodljivost ($80,64 \text{ mmol/s}^2$). Pri jakoj suši (9% vode - T2) izdvojila se sorta Dukat sa najvećim vrednostima za provodljivost stoma ($37,96 \text{ mmol/s}^2$), dok je najmanje vrednosti imala sorta Junior ($16,08 \text{ mmol/s}^2$).

Da bi se efekti tretmana mogli pravilno tumačiti, urađena je regresiona analiza. Za crtanje krive zavisnosti provodljivosti stoma u odnosu na zapreminski sadržaj vode u supstratu, korišćen je sigmoidan obrazac četvrtog reda regresije (slika 41). Ovi rezultati pokazuju da se najveće razlike u reakcijama stoma ispitivanih genotipova ispoljavaju u uslovima umerene suše (T1 tretman i količina vode u supstratu od oko 18%). Sorta Dukat u ovom tretmanu je ispoljila najveću osetljivost stominih ćelija jer se njihova provodljivost smanjila za 66,98% u odnosu na provodljivost u optimalnim uslovima. Slične su i reakcije sorte Pionir (smanjenje provodljivosti za 63,30%).

Stome sorte Junior su u istom T1 tretmanu pokazale manju osetljivost na sušu i imale su izrazito veću provodljivost od provodljivosti stoma ostalih sorti (52,98% u odnosu na kontrolu). Međutim, sa daljim opadanjem vode u supstratu i jačim stresom (T2 tretman), stome ove sorte su se najbrže zatvorile i stoga je izmerena najmanja provodljivost (11,20% u odnosu na kontrolu). U poređenju sa reakcijama stominih ćelija drugih sorti kod sorte Partner je utvrđen najsporiji pad provodljivosti i najmanja osetljivost stoma na smanjenje sadržaja vode u zemljištu.



Slika 41. Promene u provodljivosti stoma (g_s) u zavisnosti od sadržaja vode u supstratu

5.2.9. Akumulacija abscisinske kiseline u listovima biljaka

U listovima ispitivanih biljaka je merena i akumulacija stres hormona abscisinske kiseline. Merenja su vršena u listovima biljaka u kontroli i kod biljaka izloženih suši (tabela 13).

Tabela 13. Vrednosti ABA u listovima biljaka (ng/g sveže mase) pod uticajem tretmana suše.

Sorta	Tretman	ABA (ng/g FW)
Mraz	Kontrola	187,00 ± 11,23
	T1	486,20*** ± 9,81
	T2	549,80*** ± 15,23
Junior	Kontrola	171,00 ± 13,72
	T1	389,00*** ± 26,63
	T2	458,40*** ± 15,24
Javor	Kontrola	146,00 ± 8,84
	T1	285,60*** ± 11,71
	T2	361,00*** ± 10,16
Dukat	Kontrola	88,00 ± 7,44
	T1	648,80*** ± 19,80
	T2	895,00*** ± 27,21
Pionir	Kontrola	164,00 ± 7,66
	T1	454,00*** ± 15,29
	T2	705,20*** ± 46,19
Partner	Kontrola	161,00 ± 9,44
	T1	456,00*** ± 20,04
	T2	657,80*** ± 26,89
Trezor	Kontrola	146,00 ± 10,78
	T1	356,40*** ± 8,12
	T2	506,00*** ± 24,00

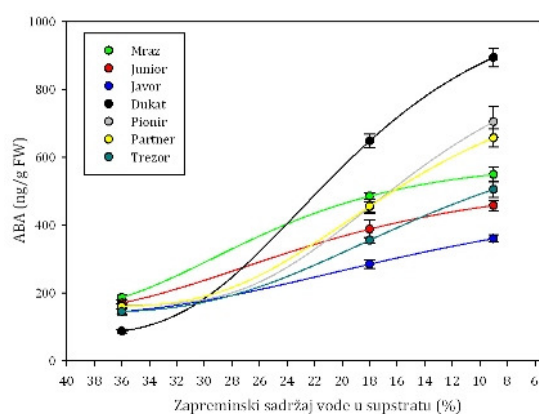
** - p<0,001

Kod svih sorti je uočeno statistički značajno povećanje sadržaja ABA u odnosu na kontrolu u oba tretmana suše (p<0,001) (tabela 13). Koncentracija ABA u kontroli se kretala od 88,00 (Dukat) do 187,00 ng/g sveže mase (Mraz). Ova vrednost se pri tretmanu suše od 18% vlažnosti supstrata kretala od 285,00 (Javor) do 648,80 ng/g sveže mase (Dukat), dok se pri tretmanu suše od 9% vlažnosti supstrata kretala od 361,00 (Javor) do 895,00 ng/g sveže mase (Dukat).

Najmanje povećanje ABA u odnosu na kontrolu pri tretmanu suše T1 bilo je kod sorte Javor (95,62%), a najveće kod sorte Dukat (637,27%), a u odnosu na kontrolu pri tretmanu T2 takođe se najmanje povećanje javlja kod sorte Javor (147,26%), a najveće kod sorte Dukat (9017,04%). Ukoliko se porede tretmani suše, najmanje povećanje ABA pri T2 u odnosu na T1 bila je kod sorte Mraz (13,08%), a najveće kod sorte Pionir (55,33%).

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na akumulaciju ABA značajan uticaj pokazali genotip ($p < 0,001$) i tretman ($p < 0,001$), kao i da se ispoljio efekat interakcije genotipa i tretmana ($p < 0,001$) (Prilog 5, tabela 17). Sorta Dukat je pokazala najveću akumulaciju hormona stresa ABA u oba tretmana u odnosu na druge sorte i ta razlika je statistički značajna. U tretmanima T1 i T2 najmanji sadržaj ABA u odnosu na ostale sorte je imala sorta Javor ($p < 0,001$). Takođe je kod ove sorte utvrđen i najmanji porast u koncentraciji ABA u suši u odnosu na optimalne uslove vodnog režima.

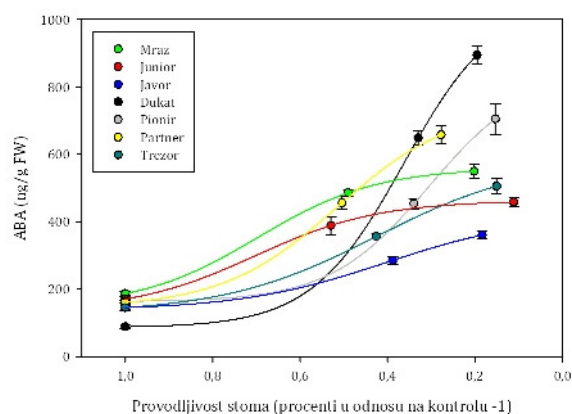
Zavisnost sadržaja ABA u listovima od zapreminskog sadržaja vode u zemljištu prikazana je na slici 42.



Slika 42. Promena koncentracije ABA u listovima u zavisnosti od sadržaja vode u zemljištu.

Uočljivo je značajno povećanje koncentracije ABA u listovima pri smanjenju sadržaja vode u zemljištu kod svih sorti, u oba tretmana ($p < 0,001$). Sorta Dukat je pokazala najveću, a sorta Javor najmanju akumulaciju ABA u odnosu na ostale sorte (tabela 13).

Rezultati provodljivosti stominih ćelija su takođe prikazani i u korelaciji sa sadržajem ABA u listovima i promene provodljivosti stominih ćelija (slika 43).



Slika 43. Odnos sadržaja ABA u listovima i provodljivosti stoma (izražene u odnosu na kontrolu =1).

Ovi rezultati su pokazali različitu osetljivost stominih ćelija ispitivanih sorti na promenu koncentracije ABA. Pri tome je akumulacija ABA u listovima najviše uticala na provodljivost stoma kod sorte Dukat, a najmanje na stome sorte Javor.

5.2.10. Uticaj suše na antioksidativni status odabranih genotipova stočnog graška

U ogledu suše su obavljena merenja aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutacion reduktaze. Merenja su

vršena u listovima biljaka u kontroli, kao i kod biljaka izloženih tretmanu jake suše od 9% vlažnosti supstrata (T2).

5.2.10.1. Uticaj suše na aktivnost enzima superoksid dismutaze

Prosečne vrednosti aktivnosti superoksid dismutaze u listovima biljaka su predstavljene u tabeli 14. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 44.

Tabela 14. Aktivnost superoksid dismutaze u listovima biljaka stočnog graška.

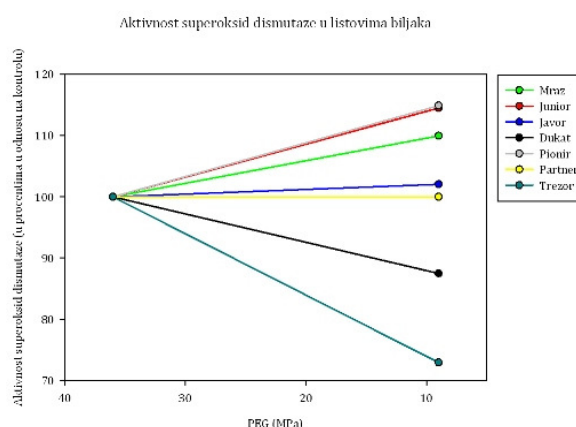
Sorta	Superoksid dismutaza (SOD) (U/mg prot)	
	Kontrola	T2
Mraz	10,55 ± 0,7514	11,60 ^{nz} ± 0,7225
Junior	6,90 ± 0,1734	7,90 ^{***} ± 0,0751
Javor	7,35 ± 0,1156	7,50 ^{nz} ± 0,3179
Dukat	6,40 ± 0,2824	5,98 ^{nz} ± 0,3988
Pionir	9,75 ± 0,1618	11,20 ^{nz} ± 0,9653
Partner	9,25 ± 0,5722	7,50 [*] ± 0,5491
Trezor	11,10 ± 0,2312	8,10 ^{***} ± 0,2659

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz – nema značajnosti

Prosečna vrednost aktivnosti SOD, izražena u U/mg proteina, merena u listovima biljaka u kontroli se kretala od 6,40 (Dukat) do 11,10 (Trezor), a kod biljaka izloženih uticaju suše od 5,98 (Dukat) do 11,60 (Mraz) (tabela 14).

Uočava se da su najmanje prosečne vrednosti aktivnosti SOD u obe grupe izmerene kod sorte Dukat. U tretiranoj grupi je došlo do povećanja aktivnosti SOD kod sorti Mraz, Junior, Javor i Pionir, ali je ovo povećanje bilo značajno samo kod

sorte Junior ($p < 0,001$). Kod sorti Trezor ($p < 0,001$), Partner ($p < 0,05$) i Dukat je izmereno smanjenje aktivnosti. Ali se kod sorte Dukat ovo smanjenje nije pokazalo značajnim. U kontroli sve sorte se mogu podeliti u tri grupe unutar kojih ne postoje značajne razlike: Trezor i Mraz (11,10 i 10,55 U/mg prot); Pionir i Partner (9,75 i 9,25 U/mg prot) i Javor, Junior i Dukat (7,50, 7,90 i 5,98 U/mg prot). U grupi koja je bila pod uticajem suše izdvaja se sorta Dukat sa najmanjim vrednostima aktivnosti SOD (5,98 U/mg prot) dok se ostale sorte mogu podeliti u dve grupe unutar kojih su izmerene bliske vrednosti: Mraz i Pionir (11,60 i 11,20 U/mg prot) i Trezor, Junior, Javor i Partner (8,10, 7,90, 7,50 i 7,50 U/mg prot). Uočljivo je da su sorte Javor i Partner pokazale iste vrednosti aktivnosti SOD (7,50 U/mg prot), pri čemu je ta vrednost kod sorte Javor predstavljala povećanje, a kod sorte Partner smanjenje u odnosu na kontrolu (tabela 14).



Slika 44. Aktivnost SOD u listovima biljaka stočnog graška izloženih delovanju suše izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Promene u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 44. Najveće povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorti Junior i Pionir (114,49% i 114,87%), a najveće smanjenje kod sorte Trezor (72,97% u odnosu na kontrolu).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i interakcije genotip i tretman ($p < 0,001$), dok uticaj tretmana

nije imao velikog značaja na aktivnost SOD u listovima biljaka izloženih uticaju suše (Prilog 5, tabela 24).

5.2.10.2. Uticaj suše na aktivnost enzima askorbat peroksidaze

Prosečne vrednosti aktivnosti askorbat peroksidaze u listovima biljaka su predstavljene u tabeli 15. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 45.

Tabela 15. Aktivnost askorbat peroksidaze u listovima biljaka stočnog graška.

Sorta	Askorbat peroksidaza (APx) (nmol/min/mg prot)	
	Kontrola	T2
Mraz	22,85 ± 1,6358	19,60 ^{nz} ± 2,2254
Junior	10,45 ± 0,6416	47,20 ^{**} ± 1,0462
Javor	35,75 ± 1,2370	5,99 ^{**} ± 0,1387
Dukat	9,92 ± 0,1792	13,00 ^{**} ± 1,3526
Pionir	23,40 ± 2,0347	17,70 ^{**} ± 1,4509
Partner	10,80 ± 1,4682	1,92 ^{**} ± 0,1156
Trezor	10,85 ± 0,8613	15,70 ^{**} ± 0,7746

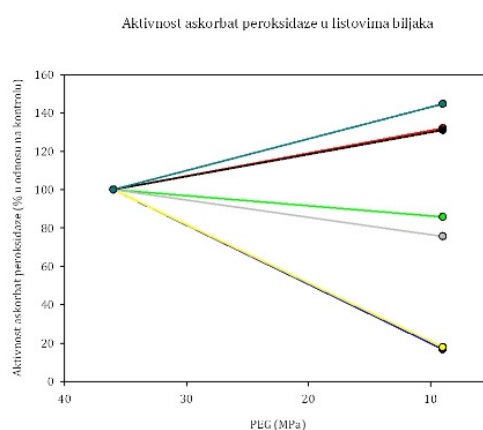
* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, nz – nema značajnosti

Prosečna vrednost aktivnosti APx, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u listovima biljaka u kontroli se kretala između 9,92 (Dukat) i 35,75 (Javor), dok se u tretiranoj grupi kretala od 1,92 (Partner) do 47,20 (Junior) (tabela 15).

Pod uticajem suše je došlo do statistički značajnog (p<0,01) smanjenja aktivnosti APx kod sorti Javor, Pionir i Partner, dok kod sorte Mraz razlika nije bila

statistički značajna. Kod sorti Junior, Dukat i Trezor je došlo do statistički značajnog ($p < 0,01$) povećanja aktivnosti APx u listovima tretiranih biljaka. U kontroli se sorta Javor izdvojila od ostalih sorti sa najvećom vrednosti ativnosti APx (35,75 nmol/min/mg prot). Sorte Pionir i Mraz nisu pokazale značajne međusobne razlike (23,40 i 22,85 nmol/min/mg prot), kao i sorte Junior, Dukat, Partner i Trezor sa vrednostima oko 10,50 nmol/min/mg prot, međutim postojala je značajna razlika između ove dve grupe. U grupi biljaka izloženih stresu suše sorta Junior se izdvojila od ostalih sorti sa znatno višom vrednosti aktivnosti APx (47,20 nmol/min/mg prot), dok su se ostale sorte podelile u dve grupe unutar kojih nisu postojale značajne razlike, ali su postojale značajne razlike između grupa. Prvu grupu su činile sorte Pionir, Dukat, Mraz i Trezor sa vrednostima koje su se kretale oko 16,50 nmol/min/mg prot, a drugu grupu su činile sorte Javor i Partner sa značajno nižim vrednostima (5,99 i 1,92 nmol/min/mg prot) (tabela 15).

Promene u aktivnosti APx u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 45. Najveće povećanje aktivnosti APx u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorte Trezor (144,70%), a najveće smanjenje kod sorti Javor (16,76%) i Partner (17,78%). Sorte Junior i Dukat su pokazale sličnu promenu aktivnosti enzima – povećanje od 132,03% i 131,05% u odnosu na kontrolu.



Slika 45. Aktivnost APx u listovima biljaka stočnog graška izloženih delovanju suše izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i interakcije genotip i tretman ($p < 0,001$), dok uticaj tretmana nije imao velikog značaja na aktivnost APx u listovima biljaka izloženih uticaju suše (Prilog 5, tabela 25).

5.2.10.3. Uticaj suše na aktivnost enzima glutation reduktaze

Prosečne vrednosti aktivnosti glutation reduktaze u listovima biljaka su predstavljene u tabeli 16. Vrednosti izražene u odnosu na kontrolu su predstavljene na slici 46.

Tabela 16. Aktivnost glutation reduktaze u listovima biljaka stočnog graška.

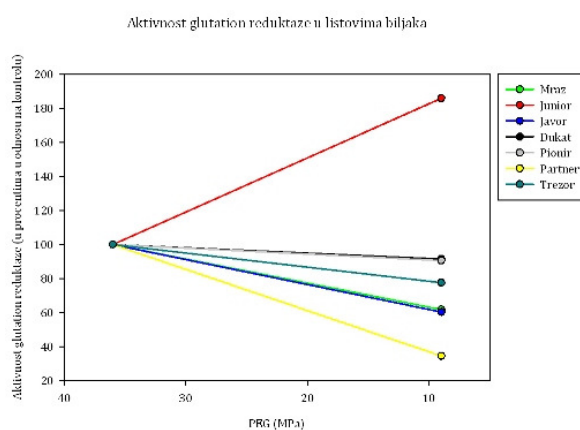
Sorta	Glutation reduktaza (GR) (nmol/min/mg prot)	
	Kontrola	T2
Mraz	38,00 ± 0,5954	23,50*** ± 0,8613
Junior	18,40 ± 2,0058	34,20*** ± 1,2370
Javor	8,95 ± 0,5144	5,40** ± 0,6069
Dukat	16,40 ± 0,6821	15,00 ^{nz} ± 1,1734
Pionir	11,70 ± 0,7341	10,60 ^{nz} ± 0,6185
Partner	22,00 ± 1,0925	7,60*** ± 0,6350
Trezor	27,20 ± 1,3121	21,10*** ± 0,5722

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$, nz – nema značajnosti

Prosečna vrednost aktivnosti GR, izražena u nmol/min/mg proteina, merena u listovima biljaka u kontroli se kretala od 8,95 (Javor) do 38,00 (Mraz), dok su se vrednosti u tretiranoj grupi kretale od 5,40 (Javor) do 34,20 (Junior) (tabela 16).

Uočljivo je da su najmanje prosečne vrednosti aktivnosti GR u obe grupe izmerene kod sorte Javor. Pod uticajem suše je došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti GR kod sorti Mraz, Partner, Trezor ($p < 0,001$) i Javor ($p < 0,01$), a kod sorte Dukat smanjenje nije bilo statistički značajno. Kod sorti Junior i Pionir su izmerene povećane aktivnosti GR pod uticajem suše, pri čemu je ta razlika bila statistički značajna kod sorte Junior ($p < 0,001$), a kod sorte Pionir bez značajnosti. U kontroli su se bliske vrednosti aktivnosti GR javile kod sorti Javor i Pionir (8,95 i 11,70 nmol/min/mg prot), kao i kod sorti Dukat i Junior (16,40 i 18,40 nmol/min/mg prot). Sorte Mraz, Trezor i Partner su se međusobno značajno razlikovale, kao i od predhodne dve grupe. U tretiranoj grupi su se Mraz i Dukat značajno razlikovale od ostalih sorti, dok su sorte Mraz i Trezor pokazale bliske vrednosti (23,50 i 21,10 nmol/min/mg prot), kao i sorte Pionir, Partner i Javor (vrednosti oko 7,90 nmol/min/mg prot). Sorta Junior je imala najveće prosečne vrednosti aktivnosti GR od 34,20 nmol/min/mg prot.

Promene u aktivnosti GR u odnosu na kontrolu predstavljene su na slici 46. Najveće povećanje aktivnosti GR u odnosu na kontrolu je bilo kod sorte Junior (185,87%), a najveće smanjenje kod sorte Partner (34,54%). Sorte Dukat i Pionir su pokazale slično smanjenje aktivnosti GR (91,46% i 90,60%), a takođe i sorte Mraz i Javor (61,84% i 60,34%).



Slika 46. Aktivnost GR u listovima biljaka stočnog graška izloženih delovanju suše izražena u odnosu na kontrolu ($k=100\%$).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvrđen je visoko značajan doprinos genotipa ($p < 0,001$) i tretmana ($p < 0,001$), kao i njihove interakcije ($p < 0,001$) na aktivnost GR u listovima biljaka izloženih uticaju suše (Prilog 5, tabela 26).

5.2.11. Uticaj suše na ekspresiju gena

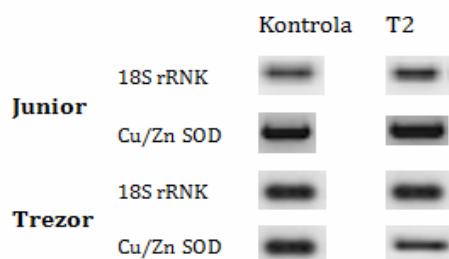
U okviru molekularnih istraživanja uticaja suše praćena je ekspresija gena koji kodiraju 3 antioksidativna enzima (*Cu/ZnSOD*, *cAPx* i *GR*), kao i 3 gena (*PsA01*, *PsA02* i *PsA03*), koji kodiraju enzim aldehid oksidazu (učestvuje u poslednjem koraku biosinteze ABA od abscisinskog aldehida).

5.2.11.1. Ekspresija gena za antioksidativne enzime pod uticajem suše

Analiza ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime je vršena kod odabranih genotipova stočnog graška, kod kojih su uočene ekstremne promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na kontrolu. Promene u ekspresiji gena su analizirane u listovima biljaka u kontroli, kao i kod biljaka izloženih tretmanu jake suše od 9% vlažnosti supstrata (T2). *Arabidopsis* 18S rRNK gen je korišćen kao referentni gen.

5.2.11.1.1. Ekspresija gena za enzim superoksid dismutazu

Izmene u nivoima ekspresije transkripta *Cu/ZnSOD* u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem jake suše predstavljene su na slici 47.

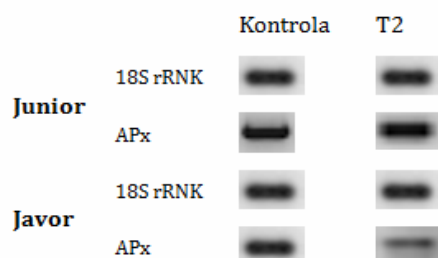


Slika 47. Uticaj suše na ekspresiju gena za Cu/ZnSOD u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog graška.

Najveće povećanje ekspresije gena za SOD u listovima biljaka pod uticajem suše uočeno je kod sorte Junior (slika 47), pri čemu je kod ove sorte došlo i do povećanja aktivnosti enzima za 114,49% (slika 44), a kod sorte Trezor je uočeno smanjenje ekspresije gena za enzim superoksid dismutazu (slika 47), kao i smanjenje aktivnosti enzima koja je činila 72,97% u odnosu na kontrolu (slika 44). Kod sorti Javor, Mraz i Pionir nije došlo do značajnih promena i stoga ovi rezultati nisu prikazani.

5.2.11.1.2. Ekspresija gena za enzim askorbat peroksidazu

Izmene u nivoima ekspresije transkripta cAPx u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem jake suše predstavljene su na slici 48.

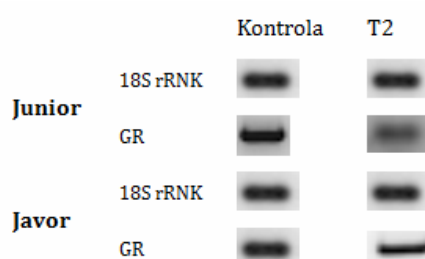


Slika 48. Uticaj suše na ekspresiju gena za cAPx u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog.

Najveća aktivnost enzima APx pod uticajem suše u listovima biljaka je izmerena kod sorte Junior (47,20 nmol/min/mg prot, tabela 15), što je predstavljalo povećanje od 132,03% u odnosu na kontrolu (slika 45) nastalo verovatno kao posledica povećane ekspresije gena za cAPx (slika 48). Kod sorte Javor je uočena smanjena ekspresija gena (slika 48) u listovima biljaka pod uticajem suše i kod ove sorte je izmerena veoma niska aktivnost enzima (16,75%, slika 45). Kod ostalih sorti nije došlo do značajne promene u ekspresiji gena za APx.

5.2.11.1.3. Ekspresija gena za enzim glutation reduktazu

Izmene u nivoima ekspresije transkripta GR u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem jake suše predstavljene su na slici 49.



Slika 49. Uticaj suše na ekspresiju gena za GR u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog.

Kod sorte Junior je uočeno povećanje ekspresije gena za GR u listovima biljaka pod uticajem suše (slika 49), što je dovelo do povećanja aktivnosti GR u odnosu na kontrolu od 185,87% (slika 46). Kod sorte Javor je uočeno smanjenje ekspresije gena za GR (slika 49), kao i smanjenje aktivnosti enzima za 39,66% u odnosu na kontrolu (slika 46). Kod sortet Javor je izmerena i najmanja prosečna vrednost aktivnosti GR od 5,40 nmol/min/mg proteina (tabela 16).

5.2.11.2. Uticaj suše na ekspresiju gena koji učestvuju u sintezi abscisinske kiseline

Analiza ekspresije 3 gena: *PsA01*, *PsA02* i *PsA03* je vršena kod odabranih genotipova stočnog graška, kod kojih je došlo do najveće (Dukat), odnosno najmanje (Javor) akumulacije ABA u odnosu na kontrolu. Promene u ekspresiji gena su analizirane u listovima biljaka u kontroli, kao i kod biljaka izloženih tretmanu jake suše. *Arabidopsis* 18S rRNK gen je korišćen kao referentni gen.

Izmene u nivoima ekspresije transkripta tri gena za AO u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog graška pod uticajem suše predstavljene su na slici 50.



Slika 50. Uticaj suše na ekspresiju gena *PsA01*, *PsA02* i *PsA03* u listovima biljaka odabranih genotipova stočnog graška.

Kod sorte Dukat sadržaj ABA se u sušnim uslovima povećao u odnosu na kontrolu za 1017% (sa 88 ng/g na 895 ng/g), a kod sorte Javor za 247% (sa 146 ng/g na 361 ng/g) (tabela 13). Kod obe sorte je pod uticajem suše uočena pojačana

ekspresija gena *PsA02* i *PsA03*, koja je kod sorte Dukat bila nešto izraženija nego kod sorte Javor, dok je ekspresija gena *PsA01* kod obe sorte bila slična ekspresiji gena u kontrolnoj grupi (slika 50).

6. DISKUSIJA

6.1. Osmotski stres

6.1.1. Osmotski stres i klijavost semena

Klijanje semena je veoma važna faza razvoja biljaka, određujući uspešnu biljnu proizvodnju, pri čemu je rana faza klijanja naročito osetljiva na osmotski stres (Magyar-Tábori *i sar.*, 2011). Klijavost semena se definiše kao pojava i razvoj ponika do onog stepena kada izgled njegovih osnovnih struktura pokazuje da li ponik jeste ili nije u stanju da se dalje razvija u normalnu biljku u povoljnim uslovima (ISTA, 2013). Mehanizam klijanja obuhvata nekoliko faza: aktivaciju enzima, razgradnju rezervnih materija, translokaciju i mobilizaciju rastvorljivih materija i zatim deobu ćelija (Kastori, 1998). Redukcija sadržaja vode u semenu, kao posledica niskog vodnog potencijala u zemljištu, dovodi do redukcije aktivnosti hidrolitičkih enzima odgovornih za hidrolizu rezervi u kotiledonima (proteaze, α -amilaze i lipaze) i obezbeđivanje energije za početne stadijume razvoja biljke iz semena i dovodi do inhibicije klijanja (Gholami *i sar.*, 2010). Vodni deficit može da dovede do zakasnelog i smanjenog procenta klijanja, a može i potpuno da inhibira klijanje (Podlešna, 2015). Još 1978. godine je Richards predložio određivanje klijavosti kao koristan kriterijum za skrining tolerantnosti biljaka na stres suše. Khakwani *i sar.* (2011) su, ispitujući šest sorti pšenice, dokazali da su one koje su bile tolerantne na osmotski stres, izazvan polietilenglikolom u laboratorijskim uslovima, pokazale sličnu tolerantnost i u poljskim uslovima. Agili *i sar.* (2012) su potvrdili te rezultate eksperimentom na slatkom krompiru. Ispitivanje uticaja osmotskog stresa primenom PEG potencijala između -0,3MPa i -0,8MPa na četiri sorte sočiva, pokazalo je značajno smanjenje procenta klijavosti sa povećanjem nivoa stresa u odnosu na kontrolu (Muscolo *i sar.*, 2014). Okçu *i sar.* (2005) su utvrdili da je osmotski stres izazvan rastvorom PEG (od -2 do -8 bara, što odgovara osmotskim potencijalima od -0,2MPa do -0,8MPa) inhibirao klijanje i porast ponika kod sve tri ispitivane sorte graška i kod

svih primenjenih nivoa osmotskog potencijala, ali je stepen inhibicije bio različit kod različitih genotipova. Slične rezultate su dobili i Singh *i sar.* (1990) ispitujući uticaj osmotskog stresa potencijala od -0,1MPa do -0,5MPa na jednoj sorti graška.

U istraživanjima u ovoj disertaciji, primena rastvora PEG sa osmotskim potencijalima od -0,1MPa i -0,2MPa, je kod svih sorti, takođe, dovela do smanjenja klijavosti u zavisnosti od nivoa stresa, pri čemu je ovo smanjenje bilo različito kod različitih sorti (slika 15). Značajno smanjenje klijavosti u odnosu na kontrolu u našim ispitivanjima se javilo već pri najnižem nivou osmotskog stresa (-0,1MPa) kod svih ispitivanih genotipova, osim kod sorti Mraz i Dukat kod kojih je do statistički značajnih razlika došlo pri nešto jačem stresu od -0,2MPa. Najveći procenat klijavosti i u kontroli i pri oba stepena osmotskog stresa je bio kod sorte Mraz (Kontrola 100% ; -0,1MPa 99% ; -0,2MPa 97%), dok je najmanji procenat pokazala sorta Javor (Kontrola 84% ; -0,1MPa 64%, -0,2MPa 58%). Kao što je već istaknuto u Rezultatima, primena rastvora PEG osmotskog potencijala od -0,3MPa je kod svih sorti redukovala klijanje na vrednosti ispod 10%, tako da ova koncentracija rastvora PEG nije korišćena u istraživanjima. Rasaei *i sar.* (2013) su, ispitujući uticaj osmotskog stresa na 6 različitih sorti soje, takođe utvrdili potpuno odsustvo klijanja pri osmotskim potencijalima preko -3 bara (-0,3MPa). Sa druge strane, Demir i Mavi (2008) su utvrdili da se značajno smanjenje klijavosti, primenom rastvora PEG na seme paprike, javlja tek pri -0,6MPa što ukazuje na to da veličina i kvalitet semena igra značajnu ulogu u otpornosti biljaka na sušu. Prema tome grašak je osetljiviji na vodni deficit u odnosu na papriku i druge biljne vrste sitnijeg semena. Osim toga potrebe za vodom u periodu klijanja semena biljaka zavise i od vrste biljke kao i od njenih potreba za vlagom i temperaturom (Shaban, 2013). O tome treba voditi računa pri korišćenju rastvora PEG za ocenu klijavosti semena. Smanjenje procenta klijavosti izazvano primenom PEG utvrdili su i mnogi drugi autori, kao što su Dobránszki *i sar.* (2006), Demir i Mavi (2008), Gamze *i sar.* (2005), Ghazi *i sar.* (2007), Siahsar *i sar.* (2010), Kandil *i sar.* (2015) i dr., proučavajući razne biljne vrste.

Vodni deficit ne samo da utiče na procenat klijavosti semena, već i na brzinu klijanja, odnosno srednje vreme klijanja (slika 16). Prema Demir *i sar.* (2008) lotovi koji sporije klijavu, na šta ukazuje srednje vreme klijanja, proizvode sitnije i neujednačenije ponike u laboratoriji, kao i sitnije i manje ujednačene ponike u zemljištu. Ispitivanje uticaja osmotskog stresa na brzinu klijanja vršeno je kod raznih biljnih vrsta, kao što su kukuruz (Alebrahim *i sar.*, 2008; Khodarahmpour, 2011), leblebija (Kandil *i sar.*, 2012), kajan (Kumar *i sar.*, 2011), paprika (Demir *i sar.*, 2008). Rezultati merenja srednjeg vremena klijanja predstavljeni u ovoj disertaciji su u skladu sa rezultatima Okçu *i sar.* (2005) koji su utvrdili povećanje srednjeg vremena klijanja, odnosno usporavanje klijanja semena, kod većine sorti graška sa povećanjem nivoa stresa. Kod sorti Mraz i Trezor javlja se smanjenje srednjeg vremena klijanja pri osmotskom stresu od $-0,2\text{MPa}$ u odnosu na $-0,1\text{MPa}$. Na taj način se, nakon početnog usporavanja, klijavost ubrzava, što ukazuje na određeni stepen tolerantnosti ovih sorti na delovanje osmotskog stresa. Usporavanje klijanja se naročito uočava kod sorte Javor kod koje i klijanje kasnije nastupa u odnosu na ostale sorte. Uzimajući u obzir rezultate merenja procenta klijavosti i srednjeg vremena klijanja uočava se da je sorta Javor znatno osetljivija od ostalih sorti na svim nivoima osmotskog stresa. Nasuprot tome najmanja osetljivost i klijanja i srednjeg vremena klijanja je utvrđena kod sorti Mraz i Trezor.

6.1.2. Osmotski stres i rast nadzemnog dela i korena ponika i akumulacija biomase

U toku analize dužine nadzemnog dela i korena ponika odabranih genotipova stočnog graška uočene su značajne razlike kako između genotipova, tako i između primenjenih koncentracija rastvora osmotikuma PEG 6000, kao i dužine izlaganja stresnim uslovima. Uočava se smanjenje dužine nadzemnog dela ponika i dužine korena, u odnosu na kontrolu u zavisnosti od nivoa stresa, kod svih sorti (slika 17 i 18). Ove razlike su bile statistički značajne već pri najnižem nivou stresa ($-0,1\text{MPa}$). Oba merena parametra pokazuju povećane vrednosti nakon 15 dana testiranja u odnosu na kraće vreme izlaganja osmotskom stresu, odnosno

povećanje tolerantnosti u toku vremena. Kod sorte Junior se koren smanjio samo pri potencijalu od $-0,1\text{MPa}$, nakon dužeg vremena izlaganja, odnosno ova sorta je uspela da prevaziđe negativne efekte viših nivoa stresa u dužem vremenskom intervalu.

Poređenje rezultata merenja brzine rasta nadzemnog dela i korena svih sorti generalno pokazuje da je osmotski stres u svim ispitivanim vremenskim periodima imao manji efekat na rast korena u odnosu na nadzemni deo. Prosečne vrednosti, izračunate na osnovu merenja kod svih sorti, su se kretale za nadzemni deo u kontroli od $21,00\text{ mm/dan}$ do $11,94\text{ mm/dan}$, u $-0,1\text{MPa}$ i $-0,2\text{MPa}$ od $3,56\text{ mm/dan}$ do $2,51\text{ mm/dan}$ (10 dana). U istim uslovima se brzina rasta korena kretala u dijapazonu od $19,21\text{ mm/dan}$ (kontrola) do $9,10\text{ mm/dan}$ ($-0,1\text{MPa}$) i $7,17\text{ mm/dan}$ ($-0,2\text{MPa}$). Za period od 15 dana u kontroli prosečne vrednosti brzine rasta nadzemnog dela svih ispitivanih sorti su iznosile $17,32\text{ mm/dan}$, u $-0,1\text{MPa}$ - $6,62\text{ mm/dan}$, dok su prosečne vrednosti za $-0,2\text{MPa}$ iznosile $3,64\text{ mm/dan}$. U istim uslovima se prosečna brzina rasta korena kretala od $15,04\text{ mm/dan}$ (kontrola), do $6,01\text{ mm/dan}$ ($-0,1\text{MPa}$) i $6,13\text{ mm/dan}$ ($-0,2\text{MPa}$). Ovi rezultati objašnjavaju manji efekat stresa na dužinu korena u odnosu na nadzemni deo ponika.

Izduživanje korena u uslovima suše indukovane osmotskim stresom, može biti značajna adaptivna reakcija za ponik i mlade biljke zbog toga što duži koren može da prodre u dublje slojeve zemljišta i samim tim omogući snabdevanje vodom čak i kada su površinski slojevi zemljišta suvi, naročito u slučaju ako sušni period potraje (Moud i Maghsoudi, 2008; Pandey i Shukla, 2014). Iz literature je poznato da kod graška, kao i kod drugih leguminoza, dolazi do redukcije broja lateralnih korenova i izduživanja primarnog korena pod uticajem dehidratacije (Grzesiak et al., 1996). Rezultati Grzesiak *i sar.* (1997) i Xiong *i sar.* (2006) ukazuju da je sposobnost biljke da menja distribuciju korena u zemljištu važan adaptivni mehanizam koji spada u kategoriju tzv. "izbegavanja suše". Kolbert *i sar.* (2008b) su pokazali da je osmotski stres izazvan PEG-om doveo do skraćivanja primarnog korena, ali i povećanja broja bočnih korenova graška. Okçu *i sar.* (2005) su utvrdili

da je porast nadzemnog dela bio manji od porasta korena graška, pri čemu je do prestanka rasta nadzemnog dela došlo pri osmotskom potencijalu od $-0,4\text{MPa}$, a korena pri $-0,6\text{MPa}$.

Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa rezultatima Dobránszki *i sar.* (2006), koji su analizirali uticaj PEG na 8 genotipova graška i utvrdili da je osmotski stres izazvan rastvorom PEG 6000 više uticao na porast nadzemnog dela ponika u odnosu na koren, kao i da su te promene bile statistički značajne već pri rastvoru od 5%, što bi odgovaralo rastvoru osmotskog potencijala od $-0,1\text{MPa}$. Smanjenje dužine nadzemnog dela ponika u prisustvu nekoliko koncentracija rastvora PEG na 12 sorti graška uočili su i Sánchez *i sar.* (2004), pri čemu je najveće smanjenje registrovano pri najvećem osmotskom potencijalu rastvora ($-1,5\text{MPa}$). Inhibicija rasta nije bila posledica toksičnog efekta PEG s obzirom na to da su biljke kada su izvađene iz rastvora PEG i prenete u posude sa vodom, nastavile rast u istom stepenu kao i kontrolne biljke. Prema tome, PEG utiče na rast ćelija i porast biljaka na taj način što smanjuje usvajanje vode od strane ćelija koje rastu. Kako je optimalni vodni režim (održanje turgora) neophodan za rast ćelija, nedostatak vode dovodi do nepravilne mitoze, smanjenja izduživanja i porasta ćelija, a što rezultuje smanjenjem porasta (Anjum *i sar.*, 2011; Abbasi *i sar.*, 2014). Ashraf *i sar.* (2010) ukazuju da osmotski stres dovodi do smanjenja deobe ćelija, kao i ćelijskog izduživanja, pre svega zbog otežanog usvajanja hraniva, nakupljanja velikih količina reaktivnih kiseoničnih vrsta (oksidativni stres), inhibicije ćelijskih enzima, gubitka turgora i hormonskog disbalansa. To sveukupno utiče na otežani rast biljaka, a kasnije se negativno odražava i na proizvodnju biomase i prinos.

Efekat ispitivanih tretmana na rastenje vegetativnih organa graška je praćen i preko merenja sveže i suve mase nadzemnog dela (slika 20 i 22) i korena ponika (slika 23 i 23). Ovi rezultati su, slično prethodnim parametrima rastenja, pokazali da je došlo do redukcije sa povećanjem nivoa stresa, i ona je u većini slučajeva bila statistički značajna već pri najnižem stepenu osmotskog stresa ($-0,1\text{MPa}$), kod svih sorti. Uočava se da je 15. dana eksperimenta smanjenje sveže

mase nadzemnog dela ponika, kao i smanjenje sveže mase korena, u odnosu na kontrolu, pri prvom nivou stresa, bilo nešto manje nego 10. dana eksperimenta. Sličan trend je dobijen i merenjem suve mase nadzemnog dela i korena ponika, što ukazuje na izvestan stepen povećanja tolerantnosti sorti pri dužem delovanju stresa. Poređenjem 10. i 15. dana uočava se da je sorta Mraz pri nivou stresa od $-0,1\text{MPa}$ imala isti procenat smanjenja suve mase nadzemnog dela u odnosu na kontrolu (65,1%), ali je to 10. dana eksperimenta predstavljalo najmanje, a 15. dana najveće smanjenje u odnosu na kontrolu, u poređenju sa ostalim sortama. Jednako smanjenje suve mase kod sorte Mraz nakon 10 i nakon 15 dana delovanja stresa, u odnosu na kontrolu, ukazuje na to da je na ovom nivou osmotskog stresa količina usvojene vode kod tretiranih biljaka bila sličnija količini usvojene vode kod kontrolnih biljaka i pri kraćem i pri dužem periodu tretiranja. Na osnovu toga, može se zaključiti da vreme trajanja tretmana nema velikog uticaja na promenu usvajanja vode pri navedenom nivou stresa kod ove sorte. Desetog dana eksperimenta Mraz, u odnosu na ostale sorte, sadrži više, a 15. dana manje suve mase u nadzemnom delu, tj. do 10. dana akumulira manju, a do 15. dana veću količinu vode. Prema tome, u odnosu na ostale sorte, Mraz je tolerantniji na nivo osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ pri dužem delovanju stresa. Sorta Pionir ima najniže vrednosti suve mase korena ponika u odnosu na ostale sorte i 10. i 15. dana eksperimenta. Kod ove sorte vreme trajanja tretmana nema velikog uticaja na promenu suve mase.

Ramos *i sar.* (1999) su ukazali na to da vodni deficit smanjuje akumulaciju sveže mase biljnih organa u većem stepenu nego suve mase, što je i jedan od znakova nedostatka vode u biljkama. Dobijeni rezultati su usaglasnosti sa rezultatima Okçu *i sar.* (2005) kod kojih su merenja i sveže i suve mase ponika graška pokazala smanjenje u odnosu na kontrolu pri potencijalu od $-0,2\text{MPa}$, dok pri $-0,4\text{MPa}$ nisu uspeali da izvrše merenja, što ukazuje na izuzetnu osetljivost ispitivanih sorti na osmotski potencijal i sušu. Slične rezultate smanjenja sveže i suve mase ponika kod graška i pšenice su objavili i Alexieva *i sar.* (2001), kao i Kumar *i sar.* (2011) ispitivanjem kajana. Odnos nadzemni deo/koren sveže mase

sorti graška tolerantnih na sušu je značajno manji u odnosu na osetljive biljke, kako ističu Magyar-Tábori *i sar.* (2011). Genetski potencijal biljaka za porast, takođe, utiče na osetljivost na osmotski stres i sušu. Prema Iwaya-Inoue *i sar.* (2003) patuljaste sorte graška su se pokazale kao otpornije u odnosu na visoke genotipove i kod njih je utvrđeno manje smanjenje i dužine i sveže mase nadzemnog dela u odnosu na kontrolu. Prema Poorter i Nagel (2000) smanjenje odnosa nadzemnog dela i korena javlja se u uslovima suše, ali i u uslovima nedostatka hranljivih materija i visokih temperatura zemljišta nepovoljnih za optimalno funkcionisanje korena kada dolazi do povećanja dužine i preraspodele korena u zemljištu.

U istraživanjima u ovoj disertaciji je praćen i odnos suve mase nadzemnog dela i korena ponika kao pokazatelj koji može da ukaže na to da li je tretman uticao više na rast izdanka ili korena, kao i na pravac transporta asimilata (slika 24). Za sortu Pionir su utvrđene vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena veće od 1,00 kako 10. tako i 15. dana merenja, a što ukazuje da je kod ove sorte efekat stresa bio više izražen na nivou korena nego nadzemnog dela. Najmanju vrednost odnosa suve mase nadzemnog dela i korena desetog dana eksperimenta u kontroli je imala sorta Partner, dok je na oba nivoa stresa najmanju vrednost imala sorta Trezor. Petnaestog dana je najmanju vrednost odnosa suve mase nadzemnog dela i korena u kontroli i pri prvom stepenu stresa imao Dukat, a pri -0,1MPa Javor. Manje vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena ukazuju na veće efekat stresa na nadzemni deo biljke u odnosu na koren. U uslovima suše, redukovano je usvajanje nutrienata korenom i transport nutrienata iz korena u nadzemni deo biljke, usled redukovanog intenziteta transpiracije i aktivnog transporta. Smanjenje vrednosti odnosa suve mase nadzemnog dela i korena utvrdili su i Moayedi *i sar.* (2009) primenom PEG rastvora do -0,3MPa u eksperimentu sa durum pšenicom.

Kod većine sorti pojačana je akumulacija suve materije u korenu već pri -0,1MPa (Junior, Dukat, Partner, Trezor), dok je kod sorti Mraz i Javor pojačana pri jačem osmotskom potencijalu (-0,2MPa). Za razliku od 10. dana, 15. dana je odnos

suve mase nadzemnog dela i korena manji od 1,00 već pri $-0,1\text{MPa}$ samo kod sorte Dukat, dok je kod sorti Javor i Partner pri $-0,2\text{MPa}$. Ukoliko se uporede vrednosti izmerene 10. i 15. dana uočava se da je nivo osmotskog stresa od $-0,1\text{MPa}$ kod većine sorti (Junior, Dukat, Partner i Trezor) više uticao na akumulaciju suve mase u korenovom sistemu 10. dana u odnosu na 15. dan. Jedino je kod sorte Dukat došlo do veće akumulacije suve mase u korenu 15. dana u odnosu na 10. dan.

Kod sorte Dukat se jedino u oba perioda odnosa suve mase nadzemnog dela i korena spušta ispod 1,00 već pri $-0,1\text{MPa}$, a što ukazuje da se kod ove sorte već u prvim fazama izlaganja biljaka stresu asimilati upućuju ka korenu.

Dobijeni rezultati merenja fizioloških parametara takođe pokazuju da je generalno kod svih sorti, pod uticajem osmotskog stresa, došlo do smanjenja praćenih parametara u odnosu na kontrolu. Nakon 15 dana delovanja tretmana opadanje merenih vrednosti se nastavilo, ali smanjenim intenzitetom odnosu na 10. dan, što ukazuje da je ispitivanim sortama potrebno duže vremena da se adaptiraju na uslove osmotskog stresa i tako smanje njegovo negativno dejstvo.

Jaleel *i sar.* (2009) su istakli da je akumulacija suve mase poželjna karakteristika u slučaju vodnog deficita, dok Sakthivelu *i sar.* (2004) tvrde da je suva masa u korelaciji sa tolerantnošću na sušu. Na osnovu podataka suve mase nadzemnog dela i ponika biljaka u kontrolnoj i tretiranoj grupu mogu se izračunati vrednosti indeksa tolerantnosti na sušu, kao i na druge stresne faktore (Maiti *i sar.*, 1994). Naghavi *i sar.* (2013) su dokazali da indeks tolerantnosti predstavlja najpogodniji parametar za skrining sorti otpornih na sušu, s obzirom na to da je u pozitivnoj korelaciji sa višim prinosima pod uticajem suše. Do sličnog zaključka su došli i Dharanguttikar *i sar.* (2015). Sio-Se Mardeh *i sar.* (2006), kao i Farshadfar *i sar.* (2012) su, pored drugih parametara, koristili i indeks tolerantnosti za skrining sorti pšenice na otpornost na sušu.

Indeks tolerantnosti je u ovoj disertaciji izračunat posebno za nadzemni deo i posebno za koren ponika, za svaki nivo stresa (slika 25 i 26). Indeks tolerantnosti

kod kontrole iznosio je 1. Izračunate vrednosti za nadzemni deo, kod biljaka koje su bile izložene osmotskom stresu, pokazale su trend smanjenja sa povećanjem nivoa stresa kod svih sorti i nakon kraćeg i nakon dužeg perioda izlaganja stresu, što ukazuje na smanjenje tolerantnosti ispitivanih sorti na pojačano delovanje stresa. Indeks tolerantnosti nadzemnog dela, međutim, i pri $-0,1\text{MPa}$ i pri $-0,2\text{MPa}$ kod većine sorti je bio viši 15. dana eksperimenta u odnosu na 10. dan, odnosno tolerantnost se povećava prilikom dužeg delovanja osmotskog stresa.

Indeks tolerantnosti korena je, takođe, kao i u slučaju indeksa tolerantnosti nadzemnog dela, kod svih sorti bio viši 15. dana eksperimenta. Jedini izuzetak je sorta Mraz kod koje je bio viši 10. dana eksperimenta.

Do zaključka da stresni uslovi imaju veći uticaj na indeks tolerantnosti nadzemnog dela biljke nego na korenov sistem su došli i Maiti *i sar.* (1994). Smanjenje indeksa tolerantnosti, pod uticajem osmotskog stresa izazvanog NaCl, utvrdili su i Dang *i sar.* (2011).

Poređenje vrednosti indeksa tolerantnosti nadzemnog dela i korena ukazuje da su vrednosti indeksa tolerantnosti korena značajno veće u odnosu na vrednosti za nadzemni deo ponika, pri svim nivoima stresa i u oba vremenska perioda merenja. Dobijene vrednosti za koren pod uticajem stresa su bliže kontrolnim vrednostima, u odnosu na vrednosti za nadzemni deo ponika, što ukazuje na manji uticaj osmotskog stresa na akumulaciju suve mase u korenu u odnosu na nadzemni deo. Uzimajući u obzir dobijene vrednosti indeksa tolerantnosti nadzemnog dela i korena u oba vremenska intervala, na svim nivoima stresa i međusobnim poređenjem sorti, može se reći da sorta Mraz ipak spada u grupu tolerantnih sorti, zajedno sa sortama Dukat i Pionir. Trezor i Partner spadaju u grupu srednje tolerantnih sorti, dok su Junior i Javor najmanje tolerantne sorte.

6.1.3. Osmotski stres i koncentracija abscisinske kiseline

Biljke obično reaguju na vodni deficit u zemljištu ili u supstratu u kome rastu tako što zatvaraju stome i redukuju rast listova kako bi smanjile transpiracionu površinu (Wilkinson i Davies, 2008; Goodger *i sar.*, 2005). Ovi odgovori na stres mogu biti inicirani tzv. hemijskim (Davies i Zhang, 1991) ili hidrauličnim signalima (Gowing *i sar.*, 1990).

Hidraulični signali podrazumevaju promene u vodnom statusu lista do kojih dolazi zbog smanjenog usvajanja vode korenom i opadanja turgora u ćelijama lista (Goodger *i sar.*, 2005). Do opadanja rasta listova i zatvaranja stominih ćelija može doći i kao rezultat tzv. hemijskih signala suše (Gowing *i sar.*, 1990; Dodd *i sar.*, 1996). Po ovom konceptu, koren je veoma značajan "senzor" promena u zemljištu (ne samo smanjenja količine vode, već i promena u mehaničkom sastavu). O tim promenama koren "obaveštava" nadzemni deo tako što sintetise različita jedinjenja i metabolite (uključujući hormone abscisinsku kiselinu, etilen i citokinine, šećere, jone). Rezultati Davies i Zhang (1991) su pokazali da se u prvim fazama vodnog deficita ABA počinje akumulirati u korenu. Kao posledica promenjene pH vrednosti ksilemskog soka, pod uticajem vodnog deficita, sintetisana jedinjenja se, kao hemijski signali stresa, transportuju ksilemom do nadzemnog dela gde izazivaju zatvaranje stoma i redukuju rast ćelija lista (Bahrun *i sar.*, 2002; Davies *i sar.*, 2002; Davies *i sar.*, 2005; Schachtman i Goodger, 2008; Wilkinson i Davies, 2008).

Istraživanja u okviru disertacije su obuhvatila merenje hormona abscisinske kiseline u nadzemnim delovima ponika, dok su merenja u korenu ponika pokazala izuzetno niske vrednosti koje su nastale kao posledica ispiranja ABA prilikom čišćenja korena od ostataka rastvora PEG i nagomilanih čestica supstrata (rezultati nisu prikazani), pa su u daljem toku eksperimenta vršena merenja ABA samo u nadzemnom delu ponika. Desetog dana ispitivanja kod sorti Mraz, Trezor i Dukat je došlo do opadanja koncentracije ABA u odnosu na kontrolu pri najnižem nivou osmotskog stresa, dok je kod sorti Javor, Partner i Junior došlo

do porasta (slika 27). Petnaestog dana tretmana uočava se trend opadanja koncentracije ABA, osim kod sorte Javor. Sorta Pionir ne pokazuje statistički značajne razlike u sadržaju ABA 10. i 15. dana ispitivanja.

Prema literaturnim podacima (Chapin *i sar.*, 1988; Zhang i Davis, 1989; Kefu *i sar.* 1991; Shashidhar *i sar.*, 1996; Zdunek, 2001) inhibicija nadzemnog dela biljke pod uticajem većeg broja stresnih faktora je povezana sa znatnom akumulacijom ABA. Rezultati predstavljeni u disertaciji su delom u skladu sa rezultatima drugih autora, s obzirom na to da je kod 3 ispitivane sorte (Javor, Partner i Junior) došlo do smanjenja porasta nadzemnog dela i korena ponika i značajnog povećanja sadržaja ABA. Ovi rezultati indirektno ukazuju da je ABA imala ulogu "hemijskog signala suše" kod ovih sorti. Međutim, u ovom istraživanju nije bilo moguće merenje koncentracije ABA u korenu ponika ili ksilemske ABA, što bi moglo da potvrdi ovu hipotezu.

Takođe, se može pretpostaviti da je kod ostalih sorti, kod kojih nije došlo do akumulacije ABA (Mraz, Dukat, Pionir, Trezor), redukcija rastjenja nastala kao rezultat tzv. "hidrauličnih signala" odnosno opadanja turgora u ćelijama, a do kojeg je došlo zbog smanjenog usvajanja i transporta vode do nadzemnih delova pod dejstvom osmotskog stresa. Ova hipoteza je takođe indirektna i da bi se proverila bilo bi potrebno obaviti merenja turgora u poncima, ali za takvu vrstu merenja ne postoji odgovarajuća metodologija.

6.1.4. Osmotski stres i aktivnost antioksidativnih enzima

Vodni stres je neminovno povezan sa povećanim oksidativnim stresom zbog pojačane akumulacije ROS, posebno $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 u hloroplastima, mitohondrijama i peroksizomima. Kao rezultat toga aktivacija antioksidativnih enzima je opšta adaptaciona strategija koju biljke koriste da prevaziđu oksidativni stres (Foyer i Noctor, 2003; Abedi i Pakniyat, 2010). Objavljeni su kontradiktorni rezultati za aktivnost antioksidativnih enzima kod različitih biljnih vrsta (povećana aktivnost, smanjena aktivnost, bez promena). Ove razlike u aktivnosti

antioksidativnih enzima izazvane abiotičkim stresom ne zavise samo od vrste i trajanja stresa, već i od biljne vrste, genotipa, faze razvoja biljke, kao i dela biljke u kome se analizira aktivnost enzima (Carvalho, 2008). U ovom radu bila su razmatrana tri enzima: superoksid dizmutaza, askorbat peroksidaza i glutation reduktaza.

Sposobnost biljaka da prevaziđu oksidativni stres delom se oslanja na indukciju aktivnosti SOD, a zatim i na aktivnost ostalih antioksidativnih enzima (Sekmen *i sar.*, 2012). U dosadašnjoj literaturi SOD je uglavnom opisan kao enzim koji se prvi aktivira u uslovima različitih stresnih faktora. Njegova uloga je da katalizira dismutaciju superoksidnih radikala i pretvara ih u manje toksičan vodonik peroksid i kiseonik, te se na taj način smanjuje opasnost od nastanka mnogo reaktivnijeg hidroksilnog radikala (Gill i Tuteja, 2010)

Istraživanja u okviru ove disertacije su pokazala da se ispitivane sorte ne razlikuju u značajnoj meri u aktivnosti SOD u nadzemnom delu i korenovima, ali da se razlike ispoljavaju pod dejstvom osmotskog stresa i dužine njegovog trajanja (tabela 6 i 7). Kod većine sorti je došlo do povećanja aktivnosti u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana delovanja osmotskog stresa od -0,1MP, osim kod sorti Junior i Javor kod kojih je došlo do smanjenja. Sa produženim delovanjem stresa, nakon 15 dana tretmana, došlo je do opadanja aktivnosti SOD, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na vrednosti izmerene 10. dana tretmana, kod svih sorti. Jedini izuzetak je sorta Trezor kod koje se aktivnost SOD povećava konstantno povećava i posle 10 dana trajanja stresa (od 29,70 do 33,80 nmol/min/mg proteina) i posle 15 dana trajanja stresa (od 10,40 do 25,20 nmol/min/mg proteina).

Vodonik peroksid, nastao kao rezultat delovanja SOD, je toksičan za ćeliju. Zbog toga je važno da se H₂O₂, pomoću antioksidativnog sistema, brzo ukloni, odnosno razloži na vodu i molekularni kiseonik (Guo *i sar.*, 2006). Askorbat peroksidaza je, uz katalazu, vrlo važan enzimatski antioksidans, čija je glavna uloga uklanjanje H₂O₂. Za razliku od CAT, APx koristi askorbat kao donor elektrona. Ima

znatno veći afinitet prema H_2O_2 od katalaze i njena uloga je presudna tokom stresa (Asada 2006; Ozkur *i sar.*, 2009).

U našim istraživanjima u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana delovanja osmotskog stresa osmotskog potencijala od $-0,1MP$, kao i u slučaju SOD, prvobitno je došlo do povećanja aktivnosti APx kod većine sorti, osim kod sorti Junior i Javor kod kojih je došlo do smanjenja (tabela 8 i 9) . Najveće procentualno povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu je uočeno kod sorte Mraz (801,80%) i ona se izdvojila od ostalih sorti, dok je najveće smanjenje od 87,61% izmereno kod sorte Junior. Nakon 15 dana delovanja stresa, došlo je do značajnog opadanja aktivnosti APx u odnosu na kontrolu, kao i u odnosu na vrednosti izmerene 10. dana, kod većine sorti, osim kod sorti Pionir i Trezor kod kojih se javlja neznatno povećanje.

Kao i kod aktivnosti SOD, jedino je kod sorte Javor došlo do opadanja aktivnosti APx i u nadzemnom delu i u korenu ponika u oba vremenska perioda merenja aktivnosti, kao i sa vremenom trajanja stresa, odnosno 15. dana u odnosu na 10. dan. Kod sorte Trezor je bio obrnut trend promene, tj. došlo je do konstantnog povećanja aktivnosti APx.

Unutarćelijska koncentracija H_2O_2 određena je brzinom njegovog nastajanja i razlaganja pomoću enzima CAT i enzima glutathion-askorbat ciklusa (APx, DHAR i GR). Glutathion reduktaza katališe posljednji korak glutathion-askorbatnog ciklusa i vrlo često je ograničavajući faktor. Povišene aktivnosti GR povećavaju odnos redukovanog i oksidovanog glutathiona (GSH/GSSG) koji je potreban za regeneraciju askorbata. Povećanje aktivnosti ovog enzima izaziva jaču redukciju ukupnog glutathiona što povećava otpornost prema stresu i dovodi do prilagođavanja biljaka na stresne uslove (Foyer i Noctor, 2000; Gill i Tuteja, 2010).

Kao i u slučaju SOD i APx, naši rezultati ispitivanja aktivnosti GR u nadzemnom delu ponika nakon 10 dana delovanja osmotskog stresa osmotskog potencijala od $-0,1MP$, pokazuju da je došlo do povećanja aktivnosti GR kod većine sorti, osim kod sorti Junior i Javor kod kojih je došlo do smanjenja (tabela 10 i 11).

Petnaestog dana ispitivanja kod svih sorti, osim kod sorte Trezor, je došlo do opadanja aktivnosti GR kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na deseti dan. Najveća promena 15. dana u odnosu na kontrolu bilo je povećanje aktivnosti kod sorte Trezor od 242,31% u odnosu na kontrolu, dok je najveće smanjenje od 78,4% bilo kod sorte Mraz.

Merenjem aktivnosti GR u korenu ponika uočeno je povećanje aktivnosti 10. dana kod većine sorti, osim kod sorti Javor i Partner. Najveća promena u odnosu na kontrolu bilo je povećanje aktivnosti kod sorte Mraz (205,59% u odnosu na kontrolu), a najveće smanjenje aktivnosti od 34,39% u odnosu na kontrolu bilo je kod sorte Javor. U odnosu na 10. dan tretmana, 15. dana se uočava opadanje aktivnosti GR u korenu kod većine sorti, odnosno smanjuje se njihova antioksidativna sposobnost, osim kod sorti Junior i Trezor. Najveće povećanje u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorte Junior (215,39%), a najveće smanjenje je pokazala sorta Mraz (30,25% u odnosu na kontrolu). Kao i u slučaju nadzemnog dela, sorta Mraz je 10. dana pokazala najveće povećanje aktivnosti GR u korenu (205,59%), a 15. dana najveće smanjenje (30,25%). Kao i u slučaju SOD i APx, kod sorte Trezor su uočene najveće vrednosti GR u oba vremenska perioda merenja i u nadzemnom delu i u korenu, dok su kod sorte Javor uočene najmanje vrednosti.

Jovanović *i sar.* (2011a) su istakli povećanu aktivnost APx i GR u početnim fazama dehidracije kod endemične biljne vrste *Ramonda nathaliae* tolerantne na vodni deficit. Mnogi autori su objavili rezultate pojačane aktivnosti GR kod raznih biljnih vrsta pod uticajem stresnih faktora kao što su suša (Rubio *i sar.*, 2002; Zhang *i sar.*, 2004; Sharma i Dubey, 2005; Ma *i sar.*, 2011; Varga *i sar.*, 2012), zaslanjenost (Ahmad *i sar.*, 2008; Jovanović *i sar.*, 2011b), teški metali (Dixit *i sar.*, 2001; Malecka *i sar.*, 2001, 2009, 2012, 2014). Ma *i sar.* (2011) su mereći enzime askorbat-glutation ciklusa u uslovima suše, na listovima jabuka, pokazali da se ovaj ciklus svakako aktivira kao odgovor na sušom izazvani stres, ali u uslovima jakog stresa aktivnost enzima se smanjuje i ciklus se zatim ne može normalno regulisati.

Dobijeni rezultati pokazuju da se, kao odgovor na oksidativni stres i akumulaciju ROS kod ispitivanih sorti, uključuju različiti antioksidativni enzimi (Prilog 1, tabela 1 i Prilog 2, tabela 1). Tako se kod sorte Trezor mehanizam uklanjanja ROS bazira na konstantno povećanoj aktivnosti SOD, APx i GR i u nadzemnom delu i u korenu ponika. To može da objasni povećanu tolerantnost i nadzemnog dela i korena ove sorte na osmotski stres. Kod sorti Mraz, Dukat, Pionir i Partner antioksidativni mehanizam se zasniva na povećanju aktivnosti sva tri ispitivana enzima u nadzemnom delu ponika 10. dana ispitivanja enzima, dok se 15. dana javlja jedino povećana aktivnost APx kod sorte Pionir. Kod sorti Junior i Javor javlja se smanjenje aktivnosti enzima u oba perioda ispitivanja što doprinosi smanjenju tolerantnosti na osmotski stres nadzemnog dela, koje je naročito izraženo kod sorte Javor. Iako koren ponika kod svih sorti pokazuje veću tolerantnost u odnosu na nadzemni deo, aktivnost antioksidativnih enzima je manje izražena. Sorte Mraz, Junior i Dukat pokazuju povećanje aktivnosti SOD, APx i GR u korenu ponika nakon 10 dana. Kod sorte Pionir mehanizam uklanjanja ROS 10. dana se zasniva na aktiviranju SOD i GR, dok se kod sorte Partner aktivira samo SOD. Nakon 15 dana kod sorte Junior se povećava aktivnost APx i GR, kod sorte Pionir SOD, APx, a kod sorte Dukat samo APx, dok kod sorti Mraz i Partner, uz sortu Javor, dolazi opadanja aktivnosti svih enzima. S obzirom na to da je generalno indeks tolerantnosti nadzemnog dela kod svih sorti veći nakon 15 dana, kao i u korenu u odnosu na nadzemni deo, može se pretpostaviti da u tim slučajevima veću ulogu u antioksidativnoj zaštiti, imaju neki drugi mehanizmi otpornosti, kao što su osmoregulacija, sinteza proteina otpornih na sušu i sl. (Chaves *i sar.*, 2003), kao i da je verovatno došlo do poremećaja u sinergiji antioksidativnih enzima (Jovanović *i sar.*, 2011a).

6.1.5. Ekspresija gena pod uticajem osmotskog stresa

Vrlo je malo literaturnih podataka vezanih za molekularnu karakterizaciju odgovora graška na osmotski stres izazvan rastvorom osmotikuma u laboratorijskim uslovima. Iz literaturnih podataka je poznato samo o uticaju PEG

na ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu osmoprotektanata oligosaharida u poncima kod vrste *P. sativum* (Pluskota i sar., 2015).

Rezultati koji su dobijeni merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, APx, GR) u poncima stočnog graška nedvosmisleno ukazuju na postojanje oksidativnog stresa tokom tretmana rastvorom PEG osmotskog potencijala od -0,1MPa, tako da nije neočekivano da se u takvim uslovima poveća ekspresija enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu.

Rezultati analize ekspresije gena, koji kodiraju antioksidativne enzime, su prikazani za genotipove stočnog graška, kod kojih su uočene najveće promene u aktivnosti antioksidativnih enzima pod uticajem osmotskog stresa u odnosu na kontrolu (slika 47 - 49). Uočava se da je kod sorte Mraz ekspresija sva tri ispitivana gena u nadzemnom delu i korenu ponika (osim Cu/ZnSOD u korenu ponika), pod uticajem osmotskog stresa od -0,1MPa, 10. dana bila najveća, dok je 15. dana došlo do opadanja ekspresije, kada se kod sorte Mraz javlja najmanja ekspresija gena (osim ekspresije cAPx u korenu 15. dana). Kada je u pitanju aktivnost enzima SOD, APx, i GR ona, takođe, kod sorte Mraz prati trend opadanja 15. dana u odnosu na 10. dan. Prethodno je već istaknuto da je kod sorte Mraz nakon 10 dana došlo do najmanjeg smanjenja u odnosu na kontrolu većine ispitivanih fizioloških parametara, kao što su sveža i suva masa nadzemnog dela, kao i odnos suve mase nadzemnog dela i korena. Međutim, nakon dužeg perioda izlaganja osmotskom stresu, tolerantnost ove sorte se smanjuje i ona 15. dana pokazuje najveće smanjenje dužine nadzemnog dela, sveže mase korena, suve mase nadzemnog dela i korena, što može biti posledica smanjene ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime, a samim tim i aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima, a što rezultuje smanjenom sposobnošću sorte da se adaptira na delovanje osmotskog stresa.

Takođe, se uočava da je ekspresija gena za ispitivane antioksidativne enzime u korenu ponika 10. dana tretmana bila najmanja kod sorte Javor, kod koje se javlja i najmanja aktivnost navedenih enzima u ispitivanom organu nakon 10

dana delovanja osmotskog stresa. Kod ove sorte je prethodno uočeno najveće smanjenje većine ispitivanih fizioloških parametara, naročito u korenu ponika, u odnosu na kontrolu, pa se može pretpostaviti, a imajući u vidu smanjenu ekspresiju gena za antioksidativne enzime u korenu ponika, da je smanjenja tolerantnost ove sorte na osmotski stres u odnosu na druge sorte posledica manjeg antioksidativnih zaštitnih mehanizama

Pokazano je i da je *Arabidopsis* 18s rRNK pogodna za korišćenje kao referentni gen u eksperimentima gde se prati ekspresija gena u uslovima abiotičkog stresa, jer je karakteriše stabilnost ekspresije tokom uslova abiotičkog stresa.

Regulacija gena za SOD je veoma osetljiva na uticaj abiotičkih stresora, kao što su niske temperature, suša ili zaslanjenost zemljišta (Zhang *i sar.*, 2014). Prema Ahmad *i sar.* (2013) kako bi se osigurao stabilan prinos, pod uticajem raznih abiotičkih stresnih faktora, neophodno je da se poveća procenat klijavosti semena i porast ponika jačanjem antioksidativne zaštite biljke preko pojačane ekspresije antioksidativnih enzima. Lee *i sar.* (2014) su pokazali da pojačana ekspresija Cu/ZnSOD i AP_x kod transgenih biljaka duvana može da dovede do povećane tolerantnosti na osmotski stres izazvan delovanjem osmotikuma, naročito u toku klijanja i porasta ponika. Utvrđena je pozitivna korelacija između otpornosti na sušu i ekspresije Cu/ZnSOD kod kukuruza (Malan *i sar.*, 1990) i paradajza (Perl-Treves *i sar.*, 1991). Zagađenost teškim metalima, kao što je Cd, dovela je, međutim, do smanjene ekspresije Cu/ZnSOD kod graška, dok je ekspresija FeSOD i MnSOD ostala nepromenjena (Rodríguez-Serrano *i sar.*, 2006). Razlike u dobijenim rezultatima bi se mogle objasniti mehanizmom delovanja različitih stresnih faktora, kao i razlikama u antioksidativnim mehanizmima kod raznih biljnih vrsta, organa i tkiva na koje deluju stresori. Što se tiče dva enzima askorbat-glutation ciklusa (AP_x i GR), dokazana je pojačana ekspresija gena u slučaju vodnog deficita kod pasulja (Turkan *i sar.*, 2005; Torres-Franklin *i sar.*, 2008), lucerke (Rubio *i sar.*, 2002) i *Vigna unguiculata* (D'Arcy-Lameta *i sar.*, 2006).

U poslednjem koraku biosinteze ABA od ABA - aldehida učestvuje enzim aldehidna oksidaza (AO), čija je ekspresija povećana za vreme vodnog deficita što ukazuje na važnu ulogu ABA u odgovoru biljaka na stres (Seo *i sar.*, 2000; Arve *i sar.*, 2011).

U ispitivanjima ove disertacije je analizirana ekspresija 3 gena (*PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3*), koji učestvuju u sintezi abscisinske kiseline kod ponika odabranih genotipova stočnog graška, kod kojih je došlo do povećanja, odnosno smanjenja sadržaja ABA u odnosu na kontrolu pod uticajem osmotskog stresa osmotskog potencijala od -0,1MPa. Tokom celog trajanja eksperimenta ekspresija gena *PsAO2* nije pokazala značajnije razlike u odnosu na kontrolu, dok se ekspresija gena *PsAO1* i *PsAO3* povećavala kod sorte kod koje je došlo do akumulacije ABA, odnosno smanjivala kod sorte kod koje je došlo do smanjene akumulacije ABA. Prema tome, može se pretpostaviti da u sintezi ABA u nadzemnom delu ponika, pod uticajem osmotskog stresa, veću ulogu imaju geni *PsAO1* i *PsAO3* u odnosu na *PsAO2*. Slične rezultate ekspresije gena *PsAO* grupe dobili su i Zdunek i Lips (2001), Zdunek-Zastocka *i sar.* (2004) i Zdunek-Zastocka (2008), ispitujući uticaj osmotskog stresa izazvanog povećanim koncentracijama NaCl kod graška.

Pojačana ekspresija gena, koji učestvuju u sintezi ABA (slika 40), verovatno je dovela do povećanja koncentracije ABA u ispitivanim organima kod sorte Javor. S obzirom na to da je inhibicija nadzemnog dela biljke, pod uticajem većeg broja stresnih faktora, povezana sa znatnom akumulacijom ABA, pojačana ekspresija ispitivanih gena, kao i pojačana akumulacija ABA, mogla je da dovede do smanjenja porasta i sveže mase nadzemnog dela ponika kod ove sorte, pod uticajem osmotskog stresa. Takođe je kod ove sorte slabija antioksidativna zaštita usled smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima.

Za razliku od sorte Javor, kod sorte Trezor, koja je na osnovu ispitivanih fizioloških parametara, kao i aktivnosti antioksidativnih enzima, tolerantnija na delovanje osmotskog stresa od sorte Javor, je došlo do smanjenja ekspresije gena

koji učestvuju u sintezi ABA (slika 40) i smanjenja akumulacije ABA, pa je prema tome i redukcija porasta ponika bila manja.

S obzirom na to da AO svoju katalitičku aktivnost pokazuje na raznim supstratima ovaj enzim, takođe, osim što učestvuje u povećanju količine ABA pod uticajem vodnog deficita, učestvuje i u stvaranju većih količina H_2O_2 i produkciji ROS (Yesbergenova *i sar.*, 2005; Zdunek-Zastocka, 2010). Na taj način posredno dovodi i do aktivacije antioksidativnih enzima (Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013).

6.2. Suša

6.2.1. Suša i rast biljaka

Rast ćelija je jedan od najosetljivijih procesa na dejstvo suše, pa je smanjen porast biljaka i njihovih organa jedan od prvih vidljivih znakova suše. U ogledu u ovoj disertaciji ispitivan je uticaj suše na svežu i suhu masu nadzemnog dela i korena biljaka i to na kraju eksperimenta, pri tretmanu jake suše (9% vlažnosti supstrata). Eksperimentalni podaci su pokazali da su najveće vrednosti sveže i suve mase nadzemnog dela i u suši i u optimalnim uslovima vodnog režima (sveža masa: kontrola 7,35 g, tretman 4,20 g, suva masa: kontrola 1,19 g, tretman 0,65 g) izmereni kod sorte Junior (slika 34 i 36). To je i bilo očekivano, s obzirom na to da je to sorta visine između 105 i 170 cm, indeterminantnog porasta, sa visokim učešćem lista u prinosu krme. Namanje vrednosti sveže mase nadzemnog dela su u oba tretmana izmerene kod sorte Javor (kontrola 3,02 g, tretman 1,89 g), dok su vrednosti suve mase u kontroli bile najniže kod sorte Javor (0,30 g), a u suši kod sorte Mraz (0,18 g). Poređenjem efekata suše i optimalnog navodnjavanja na biomasu kod ispitivanih sorti dobijaju se nešto izmenjeni rezultati. Najveći efekat sušom izazvane redukcije suve mase nadzemnog dela je utvrđen kod sorte Mraz (smanjenje za 63%), sledi sorta Junior (45%) a najmanji je kod sorti Trezor i Dukat (14% i 10%).

Da bi se još bliže uporedila osetljivost parametara rastenja na sušu kod ispitivanih sorti su izračunate vrednosti indeksa tolerantnosti i to posebno za nadzemni deo i posebno za koren biljaka pri tretmanu od 9% vode u supstratu (slika 39 i 40). Ovi rezultati, kao i rezultati biomase, potvrđuju da je kod sorte Dukat najveći stepen tolerantnosti na sušu nadzemnog dela ponika. Sa druge strane, najmanji indeks tolerantnosti na sušu nadzemnog dela je utvrđen kod sorte Trezor. Nizak stepen tolerantnosti, ali u manjem obimu, je utvrđen i za sortu Junior.

Istraživanja su pokazala i genotipske razlike i u akumulaciji biomase korena (sveže i suve) u oba tretmana, kao i u trendu njenog smanjenja pod dejstvom suše (slika 35 i 37). Prema literaturnim podacima vodni deficit može da deluje različito, i to ili da redukuje ili inhibira rast korena ili da u uslovima umerenog stresa čak povećava rast korena (Hooker i Thorpe, 1997). Postoji dosta neslaganja o tome da li su na sušu osetljiviji nadzemni deo ili koren. Rezultati Sharp-a (2002) su pokazali da je efekat suše mnogo manje izražen na nivou korena nego izdanka, jer koren može da nastavi sa rastom čak i u uslovima kada je pri niskim vrednostima potencijala vode rast izdanka obustavljen. Manji efekat suše na rast korena nego stabla ili listova je utvrđen i kod paradajza (Kulkarni i Deshpande, 2006). Riaz *i sar.* (2013) su ispitivanjem uticaja suše na biljke nevena došli do zaključka da je na početku eksperimenta došlo do povećanja korena, ali je sa produženim delovanjem suše došlo do njegovog smanjenog porasta. Ovi rezultati su pokazali i da je obrazovanje suve mase u korelaciji sa količinom transpirisane vode. Rezultati ove disertacije su u skladu sa rezultatima Pace *i sar.* (1999), koji su analizirali uticaj suše na biljke pamuka, i utvrdili da suša značajno više utiče na porast nadzemnog dela biljaka u odnosu na koren.

Najveće vrednosti u oba tretmana i sveže (2,45 g i 1,49 g) i suve mase (0,22 g i 0,17 g) korena su izmerene kod sorte Trezor, a najniže sveže mase korena u oba tretmana kod sorte Partner (1,42 g i 0,6 9g), dok je suva masa korena i u optimalnim uslovima i u suši bila najmanja kod sorte Javor (0,13 g i 0,07 g) (slika 37). Analiza promene biomase korena u suši u odnosu na vrednosti kontrole,

pokazuje da su najveće promene ostvarene kod sorte Trezor (opadanje sveže za 39% i suve za 21%), i Javor (opadanje suve mase korena za 43%), dok kod sorte Pionir nije utvrđena značajna promena sveže mase, a kod sorte Dukat suve mase korena.

Riaz *i sar.* (2013) ukazuju da mnoge biljne vrste odgovaraju na sušu na taj način što povećavaju udeo asimilata koji usmeravaju na rast nadzemnog dela čime povećavaju odnos sveže mase nadzemnog dela i korena. Samarah *i sar.* (2007) su takođe dobili slično povećanje odnosa sveže mase nadzemnog dela i korena se kod soje izložene dejstvu suše. Rezultati Poorter i Nagel (2000) su međutim pokazali suprotan efekat (smanjen odnos izdanak/koren) kao adaptivnu reakciju na sušu, nedostatke hranljivih elemenata i visoku temperaturu zemljišta.

Istraživanja odnosa suve mase nadzemnog dela i korena u ovoj disertaciji su ukazala da je stres suše različito uticao na transport asimilata između korena i nadzemnog dela kod ispitivanih genotipova (slika 38). Opadanje ovog odnosa kod sorti Junior i Mraz ukazuje da je suša uticala na transport ka korenu, a što je verovatno povećalo osetljivost nadzemnih delova ovih sorti prema suši, posebno Mraza. Sa druge strane, suprotan efekat (povećan odnos nadzemni deo/koren) je utvrđen kod sorte Javor što ukazuje da je transport asimilata bio prvenstveno orijentisan ka nadzemnim delovima biljaka. To može i da objasni najveći indeks osetljivosti korena na sušu koji je utvrđen kod ove sorte. Za razliku od drugih sorti kod sorte Dukat nije utvrđena značajna promena odnosa suve mase nadzemnog dela i korena, a ovako ujednačen transport asimilata je uticao i na to da je kod ove sorte najveći indeks otpornosti utvrđen i za nadzemni deo i za koren. Slične rezultate smanjenja suve mase i nadzemnog dela i korena biljke graška dobili su i Duzdemir *i sar.* (2009).

Poređenje odnosa suve mase nadzemnog dela i korena u suši sa osmotskim stresom od -0,2MPa (posle 15 dana) pokazuje da kod svih sorti u uslovima osmotskog stresa ovaj odnos opada i to mnogo više nego u suši (slika 24b i 38). Ti

rezultati ukazuju na značaj transporta asimilata ka korenu kao adaptivne reakcije reakcije na stres u ranim fazama razvoja biljaka.

Rezultati indeksa tolerantnosti nadzemnog dela (slika 39) i korena (slika 40) na sušu pokazuju najmanju promenu oba parametra kod sorte Dukat, dok je kod sorte Mraz najviše izražen pad tolerantnosti nadzemnog dela, a kod sorte Javor korena. Poređenje ovih rezultata sa vrednostima dobijenim u rastvoru PEG sa vrednostima osmotskog potencijala (-0,2MPa) i posle 15 dana (slika 24 i 25), a koje bi odgovaralo ispitivanom stepenu suše, ukazuju da je najveći indeks tolerantnosti nadzemnog dela i korena, slično kao i u suši, utvrđen za sortu Dukat, a najniži za nadzemni deo kod sorte Javor. Razlike se ispoljavaju u najvećoj osetljivosti korena (najniži indeks tolerantnosti) koja je utvrđena za sortu Mraz.

Na osnovu dobijenih indeksa tolerantnosti u oba ispitivana eksperimentalna sistema (osmotskog stresa i stresa suše) ispitivane sorte graška se mogu podeliti u tri grupe prema otpornosti na sušu: tolerantne (Dukat, Mraz, Pionir), srednje tolerantne (Partner, Trezor, Junior) i osetljive (Javor).

6.2.2. Suša i reakcije stominih ćelija

Istraživanja efekata suše su kod ispitivanih genotipova obuhvatila i merenja provodljivosti stominih ćelija (slika 41 i 43). To je od posebnog značaja jer je regulisanje provodljivosti stominih ćelija (g_s) osnovni mehanizam kontrole razmene gasova (H_2O i CO_2), održanja turgora i temperature listova kod biljaka (Pospíšilová, 2003). Reakcije stominih ćelija su od posebnog značaja za biljke izložene suši i drugim stresnim faktorima jer one na signale stresa u kraćem vremenskom intervalu reaguju tako što delimično smanjuju svoju provodljivost (transpiraciju) i to tako da se pri tome održi usvajanje CO_2 za fotosintezu, a u slučaju dugotrajne suše svojim daljim zatvaranjem sprečavaju jaku dehidraciju tkiva i tako pomažu preživljavanju. Te reakcije stominih ćelija se stoga definišu kao "primarna i sekundarna linija odbrane od suše" (Kang i Zhang, 2004).

Provodljivost stoma u ovom eksperimentu je merena za svaku sortu u kontroli pri optimalnom vodnom kapacitetu u zemljištu, kao i pri dva različita tretmana suše: umerena - 18% vode u supstratu i jaka suša - 9% vode u supstratu. Uočava se da postoji razlika između tretmana i da su sve sorte imale značajno nižu provodljivost stoma pri jakoj suši, ali i da su se sorte razlikovale u otvorenosti stominih ćelija i u optimalnim uslovima. Sorta Pionir je imala najmanju provodljivost stoma u suši od 18% vode u supstratu, dok je sorta Trezor imala najveću provodljivost. Pri jakoj suši se izdvojila se sorta Dukat sa najvećim vrednostima za provodljivost stoma, dok je najmanje vrednosti imala sorta Junior.

Da bi se efekti tretmana mogli pravilno tumačiti, urađena je regresiona analiza, koja je pokazala da su reakcije zatvaranja stoma, u uslovima suše, pratile opadanje sadržaja vode u zemljištu. Najveće razlike u reakcijama stoma ispitivanih genotipova ispoljile su se u uslovima umerene suše, dok su u uslovima jake suše sve sorte reagovalе slično - bržim zatvaranjem stoma. Sorta Dukat je u tretmanu umerene suše ispoljila najveću osetljivost stominih ćelija, jer se njihova provodljivost smanjila za 66,98% u odnosu na provodljivost u optimalnim uslovima. Slične su i reakcije sorte Pionir (smanjenje provodljivosti za 63,30%). Stome sorte Junior su u istom tretmanu pokazale manju osetljivost na sušu (52,98% u odnosu na kontrolu) i imale su izrazito veću provodljivost od provodljivosti stoma ostalih sorti. Međutim, sa daljim opadanjem vode u supstratu i jačim stresom, stome sorte Junior su se najbrže zatvorile i stoga je izmerena najmanja provodljivost (11,20% u odnosu na kontrolu). U poređenju sa reakcijama stominih ćelija drugih sorti kod sorte Partner je utvrđen najsporiji pad provodljivosti i najmanja osetljivost stoma na smanjenje sadržaja vode u zemljištu. Slične rezultate promene u provodljivosti stoma su utvrdili i Maksimović *i sar.* (2010), merenjem provodljivosti stoma na listovima biljaka graška pod uticajem zaslanjenosti, kao i Sassi *i sar.* (2010), koji su ispitivali uticaj osmotskog stresa na biljke pasulja.

6.2.3. Suša i koncentracija abscisinske kiseline

Niz literaturnih podataka pokazuje da je inhibicija rasta nadzemnog dela biljke pod uticajem većeg broja stresnih faktora povezana sa akumulacijom ABA u listovima (Zhang i Davis, 1989; Kefu *i sar.* 1991; Zdunek i Lips 2001; Achard *i sar.*, 2006; Prokić i Stikić, 2011). Merenje koncentracije ABA u listovima ispitivanih genotipova izloženih suši u ovoj disertaciji su to takođe potvrdila (tabela 12). Kod svih ispitivanih sorti je uočeno statistički značajno povećanje sadržaja ABA u listovima u odnosu na kontrolu u oba tretmana (slika 42, tabela 12). Najmanje povećanje ABA u odnosu na kontrolu pri oba tretmana bilo je kod sorte Javor (96% - T1 i 147% - T2), a najveće kod sorte Dukat (637% - T1 i 917% - T2). Ukoliko se porede tretmani suše, najmanje povećanje ABA pri jakoj, u odnosu na umerenu sušu, bilo je kod sorte Mraz, a najveće kod sorte Pionir. Sorta Dukat je pokazala najveću, a sorta Javor najmanju akumulaciju hormona stresa ABA u oba tretmana u odnosu na druge sorte.

Već je prethodno istaknuto da povećanje koncentracije ABA u ksilemu ima za posledicu smanjenje provodljivosti stominih ćelija, odnosno njihovo zatvaranje. Po konceptu tzv. "hemijskih signala suše" povećana akumulacija i transport ksilemske ABA dovodi do zatvaranja stoma. Sa druge strane, zatvaranje stoma može biti i rezultat tzv. "hidrauličnih signala suše" kada opadanje turgora (vodnog režima) u stominim ćelijama dovodi do zatvaranja stoma, ali merenja pokazatelja vodnog režima (potencijala vode ili njegovih komponenti) nisu vršena u ovom eksperimentu. Istraživanja, zbog problema u izolaciji potrebne količine ksilemskog soka, nisu obuhvatila merenja ksilemske ABA čija koncentracija može direktno da korelira sa reakcijama stominih ćelija. Stoga, korelacija između reakcija stoma i ABA u listovima (slika 43) ukazuje na indirektnu vezu između akumulacije ovog hormona i stepena otvorenosti stominih ćelija, odnosno na učešće "hemijskih signala" u reakcijama stoma. Međutim, količina ABA akumulirane u listovima ne mora biti od presudnog značaja za determinaciju otvorenosti stoma (Stoll *i sar.*, 2000), već je za funkcionisanje stoma mnogo značajnija koncentracija ABA u ksilemu (Jia i Zhang, 1999).

Korelativni odnosi između koncentracije ABA u listovima biljaka i provodljivosti stominih ćelija (slika 43) su pokazali da je kod sorte Dukat utvrđena i najveća akumulacija ABA u suši (od 88,00 do 895,00 ng/g sveže mase) i najveća osetljivost stominih ćelija (redukcija provodljivosti od 194,00 do 37,96 mmol/sec²), tako da je na osnovu toga i reakcije rasta biljaka zaključeno da su reakcije ove sorte na sušu rezultat obrazovanja "hemijskih signala" suše. Na osnovu manje osetljivosti stominih ćelija sorte Javor (od 166,57 do 30,66 mmol/sec²) i manje akumulacije ABA u suši (od 146,00 do 361,00 ng/g sveže mase), kao i promena u rastu, zaključeno je da su reakcije ove sorte na sušu rezultat "hidrauličnih signala" suše. Zaključeno je i da je dinamički odgovor stominih ćelija sorte Dukat, na sušom izazvanu akumulaciju ABA, značajna adaptivna reakcija koja ovoj sorti omogućava da u uslovima jake suše održi delimičnu otvorenost stoma i nastavak procesa asimilacije, a što je rezultiralo i najvećim indeksom tolerantnosti na sušu i nadzemnog dela i korena.

Poređenje rezultata akumulacije ABA u poncima i listovima je pokazalo značajne razlike između efekata osmotskog stresa i suše jer je kod većine sorti, za razliku od ogleda suše, koncentracija ABA smanjena pod dejstvom osmotskog stresa. Jedino je kod sorte Javor došlo do povećanja koncentracije ABA posle 15 dana tretmana od -0,2MPa. Različite rezultate za ispitivane eksperimentalne sisteme je teško objasniti zbog toga što nisu obavljena merenja koncentracije ABA u korenu ponika ili ksilemske ABA koji bi mogla da ukažu da li je efekat smanjenja rezultat smanjene biosinteze ABA u korenu ili njenog transporta. Takođe, treba uzeti u obzir i da je biosinteza ABA povezana sa biosintezom karotenoida, tako da, kao što je već navedeno, smanjena koncentracija ABA u nadzemnim delovima ponika može biti rezultat toga da se metabolički put u uslovima suše orijentiše u pravcu sinteze karotenoida koji su poncima neophodni i za procese metabolizma i kao antioksidativni agensi (Cutler i Krochko, 1999; Cazzonelli 2011; Ruiz-Sola *i sar.*, 2014; Van Norman *i sar.*, 2014; McAdam *i sar.*, 2015).

6.2.4. Suša i aktivnost antioksidativnih enzima

U ogledu suše, kao i u ogledu osmotskog stresa, je ispitivana aktivnost 3 ključna antioksidativna enzima i to: superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutation reduktaze. U ogledu stresa suše biljke su se nalazile u nešto kasnijem stadijumu razvoja u odnosu na biljke u ogledu osmotskog stresa. Zalivane su optimalno do pojave trećeg para listova, a zatim podvrgnute uticaju suše prestankom zalivanja do 9% vlažnosti u supstratu. Kod većeg broja sorti je došlo do povećanja aktivnosti SOD (tabela 13). Najveće povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu uočeno je kod sorti Junior i Pionir (114,49% i 114,87%). Kod sorte Dukat je nastavljen trend opadanja aktivnosti SOD, dok je kod sorte Trezor, za razliku od ogleda osmotskog stresa, pod uticajem suše došlo do opadanja aktivnosti i kod nje se javlja najveće smanjenje (72,97% u odnosu na kontrolne vrednosti). Zanimljiva je činjenica da je kod sorte Javor, kod koje je u ogledu osmotskog stresa došlo do konstantnog opadanja aktivnosti SOD i u nadzemnom delu i u korenu ponika, pod uticajem suše, u kasnijim stadijumima razvoja biljke, došlo do porasta aktivnosti (102,04% u listovima u ogledu suše). Kod sorte Junior je uočeno slično, odnosno nakon najvećeg opadanja aktivnosti u nadzemnom delu ponika 10. dana (58,72% u odnosu na vrednosti u kontroli) u poređenju sa ostalim sortama, nakon 15 dana delovanja osmotskog stresa aktivnost se neznatno povećala, iako je i dalje smanjena u odnosu na kontrolu (87,32%), a u ogledu suše se povećala na 114,49% u odnosu na kontrolu. Kod sorte Trezor je bila potpuno obrnuta situacija (162,41% 10. dana, 138,57% 15. dana, 72,97% ogled suše). Ostale ispitivane sorte su nakon opadanja aktivnosti SOD 15. u odnosu na 10. dan delovanja osmotskog stresa, pokazale porast aktivnosti enzima u kasnijim stadijumima razvoja i pod uticajem suše.

Nekoliko istraživanja je potvrdila vrlo visoku antioksidativnu efikasnost SOD pod uticajem vodnog deficita kod graška (Karataş *i sar.*, 2010; Osman, 2015) i drugih biljnih vrsta (Bakalova *i sar.*, 2004; Csiszar *i sar.*, 2005; Pan *i sar.*, 2006; Gunes *i sar.*, 2008; Xiao *i sar.*, 2008; Abedi *i sar.*, 2010; Pratap i Sharma., 2010; Kumar *i sar.*, 2011). O značajnoj ulozi SOD u tolerantnosti biljaka na oksidativni

stres izazvan većim količinama soli govore brojna istraživanja koja su pokazala povećanu aktivnost ovog enzima u genotipovima tolerantnim na zaslanjenost (Ahmad *i sar.*, 2008; Noreen i Ashraf, 2009; Jovanović *i sar.*, 2011b; Shahid *i sar.*, 2012). Kod nekih biljaka rezistencija na herbicide, koji izazivaju oksidativni stres, objašnjena je povećanjem aktivnosti SOD (Shaaltiel i Gressel, 1986). Joni teških metala, kao što je na primer Pb^{2+} , koji izazivaju i oksidativni stres, takođe dovode do povećanja aktivnosti SOD u pojedinim organima kontaminiranih biljaka (Malecka *i sar.*, 2001; Verma i Dubey, 2003; Malecka *i sar.*, 2009).

Međutim, utvrđeno je i smanjenje aktivnosti SOD u uslovima vodnog deficita kod različitih biljnih vrsta (Badiani *i sar.*, 1990; Liu *i sar.*, 2014; Li *i sar.*, 2015). Smanjena aktivnost SOD ukazuje da je aktivnost "hvatača slobodnih radikala" ovog enzima ugrožena ili može biti adaptacija biljaka na stres (Shahbazi *i sar.*, 2011). Smanjenje aktivnosti SOD može biti posledica oštećenja enzima pod uticajem stresa i ona može dovesti do akumulacije superoksidnih radikala (Jovanović *i sar.*, 2011b). Na delovanje SOD utiču priroda i intenzitet oksidativnog stresa. Ukoliko je osmotski stres veoma jak SOD neće biti u mogućnosti da povećanom aktivnosti deluje na njegovo smanjenje, već će biti oštećen kao posledica delovanja stresa. Konstantan osmotski stres srednje jačine izaziva početno povećanje aktivnosti SOD posle koga sledi smanjenje aktivnosti, a ukoliko je stres slab verovatno neće biti uočeno značajno povećanje aktivnosti SOD, jer će njegovu ulogu preuzeti glutation ili neki drugi neenzimski antioksidanti (Hasanuzzaman *i sar.*, 2013). Upravo iz razloga što brojna dosadašnja istraživanja nisu pokazala iste efekte ovog enzima tokom stresa, Zhang *i sar.* (2004) su ukazali na potrebu istraživanja pojedinih izoformi SOD u svrhu dobijanja novih saznanja. Alscher *i sar.* (2002) naglašavaju da postoje razlike u delovanju izoformi SOD koje se mogu povezati sa njihovim lokacijama unutar ćelije i mestima delovanja različitih oblika oksidativnog stresa. Tako, na primer, stresori koji ne utiču na aktivnost MnSOD verovatno deluju na hloroplaste. Moran *i sar.* su (1994) utvrdili da je pod uticajem suše kod graška došlo do promene odnosa pojedinih izoformi SOD (50% Cu/ZnSOD prema 30% MnSOD), što ukazuje na pojačanu produkciju $O_2^{\bullet-}$

u hloroplastima, verovatno kao posledicu smanjenog usvajanja CO₂ i povećanog prenosa elektrona sa fotosistema na O₂ pod uticajem stresa.

U ogledu stresa suše kod sorti Junior i Dukat, u odnosu na 15. dan delovanja osmotskog stresa, je došlo do povećanja aktivnosti APx i sorta Junior se izdvojila od ostalih sorti sa znatno višom vrednosti aktivnosti APx (47,20 nmol/min/mg prot), dok je kod sorte Pionir bilo obrnuto i došlo je do opadanja aktivnosti (tabela 14). Kod sorti Mraz, Javor i Partner se nastavlja opadanje aktivnosti APx, dok je kod sorte Trezor nastavljen trend porasta aktivnosti enzima. Najveće procentualno smanjenje aktivnosti u odnosu na kontrolu bilo je kod sorti Javor (16,76%) i Partner (17,78%), a najveće povećanje kod sorte Trezor (144,70%). Sorte Junior i Dukat su pokazale sličnu promenu aktivnosti enzima (povećanje od 132,03% i 131,05%) u odnosu na kontrolu. Kao i u slučaju SOD, uočljivo je da je jedino kod sorte Javor došlo do opadanja aktivnosti APx i u nadzemnom delu i u korenu ponika u oba vremenska perioda merenja delovanja osmotskog stresa, kao i ogledu suše, dok je kod sorte Trezor došlo do konstantnog povećanja aktivnosti APx.

Pod uticajem suše kod svih sorti je došlo do opadanja aktivnosti GR u odnosu na kontrolu. Jedini izuzetak je sorta Junior kod koje je došlo do značajnog povećanja aktivnosti (185,87%), što ukazuje na povećanu sposobnost ove sorte da se izbori sa delovanjem stresa u kasnijim fazama razvoja, za razliku od početnih faza razvoja ponika pod uticajem osmotskog stresa. Najveće smanjenje od 64,55% zabeleženo je kod sorte Partner. Sorte Dukat i Pionir su pokazale slično smanjenje aktivnosti GR (91,46% i 90,60%), a takođe i sorte Mraz i Javor (61,84% i 60,34%) (slika 46). Uočljivo je da je sorta Javor, kao i u slučaju APx, pokazala konstantno smanjenje aktivnosti enzima GR za sve vreme trajanja eksperimenta delovanja osmotskog stresa i delovanja suše. Kod sorte Trezor se uočava da je, iako je imala visoku aktivnost GR u ogledu osmotskog stresa, u kasnijim fazama razvoja, u ogledu suše došlo do značajnog opadanja aktivnosti na 77,57% od kontrolnih vrednosti. Uočljivo je da je sorta Javor, kao i u slučaju APx, pokazala konstantno smanjenje aktivnosti enzima GR za sve vreme trajanja eksperimenta delovanja osmotskog stresa i delovanja suše. Kod sorte Trezor se uočava da je, iako je imala

visoku aktivnost GR u ogledu osmotskog stresa, u kasnijim fazama razvoja, u ogledu suše došlo do značajnog opadanja aktivnosti na 77,57% od kontrolnih vrednosti.

Prema Jovanović *i sar.* (2006) ponici i listovi biljaka u kasnijim stadijumima vegetativnog razvoja imaju različite mehanizme antioksidativne zaštite. Mittler i Zilinskas (1994) ističu da je i malo povećanje aktivnosti APx, kao odgovor na stres suše, dovoljno za uklanjanje povećane količine H₂O₂ koja nastaje pri delovanju ovog stresa. Pojačana aktivnost peroksidaza pod uticajem osmotskog stresa izazvanog rastvorom PEG 6000 utvrđena je kod tolerantnih genotipova mungo pasulja (Pratap i Sharma, 2010), kajana (Kumar *i sar.*, 2011), deteline (Wang *i sar.*, 2011), uljane repice (Mirzaee *i sar.*, 2013), pšenice (Naderi *i sar.*, 2014). Osman (2015) ističe da je suša uticala na povećanje aktivnosti SOD u listovima graška u kasnijim stadijumima vegetativnog razvoja i pri cvetanju, a posledično i na povećanje aktivnosti drugih antioksidativnih enzima kao što su APx i GR. Slično povećanje aktivnosti APx su dobili i Karataş *i sar.* (2012). Brojna su istraživanja uloge APx u tolerantnosti biljaka graška na oksidativni stres izazvan većim količinama soli (Hernandez *i sar.*, 2000; Gómez *i sar.*, 2004; Ahmad *i sar.*, 2008; Noreen i Ashraf, 2009; Shahid *i sar.*, 2012). Sva ova istraživanja ukazuju na višestruko povećanje aktivnosti APx kod tolerantnih sorti graška, a smanjenje kod osetljivih na osmotski stres. Utvrđeno je da se aktivnost peroksidaza povećava istovremeno sa povećanjem aktivnosti drugih antioksidativnih enzima kao što su SOD, CAT i GR, kao odgovor na različite negativne čionioce spoljašnje sredine, pri čemu je aktivnost komponenata sistema koji neutrališu ROS međusobno povezana i zavisna (Shigeoka *i sar.*, 2002). Pretpostavlja se da između ovih enzima postoji sinergijska veza u cilju zajedničkog odupiranja oksidativnim oštećenjima izazvanim dejstvom oksidativnog stresa (Hemavathi Chandrama *i sar.*, 2010).

Ayaj *i sar.* (2002) su istakli da je sinergično delovanje sistema za otklanjanje viška H₂O₂, kao što su APx, GR i CAT, važnije u otpornosti biljaka na osmotski stres izazvan sušom nego delovanje samo SOD. Relativna tolerantnost genotipa na stres suše izražena kroz nisku lipidnu peroksidaciju, i veći indeks stabilnosti membrane,

veći sadržaj hlorofila i karotenoida je usko povezana sa antioksidativnim sistemom (SOD, APx, GR, CAT). U slučaju smanjenja aktivnosti neke komponente antioksidativnog sistema, ostale komponente preuzimaju ulogu u sistemu antioksidativne zaštite tako da se antioksidativni sistem ponaša kao neraskidiva celina čije su pojedine komponente povezane u svojoj aktivnosti. Takođe, najverovatnije će doći do povećanja količine glutationa koji je izuzetno važan neenzimski antioksidant (Foyer i Noctor, 2005).

Poređenje rezultata u oba eksperimentalna sistema pokazuje da se ispitivane sorte razlikuju po tome koji su antioksidativni enzimi uključeni u eliminaciju ROS. Uzimajući u obzir sva tri ispitivana antioksidativna enzima, sorta Javor jedina pokazuje smanjenu aktivnost svih enzima i u nadzemnom delu i u korenu ponika tokom celog ogleada osmotskog stresa i ogleada suše. Jedini izuzetak je povećana aktivnost SOD u listovima biljaka pod uticajem suše.

Za razliku od Javora, sorta Trezor pokazuje konstantno povećanu aktivnost svih enzima, osim SOD i GR u listovima pod uticajem suše. Međutim, kod ove sorte u uslovima suše značajnu ulogu u uklanjanju ROS od SOD i GR preuzima enzim APx. Rezultat toga je i relativno stabilni indeks tolerancije i nadzemnog dela i korena kod ove sorte.

Kod sorte Junior se javlja smanjenje aktivnosti svih enzima u ogledu osmotskog stresa što se verovatno odrazilo i na povećanu osetljivost ispitivanih organa kod ove sorte. Međutim, pod uticajem suše u listovima biljaka dolazi do povećanja aktivnosti sva tri antioksidativna enzima. Ostale sorte uglavnom pokazuju smanjenje aktivnosti enzima nakon početnog povećanja u ogledu osmotskog stresa, kao i u kasnijim stadijumima razvoja u ogledu uticaja suše.

Dobijeni rezultati pokazuju da se veća efikasnost antioksidativnog sistema pojedinih genotipova može smatrati jednim od faktora odgovornim za njihovu tolerantnost na osmotski stres i stres suše.

Ispitivanja Jiang i Zhanga (2001) su pokazala i da ABA stimuliše antioksidativni odbrambeni sistem kod biljaka, dok su rezultati Agarwal *i sar.* (2005) pokazali da egzogena aplikacija ABA kod ponika pšenice dovodi do povećanja aktivnosti SOD, APx, katalaze i NADPH oksidaze. Poređenje akumulacije ABA i aktivnosti SOD, APx i GR u ovoj disertaciji pokazuje da je kod sorte Javor bila najmanja i akumulacija ABA i antioksidativnih enzima. Veći stepen akumulacije ROS (odnosno jači oksidativni stres) kod ove sorte može i da objasni veću osetljivost na sušu i osmotski stres ispitivanih organa. Nasuprot tome, najveća akumulacija ABA kod sorte Dukat i značajna kod sorte Trezor je u oba eksperimentalna sistema indukovala veoma značajno povećanje aktivnosti svih antioksidativnih enzima, što je doprinelo značajnom stepenu tolerantnosti ispitivanih organa kod ovih sorti.

Kod drugih sorti otpornih na sušu i osmotski stres, kao što su Mraz, Partner i Junior, proces adaptacije verovatno ide ABA-nezavisnim mehanizmom, koji uključuje druge mehanizme otpornosti kao što su osmoregulacija, sinteza proteina otpornih na sušu, aktivaciju antioksidativnih enzima i dr. (Chaves *i sar.*, 2003). Takođe, se u ovim razmatranjima mora uzeti u obzir i interakcija ABA sa drugim hormonima (etilenom, citokininima) i hemijskim komponentama ksilema u toku njenog transporta od korena do nadzemnih delova biljaka (Davies *i sar.*, 2005).

Međutim, treba naglasiti da je veoma teško porediti rezultate dobijene u klima komori, u uslovima koji su slični onima koji vladaju u prirodi (gde je dehidracija izazvana promenom vodnog potencijala zemljišta), sa onima dobijenim dejstvom neke osmotski aktivne supstance (PEG, manitol), s obzirom na to da se u takvim eksperimentima razlikuje vodni deficit, u smislu brzine postizanja određenog vodnog potencijala, kao i od stepena oštećenja koje takav stres uzrokuje (Wang *i sar.*, 2011).

6.2.5. Uticaj suše na ekspresiju gena

S obzirom na to da su se u ogledu stresa suše biljke nalazile u nešto kasnijem stadijumu razvoja u odnosu na biljke u ogledu osmotskog stresa, njihov sistem antioksidativne zaštite se razikuje od sistema kod ponika u ogledu osmotskog stresa. Rezultati analize ekspresije gena, koji kodiraju antioksidativne enzime, su prikazani za genotipove stočnog graška, kod kojih su uočene najveće promene u aktivnosti antioksidativnih enzima pod uticajem jake suše od samo 9% vlažnosti supstrata. Uočava se da je kod sorte Junior povećana ekspresija sva tri ispitivana gena u listovima pod uticajem suše, a samim tim je i povećana aktivnost ovih enzima, što joj omogućava da se izbori sa delovanjem u kasnijim fazama razvoja. Nasuprot tome, kod ponika ove sorte se javlja smanjenje aktivnosti svih enzima u ogledu osmotskog stresa što se verovatno odrazilo i na povećanu osetljivost ispitivanih organa kod ove sorte na osmotski stres. Kod sorte Trezor se u uslovima suše pojačava ekspresija gena za APx, kao i njena aktivnost, a smanjuje se ekspresija gena za Cu/ZnSOD, pa se može pretpostaviti da kod ove sorte značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti igra APx. Efikasan sistem uklanjanja ROS kod ove sorte dovodi i do relativno stabilnog indeksa tolerantnosti ispitivanih organa kod ove sorte. Kod sorte Javor se nastavlja opadanje aktivnosti APx i GR i u kasnijim stadijumima razvoja i pod uticajem suše. Slabija antioksidativna zaštita kod sorte Javor i u kasnijim stadijumima razvoja verovatno je dovela do toga da je kod ove sorte izmerena i najmanja vrednost sveže mase nadzemnog dela ponika (1,89 g) (slika 34).

Ispitivanja ekspresije gena za SOD pod uticajem suše kod biljaka kukuruza su pokazala povećanje ekspresije Cu/ZnSOD kod tolerantnih biljaka (Shiriga *i sar.*, 2014). Pojačana ekspresija cAPX poreklom od graška u transgenim biljkama paradajza omogućava biljkama da se izbore sa niskim temperaturama i sonim stresom (Wang *i sar.*, 2005). Rezultati kod transgenih biljaka duvana i *Arabidopsis*-a pokazali su da povećana pojedinačna ekspresija citosolne Cu/ZnSOD ili APx u citosolu, ili njihova kombinacija, ublažava negativne efekte stresa suše (Yabuta *i*

sar., 2002; Faize i sar., 2011). Povećanje količine transkripta GR pod uticajem suše potvrđeno je kod tolerantnih sorti *Vigna unguiculata* (Contour-Ansel i sar., 2006).

Analiza ekspresije *PsA01*, *PsA02* i *PsA03* je vršena kod odabranih genotipova stočnog graška, kod kojih je došlo do najveće, odnosno najmanje akumulacije ABA u listovima biljaka graška izloženih tretmanu jake suše u odnosu na kontrolu (slika 40). Može se pretpostaviti da u sintezi ABA u listovima biljaka, koje su se nalazile u starijoj vegetativnoj fazi razvoja, pod uticajem suše, veću ulogu imaju geni *PsA02* i *PsA03* u odnosu na *PsA01*, za razliku od uticaja osmotskog stresa kod ponika kod kojih gen *PsA02* ima manji značaj u sintezi ABA u odnosu na druge gene. To je posebno izraženo kod sorte Dukat gde je, pod uticajem jake suše, izmerena povećana koncentracija ABA u listovima biljaka u odnosu na kontrolu (sa 88,00 ng/g je povećana na 895,00 ng/g, odnosno 1017%; tabela 13). Akumulacija ABA kod ove sorte doprinosi i bržem zatvaranju stoma, čime se smanjuje transpiracija, kao i aktivaciji antioksidativnih mehanizama. Kod sorte Javor je, takođe, izmereno povećanje koncentracije ABA, ali nešto manje nego kod sorte Dukat (sa 146,00 ng/g povećana na 361,00 ng/g, odnosno 147%; tabela 13), pa kod ove sorte dolazi i do sporijeg zatvaranja stoma, a i aktivacija antioksidativnih mehanizama je smanjena.

Rezultati ove disertacije su u skladu sa rezultatima Zdunek-Zastocka (2010) i Zdunek-Zastocka i Sobczak (2013), koji su pokazali de je najvažniji gen, čija ekspresija se povećava kod biljaka graška izloženih delovanju suše, *PsA03*.

Kod svih ispitivanih parametara su uočene razlike u zavisnosti od samog dizajna eksperimenta, načina izlaganja suši, kao i trajanja sušnog perioda. Zbog toga je važno nastaviti fiziološka, biohemijska i molekularna istraživanja s ciljem upoznavanja navedenih mehanizama koji omogućavaju biljci preživljavanje u sušnim periodima.

7. ZAKLJUČCI

1. Dobijeni rezultati su pokazali da je osmotski stres, izazvan različitim koncentracijama rastvora osmotikuma PEG 6000, značajno uticao na ispitivane biljke u obe rane vegetativne faze njihovog razvoja (fazi klijanja i fazi ponika), ali i da je taj efekat zavisio i od stepena stresa, njegovog trajanja i ispitivanih sorti stočnog graška.

2. Ispitivanja u fazi klijanja su kod svih sorti pokazala da se sa povećanjem nivoa osmotskog stresa značajno smanjuje procenat klijavosti i produžava se vreme srednjeg i ukupnog klijanja. Ove promene se javljaju već pri najnižem stepenu stresa (-0,1MPa), ali se u tim kao i u ostalim osmotskim uslovima (-0,2MPa i -0,3MPa), ispoljavaju značajne razlike izmedju ispitivanih sorti. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da su sorte Javor i Junior znatno osetljivije od ostalih sorti na osmotski stres (smanjena klijavost za prosečno 21,52% i produženo vreme srednjeg klijanja za prosečno 1,06 dana u odnosu na kontrolu), dok su u grupi tolerantnih sorti Mraz i Dukat (smanjenje klijavosti za prosečno 3,32% i produženo vreme srednjeg klijanja za prosečno 0,83 dana u odnosu na kontrolu), a umereno tolerantne sorte Trezor, Partner i Pionir (smanjena klijavost za prosečno 7,09% i produženo vreme srednjeg klijanja za prosečno 0,2 dana).

3. Rezultati ispitivanja uticaja osmotskog stresa na biljke u fazi ponika su pokazali da su osmotski stres i dužina njegovog trajanja značajno uticali na rast vegetativnih organa ponika (nadzemni deo i koren) i akumulaciju biomase i da se taj efekat više odrazio na rast nadzemnog dela (smanjenje brzine rasta u odnosu na kontrolu prosečno kod svih sorti za 75,90%) u odnosu na rast korena (smanjenje za 55,72%). To potvrđuju i rezultati odnosa biomase nadzemnog dela i korena koji su kod svih sorti (prosečne vrednosti ispod 1), izuzev sorte Pionir (vrednosti iznad 1), indirektno ukazali da u uslovima osmotskog stresa ispitivane sorte akumuliraju suhu masu više u korenu nego u nadzemnom delu, a što može predstavljati adaptivni mehanizam kojim sorte pokušavaju da održe i rast korena i usvajanje

vode. Na osnovu poređenja trajanja efekata osmotskog stresa na ispitivane parametre takođe se može zaključiti da je delovanje osmotskog stresa manje izraženo u dužem vremenskom intervalu (15 dana) nego u kraćem (10 dana), a što što ukazuje na to da je ispitivanim sortama potrebno duže vremena da se adaptiraju na uslove osmotskog stresa i tako smanje njegovo negativno dejstvo.

4. Kod svih ispitivanih sorti vrednosti indeksa tolerantnosti korena i 10. i 15. dana trajanja osmotskog stresa su bile veće (prosečne vrednosti 0,54) u odnosu na indeks tolerantnosti nadzemnog dela (prosečne vrednosti 0,32) što takođe ukazuje na to da stresni uslovi imaju veći uticaj na nadzemni deo biljke nego na korenov sistem. Na osnovu rezultata merenja parametara rastenja i indeksa tolerantnosti može se zaključiti da u grupu tolerantnih sorti na osmotski stres spadaju sorte Mraz i Dukat, u grupu srednje tolerantnih Trezor, Pionir i Partner, dok su Junior i Javor osetljive sorte.

5. Na osnovu ispitivanja biohemijskih osnova reakcija ispitivanih sorti na osmotski stres (akumulacije stres hormona ABA i aktivnosti antioksidativnih enzima) se može zaključiti da osmotski stres, kao primarni stresni faktor, i oksidativni stres, kao sekundarni stresni faktor, izazivaju različite biohemijske reakcije kod ispitivanih sorti. Kod jedne grupe sorti (Javor, Partner i Junior) je došlo do značajnog povećanja sadržaja ABA (prosečno za 41,22 ng/g sveže mase), a što indirektno ukazuje da je ABA uticala na redukciju rasta. Nasuprot tome smanjenje koncentracije ABA kod sorti Mraz, Dukat, Pionir i Trezor (prosečno za 51,06 ng/g sveže mase) ukazuju da je redukcija rasta nadzemnih delova i korena ponika nastala kao rezultat procesa koji nisu pod direktnom kontrolom ABA. Stoga bi u ovakva istraživanja trebalo uključiti i druge hormone i ispitati njihovu interakciju sa ABA.

6. Dobijeni rezultati pokazuju da se, kao odgovor na oksidativni stres i akumulaciju ROS, koji se javljaju u uslovima osmotskog stresa, kod ispitivanih sorti povećava aktivnost antioksidativnih enzima (najviše APx) i to u ranijim fazama dejstva oksidativnog stresa (10. dana), kao i da se tu uključuju različiti enzimi i da

to može da ukaže i na različiti stepen osetljivosti ispitivanih sorti. Tako se kod tolerantne sorte Trezor mehanizam uklanjanja ROS bazira na konstantno povećanoj aktivnosti sva 3 enzima (SOD u proseku za 158%, APx za 650%, GR za 381%). Nasuprot tome kod sorte Junior, sorte koja je osetljiva na osmotski stres, aktivnost enzima je smanjena (SOD na 58 %, APx na 12%, GR na 46%), a slično je i u nadzemnim delovima sorte Javor (SOD na 78x %, APx na 71%, GR na 57 %), kod koje je osetljivost na osmotski stres nadzemnog dela posebno jako izražena.

7. Rezultati ispitivanja efekta suše na ukupnu biomasu su pokazali najveći efekat redukcije kod sorte Javor (sa 0,28g na 0,07g), najmanji kod sorte Dukat (sa 0,89g na 0,63g), dok su ispitivanja odnosa suve mase nadzemnog dela/korena pokazala da je suša kod sorti Mraz i Junior više uticala na rast nadzemnog dela nego korena, dok je kod sorte Javor bilo obrnuto (veći uticaj na koren). Na osnovu ovih, kao i rezultata indeksa tolerantnosti nadzemnog dela i korena, u uslovima suše ispitivane sorte graška se mogu podeliti u tri grupe prema otpornosti na sušu: tolerantne (Dukat, Partner), srednje tolerantne (Trezor, Pionir, Junior) i osetljive (Javor i Mraz).

8. Korelativni odnosi između koncentracije ABA u listovima biljaka i provodljivosti stominih ćelija (slika 43) su pokazali da je kod sorte Dukat utvrđena i najveća akumulacija ABA u suši (od 88,00 do 895,00 ng/g sveže mase) i najveća osetljivost stominih ćelija (redukcija provodljivosti od 194,00 do 37,96 mmol/sec²), tako da je na osnovu toga i reakcije rasta biljaka zaključeno da su reakcije ove sorte na sušu rezultat obrazovanja "hemijskih signala" suše. Na osnovu manje osetljivosti stominih ćelija sorte Javor (od 166,57 do 30,66 mmol/sec²) i manje akumulacije ABA u suši (od 146,00 do 361,00 ng/g sveže mase), kao i promena u rastu, zaključeno je da su reakcije ove sorte na sušu rezultat "hidrauličnih signala" suše. Zaključeno je i da je dinamički odgovor stominih ćelija sorte Dukat, na sušom izazvanu akumulaciju ABA, značajna adaptivna reakcija koja ovoj sorti omogućava da u uslovima jake suše održi delimičnu otvorenost stoma i nastavak procesa asimilacije, a što je rezultiralo i najvećim indeksom tolerantnosti na sušu i nadzemnog dela i korena.

9. Dobijeni rezultati pokazuju da se, kao odgovor na oksidativni stres i akumulaciju ROS koji se javljaju u uslovima suše u listovima ispitivanih sorti, aktivnost antioksidativnih enzima (najviše APx) povećava u manjoj meri u odnosu na uslove osmotskog stresa i to u ranijim fazama dejstva oksidativnog stresa (10 dana), kao i da se tu uključuju različiti enzimi i da to može da ukaže i na različiti stepen osetljivosti ispitivanih sorti. Tako se kod tolerantne sorte Trezor mehanizam uklanjanja ROS bazira na konstantno povećanoj aktivnosti sva 3 enzima (SOD u proseku za 135%, APx za 155%, GR za 106%). Nasuprot tome kod sorte koja je osetljiva na osmotski stres, Javor, aktivnost ovih enzima je smanjena (SOD na 81%, APx na 39%, GR na 49%).

10. Poređenjem ispitivanih sorti u oba eksperimentalna sistema (osmotskom stresu i suši) na osnovu vrednosti indeksa tolerantnosti ispitivanih organa na stres, uočava se da je sorta Mraz pokazala najveću tolerantnost u ogledu osmotskog stresa, dok je u ogledu suše bila najosetljivija, što ukazuje da ova sorta gubi tolerantnost u kasnijim stadijumima vegetativnog razvoja. Sorta Javor spada u grupu osetljivih sorti u oba eksperimentalna sistema, dok sorte Dukat, Pionir i Partner pokazuju tolerantnost na dehidraciju (izazvanu ili osmotskim stresom ili stresom suše) u različitom stepenu u oba eksperimentalna sistema.

11. Ispitivane sorte se u svojim reakcijama na dehidraciju (izazvanu osmotskim stresom ili sušom) oslanjaju i na različite biohemijske mehanizme. Toleratne sorte kao što su Dukat i Trezor, akumuliraju ABA koja u ranim fazama razvoja i pod dejstvom osmotskog stresa, doprinosi aktivaciji antioksidativnih enzima, dok u kasnijoj fazi razvoja biljaka i njihovoj izloženosti efektu suše, doprinosi i bržem zatvaranju stoma (smanjuje se transpiracija), kao i aktivaciji antioksidativnih mehanizama. Kod osetljive sorte Javor je aktivnost oksidacionih enzima najviše smanjena, dok je kapacitet za akumulaciju ABA takođe najmanji u poređenju sa drugim sortama. Kod drugih sorti tolerantnih na sušu i osmotski stres, kao što su Partner i Junior, kao i Mraz (toleratna u ranijim fazama razvoja), proces tolerancije i aktivacije antioksidativnih enzima verovatno uključuje ABA - nezavisne mehanizme.

12. Rezultati analize ekspresije gena i transkripta koji kodiraju antioksidativne enzime (*Cu/ZnSOD*, *cAPx*, *GR*) mogu da objasne promene u aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, APx, GR). Ovi rezultati takođe ukazuju da je reakcija ispitivanih sorti na ROS vrste, koje nastaju u osmotskom ili stresu suše, rezultat povećane ekspresije ispitivanih gena kod tolerantnih sorti (Trezor, Pionir, Mraz u ranim fazama osmotskog stresa), odnosno smanjene ekspresije kao što se pokazalo za sortu Javor.

13. Dobijeni rezultati su kod ispitivanih sorti graška potvrdili ekspresiju 3 gena (*PsAO1*, *PsAO2* i *PsAO3*) koji su potrebni za sintezu enzima aldehidne oksidaze (AO), koja katališe finalnu fazu biosinteze ABA iz ABA - aldehida. Tokom celog trajanja osmotskog eksperimenta ekspresija gena *PsAO2* nije pokazala značajnije razlike u odnosu na kontrolu, dok se ekspresija gena *PsAO1* i *PsAO3* povećavala kod ponika sorte kod koje je došlo do akumulacije ABA (sorta Javor, povećanje za 106,3 ng/g), odnosno smanjivala kod sorte kod koje je došlo do smanjene akumulacije ABA (sorta Trezor, smanjenje za 83,3 ng/g). Na osnovu rezultata za listove biljaka izloženih suši, može se pretpostaviti da veću ulogu u sintezi ABA u starijoj vegetativnoj fazi razvoja, imaju geni *PsAO2* i *PsAO3* u odnosu na *PsAO1*. Ova promena je bila posebno izražena kod sorte Dukat kod koje je utvrđeno i povećanje koncentracije ABA za 807 ng/g. Na osnovu toga je zaključeno da od ekspresije *PsAO1* i, posebno *PsAO3*, zavisi sinteza AO u uslovima i osmotskog i stresa suše.

14. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti i da je *Arabidopsis* 18S rRNK pogodna za korišćenje kao referentni gen u eksperimentima gde se prati ekspresija gena u uslovima osmotskog i stresa suše, jer je karakteriše stabilnost ekspresije tokom ispitivanih uslova.

15. Dobijeni rezultati ukazuju da se na osnovu relativno jednostavnih metoda kao što su određivanje procenta klijavosti i porasta ponika u rastvorima osmotikuma PEG 6000, može izvršiti testiranje većeg broja genotipova graška na dehidrataciju. Takođe, analiza ekspresije gena za antioksidativne enzime (SOD, APx

i GR) može biti korisna za ocenjivanje tolerantnosti genotipova stočnog graška na osmotski stres i sušu.

9. LITERATURA

- Abbasi A. R., Sarvestani R., Mohammadi B., Baghery A. (2014) Drought stress-induced changes at physiological and biochemical levels in some common vetch (*Vicia sativa* L.) genotypes, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16:505-516.
- Abedi T., Pakniyat H. (2010) Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46:27-34.
- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N. P. (2006) Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals. *Science*, 311:91-94. DOI: 10.1126/science.1118642.
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105:121-126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Agarwal, S., Sairam, S. A, Srivastava, R. K., Tyagi, A., Meena, R. C. (2005) Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Science*, 169:559-570. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.05.004.
- Agili S., Nyende B., Ngamau K., Masinde P. (2012) Selection, yield evaluation, drought tolerance indices of orange-flesh sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) Hybrid Clone. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2:138. DOI: 10.4172/2155-9600.1000138.
- Alebrahim M. T., Janmohammadi M., Sharifzade F., Tokasi S. (2008) Evaluation of salinity and drought stress effects on germination and early growth of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *Electronic Journal of Crop Production*, 1:35-43.

- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24:1337-1344. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x.
- Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. (2003) Interaction between stresses. *Bulgarian Journal of Plant Physiology Special issue*, 1-17.
- Alscher R. G., Neval E., Lenwood S. H. (2002) Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53:1331-1341. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1331.
- Ahmad P., John R., Sarwat M., Umar S. (2008) Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*, 2:353-366.
- Ahmad I., Basra S. M. A., Afzal I., Farooq M., Wahid A. (2013) Stand establishment improvement in spring maize through exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15:95-100.
- Ajay A., Sairam R. K., Srivastava G. C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82:1227-1238.
- Ambrose M. J., Weeden N. F., Simon C. J. (1997) *Pisum* spp. IN: Conserved resources, priorities for collection and future prospects, International Food Legume Research Conference III, Adelaide, Australia, September 1997.
- Andersen N. M., Aremu J. A. (1991) Drought sensitivity, root development and osmotic adjustment in field grown peas. *Irrigation Science*, 12:45-51. DOI: 10.1007/BF00190708.

- Anderson B. E., Ward J. M., Schroeder J. I. (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiology*, 104:1177-1183. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.4.1177>.
- Anjum N. A., Aref I. M., Duarte A. C., Pereira E., Ahmad I., Iqbal M. (2014) Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal(loid) and salinity stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5:1-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00662>.
- Anjum S. A., Xie X., Wang L., Saleem M. F., Man C., Lei W. (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6:2026-2032. DOI: 10.5897/AJAR10.027.
- Annicchiarico P., Iannucci A. (2008) Adaptation strategy, germplasm type and adaptive traits for field pea improvement in Italy based on variety responses across climatically contrasting environments. *Field Crops Research*, 108:33-142. DOI: 10.1016/j.fcr.2008.04.004.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Aroca R., Vernieri P., Irigoyen J. J., Sánchez-Díaz M., Tognoni F., Pardossi A. (2003) Involvement of abscisic acid in the leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science*, 165:671-679. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00257-7.
- Arve L. E., Torre S., Olsen J. E., Tanino K. K. (2011) Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity. In: Prof. Arun Shanker (Ed.) *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*.

- Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141:391-396. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.082040>.
- Asch F. (2000) Determination of Abscisic Acid by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Technical Report. Laboratory for Agrohydrology and Bioclimatology, Department of Agricultural Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, Tastrup, Denmark.
- Ashraf M., Harris P. J. C. (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51:163-190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
- Ashraf M., Akram N. A., Arteca R. N., Foolad M. R. (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29:162-190. DOI: 10.1080/07352689.2010.483580.
- Athar H. R., Khan A., Ashraf M. (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 63:224-231. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.10.018.
- Bacon M. A., Wilkinson S., Davies, W. J. (1998) pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiology*, 118:1507-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.118.4.1507>.
- Bahrn A., Jensen C. R., Asch F, Mogensen V. O. (2002) Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L). *Journal of Experimental Botany*, 53:251-263. DOI: 10.1093/jexbot/53.367.251.
- Bano A., Hensen H., Dörffling K., Hahn H. (1994) Changes in the content of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in the xylem sap of

- drought-stressed sunflower plants. *Phytochemistry*, 37:345-347. DOI: 10.1007/s00344-005-0103-1.
- Bano, A., Dörffling K., Bettin D., Hahn H. (1993) Abscisic acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20:109-115. DOI: 10.1071/PP9930109.
- Bailey-Serres J., Mittler R. (2006) The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*, 141: 311. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.900191>.
- Bakalova S., Nikolova A., Wedera D. (2004) Isoenzyme profiles of peroxidase catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. *Journal of Plant Physiology*, 30:64-77.
- Barbieri G., Valloneb S., Orsini F., Paradisoa R., De Pascale S., Negre-Zakharovb F., Maggioa A. (2012) Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 169:1737-1746. DOI:10.1016/j.jplph.2012.07.001.
- Beauchamp C. O., Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase:improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*, 91:179-194. DOI: 10.1093/aob/mcf118.
- Blum A. (1986) Breeding Crop Varieties for Stress Environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2:199-237. DOI: 10.1080/07352688509382196.

- Boguszewska D., Zagdańska B. (2012) ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions. IN: Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.) Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects, InTech, Croatia.
- Bolwell G. P., Bindschedler L. V., Blee K. A., Butt V. S., Davies D. R., Gardner S. R., Gerrish C., Minibayeva F. (2002) The apoplastic oxidative burst response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of Experimental Botany*, 53:1367-1376. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1367.
- Bota J., Flexas J., Medrano H. (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*, 162:671-681. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01056.x.
- Botella-Pavia P., Rodriguez-Concepcion M. (2006) Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, 126:369-381. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00632.x.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Carmo-Silva A. E., Gorea M. A., Andrade-Sanchez P., Frencha A. N., Hunsakera D. J., Salvucci M. E. (2012) Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environmental and Experimental Botany*, 83:1-11.
- Carvalho M. H. C. (2008) Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, 3:56-165. DOI: 10.4161/psb.3.3.5536.

- Cazzonelli C. (2011) Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38:833-847. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/FP11192>.
- Chapin F. S., Walter C. H. S., Clarkson D. T. (1998) Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta*, 173:352-366. DOI: 10.1007/BF00401022.
- Chaves M. M. (1991) Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42:1-16. DOI: 10.1093/jxb/42.1.1.
- Chaves M. M., Pereira J. S., Maroco J. (2003) Understanding plant response to drought-from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239-264. DOI: 10.1071/FP02076.
- Chaves M. M., Santos T. P., Souza C. R., Ortuño M. F., Rodrigues M. L., Lopes C. M., Maroco J. P., Pereira J. S. (2007) Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150:237-252. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2006.00123.x.
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. (1999) Intracellular antioxidants:from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37:949-962. DOI: 10.1016/S0278-6915(99)00090-3.
- Ciarmiello L. F., Woodrow P., Fuggi A., Pontecorvo G., Carillo P. (2011) Plant Genes for Abiotic Stress, In: Prof. Arun Shanker (ed.) *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, InTech 283-308.
- Cle L. M., Hill R., Niggeweg C., Martin R., Guisez Y., Prinsen E., Jansen M. A. K. (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry*, 69:2149-2156. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.04.024.
- Collins A. (2001) Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research*, 475:1-28.

- Contour-Ansel D., Torres-Franklin M. L., De Carvalho M. H. C., D'Arcy-Lameta A. A., Zuily-Fodil Y. (2006) Glutathione Reductase in Leaves of Cowpea: Cloning of Two cDNAs, Expression and Enzymatic Activity under Progressive Drought Stress, Desiccation and Abscisic Acid Treatment. *Annals of Botany*, 98:1279-1287. DOI: 10.1093/aob/mcl217.
- Comstock J. P. (2002) Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 53:195-200. DOI: 10.1093/jexbot/53.367.195.
- Corpas F. J., Palma J. M., Sandalio L. M., López-Huertas E., Romero-Puertas M. C., Barroso J. B., Del Río L. A. (1999) Purification of Catalase from Pea Leaf Peroxisomes: identification of Five Different Isoforms. *Free Radical Research* 31:S235-241. DOI: 10.1080/10715769900301561.
- Csiszar J., Feher-Juhasz E., Kotai E., Ivankovits-Kiss O., Horvath G.V., Mai A., Galle A., Tari I., Pauk J., Dudits D., Erdei L. (2005) Effect of osmotic stress on antioxidant enzyme activities in transgenic wheat calli bearing MsALR gene. *Acta Biologica Szegediensis*, 49:49-50.
- Ćupina B. (1993) Produktivnost i kvalitet jarog stočnog graška u zavisnosti od genotipa i gustine setve useva. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Cutler A., Krochko J. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4:472-478. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01497-1.
- D'Arcy-Lameta A., Ferrari-Iliou R., Contour-Ansel D., Pham-Thi A. T., Zuily-Fodil Y. (2006) Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany*, 97:133-140. DOI: 10.1093/aob/mcj010.

- Dang H. Q., Tran N. Q., Gill S., Tuteja R. (2011) A single subunit MCM6 from pea promotes salinity stress tolerance without affecting yield. *Plant Molecular Biology*, 76:19-34. DOI: 10.1007/s11103-011-9758-0.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57:779-795. DOI: 10.1007/s000180050041.
- Davis P. H. (1970) *Pisum L.* In: Davis P.H. (Ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 3:370-373.
- Davies W. J., Zhang J. H. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:55-76. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.000415.
- Davies W. J., Wilkinson S, Loveys B. R. (2002) Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist*, 153:449-460. DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00345.x.
- Davies W.J., Kudoyarova G., Hartung W. (2005) Long-distance ABA signalling and its relation to other signalling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24:285-295. DOI: 10.1007/s00344-005-0103-1.
- Demir I., Mavi K. (2008) Effect of Salt and Osmotic Stresses on the Germination of Pepper Seeds of Different Maturation Stages. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51:897-902.
- Demir I., Ermis S., Mavi K., Matthews S. (2008) Mean germination time of pepper seed lots (*Capsicum annuum L.*) predicts size and uniformity of seedlings in

- germination tests and transplant modules. *Seed Science and Technology*, 36:21-30.
- Dharanguttikar V. M., Bharud R. W., Borkar V. H. (2015) Physiological responses of chickpea genotypes for drought tolerance under induced moisture stress. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5.
- Dianzani M., Barrera G. (2008) Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. In: Alvarez S., Evelson P. (Eds.), *Free Radical Pathophysiology*. Transworld Research Network:Kerala, India:19-38.
- Dita M., Rispaíl N., Prats E., Rubiales D., Singh K. B. (2006) Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, 147:1-24. DOI: 10.1007/s10681-006-6156-9.
- Dixit V., Pandey V., Shyam R. (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52:1101-1109. DOI: 10.1093/jexbot/52.358.1101.
- Dobránszki J., Iszály-Tóth J., Magyar-Tábori K. (2006) Inhibition and recovery of germination and growing ability of seedlings under and after osmotic stress induced by polyethylene glycol in 8 pea genotypes. *International Journal of Horticultural Science*, 12:53-59.
- Dodd, I. C. (2007) Soil moisture heterogeneity during deficit irrigation alters root-to-shoot signalling of abscisic acid. *Functional Plant Biology*, 34:439-448. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/FP07009>.
- Dodd I. C., Stikić R., Davies W. J. (1996) Chemical regulation of gas exchange and growth of plants in drying soil in the field. *Journal of Experimental Botany*, 47:1475-1490. DOI: 10.1093/jxb/47.10.1475.
- Đorđević V. (1942) Gajenje biljaka za stočnu hranu. Težakova biblioteka, Beograd, 13-21.

- D' souza M. R., Devaraj V. R. (2011) Specific and non-specific responses of Hyacinth bean (*Dolichos lablab*) to drought stress. *Indian Journal of Biotechnology*, 10:130-139.
- Duzdemir O., Kurunc A., Unlukara A. (2009) Response of pea (*Pisum sativum*) to salinity and irrigation water regime. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15:400-409.
- Edelenbos M., Christensen L., Grevsen K. (2001) HPLC Determination of Chlorophyll and Carotenoid Pigments in Processed Green Pea Cultivars (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4768-4774.
- Erić P, Mihailović V, Ćupina B, Đukić D (2002) Stočni grašak - značajan faktor obezbeđenja biljnih proteina. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad* 36:85-92.
- Eitzinger J., Kubu G., Alexandrov V., Utset A., Mihailovic D.T., Lalic B., Trnka M., Zalud Z., Semeradova D., Ventrella D., Anastasiou D., Medany M., Altaher S., Olejni J., Lešny, J., Nemesko N., Nikolaev M., Simota C., Cojocaru G. (2008) Vulnerabilities and adaptation options of European agriculture - recent results from the ADAGIO project. *Proceedings of the Conference "Global Environmental Change - Challenges to Science and Society in Southwestern Europe"* CD version.
- Faize M., Burgos L., Faize L., Piqueras A., Nicolas E., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M.J., Alcobendas R., Artlip T., Hernandez J. A. (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2599-2613. DOI: 10.1093/jxb/erq432.
- FAOSTAT Food And Agriculture Organization Of The United Nations (<http://faostat.fao.org>).

- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S. M. A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy of Sustainable Development*, 29:185-212. DOI: 10.1007/978-90-481-2666-8_12.
- Farshadfar E., Farshadfar M., Dabiri S. (2012) Comparison between effective selection criteria of drought tolerance in bread wheat landraces of Iran. *Annals of Biological Research*, 3:3381-3389.
- Finkelstein R. R., Rock C. D. (2002) Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book* 1-52.
- Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61:3211-3222. DOI: 10.1093/jxb/erq152.
- Foyer C. H., Halliwell B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133:21-25. DOI: 10.1007/BF00386001.
- Foyer C., Noctor G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119:355-364. DOI: 10.1007/BF00386001.
- Foyer C. H., Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28:1056-1071. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.
- Fujita Y., Fujita M., Satoh R., Maruyama K., Parvez M. M., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17:3470-3488. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.035659>.

- Garg N., Manchanda G. (2009) ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*, 143:8-96. DOI: 10.1080/11263500802633626.
- Generozova I. P., Maevskaya S. N., Shugaev A. G. (2009) The inhibition of mitochondrial metabolic activity in etiolated pea seedlings under water stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56:38-44. DOI: 10.1134/S1021443709010063.
- Ghazi N., Karaki Al., Asadulla A. A, Yahia O. (2007) Seed germination and early root growth of three barley cultivars as affected by temperature and water stress. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 2:12-117.
- Gholami M., Rahemi M., Kholdebarin B (2010) Effect of drought stress induced by polyethylene glycol on seed germination of four wild almond species. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4:785-791.
- Giannopolites C. N., Ries S. K. (1977) Superoxide dismutase. I: occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gill S. S., Anjum N. A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D. K., Ahmad I., Tuteja N. (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70:204-212. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.032.
- Giordano I., Pirani V., Novelli A., Lahoz E., Lombardo G., Ziliotto M., Ranalli P. (1991) Speciale legumiose da granella - problematiche a prospettive del

- pisello proteico, con particolare riferimento agli aspetti di tecnica agronomica. *Agronomia ricerca*, 128:107-118.
- Gómez J. M., Jiménez A, Olmos E., Sevilla F. (2004) Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 55:119-130.
- Gómez-García M.D.R., Ochoa-Alejo N. (2013) Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14:19025-1905. DOI: 10.3390/ijms140919025.
- Goodger J. Q. D., Sharp R. E., Marsh E. L., Schachtman D. P. (2005) Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. *Journal of Experimental Botany*, 56:2389-2400. DOI: 10.1093/jxb/eri231.
- Gowing D. J., Davies W. J., Jones H. G. (1990) A positive root-sourced signal as indicator of soil drying in apple *Malus domestica* Borh. *Journal of Experimental Botany*, 41:1535-1540. DOI: 10.1093/jxb/41.12.1535.
- Grzesiak S., Filek W., Skrudlik G., Nizioł B. (1996) Screening for drought tolerance: evaluation of seed germination and seedling growth for drought resistance in legume plants. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 177:245-252.
- Grzesiak S., Lijima M., Kono Y., Yamauchi A. (1997) Differences in drought tolerance between cultivars of field bean and field pea. A comparison of drought-resistant and drought-sensitive cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 9:349-357. DOI: 10.1007/s11738-997-0012-y.

- Grzesiak S., Grzesiak M., Hura T. (1999) Effects of Soil Drought during the Vegetative Phase of Seedling Growth on the Uptake of $^{14}\text{CO}_2$ and the Accumulation and Translocation of ^{14}C in Cultivars of Field Bean (*Vicia faba* L Var. *minor*) and Field Pea (*Pisum sativum* L) of Different Drought Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 183:183-192. DOI: 10.1046/j.1439-037x.1999.00340.x.
- Gunes A., Pilbeam D., Inal A., Coban S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, In: Growth, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Commun. Soil Science & Plant Nutrition*, 39:1885-1903.
- Guo R., Huang L. (2008) New insights into the activation mechanism of store-operated calcium channels:roles of STIM and Orai. *Journal of Zhejiang University Science B*.ISSN 1862-1783 (online).
- Halliwell B., Gutteridge J. M C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases:an overview. *Methods in Enzymology*, 186:1-86. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86093-B.
- Halliwell B., Aeschbach R., Loliger J., Aruoma O. (1995) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33:601-617. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00024-V.
- Hartung W., Peuke A.D., Davies W.J. (1999) Abscisic acid-a hormonal long distance stress signal in plants under drought and salt stress. In: *Handbook of Crop Stress* (ed. M. Pessarakali) 2nd edn, Marcel Dekker, New York, 731-747.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M., Roychowdhury R., Fujita M. (2013) Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:9643-9684.

- Hemavathi Chandrama P. U., Akula N., Kim H. S., Jeon J. H., Ho O. M., Chun S. C., Kim D. H., Park S. W. (2010) Biochemical analysis of enhanced tolerance in transgenic potato plants overexpressing D-galacturonic acid reductase gene in response to various abiotic stresses. *Molecular Breeding*, 28:105-115.
- Hernandez J. A., Jiménez A., Mullineaux P., Sevilla F. (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defence. *Plant, Cell and Environment*, 23:853-862.
- Holbrook N. M., Shashidhar V. R., James R. A., Munns R. (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 53:1503-1514.
- Hooker T. S., Thorpe T. A. (1997) Effects of water deficit stress on the developmental growth of excised tomato roots cultured in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 33:245-251.
- Hornberg C., Weiler E. W. (1984) High affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cell. *Nature*, 310:321-324.
- Hose E., Sauter A., Hartung W. (2002) Abscisic acid in roots- biochemistry and physiology. In: Waisel, Z., Eshel, A., Kafkafi, U. (Ed): *plant Roots. The Hidden Half*. 3rd ed., Marcel Dekker, New York-Basel 435-448.
- Hossain M. A., Piyatida P., Teixeira da Silva J. A., Fujita M. (2012) Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 1-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/872875>.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P.

- Palutikof, P.J. van der Linden & C.E. Hanson, (Eds.), 1996, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- ISTA (2013) International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Switzerland.
- Iwaya-Inoue M., Motooka K., Ishibashi Y., Fukuyama M. (2003) Characteristic water status in dwarf pea in relation to drought resistance. *Journal of Faculty of Agriculture Kyushu University*, 48:29-38.
- Jaleel C. A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Somasundaram R., Panneerselvam R. (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11:100-105.
- Jia W., Zhang J. (1999) Stomatal closure is induced rather by prevailing xylem abscisic acid than by accumulated amount of xylem-derived abscisic acid. *Physiologia Plantarum*, 106:268-275.
- Jia W., Zhang J. (2008) Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 3:772-777.
- Jiang M., Zhang J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology*, 42:1265-1273. DOI: 10.1093/pcp/pce162.
- Jiménez A., Hernandez J. A., del Rio J. A., Sevilla F. (1997a) Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves: Changes Induced by Leaf Senescence. *Phyton (Austria)*, 37:101-108.
- Jiménez A., Hernández J. A., el Río L. A., Sevilla F. (1997b) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, 114:175-284. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.1.275>.

- Jones P. (1982) Catalases and ironporphyrin model systems: Roles of the coordination environment of iron catalytic mechanism, *The Biological Chemistry of Iron*, 427. DOI: 10.1007/978-94-009-7882-9_28.
- Jovanović Z., Stikić R. (2012) Strategies for improving water productivity and quality of agricultural crops in an era of climate change, In: T. S. Lee (Ed.), *Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments*, ed. InTech. 77-102.
- Jovanović Ž., Milošević J., Radović S. (2006) Antioxidative Enzymes in the response of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) to Ultraviolet B Radiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:9472-9478.
- Jovanović Ž., Rakić T., Stevanović B., Radović S. (2011a) Characterisation of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant *Ramonda nathaliae*. *Plant Growth Regulation*, 64:231-240.
- Jovanović Ž., Maksimović V., Radović S. (2011b) Biochemical and molecular changes in buckwheat leaves during exposure to salt stress. *Archives of Biological Science Belgrade*, 63:67-77.
- Jovanović Ž., Stanisavljević N., Mikić A., Radović S., Maksimović V. (2013) The expression of drought responsive element binding protein (DREB2A) related gene from pea (*Pisum sativum* L.) as affected by water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 7:1590-1596.
- Kandil A. A., Sharief A. E., Ahmed S. R. H. (2012) Germination and Seedling Growth of Some Chickpea Cultivars (*Cicer arietinum* L.) under Salinity Stress. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 8:561-571.
- Kandil A. A., Sharief A. E., Ahmed S. R. H. (2015) Performance of some soybean *Glycine max* (L.) Merrill. cultivars under salinity stress to germination

- characters. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 6:48-56.
- Kang S., Liang Z., Hu W., Zhang J. (1998) Water use efficiency of controlled alternate irrigation on root-divided maize plants. *Agricultural Water Management*, 38:69-76.
- Kang S., Hu X., Goodwin I., Jerie P. (2002) Soil water distribution, water use, and yield response to partial root zone drying under a shallow groundwater table condition in a pear orchard. *Scientia Horticulturae*, 92:277-291.
- Karagić Đ., Mihailović V., Katić S., Milošević B., Pataki I. (2007) Prinos i kvalitet semena NS sorti krmnih biljaka u periodu 2007-2010. Zbornik referata sa 45. Savetovanja agronoma Srbije, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, 143-153.
- Karataş I., Öztürk L., Demir Y., Ünlükara A., Kurunç A., Düzdemir O. (2014) Alterations of antioxidant enzyme activities and proline content in pea leaves under long-term drought stress. *Toxicology and Industrial Health*, 30:693-700.
- Karim M. R., Rahman M. A. (2015) Drought risk management for increased cereal production in Asian Least Developed Countries. *Weather and Climate Extremes*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wace.2014.10.004i>.
- Karuppanapandian T., Moon J.-C., Kim C., Manoharan K., Kim W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5:709-725.
- Kastori R. (1998) *Fiziologija biljaka*. Feljton, Novi Sad.
- Kausar R., Hossain Z., Makino T., Komatsu S. (2012) Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Molecular Biology Reports*, 39:10573-10579.

- Kaya M. D., Okçu G., Atak M., Cikili Y., Kolsarici O. (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, 24:291-295. DOI: 10.1016/j.eja.2005.08.001.
- Kefu Z., Munns R., King R. W. (1991) Abscisic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush. *Australian Journal of Plant Physiology*, 110:17-24.
- Khakwani A. A., Dennett M. D., Munir M. (2011) Drought tolerance screening of wheat varieties by inducing water stress conditions. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33:135-142.
- Khalili M., Naghavi M.R., Pour Aboughadareh A.R., Talebzadeh J. (2012) Evaluating of drought stress tolerance based on selection indices in spring canola cultivars (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Sciences*, 4:78-85.
- Khodarahmpour Z. (2011) Effect of drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) on germination indices in corn (*Zea mays* L.) hybrids. *African Journal of Biotechnology*, 10:18222-18227.
- Kim H. J., Feng H., Kushad M. M., Fan X. (2006) Effects of Ultrasound, Irradiation, and Acidic Electrolyzed Water on Germination of Alfalfa and Broccoli Seeds and Escherichia Coli O157:H7. *Journal Of Food Sciences*, 71:M168-M173.
- Kjellström E., Barring L., Jacob D., Jones R., Lenderink G. (2007) Modelling daily temperature extremes: recent climate and future changes over Europe. *Climatic Change* 81, Suppl.1:249-265, ISSN 1573-1480.
- Kolasinska K., Szyrmer J., Dul S. (2000) Relationship between laboratory seed quality tests and field emergence of common bean seed. *Crop Science*, 40:470-475.
- Kolbert Z, Sahin N, Erdei L (2008a) Early nitric oxide (NO) responses to osmotic stress in pea, Arabidopsis and wheat. *Acta Biologica Szegediensis*, 52:63-65.

- Kolbert Z., Bartha B., Erdei L. (2008b) Osmotic stress-and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct process in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, 133:406-416.
- Kudoyarova G. R., Vysotskaya L. B., Cherkozyanova A., Dodd I. C. (2006) Effects of partial root drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *Journal of Experimental Botany*, 58:161-168.
- Kulkarni M., Deshpande U. (2006) Comparative studies in stem anatomy and morphology in relation to drought resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *American Journal of Plant Physiology*, 1:82-88.
- Kumar R. R., Karjol K., Naik G. R. (2011) Variation of sensitivity to drought stress in pigeon pea (*Cajanus Cajan* (L.) Millsp) cultivars during seed germination and early seedling growth. *World Journal of Science and Technology*, 1:11-18.
- Labudda M., Azam F. M. S. (2014) Glutathione-dependent responses of plants to drought:a review. *Acta Societatis Botanicorum Polonie*, 83:3-12.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J.-M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. (2015) Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4:112-166.
- Lee Y. P., Ahmad R., Lee H. S., Kwak S. S., Shafqat M. N., Kwon S. Y. (2013) Improved tolerance of Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase expressing transgenic tobacco seeds and seedlings against multiple abiotic stresses. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15:725-730.
- Li J., Cang Z, Jiao F., Bai X., Zhang D., Zhai R. (2015) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* in press.

- Liener I.E. (1982) Toxic constituents in legumes. IN: Arora S.K. (ed.) Chemistry and biochemistry of legumes, Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, 217-257.
- Liu F., Shahnazari A., Andersen M.N., Jacobsen S. E., Jensen C. R. (2006) Physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signalling, leaf gas exchange, and water use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 57:3727-3735.
- Liu J., Xia J., Fang Y., Li T., Liu J. (2014) Effects of Salt-Drought Stress on Growth and Physiobiochemical Characteristics of *Tamarix chinensis* Seedlings. *The Scientific World Journal*, 2014:1-7.
- Lawlor D. W., Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, 25:275-294.
- Magyar-Tábori K., Mendler-Drienyovszki N., Dobránszki J. (2011) Models and Tools for Studying Drought Stress Responses in Peas. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 15:829-838. DOI: 10.1089/omi.2011.0090.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444:139-158. DOI: 10.1016/j.abb.2005.10.018.
- Maiti R. K., De La Rosa-Ibarra M., Sandoval N. D. (1994) Genotypic Variability in Glossy Sorghum Lines for Resistance to Drought, Salinity and Temperature Stress at the Seedling Stage. *Journal of Plant Physiology*, 143:241-244. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81694-9.
- Maksimović I., Putnik-Delić M., Gani I., Marić J., Ilin Ž. (2010) Growth, ion composition, and stomatal conductance of peas exposed to salinity. *Central European Journal of Biology*, 5:682-691.

- Malecka A., Piechala A., Tomaszewska B. (2009) Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions:the whole roots level. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31:1053-1063.
- Malecka A., Piechalak A., Mensinger A., Hanć A., Baralkiewicz D., Tomaszewska B. (2012) Antioxidative Defense System in *Pisum sativum* Roots Exposed to Heavy Metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal of Environmental Studies*, 21:1721-1730.
- Malecka A., Piechalak A., Zielińska B., Kutrowska A., Tomaszewska B. (2014) Response of the pea roots defense systems to the two-element combinations of metals (Cu, Zn, Cd, Pb). *Acta Biochimica Polonica*, 61:23-28.
- Malecka A., Jarmuszkiewicz W., Tomaszewska B. (2001) Antioxidative defense to leaf stress in subcellular compartment of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica*, 48:687-698.
- Mengel K., Kirkby, E.A. (2001) *Principles of Plant Nutrition*, 5th Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mansfield T. A., Hetherington A. M., Atkinson C. J. (1990) Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41:55-75.
- Maruyama K., Sakuma Y., Kasuga M., Ito Y., Seki M., Goda H., Shimada Y., Yoshida S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using microarray systems. *The Plant Journal*, 38:982-993. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02100.x.

- Mattioli R., Constantino P., Trovato M. (2009) Proline accumulation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4:1016-1018. DOI: 10.4161/psb.4.11.9797.
- Maxted N, Ambrose M (2000) Peas (*Pisum L.*). IN: Maxted N., Bennet S. (Eds) *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean* Kluwer, The Netherlands.
- Ma Y. H., Ma F. W., Wang Y. H., Zhang J. K. (2011) The responses of the enzymes related with ascorbate-glutathione cycle during drought stress in apple leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33:173-180.
- May M. J., Vernoux T., Leaver C., Van Montagu M., Inzé D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49:649-667. DOI: 10.1093/jxb/49.321.649.
- Malan C., Greyling M. M., Gressel, J. (1990) Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbred. *Plant Science*, 69:157-166.
- McAdam S., Susmilch F., Brodribb T., Ross J. (2015) Molecular characterization of a mutation affecting abscisic acid biosynthesis and consequently stomatal responses to humidity in an agriculturally important species. *AoB Plants*, 1-11.
- Michel B. E., Kaufmann M. R. (1973) The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51:914-916
- Miladinović M (2001) *Proizvodnja semena krmnog bilja*. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
- Mihailović V., Mišković B. (1987) Značaj i mogućnosti gajenja krmnog graška kao proteinskog hraniva. *Zbornik referata XXI Seminara agronoma Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 25.01. - 8.02.1987, Cavtat, 313-320.

- Mihailović V., Čupina B., Erić P. (1997) Proizvodnja stočnog graška. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 30, 311-322. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 29:355-364.
- Mihailović V., Šibalić I., Mikić A., Milić D., Vasiljević S., Lukić D. (2003) Production and usage of pea grain in animal and human nutrition. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 19:457-464.
- Mihailović V., Mikić A., Katić S., Karagić Đ. (2009) Forage and dry pea (*Pisum sativum*) breeding in Serbia. *Pisum Genetics*, 41:26-28.
- Mirzaee M., Moieni A., Ghanati F. (2013) Effects of Drought Stress on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15:593-602.
- Mišković B. (1986) Krmno bilje. Naučna knjiga, Beograd.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405-410. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
- Moayedi A. A., Boyce A. N., Barakbah S. S., Ghodsi M. (2009) The Effect of Different Levels of Osmotic Stress on Germination and Seedling Growth in Promising Durum Wheat Genotypes. *Middle eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology* 3(Special Issue 1):10-14.
- Monti L. (1983) Natural and induced variability in peas for protein production. IN: Thompson R., Casey R. (eds.) *Perspectives for pea and lupinus as protein crops*, Martinus, Nijhoff, The Hague, 23-29.
- Moran J. F., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R. V., Aparicio-Tejo P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194:346-352.

- Morison J. I., Baker N. R., Mullineaux P. M., Davies W. J. (2008) Improving water use in crop production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363:639-58.
- Moud A. M., Maghsoudi K. (2008) Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4:351-358.
- Moussa H. R., Mohamed A. E. H. (2011) Role of nitric acid or H₂O₂ in antioxidant defense system of *Pisum sativum* L. under drought stress. *Nature and Science*, 9:211-216.
- Munné-Bosch S. (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162:743-748. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.04.022.
- Muscolo A., Sidari M., Anastasi U., Santonoceto C., Maggio A. (2014) Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interactions*, 9:354-363.
- Naderi R., Valizadeh M., Toorchi M., Shakiba M. R. (2014) Antioxidant enzyme changes in response to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Acta Biologica Szegediensis*, 58:95-101.
- Naghavi M. R., Pour Aboughadareh A., Khalili M. (2013) Evaluation of Drought Tolerance Indices for Screening Some of Corn (*Zea mays* L.) Cultivars under Environmental Conditions. *Notulae Scientia Biologicae*, 5:388-393.
- Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C. L. M. (1997) Desiccation Tolerance in Higher Plants Related to Free Radical Defences. *Phyton (Austria)* 37:203-214.
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*, 32:959-970. DOI: 10.1007/s00299-013-1418-1.

- Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22:867-880.
- Niyogi K. K., Shih C., Chow W. S, Pogson B.J., Della Penna D., Bjorkman O. (2001) Photoprotection in a zeaxanthin-and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynthesis Research*, 67:139-145. DOI: 10.1023/A:1010661102365.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998) A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *Journal of Experimental Botany*, 49:1895-1908. DOI: 10.1093/jxb/49.329.1895.
- Noreen Z., Ashraf M. (2009) Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology*, 166:1764-1774.
- Oelke E. A., Oplinger E. S., Hanson C. V., Davis D. W., Putnam D. H., Fuller E. I., Rosen C. J. (1991) Dry field pea. *Alternative Field Crop Manual*, University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension.
- Okçu G., Kaya M. D., Atak M. (2005) Effects of Salt and Drought Stresses on Germination and Seedling Growth of Pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29:237-242.
- Osman H. S. (2015) Enhancing antioxidant-yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. *Annals of Agricultural Science*, 60:389-402.
- Ozfidan C., Turkan I., Sekmen A. H., Seckin B. (2013) Time course analysis of ABA and non-ionic osmotic stress-induced changes in water status, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in *Arabidopsis thaliana* wild-type

- (Columbia) and ABA-deficient mutant (*aba2*). *Environmental and Experimental Botany*, 86:44-51. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.09.008.
- Ozkur O., Ozdemir F., Bor M., Turkan I. (2009) Physiochemical and Antioxidant Responses of the Perennial Xerophyte *Capparis ovata* Desf. to Drought. *Environmental and Experimental Botany*, 66:487-492.
- Ozturk, L., Demir, Y., Unlukara, A., Karatas, I., Kurunc, A., Duzdemir, O. (2012) Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. *Romanian Biotechnological Letters*, 17:7227-7236.
- Pace P. F., Cralle H. T., Sherif H. M., El-Halawany J., Cothren T, Senseman S. A (1999) Drought-induced Changes in Shoot and Root Growth of Young Cotton Plants. *The Journal of Cotton Science*, 3:183-187.
- Pan Y., Wu L. J., Yu Z. L. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycorhiza uralensis* Fisch). *Journal of Plant Growth Regulation*, 49:157-165.
- Panda S. K. (2012) Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants IN: Mohammed Amr El-Missiry (Ed.) *Antioxidant enzyme, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* 381-400.
- Pandey V., Shukla A. (2014) Acclimation and Tolerance Strategies of Rice under Drought Stress. *Rice Science*, 22:147-161.
- Perl-Treves R. Galun, E. (1991) The tomato Cu/Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Journal of Plant Molecular Biology*, 17:745-760.

- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *BBA-Bioenergetics*, 1807:989-998. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.11.002.
- Pluskota W. E., Szablińska J., Obendorf R. L., Górecki R. J., Lahuta L. B. (2015) Osmotic stress induces genes, enzymes and accumulation of galactinol, raffinose and stachyose in seedlings of pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:156.
- Podleśna A., Gładyszewska B., Podleśny J., Zgrajka W. (2015) Changes in the germination process and growth of pea in effect of laser seed irradiation. *International Agrophysics*, 29:485-492.
- Poorter H., Nagel O. (2000) The role of biomass allocation in the growth responses of plant to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27:595-607.
- Pospíšilová J. (2003) Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum*, 46:491-506.
- Pratap V., Sharma Y. K. (2010) Impact of osmotic stress on seed germination and seedling growth in black gram (*Phaseolus mungo*). *Journal of Environmental Biology*, 31:721-726.
- Prokić Lj., Stikić R. (2011) Effects of different treatments on root and shoot development of the tomato wild type and flacca mutant. *Archives of Biological Science Belgrade*. 63:1167-1171.
- Prokić Lj., Jovanović Z., Stikić R., Vučinić Z. (2005) The Mutual Effect of Extracellular Ca²⁺, Abscisic Acid, and pH on the Rate of Stomatal Closure. *Biophysics from Molecules to Brain. Annals of the New York Academy of Science*, 1048:513-516.

- Prokić Lj., Jovanović Z., McAinsh R.M., Vučinić Z., Stikić R. (2006) Species-dependent changes in stomatal sensitivity to abscisic acid mediated by external pH. *Journal of Experimental Botany*, 57:675-683.
- Pynngrope S., Bhoomika K., Dubey R. S. (2013) Reactive oxygen species, ascorbate-glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. *Protoplasma*, 250:585-600.
- Quan L. J., Zhang B., Shi W. W., Li H. Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50:2-18.
- Quarrie S. A., Whitford P. N., Appleford N. E., Wang T. L., Cook S. K., Henson I. E., Loveys B. R. (1988) A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts cereal and lupin leaves. *Planta*, 173:330-339. DOI: 10.1007/BF00401020.
- Ramos M. L. G., Gordon A. J., Minchin F. R., Sprent J. I., Parsons, R. (1999) Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany*, 83:57-63.
- Rapi J. (1988) Šľachtenie strukovín vo VÚRV Piešťany - Šľachtiteľ'ska stanica Horná Streda. *Príroda*, Bratislava, 34-37.
- Rasaei B., Ghobadi M.-E., Khas-Amiri M., Ghobadi M. (2013) Effect of osmotic potential on germination and seedling characteristics of soybean seeds. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5:1265-1268.
- Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. (1992) *Biology of Plants*, 5th Edition. Worth Publishers, New York.

- Repetto M., Semprine J., Boveris A. (2012) Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. IN: Dr. Angel Catala (Ed.) Lipid Peroxidation, InTech 3-30.
- Reynolds-Henne C. E., Langenegger A., Mani J., Schenk N., Zumsteg A., Feller U. (2010) Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 68:37-43.
- Riaz A., Younis A., Riaz Taj A., Karim A., Tariq U., Munir S., Riaz S. (2013) Effect of drought stress on growth and flowering of marigold (*Tagetes erecta* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 45:123-131.
- Richards R. A. (1978) Variation between and within species of rapeseed (*Brassica campestris* and *B. napus*) in response to drought stress. III. Physiological and physicochemical characters. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29:491-501.
- Rivera-Becerril F., van Tuinen D., Martin-Laurent F., Metwally A., Dietz K. J., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (2005) Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza*, 16:51-60.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M., Zabalza A., Corpas F. J., Gómez M., Del Río L. A., Sandalio L. M. (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment*, 29:1532-1544.
- Roy Davies D. (1995) Peas: *Pisum sativum* (*Leguminosae-Papilionidae*). IN: Smartt J., Simmonds N.W. (eds.) *Evolution of crop plants*, 2nd edition, Longman Group, Harlow, Essex, 294-296.
- Rubio M. C., Gonzalez E. M., Minchin F. R., Webb K. J., Arrese-Igor C., Ramos J., Becana M. (2002) Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves

- and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, 115:531-540. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150407.x.
- Rubio M. C., González E. M., Minchin F. R., Webb K. J., Arrese-Igor C., Ramos J., Becana M. (2002) Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, 115:531-540.
- Ruiz-Sola Á., Arbona V., Gómez-Cadenas A., Rodríguez-Concepción M., Rodríguez-Villalón A. (2014) A Root Specific Induction of Carotenoid Biosynthesis Contributes to ABA Production upon Salt Stress in Arabidopsis. *PLoS ONE* 9(3):e90765. DOI: 10.1371/journal.pone.0090765.
- Sagi M., Fluhr R. (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 126:1281-1290.
- Sagi M., Scazzocchio C., Fluhr R. (2002) The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *The Plant Journal*, 31:305-317. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01363.x.
- Sakata Y., Komatsu K., Takezawa D. (2014) ABA as a Universal Plant Hormone. In: U. Lüttge et al. (ed.), *Progress in Botany*, Springer 75:57-96.
- Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought -responsive gene expression. *Plant Cell*, 18:1292-1309. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.035881>.
- Sakthivelu G., Devi M.K.A., Giridhar P., Rajasekaran T., Ravishankar G. A., Nedev T., Kosturkova G. (2008) Drought-induced alterations in growth, osmotic

- potential and in vitro regeneration of soybean cultivars. *General and Applied Plant Physiology*, 34 (Special Issue):103-112.
- Saliendra N. Z., Sperry J. S., Comstock J. P. (1995) Influence of leaf water status on stomatal response to humidity, hydraulic conductance, and soil drought in *Betula occidentalis*. *Planta*, 196:357-366.
- Samarah N., Mullen R., Cianzio S. (2007) Size distribution and mineral nutrients of soybean seeds in response to drought stress. *Journal of Plant Nutrition*, 27:815-835. DOI: 10.1081/PLN-120030673.
- Sanchez F. J., De Andres E. F., Tenorio J. L., Ayerbe L. (2004) Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *Field Crop Research*, 86:81-90. DOI: 10.1016/S0378-4290(03)00121-7.
- Sassi S., Aydi S., Hessini K., Gonzalez E. M., Arrese-Igor C., Abdelly C. (2010) Long-term mannitol-induced osmotic stress leads to stomatal closure, carbohydrate accumulation and changes in leaf elasticity in *Phaseolus vulgaris* leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9:6061-6069.
- Savić S. (2008) Fiziološki mehanizmi regulacije produktivnosti paradajza (*Lycopersicon esculentum* L.) u uslovima stresa suše, Doktorska disertacija, Univerziteta u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Schachtman D. P., Goodger J. Q. (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, 13:281-287. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.04.003.
- Sekmen A. H., Turkan I., Tanyolac Z. O., Ozfidan C., Dinc A. (2012) Different antioxidant defense responses to salt stress during germination and vegetative stages of endemic halophyte *Gypsophila ob lanceolata* Bark. *Environmental and Experimental Botany*, 77:63-76.

- Seo M., Peeters A. J. M., Koiwai H., Oritani T., Marion-Poll A., Zeevaart J. A. D., Koornneef M., Kamiya Y., Koshiba T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:12908-12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197.
- Schwartz A., Wu W-H., Tucker E. B., Assmann S. M. (1994) Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: An intracellular locus of phytohormone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91:4019-4023.
- Shaaltiel Y., Gressel J. (1986) Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26:22-28.
- Shaban M. (2013) Effect of water and temperature on seed germination and emergence as a seed hydrothermal time model. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1:1686-1691.
- Shahbazi E. S., Arzani A., Saeidi G. (2011) Effects of NaCl treatments on seed germination and antioxidant activity of canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Bangladesh Journal of Botany*, 41:67-73.
- Shahid M. A., Balal R. M., Pervez M. A., Abbas T., Ashfaq T., Ghazanfar U., Afzal M., Rashid A., Garcia-Sanchez F., Mattson N. S. (2012) Differential response of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to salt stress in relation to the growth, physiological attributes, antioxidant activity and organic solutes. *Australian Journal of Crop Science*, 6:828-838.
- Shang S. I., Ma L. G., Zhang H. L., He R. R., Wang X. C., Cui S. J., Sun D. Y. (2005) Ca²⁺ influx in to the Lily pollen grains through a hyperpolarization-activated

- Ca²⁺-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. *Plant Cell Physiology*, 46:598-608.
- Sharma P., Dubey R. S. (2005) Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology*, 162:854-864.
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012:1-26. DOI: 10.1155/2012/217037.
- Sharp R. E. (2002) Interaction with ethylene:changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25:211-222. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x.
- Sharp R. E., LeNoble M. E. (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 53:33-37.
- Shashidhar V. R., Prasad T. G., Sudharshan L. (1996) Hormone signals from roots to shoots of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Moderate soil drying increase delivery of abscisic acid and depresses delivery of cytokinins in xylem sap. *Annals of Botany*, 78:151-155. DOI: 10.1006/anbo.1996.0107.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002) Regulation and functions of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53:1305-1311.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:410-417. DOI: 10.1016/S1369-5266(03)00092-X.
- Siahsar B. A., Ganjali S., Allahdoo M. (2010) Evaluation of drought tolerance indices and their relationship with grain yield of lentil lines in drought-stressed and

- irrigated environments. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4:4336-4346.
- Singh M., Singh B. B., Ram P. C. (1990) Effect of iso-osmotic levels of salt and PEG-6000 on germination and early seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Biologia Plantarum*, 32:226-231. DOI: 10.1007/BF02890880.
- Singh M., Singh B. B. (1992) Effect of iso-osmotic levels of salts and PEG-6000 on enzymes in germinating pea seeds. *Biologia Plantarum*, 34:415-422. DOI: 10.1007/BF02923591.
- Sio-Se Mardeh A., Ahmadi A., Postini K., Mohammadi V. (2006) Evaluation of drought resistance indices under various environmental conditions. *Field Crop Research*, 98:222-229. DOI: 10.1016/j.fcr.2006.02.001.
- Shiriga K., Sharma R., Kumar K., Kumar Yadav S., Hossain F., Thirunavukkarasu N. (2014) Expression Pattern of Superoxide Dismutase Under Drought Stress in Maize. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3:11333-11337.
- Slinkard A. E., Holm F. A., McVicar R., Kominski D., Soroka J. (1994) Dry pea production in Saskatchewan. *Sask. Ag. and Food, Farmfact*, 1-7.
- Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A. (2015) Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:3561-13578.
- Spasojević B, Stanačev S, Starčević Lj, Marinković B (1984) Posebno ratarstvo I. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Nom Sadu, Novi Sad.
- Stanisavljević N., Savić J., Jovanović Ž., Miljuš-Djukić J., Radović S., Vinterhalter D., Vinterhalter B. (2012) Antioxidative-related enzyme activity in *Alyssum*

- markgrafii* shoot cultures as affected by nickel level. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:1997-2006. DOI: 10.1007/s11738-012-1001-3.
- Stikić R., Jovanović Z. (2012) Fiziologija stresa biljaka. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Stoll M., Loveys B. R., Dry P. (2000) Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 51:1627-1634.
- Swamy P. M., Smith B. (1999) Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Current Science*, 76:1220-1227.
- Tahi H., Wahbi S., El Modafar C., Aganchich A., Serraj R. (2008) Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit irrigation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 142:550-562.
- Taiz L., Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*, 3rd Edition., Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tandoğan B., Ulusu N. N. (2006) Kinetic Mechanism and Molecular Properties of Glutathione Reductase. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31:230-237.
- Torres-Franklin M.L., Contour-Ansel D., Zuily-Fodil Y., Pham-Thi A.T. (2008) Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from a moderate drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 165:514-521.
- Tripathy B., Oelmüller R. (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7:1621-1633. DOI: 10.4161/psb.22455.

- Trovato M., Mattioli R., Constantino P. (2008) Multiple Roles of Proline in Plant Stress Tolerance and Development. *Rendiconti Lincei*, 19:325-346.
- Turkan I., Bor M., Ozdemir F., Koca H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168:223-231.
- Tuteja N. (2007) Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior* 2:135-138. DOI: 10.1007/s00299-013-1418-1.
- Urbez C., Cercos M., Perez-Amador M.A., Carbonell J. (2006) Expression of *PsGRP1*, a novel glycine rich protein gene of *Pisum sativum*, is induced in developing fruit and seed and by ABA in pistil and root. *Planta*, 223:1292-1302. DOI: 10.1007/s00425-005-0178-8.
- Vainshtein B. K., Melik-Adamyany W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. I. (1981) Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature*, 293:411-412. DOI: 10.1038/293411a0.
- Van Norman J., Zhang J., Cazzonelli C., Pogson B., Harrison P., Bugg T., Xun Chan K., Thompson A., Benfey P. (2014) Periodic root branching in *Arabidopsis* requires synthesis of an uncharacterized carotenoid derivative. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, E1300-E1309.
- Van Volkenburgh E. W. J. (1983) Inhibition of light-stimulated leaf expansion by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 34:835-845. DOI: 10.1093/jxb/34.7.835.
- Vanacker H., Sandallo L. M., Jiménez A., Palma J. M., Corpas F. J., Meseguer V., Gómez, Sevilla F., Leterrier M., Foyer C. H., del Rio L. A. (2006) Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different

- sources of nitrogen nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 57:1735-1745.
- Varga B, Janda T, László E, Veisz O (2012) Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:849-858.
- Vavilov N. I. (1935) *Teoretičeskie osnovi selekcii rastenij, I-III*, Seljskohoz, Moskva-Leningrad.
- Verma S., Dubey R. S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164:645-655.
- Vučković S. (1999) *Krmno bilje*. Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija, Beograd - Bonart, Nova Pazova.
- Wang C. Q., Liu T., Xu H. J. (2011) Ascorbate-Glutathione Metabolism during PEG-Induced Water Deficit in *Trifolium repens*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58:597-602.
- Wang X-F., Zhang D-P. (2008) Abscisic acid receptors: multiple signal-perception sites. *Annals of Botany*, 101:311-317.
- Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Cui M., Webb R., Fuchigami L. (2005) Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130:167-173.
- Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redob Y., Jammes F., Valon C., Frei dit Frey N. and Leungal J. (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Molecular Plant*, 1:198-217.

- Wilkinson S. (1999) pH as a stress signal. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29:87-99.
- Wilkinson S., Davies W. J. (2002) ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell and Environment*, 25:195-210. DOI: 10.1046/j.0016-8025.2001.00824.x.
- Wilkinson S., Davies W. J. (2008) Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *Journal of Experimental Botany*, 59:619-631. DOI: 10.1093/jxb/erm338.
- Wilkinson S., Corlett J.E., Oger L., Davies W. J. (1998) Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and flacca tomato leaves. *Plant Physiology*, 117:703-709.
- Wituszyńska W., Karpiński S. (2013) Programmed Cell Death as a Response to High Light, UV and Drought Stress in Plants. In: Dr. Kourosh Vahdati (Ed.) *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*, InTech, 207-246.
- Wood A. J. (2006) Eco-physiological adaptations to limited water environments. In: M. A. Jenks, P. M. Hasegawa (Eds.) *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing Oxford, UK 1-3.
- Wu C., Wang Q., Xie B., Wang Z., Cui J., Hu T. (2011) Effects of drought and salt stress on seed germination of three leguminous species. *African Journal of Biotechnology*, 10:17954-17961.
- Xiao X., Xu X., Yang F. (2008) Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 42:705-719.

- Xiong L. (2007) Abscisic acid in plant response and adaptation to drought and salt stress. In: M.A. Jenks et al. (eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, Springer 193-221.
- Xiong L., Zhu J.-K. (2003) Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133:29-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.025395>.
- Xiong L., Wang R. G., Mao G., Koczan J. M. (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology*, 142:1065-1074. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.084632>.
- Xu D. H., Wang X. W., Wang G. (2012) Ecophysiological responses of *Caragana korshinskii* Kom. under extreme drought stress: Leaf abscission and stem survives. *Photosynthetica*, 50:541-548. DOI: 10.1007/s11099-012-0060-4.
- Yabuta Y., Motoki T., Yoshimura K., Takeda T., Ishikawa T., Shigeoka S. (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant Journal*, 32:915-925.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57:781-803. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444.
- Yesbergenova Z., Yang G, Oron E., Soffer D., Fluhr R., Sagi M. (2005) The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *The Plant Journal*, 42:862-876.

- Yokota A., Kawasaki S., Iwano M., Nakamura C., Miyake C., Akashi K. (2002) Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Annals of Botany*, 89:825-832.
- Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38:171-186. DOI: 10.1023/A:1007201411474.
- Yoshida H., Tomiyama Y., Saiki M., Mizushina Y. (2007) Tocopherol Content and Fatty Acid Distribution of Peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of the American oil Chemists' Society*, 84:1031-1038.
- Zdunek E., Lips H. (2001) Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *Journal of Experimental Botany*, 52:1269-1276. DOI: 10.1093/jexbot/52.359.1269.
- Zdunek-Zastocka E. (2008) Molecular cloning, characterization and expression analysis of three aldehyde oxidase genes from *Pisum sativum* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:19-28. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.09.011.
- Zdunek-Zastocka E. (2010) The activity pattern and gene expression profile of aldehyde oxidase during the development of *Pisum sativum* seeds. *Plant Science*, 179:543-548. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.08.005.
- Zdunek-Zastocka E., Sobczak M. (2013) Expression of *Pisum sativum* PsA03 gene, which encodes an aldehyde oxidase utilizing abscisic aldehyde, is induced under progressively but not rapidly imposed drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71:57-66. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.06.027.
- Zdunek-Zastocka E., Omarov R. T., Koshiba T., Lips H. S. (2004) Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during

vegetative development and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 1-9. DOI: 10.1093/jxb/erh134.

Zeven A. C., Zhukovsky P. M. (1975) *Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity*, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.

Zhang J., Davies W.J. (1989) Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behavior of sunflower plants. *New Phytologist*, 113:167-174. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb04703.x.

Zhang W. B., Li N. N., Qi F., Chen X., Hao J., Yu C. R., Hao J., Yu C. R., Lin X. F. (2014) Isolation and Expression Analysis of Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes from Three *Caragana* Species. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61: 656-663.

Zhang F., Guo J. K., Yang Y. L., He W. L., Zhang L. X. (2004) Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and re-watering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26:345-352.

Zhu J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53:247-273. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091401.

10. PRILOZI

PRILOG 1.

Tabela 1. Klijavost i srednje vreme klijanja kod ponika pod osmotskim stresom.

Sorta	Tretman	Klijavost (%)	MGT (dani)
Mraz	Kontrola	100±0,25	5,04±0,00
	-0,1MPa PEG	99 ^{nz} ±0,25	5,61 ^{***} ±0,85
	-0,2MPa PEG	97 ^{***} ±0,48	5,52 ^{***} ±0,08
Junior	Kontrola	99±0,41	5,52±0,00
	-0,1MPa PEG	84 ^{***} ±0,63	5,86 ^{***} ±0,00
	-0,2MPa PEG	83 ^{***} ±0,82	6,42 ^{***} ±0,00
Javor	Kontrola	84±0,25	5,58±0,00
	-0,1MPa PEG	64 ^{***} ±0,41	6,91 ^{***} ±0,01
	-0,2MPa PEG	58 ^{***} ±0,82	7,24 ^{***} ±0,01
Dukat	Kontrola	97±0,63	5,15±0,00
	-0,1MPa PEG	95 ^{nz} ±0,81	5,56 ^{***} ±0,02
	-0,2MPa PEG	90 ^{***} ±1,22	7,02 ^{***} ±0,04
Pionir	Kontrola	96±0,25	5,21±0,01
	-0,1MPa PEG	86 ^{***} ±0,41	5,14 ^{nz} ±0,00
	-0,2MPa PEG	84 ^{***} ±1,93	5,57 ^{***} ±0,01
Partner	Kontrola	96±0,63	5,09±0,01
	-0,1MPa PEG	92 ^{***} ±0,25	5,25 ^{***} ±0,01
	-0,2MPa PEG	87 ^{***} ±0,63	5,59 ^{***} ±0,01
Trezor	Kontrola	99±0,25	5,11±0,00
	-0,1MPa PEG	96 ^{***} ±0,41	5,27 ^{***} ±0,00
	-0,2MPa PEG	96 ^{***} ±0,25	5,17 ^{nz} ±0,00

*** - $p < 0,001$, nz - nema značajnosti

PRILOG 2.

Tabela 1. Fiziološki parametri kod ponika pod osmotskim stresom 10. dana oglada.

Sorta	Tretman	Dužina nadzemnog dela (mm)	Dužina korena (mm)	Sveža masa nadzemnog dela (g)	Sveža masa korena (g)	Suva masa nadzemnog dela (g)	Suva masa korena (g)	Odnos suve mase nadzemnog dela i korena
Mrz	Kontrola	119,38±1,23	212,38±1,48	3,860±0,005	2,319±0,007	0,290±0,000	0,168±0,000	1,72±0,04
	-0,1MPa PEG	31,38***±1,16	105,62***±1,16	0,980***±0,003	0,843***±0,002	0,100***±0,001	0,080***±0,000	1,26***±0,02
	-0,2MPa PEG	20,50***±0,79	83,00***±0,54	0,540***±0,001	0,668***±0,003	0,700***±0,000	0,080***±0,002	0,88***±0,03
Junior	Kontrola	215,00±0,04	165,12±0,43	4,920±0,001	2,710±0,002	0,394±0,001	0,160±0,002	2,18±0,04
	-0,1MPa PEG	35,00***±0,16	107,00***±0,12	0,660***±0,002	0,790***±0,003	0,069***±0,001	0,078***±0,002	0,88***±0,00
	-0,2MPa PEG	29,05***±0,06	64,00***±0,04	0,580***±0,001	0,470***±0,001	0,070***±0,001	0,060***±0,001	1,16***±0,04
Javor	Kontrola	126,50±0,18	211,50±0,74	4,840±0,004	3,376±0,002	0,350±0,002	0,208±0,002	1,69±0,02
	-0,1MPa PEG	27,50***±0,08	62,00***±0,20	0,794***±0,002	0,810***±0,002	0,080***±0,000	0,080***±0,001	0,10***±0,01
	-0,2MPa PEG	11,00***±0,04	53,50***±0,31	0,420***±0,000	0,500***±0,001	0,050±0,001	0,070***±0,001	0,71***±0,01
Dukat	Kontrola	149,52±0,70	210,05±1,03	6,700±0,008	6,379±0,009	0,470±0,001	0,310±0,001	1,52±0,00
	-0,1MPa PEG	39,75***±0,53	88,50***±0,11	1,238***±0,004	1,731***±0,003	0,120***±0,004	0,160***±0,000	0,75***±0,00
	-0,2MPa PEG	23,05***±0,18	77,50±0,04	0,688***±0,004	1,149***±0,001	0,091***±0,001	0,131***±0,000	0,69***±0,01
Pionir	Kontrola	210,00±0,63	161,50±1,39	3,130±0,020	1,480±0,002	0,240±0,001	0,070±0,000	3,44±0,00
	-0,1MPa PEG	52,50***±0,28	77,02***±0,16	0,670***±0,001	0,390***±0,000	0,070***±0,001	0,040***±0,000	1,60*±0,01
	-0,2MPa PEG	29,50***±0,04	63,00±0,63	0,410***±0,627	0,320***±0,001	0,050***±0,001	0,040***±0,001	1,26***±0,01
Partner	Kontrola	163,50±0,18	183,50±0,12	5,490±0,001	4,650±0,001	0,370±0,001	0,330±0,001	1,12±0,00
	-0,1MPa PEG	38,52***±0,02	85,00***±0,07	1,090***±0,001	2,060***±0,001	0,100***±0,001	0,180***±0,001	0,56***±0,00
	-0,2MPa PEG	29,95***±0,73	58,00±0,04	0,730***±0,001	0,860***±0,001	0,080***±0,001	0,010***±0,000	0,81***±0,11
Trezor	Kontrola	153,52±0,06	200,48±0,20	4,580±0,001	4,170±0,001	0,360±0,001	0,230±0,000	1,56±0,00
	-0,1MPa PEG	24,92***±0,05	112,48***±0,06	0,620***±0,001	1,180***±0,000	0,070***±0,000	0,130***±0,000	0,54***±0,00
	-0,2MPa PEG	22,98***±0,19	103,48***±0,19	0,750***±0,001	1,160***±0,001	0,070***±0,000	0,120***±0,000	0,58***±0,00

*** - p<0,001, ** - p<0,01, * - p<0,05, nz - nema značajnosti

PRILOG 3.

Tabela 1. Fiziološki parametri kod ponika pod osmotskim stresom 15. dana oglada.

Sorta	Tretman	Dužina nadzemnog dela (mm)	Dužina korena (mm)	Sveža masa nadzemnog dela (g)	Sveža masa korena (g)	Suva masa nadzemnog dela (g)	Suva masa korena (g)	Odnos suve mase nadzemnog dela i korena
Mrz	Kontrola	217,00±0,91	271,52±0,39	6,086±0,012	4,062±0,004	0,491±0,002	0,270±0,001	1,82±0,01
	-0,1MPa PEG	59,02***±0,43	240,00***±0,37	1,660***±0,001	1,310***±0,001	0,171***±0,001	0,120***±0,001	1,42***±0,01
	-0,2MPa PEG	41,00***±0,20	95,50***±0,11	1,088***±0,002	1,160***±0,001	0,120***±0,001	0,111***±0,000	1,09***±0,01
Junior	Kontrola	338,02±0,03	204,00±0,04	7,220±0,000	3,530±0,000	0,530±0,000	0,190±0,000	2,79±0,01
	-0,1MPa PEG	149,58***±0,05	106,50***±0,03	2,300***±0,001	1,310***±0,000	0,210***±0,000	0,110***±0,000	1,91***±0,02
	-0,2MPa PEG	67,50***±0,04	90,50***±0,04	1,040***±0,000	0,860***±0,001	0,120***±0,000	0,090***±0,000	1,33***±0,01
Javor	Kontrola	206,52±0,08	263,05±0,23	8,000±0,004	5,690±0,002	0,600±0,003	0,280±0,001	2,14±0,02
	-0,1MPa PEG	64,98***±0,10	96,48***±0,08	2,320***±0,002	2,110***±0,004	0,230***±0,001	0,160***±0,001	1,44***±0,00
	-0,2MPa PEG	27,50***±0,11	67,50***±0,04	0,940***±0,001	1,960***±0,001	0,110***±0,000	0,150***±0,000	0,73***±0,00
Dukat	Kontrola	248,00±0,14	219,00±0,04	10,220±0,001	5,730±0,001	1,060±0,000	0,710±0,001	1,49±0,00
	-0,1MPa PEG	100,00***±0,15	108,00***±0,18	2,525***±0,025	2,760***±0,001	0,680***±0,000	0,690***±0,000	0,98***±0,00
	-0,2MPa PEG	49,02***±0,06	62,98***±0,05	1,410***±0,001	1,360***±0,001	0,590***±0,000	0,570***±0,001	1,04***±0,00
Pionir	Kontrola	283,50±0,08	202,00±0,15	4,228±0,002	1,781±0,001	0,360±0,000	0,110±0,000	3,27±0,01
	-0,1MPa PEG	144,50***±0,24	121,52***±0,20	1,580***±0,002	0,700***±0,001	0,170***±0,000	0,070***±0,001	2,43***±0,02
	-0,2MPa PEG	59,05***±0,18	91,02***±0,20	0,760***±0,001	0,400***±0,001	0,100***±0,001	0,070***±0,000	1,43***±0,01
Partner	Kontrola	252,50±0,08	204,00±0,03	10,220±0,001	6,260±0,001	0,640±0,001	0,320±0,000	2,00±0,00
	-0,1MPa PEG	86,05***±0,18	92,02***±0,13	2,800***±0,002	2,370***±0,001	0,260***±0,000	0,240***±0,000	1,08***±0,00
	-0,2MPa PEG	64,02***±0,06	80,52***±0,05	1,490***±0,001	1,600***±0,001	0,170***±0,002	0,210***±0,001	0,81***±0,00
Trezor	Kontrola	273,00±0,23	215,02±0,16	7,070±0,001	4,560±0,001	0,600±0,001	0,260±0,000	2,31±0,00
	-0,1MPa PEG	91,50***±0,04	135,48***±0,08	2,180***±0,002	2,670***±0,001	0,260***±0,001	0,210***±0,000	1,24***±0,00
	-0,2MPa PEG	74,50***±0,04	156,00***±0,07	1,630***±0,001	1,960***±0,001	0,190***±0,001	0,190***±0,000	1,00***±0,01

*** - p<0,001, ** - p<0,01, * - p<0,05, nz - nema značajnosti

PRILOG 4.

Tabela 1. Fiziološki parametri kod biljaka u suši.

Sorta	Tretman	Sveža masa nadzemnog dela (g)	Sveža masa korena (g)	Suva masa nadzemnog dela (g)	Suva masa korena (g)	Odnos suve mase nadzemnog dela i korena	Indeks tolerantnosti nadzemnog dela	Indeks tolerantnosti korena
Miraz	Kontrola	3,520±0,182	1,630±0,063	0,490±0,031	0,160±0,010	3,149±0,216	1,00	1,00
	T2	1,910 ^{***} ±0,011	1,030 ^{***} ±0,140	0,180 ^{***} ±0,010	0,120 ^{nz} ±0,010	1,659 ^{***} ±0,120	0,37 ^{***} ±0,03	0,75 [*] ±0,07
Junior	Kontrola	7,354±0,177	1,672±0,100	1,186±0,017	0,172±0,007	6,937±0,280	1,00	1,00
	T2	4,200 ^{***} ±0,162	0,864 ^{***} ±0,020	0,650 ^{***} ±0,029	0,146 ^{nz} ±0,009	4,529 ^{***} ±0,196	0,55 ^{***} ±0,02	0,86 [*] ±0,06
Javor	Kontrola	3,022±0,127	1,700±0,076	0,300±0,359	0,130±0,009	2,305±0,134	1,00	1,00
	T2	1,89 ^{***} ±0,066	1,298 ^{***} ±0,042	0,250 ^{nz} ±0,102	0,070 ^{***} ±0,005	3,305 ^{***} ±0,160	0,63 ^{***} ±0,03	0,57 ^{***} ±0,04
Dukat	Kontrola	3,714±0,207	2,004±0,082	0,458±0,026	0,148±0,009	3,131±0,274	1,00	1,00
	T2	3,208 ^{nz} ±0,293	0,130 ^{***} ±0,018	0,412 ^{nz} ±0,041	0,134 ^{nz} ±0,147	3,088 ^{nz} ±0,076	0,92 ^{***} ±0,10	0,90 ^{nz} ±0,13
Pionir	Kontrola	3,969±0,091	1,542±0,093	0,580±0,026	0,170±0,012	3,460±0,117	1,00	1,00
	T2	2,060 ^{***} ±0,220	1,334 ^{***} ±0,073	0,370 ^{***} ±0,030	0,130 [*] ±0,008	2,910 ^{nz} ±0,272	0,67 ^{***} ±0,05	0,76 ^{***} ±0,04
Partner	Kontrola	3,682±0,216	1,424±0,078	0,494±0,036	0,148±0,018	3,443±0,268	1,00	1,00
	T2	2,714 ^{***} ±0,191	0,690 ^{***} ±0,063	0,386 ^{nz} ±0,034	0,130 ^{nz} ±0,018	3,045 ^{nz} ±0,187	0,79 ^{***} ±0,07	0,87 ^{nz} ±0,12
Trezor	Kontrola	5,960±0,289	2,450±0,178	0,730±0,034	0,220±0,012	5,522±0,221	1,00	1,00
	T2	3,628 ^{***} ±0,166	1,494 ^{***} ±0,101	0,620 ^{nz} ±0,014	0,170 ^{***} ±0,004	3,593 ^{nz} ±0,107	0,84 ^{***} ±0,02	0,79 ^{***} ±0,02

*** - p<0,001, ** - p<0,01, * - p<0,05, nz - nema značajnosti

PRILOG 5.

Tabela 1a. ANOVA za klijavost semena.

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	7173,452	1195,575	618,655	<0,001
Tretman	2	1763,643	881,821	456,302	<0,001
Genotip x Tretman	12	971,190	80,933	41,879	<0,001

Tabela 1b. ANOVA za MGT.

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	18,328	3,055	1621,251	<0,001
Tretman	2	9,711	4,856	2577,117	<0,001
Genotip x Tretman	12	7,539	0,628	333,422	<0,001

Tabela 2a. ANOVA za dužinu nadzemnog dela ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	19460,755	3243,459	3524,739	<0,001
Tretman	2	331214,511	165607,256	179969,073	<0,001
Genotip x Tretman	12	17343,690	1445,308	1570,648	<0,001

Tabela 2b. ANOVA za dužinu nadzemnog dela ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	65224,173	10870,696	42451,810	<0,001
Tretman	2	651599,545	325799,772	1272300,366	<0,001
Genotip x Tretman	12	18563,454	1546,954	6041,105	<0,001

Tabela 3a. ANOVA za dužinu korena ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	14856,890	2476,148	1653,357	<0,001
Tretman	2	233721,072	116860,536	78029,332	<0,001
Genotip x Tretman	12	12149,570	1012,464	676,036	<0,001

Tabela 3b. ANOVA za dužinu korena ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	19532,796	3255,466	30039,451	<0,001
Tretman	2	291355,302	145677,651	1344224,387	<0,001
Genotip x Tretman	12	29401,225	2450,102	22608,046	<0,001

Tabela 4a. ANOVA za svežu masu nadzemnog dela ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	15,762	2,627	80069,959	<0,001
Tretman	2	309,101	154,551	4710541,431	<0,001
Genotip x Tretman	12	17,396	1,450	44184,661	<0,001

Tabela 4b. ANOVA za svežu masu nadzemnog dela ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	62,596	10,433	65091,102	<0,001
Tretman	2	659,583	329,791	2057623,204	<0,001
Genotip x Tretman	12	56,600	4,717	29428,046	<0,001

Tabela 5a. ANOVA za svežu masu korena ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	48,204	8,034	237233,582	<0,001
Tretman	2	134,117	67,058	1980163,181	<0,001
Genotip x Tretman	12	27,281	2,273	67131,271	<0,001

Tabela 5b. ANOVA za svežu masu korena ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	61,451	10,242	967002,143	<0,001
Tretman	2	162,183	81,092	7656458,011	<0,001
Genotip x Tretman	12	19,671	1,639	154774,476	<0,001

Tabela 6a. ANOVA za suhu masu nadzemnog dela ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,0758	0,0126	3781,153	<0,001
Tretman	2	1,356	0,678	202966,985	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,0615	0,00512	1533,218	<0,001

Tabela 6b. ANOVA za suhu masu nadzemnog dela ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	2,562	0,427	100190,315	<0,001
Tretman	2	2,652	1,326	311156,659	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,0891	0,00742	1741,841	<0,001

Tabela 7a. ANOVA za suhu masu korena ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,227	0,0379	4277,538	<0,001
Tretman	2	0,251	0,125	14163,738	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,0550	0,00459	518,029	<0,001

Tabela 7b. ANOVA za suhu masu korena ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	2,616	0,436	301898,508	<0,001
Tretman	2	0,171	0,0856	59243,769	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,0438	0,00365	2527,663	<0,001

Tabela 8a. ANOVA za shoot/root odnos suve mase ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	14,554	2,426	1660,641	<0,001
Tretman	2	17,857	8,928	6112,286	<0,001
Genotip x Tretman	12	4,878	0,406	278,268	<0,001

Tabela 8b. ANOVA za odnos suve mase nadzemnog dela i korena ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	13,280	2,213	7767,960	<0,001
Tretman	2	20,568	10,284	36094,379	<0,001
Genotip x Tretman	12	3,167	0,264	926,418	<0,001

Tabela 9a. ANOVA za indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,0499	0,00832	403,000	<0,001
Tretman	2	11,238	5,619	272314,212	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,0448	0,00373	180,798	<0,001

Tabela 9b. ANOVA za indeks tolerantnosti nadzemnog dela ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,383	0,0638	3922,049	<0,001
Tretman	2	7,734	3,867	237679,976	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,217	0,0181	1113,098	<0,001

Tabela 10a. ANOVA za indeks tolerantnosti korena ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,107	0,0178	194,961	<0,001
Tretman	2	5,938	2,969	32532,313	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,165	0,0138	150,861	<0,001

Tabela 10b. ANOVA za indeks tolerantnosti korena ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,766	0,128	840,264	<0,001
Tretman	2	2,431	1,216	7997,930	<0,001
Genotip x Tretman	12	0,425	0,0354	233,230	<0,001

Tabela 11a. ANOVA za svežu masu nadzemnog dela biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	89,631	14,939	83,987	<0,001
Tretman	1	45,895	45,895	258,028	<0,001
Genotip x Tretman	6	11,917	1,986	11,166	<0,001

Tabela 11b. ANOVA za svežu masu korena biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	5,149	0,858	22,705	<0,001
Tretman	1	6,984	6,984	184,776	<0,001
Genotip x Tretman	6	0,966	0,161	4,259	0,001

Tabela 12a. ANOVA za suhu masu nadzemnog dela biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	2,956	0,493	118,897	<0,001
Tretman	1	0,664	0,664	160,332	<0,001
Genotip x Tretman	6	0,462	0,0771	18,597	<0,001

Tabela 12b. ANOVA za suhu masu korena biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,0493	0,00821	12,885	<0,001
Tretman	1	0,0189	0,0189	29,652	<0,001
Genotip x Tretman	6	0,00318	0,000530	0,831	0,551

Tabela 13. ANOVA za odnos suve mase nadzemnog dela i korena biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	69,604	11,601	51,670	<0,001
Tretman	1	5,208	5,208	23,198	<0,001
Genotip x Tretman	6	18,500	3,083	13,733	<0,001

Tabela 14a. ANOVA za indeks tolerantnosti nadzemnog dela biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,547	0,0911	11,586	<0,001
Tretman	1	1,530	1,530	194,556	<0,001
Genotip x Tretman	6	0,547	0,0911	11,586	<0,001

Tabela 14b. ANOVA za indeks tolerantnosti korena biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	0,203	0,0338	2,224	0,054
Tretman	1	0,768	0,768	50,523	<0,001
Genotip x Tretman	6	0,203	0,0338	2,224	0,054

Tabela 15. ANOVA za provodljivost stoma.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	24392,506	4065,418	37,78	<0,001
Tretman	2	360829,454	180414,727	1676,640	<0,001
Genotip x Tretman	12	27808,162	2317,347	21,536	<0,001

Tabela 16a. ANOVA za sadržaj ABA u nadzemnom delu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	111980,762	18663,460	524,208	<0,001
Tretman	2	1135,841	567,921	15,951	<0,001
Genotip x Tretman	12	14693,048	1224,421	34,391	<0,001

Tabela 16b. ANOVA za sadržaj ABA u nadzemnom delu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	297626,381	49604,397	429,564	<0,001
Tretman	2	57784,794	28892,397	250,202	<0,001
Genotip x Tretman	12	136158,095	11346,508	98,258	<0,001

Tabela 17. ANOVA za sadržaj ABA u listovima biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	883975,360	147329,227	100,118	<0,001
Tretman	2	5016893,343	2508446,671	1704,622	<0,001
Genotip x Tretman	12	904510,857	75375,905	51,222	<0,001

Tabela 18a. ANOVA za aktivnost SOD u nadzemnom delu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	71,975	11,996	3,539	0,010
Tretman	1	16,033	16,033	4,730	0,038
Genotip x Tretman	6	145,775	24,296	7,167	<0,001

Tabela 18b. ANOVA za za aktivnost SOD u nadzemnom delu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	58,402	9,734	11,552	<0,001
Tretman	1	1,802	1,802	2,139	0,155
Genotip x Tretman	6	30,815	5,136	6,095	<0,001

Tabela 19a. ANOVA za za aktivnost SOD u korenu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	51,028	8,505	4,296	0,003
Tretman	1	38,477	38,477	19,437	<0,001
Genotip x Tretman	6	71,368	11,895	6,009	<0,001

Tabela 19b. ANOVA za za aktivnost SOD u korenu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	26,360	4,393	5,315	<0,001
Tretman	1	14,762	14,762	17,859	<0,001
Genotip x Tretman	6	47,660	7,943	9,610	<0,001

Tabela 20a. ANOVA za za aktivnost APx u nadzemnom delu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	93683,901	15613,983	584,358	<0,001
Tretman	1	1623,767	1623,767	60,770	<0,001
Genotip x Tretman	6	146779,908	24463,318	915,546	<0,001

Tabela 20b. ANOVA za za aktivnost APx u nadzemnom delu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	5569,795	928,299	147,399	<0,001
Tretman	1	3273,179	3273,179	519,727	<0,001
Genotip x Tretman	6	4829,104	804,851	127,797	<0,001

Tabela 21a. ANOVA za za aktivnost APx u korenu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	56443,300	9407,217	2065,218	<0,001
Tretman	1	1951,913	1951,913	428,514	<0,001
Genotip x Tretman	6	76552,534	12758,756	2801,000	<0,001

Tabela 21b. ANOVA za za aktivnost APx u korenu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	761713,053	126952,175	9786,085	<0,001
Tretman	1	5637,966	5637,966	434,602	<0,001
Genotip x Tretman	6	88873,468	14812,245	1141,799	<0,001

Tabela 22a. ANOVA za za aktivnost GR u nadzemnom delu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	2360,086	393,348	62,385	<0,001
Tretman	1	1143,493	1143,493	181,359	<0,001
Genotip x Tretman	6	9471,844	1578,641	250,374	<0,001

Tabela 22b. ANOVA za za aktivnost GR u nadzemnom delu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	3209,239	534,873	142,761	<0,001
Tretman	1	3015,659	3015,659	804,901	<0,001
Genotip x Tretman	6	3538,760	589,793	157,420	<0,001

Tabela 23a. ANOVA za za aktivnost GR u korenu ponika (10. dan).

Nakon 10 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	16480,873	2746,812	705,962	<0,001
Tretman	1	0,161	0,161	0,0414	0,840
Genotip x Tretman	6	11257,793	1876,299	482,230	<0,001

Tabela 23b. ANOVA za za aktivnost GR u korenu ponika (15. dan).

Nakon 15 dana	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	5531,501	921,917	173,639	<0,001
Tretman	1	1426,485	1426,485	268,673	<0,001
Genotip x Tretman	6	2847,297	474,549	89,379	<0,001

Tabela 24. ANOVA za za aktivnost SOD u listovima biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	115,825	19,304	25,089	<0,001
Tretman	1	0,495	0,495	0,643	0,429
Genotip x Tretman	6	24,205	4,034	5,243	<0,001

Tabela 25. ANOVA za za aktivnost APx u listovima biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	2047,331	341,222	71,571	<0,001
Tretman	1	1,815	1,815	0,381	0,542
Genotip x Tretman	6	3584,889	597,482	125,321	<0,001

Tabela 26. ANOVA za za aktivnost GR u listovima biljaka.

	DF	SS	MS	F	P
Genotip	6	2679,562	446,594	154,267	<0,001
Tretman	1	136,621	136,621	47,193	<0,001
Genotip x Tretman	6	943,728	157,288	54,332	<0,001

11. BIOGRAFIJA

Gordana R. Zdjelar (udata Petrović) je rođena 12.08.1975. godine u Senti. Osnovnu školu je završila u Bajši, a Gimnaziju u Bačkoj Topoli. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Odsek za biologiju, smer diplomirani biolog, upisala je školske 1994/1995. godine. Diplomirala je 1999. godine sa prosečnom ocenom 9,67. Iste godine je upisala magistarske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom sadu, grupa Genetika i oplemenjivanje biljaka. Sve ispite predviđene planom i programom položila je sa prosečnom ocenom 9,62. Magistarsku tezu pod nazivom "Određivanje genetičke udaljenosti genitipova suncokreta (*Helianthus annuus* L) primenom RAPD markera" odbranila je 2003. godine.

U toku školske 1999/2000. godine bila je zaposlena kao asistent pripravnik na predmetu Genetika na Odseku za biologiju PMF-a u Novom Sadu. U toku 2002. godine, bila je istraživač pripravnik u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, u Odeljenju za uljane kulture. Radila je kao honorarni predavač na predmetu Genetika na Univerzitetu Megatrend i kao profesor biologije u Gimnaziji u Bačkoj Topoli. Radila je i na poslovima zaštite životne sredine u Opštinskoj upravi u Bačkoj Topoli i u a.d. "Bio-Ekološki centar" u Zrenjaninu. U "A BIO TECH LAB" d.o.o. u Sremskoj Kamenici je obavljala posao rukovodioca Biotehnološke laboratorije od 2008. do 2011. godine. Od aprila 2011. zaposlena je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, u Laboratoriji za ispitivanje semena na poslovima ispitivanja GMO i genetičke čistoće semenskog materijala. Septembra 2012. godine je stekla zvanje istraživača saradnika.

Pohađala je više kurseva iz oblasti GMO detekcije i utvrđivanja genetičke čistoće i verifikacije hibrida u našoj zemlji i u inostranstvu.

Učesnik je nacionalnog projekta "Povećanje tržišnog značaja krmnih biljaka oplemenjivanjem i optimizacijom tehnologije proizvodnje semena" (TR 1024) i FP7 evropskog projekta LEGATO (LEGumes for the Agriculture of TOMorrow).

U saradnji sa kolegama objavila je 39 bibliografskih jedinica. Ostvareni koeficijent naučne kompetentnosti prema Pravilniku Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije iznosi 64,3.

Član je Srpskog društva za fiziologiju biljaka i FESPB (Federation of European Societies for Plant Biology) i Društva genetičara Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: **Gordana Zdjelar**

Broj prijave doktorske disertacije: **356/8-4.2. od 29.05.2013. godine**

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom:

"Fiziološke, biohemijske i molekularne osnove tolerantnosti na sušu i osmotski stres u ranim vegetativnim fazama razvoja odabranih genotipova roda *Pisum*"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programimadrugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 29.03.2016.

Zdjelar Gordana

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Gordana Zdjelar**

Broj prijave doktorske disertacije: **356/8-4.2. od 29.05.2013. godine**

Studijski program

Naslov doktorske disertacije **"Fiziološke, biohemijske i molekularne osnove tolerantnosti na sušu i osmotski stres u ranim vegetativnim fazama razvoja odabranih genotipova roda *Pisum*"**

Mentori: **prof. dr Tomislav Živanović i prof. dr Radmila Stikić**

Potpisana **Gordana Zdjelar**

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 29. 03. 2016.

Zdjelar Gordana

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

"Fiziološke, biohemijske i molekularne osnove tolerantnosti na sušu i osmotski stres u ranim vegetativnim fazama razvoja odabranih genotipova roda *Pisum*"

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. **Autorstvo - nekomercijalno**
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 29.03.2016.

Jelena Gordava