



**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**PRIRODNO-MATEMATIČKI**  
**FAKULTET**  
**DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I**  
**ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE**



**Biohemijski mehanizmi otpornosti**  
**klonova topole (*Populus* spp.)**  
**na vodni stres**

**- DOKTORSKA DISERTACIJA -**

Mentori:

**Vanr. prof. dr Boris Popović**

**Vanr. prof. dr Ivana Beara**

Kandidat:

**Ružica Ždero Pavlović**

**Novi Sad, 2017.**



*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u hemijskim i biohemijskim laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, laboratoriji za mikropropagaciju i molekularna istraživanja Instituta za nizijsko šumarstvo i zaštitu životne sredine, laboratorijama organske hemije Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu i laboratoriji za fluorescentnu mikroskopiju i elektroforezu Departmana za biologiju Univerziteta u Segedinu, u okviru realizacije projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III 43002.*

*Želim da se zahvalim svima koji su mi na bilo koji način pomogli u toku izrade ovog rada:*

*Na prvom mestu, zahvaljujem se vanr. prof. dr Borisu Popoviću, mentoru - na velikoj pomoći, podršci, interesovanju, veoma korisnim stručnim savetima, usmeravanju, uloženom trudu i vremenu i pokazanom razumevanju.*

*Zahvaljujem se vanr. prof. dr Ivani Beari, mentoru - na stručnim savetima, smernicama i diskusiji u toku rada i na finalnom oblikovanju disertacije.*

*Profesoru dr Saši Orloviću se zahvaljujem na brzini u čitanju disertacije i na korisnim sugestijama u toku izrade ovog rada, kao i ukazanom poverenju i prilici da sarađujem sa njegovim istraživačkim timom prilikom izvođenja eksperimenta na kulturi tkiva.*

*Iskreno se zahvaljujem prof. dr Nedi Mimici-Dukić na podršci i prenesenom znanju, kao i na interesovanju i sugestijama tokom izrade ove disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem prof. dr Dubravki Štajner na divnoj saradnji od samog početka mog rada na Poljoprivrednom fakultetu, kao i na pruženoj prilici da radeći sa njom naučim puno toga.*

*Želim takođe da se zahvalim:*

*dr Vesni Tumbas Šaponjac za pomoć pri HPLC analizi i ESR analizi ekstrakata listova topole; dr Vladislavi Galović i dr Branislavu Kovačeviću se zahvaljujem na pruženoj pomoći prilikom obuke za rad na kulturi tkiva; nastavnicima i tehničkim saradnicima na predmetu Hemija i Biohemija Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu – na podršci tokom rada na disertaciji, a posebno MSc Bojani Blagojević na podršci i iskrenom prijateljstvu.*

*Mojoj porodici dugujem neizmernu zahvalnost za svo strpljenje, razumevanje, ljubav i podršku.*

*Novi Sad, jul 2017.*

*MSc Ružica Ždero Pavlović*



## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPŠTI DEO .....	4
2.1. Problem vodnog stresa.....	4
2.1.1. Biljke i vodni stres.....	5
2.1.1.1. Uticaj nedostatka vode na biljke-biohemija suše .....	6
2.1.1.2. Percepcija signala i ćelijski odgovor na sušu – signalana transdukcija .....	8
2.1.1.3. Otpornost na nedostatak vode - mehanizmi adaptacije na sušu.....	11
2.1.1.3.1. Osmotsko prilagođavanje u uslovima vodnog deficita.....	12
2.1.1.4. Uloga prolina i glicin-betaina .....	13
2.1.1.4.1. Prolin .....	13
2.1.1.4.2. Glicin-betain .....	17
2.2. Biljke i oksidativni stres .....	20
2.2.1. ROS i markeri oksidativnog stresa.....	20
2.2.2. RNS i biološka uloga NO .....	23
2.2.3. Antioksidantni sistem biljaka.....	27
2.2.3.1. Antioksidantni enzimi.....	27
2.2.3.2. Neenzimski antioksidanti.....	30
2.2.4. Fluorescentne metode detekcije ROS/RNS.....	34
2.2.4.1. Fluorescencija .....	34
2.2.4.2. Fluorescentna mikroskopija .....	35
2.3. Osobine roda Populus.....	40
2.3.1. Topola kao model drvo .....	41
2.3.2. Privredni značaj .....	41
2.3.3. Odabrani klonovi topole .....	41
2.3.4. Fenolna jedinjenja u vrstama roda Populus.....	43
2.3.4.1. Salicinoidi.....	43
2.3.4.2. Fenolne kiseline i derivati.....	46
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	49
3.1. Ogljed u kulturi tkiva.....	49
3.2. Ogljed u hidroponima.....	50
3.3. Metode ispitivanja .....	52
3.3.1. Priprema ekstrakata .....	52
3.3.2. Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina .....	52
3.3.3. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze.....	53
3.3.4. Određivanje aktivnosti katalaze .....	53

3.3.5. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze.....	53
3.3.6. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze .....	54
3.3.7. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze.....	54
3.3.8. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze.....	55
3.3.9. Određivanje količine redukovanog glutationa.....	55
3.3.10. Određivanje kolčine malonildialdehida.....	55
3.3.11. Određivanje intenziteta oksidacije proteina.....	56
3.3.12. Određivanje količine vodonik peroksida.....	56
3.3.13. ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala .....	57
3.3.14. Određivanje pigmenata .....	59
3.3.15. Određivanje prolina.....	60
3.3.16. Određivanje aktivnosti prolin-dehidrogenaze.....	60
3.3.17. Određivanje glicin-betaina .....	60
3.3.18. Merenja fluorescentnim mikroskopom.....	61
3.3.18.1. Određivanje nivoa ukupnih unutarćelijskih ROS .....	61
3.3.18.2. Određivanje nivoa NO.....	61
3.3.18.3. Određivanje nivoa ONOO <sup>-</sup> .....	62
3.3.18.4. Određivanje vijabilnosti ćelija FDA metodom.....	62
3.3.19 . HPLC analiza fenolnih komponenti topole .....	62
3.3.20. Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	63
3.3.21. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	63
3.3.22. Određivanje sadržaja ukupnih kondenzovanih tanina ili proantocijanidina.....	64
3.3.23. Određivanje PAL .....	64
3.3.24. Određivanje PPO.....	65
3.3.25. Određivanje skevindžer aktivnosti ekstrakata DPPH-metodom .....	65
3.3.26. Određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom .....	66
3.3.27. Određivanje O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> skevindžer aktivnost.....	66
3.3.28. Statistička obrada podataka .....	67
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	68
4.1. Biohemijski odgovor kulture tkiva topole klon M-1 na vodni stres izazvan sa PEG 600068	
4.1.1. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost antioksidantnih enzima ....	69
4.1.2. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj fenola i antioksidantnu aktivnost ekstrakata.....	70
4.1.3. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj RNOS i parametre oksidativnog stresa.....	71
4.1.4. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na osmotske parametre .....	73

4.1.5. Korelaciona analiza analiziranih parametara .....	74
4.2. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na antioksidantni sistem, parametere oksidativnog stresa i metabolizam prolina i glicin-betaina u listu i korenu odabranih klonova topole.....	79
4.2.1. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost antioksidantnih enzima ...	79
4.2.2. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na parametre oksidativnog stresa i sadržaj pigmenata .....	88
4.2.3. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na osmotske parametre .....	96
4.2.4. Korelaciona analiza biohemijskih parametara topole izložene vodnom stresu.....	100
4.3. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na polifenolni profil i antioksidantni kapacitet lista i korena odabranih klonova topole .....	104
4.3.1. Korelaciona analiza i PCA.....	116
5. ZAKLJUČAK .....	122
6. SUMMARY .....	127
7. LITERATURA.....	129

## SKRAĆENICE

ABA	abscisinska kiselina
APF	3'-(p-aminofenil) fluorescein
ARP	antiradikalska aktivnost ( <i>AntiRadical Power</i> )
ASC	askorbinska kiselina
ASC-Px	askorbat-peroksidaza
ATP	adenozin-trifosfat
BA	6-benziladenin
BAD	betain aldehid dehidrogenaza
BSA	albumin goveđeg seruma ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C4H	cinamat-4-hidroksilaza
CAT	katalaza
chl <sub>a</sub>	hlorofil a
chl <sub>b</sub>	hlorofil b
CMO	holin-monoksigenaza
DAF	diaminofluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino-2', 7-difluorofluorescein diacetat
DAR4M	diaminorodamin-4M
DCF	2',7'- dihlorofluorescein
DCFH-DA	2',7'- dihlorodihidrofluorescein-diacetat
DHA	dehidroaskorbat
DHAR	dehidroaskorbat-reduktaza
DHR	Dihidrorodamin
DMPO	5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhirdazil radikal
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
ESR	elektron-spin rezonanca
FAD	flavin adenin dinukleotid
Fd	feredoksin
FDA	fluorescein diacetat
FOX	( <i>Ferrous Ion Oxidation Xylenol Orange</i> )
FRAP	antioksidantna moć redukcije Fe(III) jona ( <i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i> )
GB	glicin-betain
GPR	γ -glutamil fosfat reduktaza
GPx	gvajakol-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GS	glutation sintetaza
GSA	glutamat semialdehid



GSDH	glutamat -5-semialdehid dehidrogenaza
GSH	redukovani glutation
GSH-Px	glutation-peroksidaza
GSSG	oksidovani glutation
GST	glutation-S-transferaza
HE	Hidroetidin
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanesulfonska kiselina
HPLC	tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC- <i>eng. High Performance Liquid Chromatography</i> )
IBA	indol-3-buterna kiselina
IPC	Međunarodna komisija za topolu ( <i>International Poplar Commission</i> )
JA	jasmonska kiselina
KT	kondenzovani tanini
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin
LEA	proteini kasne embriogeneze ( <i>Late Embryogenesis Abundant</i> )
LP	lipidna peroksidacija
MDA	malonildialdehid
MDAR	monodehidroaskorbat-reduktaze
MES	2-(N-morfolino) etansulfonska kiselina
MS	Murashige i Skoog
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBT	nitroblutetrazolijum
NCED	9-cis-epoksikarotenoid dioksidgenaza
NOS	azotoksid-sintaza
NR	nitrat-reduktaza
P5C	pirolin-5-karboksilat
P5CDH	pirolin-5-karboksilat dehidrogenaza
P5CR	pirolin-5-karboksilat reduktaza
P5CS	Δ-1-pirolin-5-karboksilat sintetaza
PAL	fenilalanilamonijum-lijaza
PCA	analiza glavnih komponenata ( <i>Principal component analysis</i> )
PDH	prolin-dehidrogenaza
PEG	polietilen glikol
PEP	fosfoenol piruvat
PPO	polifenol-oksidaza
PSI	fotosistem I
PSII	fotosistem II
RI	relativni intenzitet
RNS	reaktivne vrste azota ( <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
ROS	reaktivne vrste kiseonika ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RSC	Kapacitet „hvatanja“ slobodnih radikala ( <i>Radical Scavenging Capacity</i> )

Rubisco	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza oksigenaza
RuBP	ribuloza-1,5-bifosfat
SA	salicilna kiselina ( <i>Salicylic Acid</i> )
SNP	natrijum nitroprusid
SOD	superoksid-dismutaza
TAL	tirozin amono lijaza
TBA	tiobarbiturna kiselina ( <i>Thiobarbituric Acid</i> )
TCA	trihlorsirćetna kiselina ( <i>Trichloroacetic Acid</i> )
TPTZ	2,4,5-tripiridil- <i>s</i> -triazin
TRIS	tris-(hidroksimetil)aminometan
VDE	violaksantin-deepoksidaza
$\gamma$ - GP	$\gamma$ - glutamil fosfat
$\gamma$ -GSC	$\gamma$ - glutamilmcistein-sintetaza
$\delta$ -OAT	ornitin- $\delta$ -aminotransferaza

## 1. UVOD

Voda je osnovna, najvažnija i najzastupljenija materija koju imaju sva živa bića na planeti Zemlji. Ona je svuda oko nas. Jedinstvena priroda je čini esencijalnom za život i opšte je poznato da sva živa bića zavise od vode. Naučni dokazi ukazuju na to da se usled povećanja sadržaja ugljenik(IV)-oksida u atmosferi klima na Zemlji menja, da postaje sve toplija i suvlja s obzirom da srednja godišnja temperature raste i da se u određenim predelima količina godišnjih padavina smanjuje (IPCC, 2007). Zbog klimatskih promena biljne vrste se suočavaju sa novim uslovima sredine na koje nisu adaptirane. Proučavanje uticaja nedostatka vode na biljke, kao i mehanizama koji povećavaju otpornost i opstanak biljaka u ovakvim uslovima je jedan od veoma aktuelnih problema sa kojima se naučnici širom sveta suočavaju.

Kako se klimatske promene ne mogu zaustaviti, jedan od načina rešavanja problema koje one donose je selekcija poljoprivrednih kultura i klonova drveća sa većom tolerancijom na štetne uslove i većim kapacitetom da održe visok prinos u štetnim uslovima. Proučavanje uticaja abiotičkih činilaca na metabolizam biljaka je zato prvi korak u procesu smanjenja uticaja eventualnih klimatskih promena i abiotičkog stresa kao posledice klimatskih promena na prinos i kvalitet biljaka. Veoma je značajno definisati najvažnije fiziološke i biohemijske pokazatelje (parametre) koji bi poslužili za pouzdano predviđanje sposobnosti biljaka da tolerišu klimatske promene. Na taj način bi se stvorili preduslovi za povećanje tolerantnosti biljaka prema različitim vrstama abiotičkog stresa, kao što su nedostatak ili višak vode, poremećaji u ishrani biljaka i kontaminacija ostacima pesticida i teškim metalima. Dobijena saznanja bi, kroz primenu u proizvodnji, selekciji (oplemenjivanju), primeni biotehnologije, trebalo da doprinesu povećanju otpornosti biljaka na stres i adaptaciji uslovima gajenja. Rezultati ovih istraživanja mogu koristiti ciljanoj selekciji otpornih genotipova i povećanju prinosa i kvaliteta. Stoga, proučavanje sposobnosti različitih biljnih vrsta ili genotipova da se adaptiraju na štetne uslove sredine može biti od koristi i u selekciji biljaka i u razumevanju fundamentalnih mehanizama adaptacije.

Smatra se da je vodni stres izazvan sušom najvažniji uzročnik smanjenja prinosa i gubitaka u poljoprivrednoj proizvodnji (Popović i Štajner, 2008). Suša se uopšteno može definisati kao nedostatak vode (padavina) tokom dužeg vremenskog perioda. Može se javiti u različitim oblicima, varirajući u trajanju i jačini, a s obzirom na efekte globalnih

klimatskih promena u mnogim delovima sveta će postati sve intenzivnija i češća pojava. Danas je uveliko prihvaćena činjenica da vodni deficit izaziva oksidativni stres kod biljaka (Lei i sar., 2006; Chaves i sar., 2009; Noctor i sar., 2014). To znači da smanjena dostupnost vode dovodi do promena u ravnoteži između nastanka (stvaranja) i uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS- eng. *Reactive Oxygene Species*). Biljke poseduju različite mehanizme otpornosti na stres, koji im omogućavaju da u nepovoljnim uslovima ne samo prežive, već i da na svom staništu budu veoma produktivne. U uslovima oksidativnog stresa biljke koriste različite mehanizme antioksidantne zaštite.

Određivanje antioksidantnih parametara može imati veliki značaj jer se merenjem aktivnosti antioksidantnih enzima, intenziteta lipidne peroksidacije i drugih parametara antioksidantnog sistema, mogu utvrditi razlike u tolerantnosti genotipova i biljnih vrsta prema vodnom stresu. U radu Toscano i saradnika (2016) ispitivan je uticaj umerene i jake suše na aktivnost antioksidantnih enzima kod mediteranskih žbunastih vrsta *Photinia fraseri* i *Eugenia uniflora* L. i na sadržaj malonildialdehida (MDA) i prolina. Mnogi autori navode da vodni stres utiče na promenu aktivnosti antioksidantnih enzima kod biljaka (Sharma i Dubey, 2005a; Li -Ping i sar., 2006; Candan i Tarhan, 2012). Lei i saradnici (2006) su ispitali dve populacije vrste *Populus przewalskii* koje potiču sa različitih klimatskih područja, jedna sa sušnog, druga sa vlažnog područja i utvrdili da postoje razlike u antioksidantnom odgovoru na sušu. Populacija sa sušnog područja je imala efikasniji antioksidantni sistem sa većim sadržajem askorbinske kiseline, većom aktivnošću askorbat-peroksidaze i glutathion-reduktaze, kao i većom akumulacijom prolina. Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da umereno sušni uslovi deluju na mnoge biohemijske i fiziološke procese biljaka. Rezultati tih ispitivanja variraju u zavisnosti od ispitivane vrste kao i od intenziteta i trajanja vodnog stresa.

Zbog navedenog, u ovom radu postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- ✓ ispitivanje uticaja vodnog stresa (različitih koncentracija polietilen glikola (PEG) 6000 u hidroponima i kulturi tkiva) na antioksidantne osobine, parametre oksidativnog stresa, fenolni metabolizam kao i metabolizam prolina i sadržaj glicin-betaina u različitim organima topole,
- ✓ odabir klona topole najotpornijeg na delovanje vodnog i oksidativnog stresa na osnovu analize antioksidantnog statusa topole, i
- ✓ definisanje parametra koji predstavlja najbolji indikator otpornosti topole na sušu.

Osnovna hipoteza je da će vodni stres izazvati različite reakcije kod različitih klonova u zavisnosti od biohemijskog odgovora samog klona. Očekuje se reakcija na vodni stres u vidu oksidativnog stresa i promene u parametrima antioksidantnog sistema, kao i promene u metabolizmu prolina i glicin-betaina. Kod neotpornih klonova se očekuje smanjenje svih ispitivanih parametara sem indikatora oksidativnog stresa, dok se kod otpornih očekuje porast nekih parametara odbrambenog sistema. Ukoliko se dokaže da umereni vodni stres dovodi do akumulacije pojedinih antioksidanata ili osmolita otvorili bi se prostori za nova istraživanja.

U okviru istraživanja postavljani su sledeći radni zadaci:

- ✓ simulacija suše pomoću PEG 6000 u ogledu sa hidroponima i kulturi tkiva,
- ✓ određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima (SOD, CAT, GPx, GSH-Px, GR, ASC-Px),
- ✓ određivanje količine glutationa i sadržaja rastvorljivih proteina,
- ✓ određivanje količine vodonik peroksida i MDA,
- ✓ određivanje intenziteta oksidacije proteina,
- ✓ određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom,
- ✓ određivanje DPPH, superoksid anjon i hidroksil skevindžer aktivnosti pomoću spektrofotometrije i ESR metode,
- ✓ određivanje sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i proantocijanidina,
- ✓ određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata,
- ✓ određivanje sadržaja prolina i aktivnosti enzima prolin-dehidrogenaze uključenog u katabolizam prolina,
- ✓ određivanje sadržaja glicin-betaina,
- ✓ određivanje aktivnosti enzima uključenih u metabolizam fenola: fenilalaninamonijum-lijaze i polifenol-oksidaze,
- ✓ određivanje fenolnog profila lista i korena topole u tri klona pomoću tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC analiza),
- ✓ određivanje nivoa reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u listu iz kulture tkiva nakon tretmana PEG-om pomoću fluorescentnog mikroskopa, i
- ✓ određivanje vijabilnosti ćelija FDA metodom.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Problem vodnog stresa

**V**odni stres se javlja kod biljaka kada je snabdevanje korenova vodom ograničeno ili kada je intenzitet transpiracije previsok. Nedostatak vode (vodni deficit) može biti izazvan različitim abiotičkim stresnim faktorima. Najčešće je prouzrokovan nedostatkom vode u zemljištu ili visokom koncentracijom soli u njoj. Takođe, usled visokih temperatura i suvih vetrova može doći do povećanog gubitka vode u biljci putem transpiracije. U slučaju zaslanjenosti, ali i u drugim uslovima kao što su poplava ili niska temperatura zemljišta, voda postoji u zemljištu, ali je biljka ne može usvojiti - ova situacija je poznata kao fiziološka suša (Teiz i Zeiger, 2010).

Mnoge od ovih pojava uzrokuju sekundarni stres u vidu osmotskog stresa. Osmotski stres u širem smislu obuhvata sušom, zaslanjenosti ili niskim temperaturama izazvano snižavanje vodnog potencijala u biljnoj ćeliji (Hohmann, 2002). Smrzavanje i hipoksija mogu indirektno dovesti do osmotskog stresa preko uticaja na unos vode ili gubitke vode.

U literaturi se često umesto pojma vodnog stresa upotrebljava i pojam suše. Ipak, postoji razlika između ova dva pojma. Stres suše se kao pojam upotrebljava samo u slučajevima kada je u eksperimentu suša izazvana nezalivanjem ili odsustvom kiše u polju. U svim drugim slučajevima, kada je nedostatak vode izazvan polietilen glikolom, manitolom ili nekim drugim osmotikumom, pravilno je koristiti pojam vodnog stresa ili osmotskog stresa.

U pogledu globalnih klimatskih promena i različitih abiotičkih i biotičkih procesa koji dovode do gubitka prirodne vegetacije, poljoprivrednih kultura i žitarica, veoma je važno razumevanje adaptacije biljaka. Prema predviđanjima se smatra da će u budućnosti različiti regioni u Evropi biti zahvaćeni sve češćim i sve jačim periodima suše (Lindner i sar., 2010). Prema IV izveštaju Međuvladinog panela o klimatskim promenama i najoptimističnijem scenariju temperatura će u 21. veku porasti za 1,8 °C (1,1 °C do 2,9 °C), a prema najpesimičnijem scenariju za čitava 4 °C (2,4 °C do 6,4 °C) (IPCC, 2007). Srbija je jedna od zemalja u zaleđu Mediteranskog regiona za koji se smatra da će biti posebno teško pogođen globalnim klimatskim promenama. Pred ovakvim izazovima neophodno je pripremiti poljoprivrednu proizvodnju na uslove visokih temperatura i suše,

posebno u biljnoj proizvodnji gde treba stvoriti nove sorte koje će biti prilagođene novoj situaciji odabirom ili ukrštanjem.

Polietilen glikol ( $H(OCH_2CH_2)_nOH$ ), je dugolančani, hemijski inertan polimer, koji se upotrebljava u eksperimentima za simulaciju vodnog stresa (Murillo-Amador i sar., 2002). Komercijalno je dostupno više jedinjenja sa različitim molarnim masama, gde broj u nazivu ukazuje na približnu molekulsku masu. Davne 1961. godine, u časopisu „Science” PEG je predstavljen kao jedinjenje koje se može koristiti za promenu osmotskog potencijala rastvora i prouzrokovati vodni deficit na relativno kontrolisan način, shodno protokolima. Smatra se da ga biljke ne mogu usvajati, i da zbog veličine molekula blokira puteve kretanja vode smanjujući time absorpciju vode i izazivajući desikaciju biljke i stoga predstavlja idealan osmotikum za upotrebu u hidroponskim kulturama (Lawlor, 1970). PEG se često koristi u laboratorijskim istraživanjima za postizanje željenog osmotskog potencijala rastvora (Kaufmann, 1969; Parmar i Moore, 1966; Thill i sar., 1979). PEG 6000 je korišćen za smanjenje vodnog potencijala i simulaciju vodnog stresa u eksperimentima sa pšenicom (Naderi i sar., 2014; Königshofer i Löppert, 2015), u kulturi tkiva ricinusa (de Araújo Silva i sar., 2016), paradajzu (Mendhulkar i Nisha, 2015), uljanoj repici (Liu i sar., 2016), nani (Candan i Tarhan, 2012), topoli (Caruso i sar., 2008), boru (López i sar., 2009) i mnogim drugim. Na osnovu prethodnih rezultata je predviđeno da se rastvor polietilen glikola može koristiti u laboratoriji za skrining tolerantnih klonova na vodni stres u ranim fazama razvoja (Naderi i sar., 2014).

### 2.1.1. Biljke i vodni stres

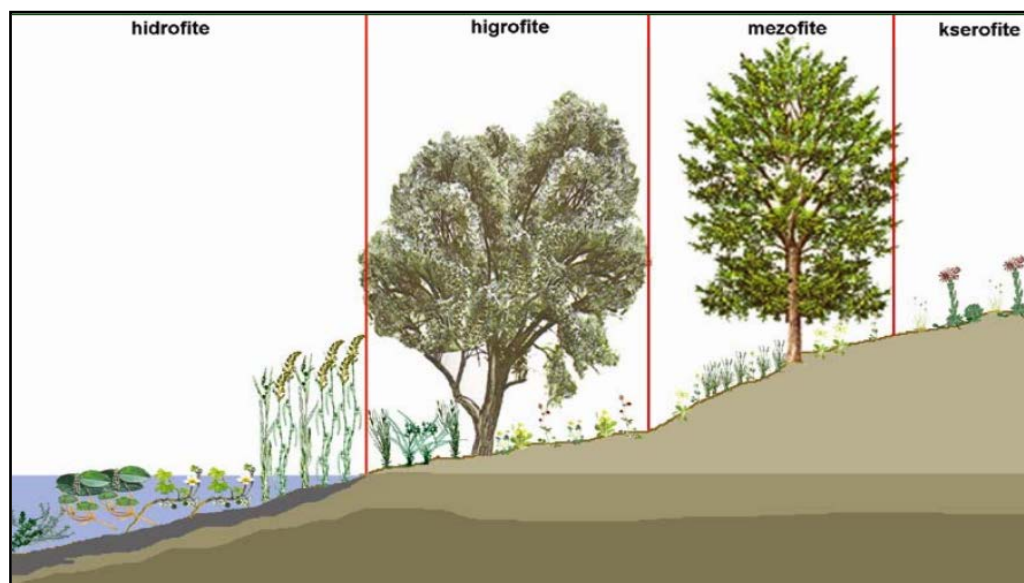
Različite biljne vrste podnose uslove vodnog stresa na različite načine i prema karakteru vlažnosti staništa koje zahtevaju razlikuju se sledeće grupe biljaka:

- Biljke koje žive u vodi – hidrofite,
- Suvozemne biljke: higrofite, mezofite i kserofite.

Higrofite su prilagođene uslovima veoma vlažnih staništa i ne mogu podneti sušu, za razliku od kserofita koje su različitim mehanizmima prilagođene da podnesu dužu sušu vazduha i zemljišta. Mezofite čine prelaznu grupu biljaka od higrofita ka kserofitama. Većina gajenih biljaka spada u grupu mezofita i mogu da podnesu kratkotrajne suše bez štetnih posledica (*Slika 2.1*).

Prema jačini, obično se razlikuju blagi, srednji i jak vodni stres. Kao mera za jačinu vodnog stresa uzima se pad vodnog potencijala ćelije ( $\Psi$ ) i kod mezofilnih biljaka te vrednosti se kreću:

- za blagi stres:  $\Psi \leq 0.1$  MPa,
- srednji stres:  $\Psi$  od -0,1 do -1 MPa i
- jak stres:  $\Psi \geq -1$  MPa (Teiz i Zeiger, 2010).



Slika 2.1. Podela biljaka prema karakteru vlažnosti staništa

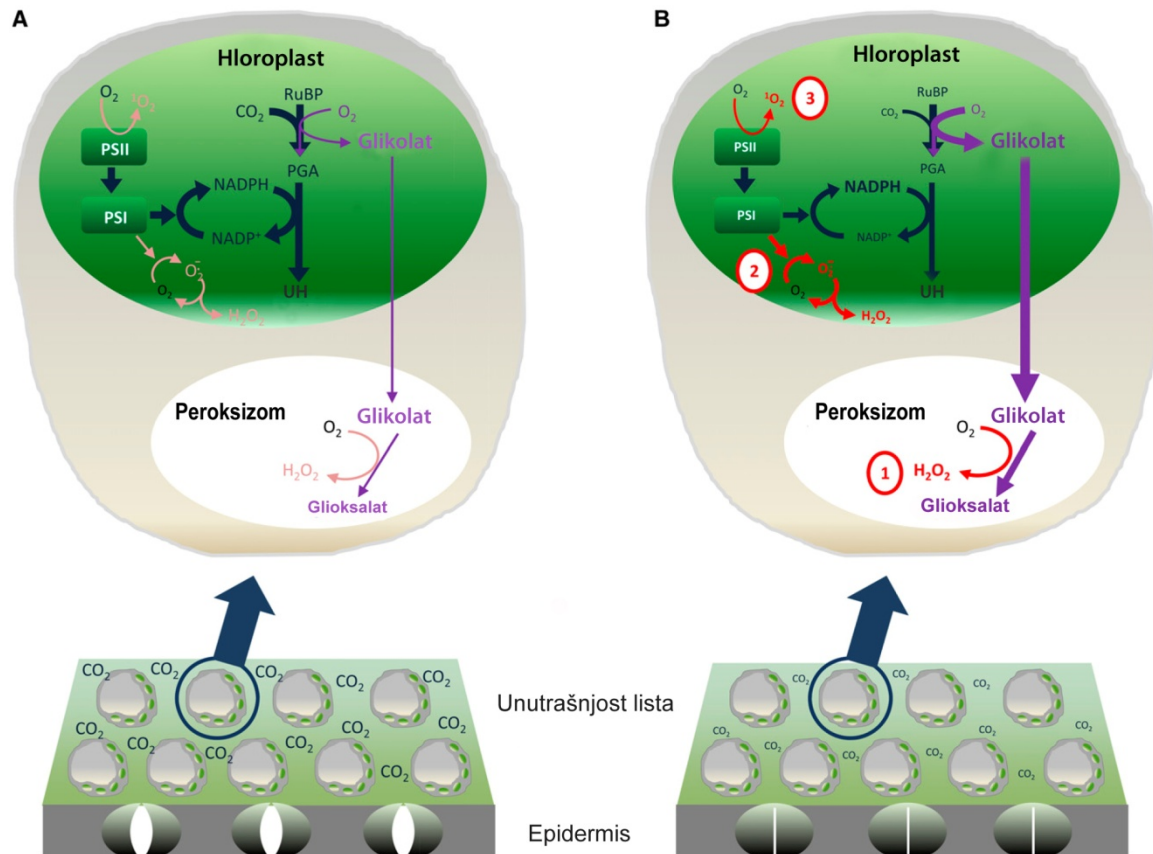
### 2.1.1.1. Uticaj nedostatka vode na biljke-biohemija suše

Nedostatak vode tokom dužeg vremenskog perioda utiče na različite metaboličke procese na nivou cele biljke, u gotovo svim biljnim organima i ćelijama (Yordanov i sar., 2000). Proces koji se najranije javlja pri nedostatku vode kod biljaka je inhibicija rasta, a razlog je inhibicija ćelijske elongacije (izduživanja) (Ren i sar., 2007). U ovakvim uslovima dolazi do promene raspodele asimilata između pojedinih organa i ravnoteže između fotosinteze i disanja. Karakteristično za biljke koje su izložene suši je da su niže, imaju manju lisnu površinu, čime se smanjuje količina fotosintetički aktivne radijacije koja se apsorbuje preko listova, kao i nivo fotosinteze i prinos.

Prvi organ koji oseti nedostatak u snabdevanju vodom je koren. Poznato je da koren šalje lišću vodu i minerale, ali takođe i signale. Abscisinska kiselina (ABA) je glavni signal stresa iz korena. Kada stresni signal stigne do lista, dolazi do zatvaranja stoma i biljka se prebacuje u režim čuvanja vode (Slika 2.2). Na taj način, prilagođavajući



otvaranje stoma, biljka može da kontroliše gubitak vode smanjujući fluks transpiracije, ali time ograničava i usvajanje CO<sub>2</sub>. Sve ovo ima direktne i indirektne posledice na fotosintezu i nastanak ROS tokom vodnog stresa.



Slika 2.2. Uticaj nedostatka vode na fotosintezu i nastanak ROS. Prikazan je presek lista u kontrolnoj biljci (A) i kod biljke izložene suši (B). U odnosu na stanje u kontrolnoj biljci, suša izaziva zatvaranje stoma čime je ograničen unos CO<sub>2</sub>, favorizovana fotorespiratorna produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u peroksizomima (1), omogućen nastanak superoksid anjon radikala (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) i singletnog kiseonika (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) u elektron transportnom lancu (3) (preuzeto iz Noctor i sar., 2014)

Kod C<sub>3</sub> biljaka nedostatak vode izaziva zatvaranje stoma, čime se ograničava unos CO<sub>2</sub> i intenzivira proces fotorespiracije (Poulson i sar., 2006). Vodni stres obično dovodi do oksidativnog stresa jer zatvaranjem stoma dolazi do prekomerne redukcije NADP<sup>+</sup> koji je konačni akceptor elektrona u fotosistemu I (PSI), a tok elektrona se preusmerava na alternativne akceptore od kojih je najznačajniji kiseonik (Lei i sar., 2006; Ozkur i sar., 2009). Pri tome nastaje superoksid anjon radikala (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), a potom i ostali ROS. Hloroplasti, mitohondrije i peroksizomi su organele u kojima se dešavaju redoks promene indukovane sušom (Foyer i Noctor, 2003). Hloroplasti koriste svetlosnu energiju za proizvodnju ATP-a i reduktivnog potencijala koji je potreban za sintezu ugljenih hidrata

iz CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O (Slika 2.2 A). Kod C<sub>3</sub> biljaka u peroksizomima može nastati značajno više H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nego u hloroplastima. Peroksizomalna produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u zelenim tkivima C<sub>3</sub> biljaka je uglavnom rezultat aktivnosti glikolat-oksidade. Ovaj enzim je najvažniji deo fotorespiratornog reciklažnog puta koji se pokreće oksigenacijom ribuloza-1,5-bisfosfata (RuBP) u hloroplastima. Nastanak glikolata je ubrzan tokom suše jer je smanjen unutarćelijski nivo CO<sub>2</sub> zbog zatvaranja stoma. Na taj način je favorizovana oksigenacija RuBP i povećana peroksizomalna produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mesto 1 B, Slika 2.2). Tokom fotosinteze u hloroplastima se dešava aktiviranje i redukcija kiseonika. Smanjena dostupnost drugih oksidanata u elektron transportnom lanacu usmerava tok elektrona ka O<sub>2</sub> u Mehlovu reakciju, stimulišući stvaranje superoksid anjon radikala i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mesto 2 B, Slika 2.2) (Asada, 2006). Takođe, prenosom energije sa hlorofila u tripletom ekscitovanom stanju na kiseonik nastaje singlet kiseonik u PSII (Fischer i sar., 2013; Slika 2.2 B, mesto 3).

Pored C<sub>3</sub> biljaka sa opisanim tipom usvajanja CO<sub>2</sub> (karboksilacije) postoje još dva tipa biljaka, C<sub>4</sub> i CAM (eng. *Crassulacean Acid Metabolism*) biljke koje su prilagođenije sušnim uslovima u odnosu na C<sub>3</sub> biljke životnom formom i fiziološko-biohemijskim adaptacijama fotosintetskih reakcija (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Odlike C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> i CAM biljaka

	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	CAM
biljke	pšenica, raž, pirinač, šećerna repa	kukuruz, sirak, šećerna trska	sukulentne biljke, kaktusi, orhideje
oblast gajenja	umerena klima	tropske oblasti	sušna područja
fiziologija	-veliki prazan prostor između sunderastog tkiva -provodni snopići neprolazni -regularna fotosinteza -fiksacija CO <sub>2</sub> i istovremena svetlosno nezavisna reakcija na istom mestu	-sunderasto tkivo je kompaktno ("Kranc" anatomija) -provodni snopići prolazni -prilagođene na malu koncentraciju CO <sub>2</sub> -fiksacija CO <sub>2</sub> u malatu (C <sub>4</sub> jedinjenja) putem PEP-karboksilaze -svetlosno zavisne i nezavisne reakcije odvijaju se odvojeno	-nemaju "Kranc" anatomiju -inicijalna reakcija karboksilacije putem PEP-karboksilaze se dešava noću kada su stome otvorene, temperatura je manja i manji je gubitak vode

### 2.1.1.2. Percepcija signala i ćelijski odgovor na sušu – signalana transdukcija

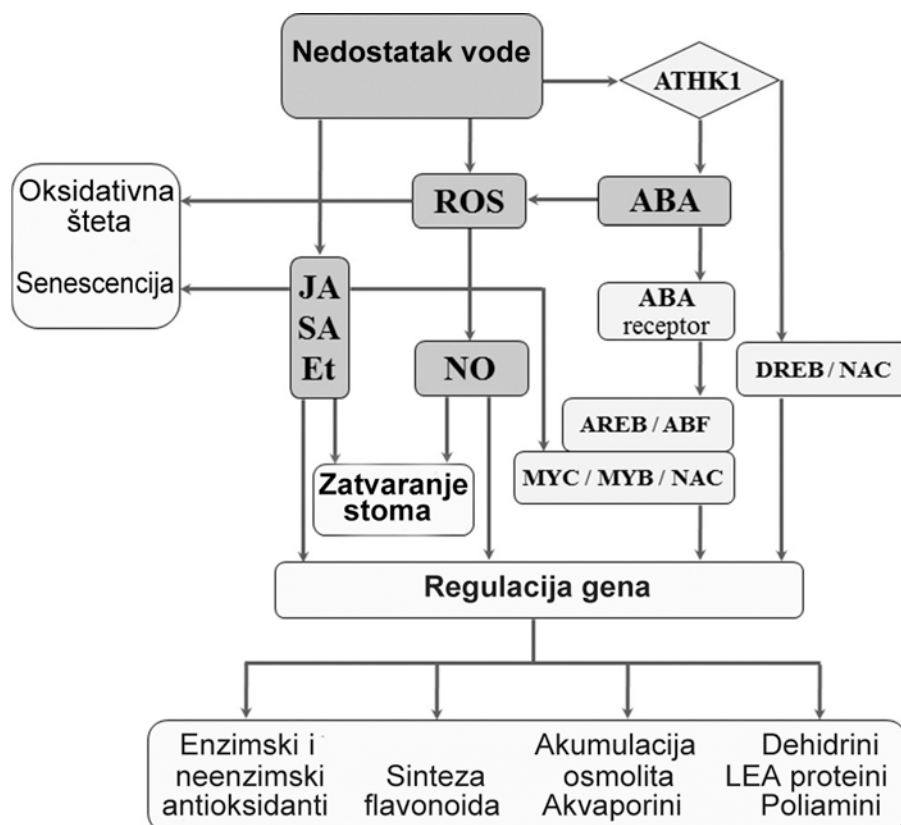
Pri vodnom deficitu ekspresija gena kod biljaka je podložna promenama i novi geni se ekspresuju kao reakcija na stres. Put od stresa do bioloških i fizioloških odgovora, a

potom i do tolerancije na vodni stres je složen i još uvek kompletno nerazjašnjen. Tu su uključeni mnogobrojni biohemijski putevi koji vode ka ekspresiji brojnih gena i sintezi proteina koji doprinose adaptaciji na stres (Neill i Burnett, 1999).

Kao i kod drugih stresnih situacija, prijem signala je prvi korak za promenu ekspresije gena i posledičnu toleranciju na stres. Neke od reakcija biljke na vodni stres direktno se pokreću promenom vodnog statusa tkiva dok se drugi pokreću kao odgovor na promene nivoa biljnih regulatora rasta. Pad koncentracije auksina, giberelina i citokinina kao i rast abscisinske kiseline (ABA), jasmonske kiseline (JA), etilena i salicilne kiseline (SA) su često primećeni kod biljaka izloženih vodnom stresu (Bandurska i sar., 2013). Prva i najbrža reakcija na nedostatak vode je akumulacija hormona ABA u korenovima i njen transport ksilemom do lista gde utiče na zatvaranje stoma. Međutim, sve veći broj dokaza ukazuje na to da su, u mnogim slučajevima, hidraulični signali verovatnije odgovorni za prenošenje signala o pojavi vodnog stresa iz korena u nadzemni deo. Naime, poremećaj u vodnom balansu utiče na smanjenje turgorovog pritiska u ćelijama i dovodi do promena u ćelijskoj membrani kojima se aktiviraju transmembranski vezane histidin kinaze (Slika 2.3). Gubitkom vode, ćelija menja svoju zapreminu, sadržaj rastvorenih sastojaka u njoj se menja, ali i proteini vezani za ćelijsku membranu, jonski kanali i protein kinaze su podložni promenama. Kod vrste *Arabidopsis thaliana* je dokazano da histidin kinaza ATHK1 ima ulogu u prijemu signala pri suši i aktiviranju puta prenosa signala koji pokreće ekspresiju gena odgovornih za biosintezu ABA (Wohlbach i sar., 2008). Ključni korak je aktivacija gena koji kodira enzim 9-cis-epoksikarotenoid dioksidenu (NCED, EC 1.13.11.51) koji je glavni enzim biosinteze ABA. Tako dehidratacija ćelije dovodi do povećanja endogenog sadržaja ABA u ćeliji, što dalje uslovljava ekspresiju ciljnih gena koji kodiraju transkripcione faktore, signalne komponente, enzime i dr. (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Geni koji se aktiviraju na ABA su uglavnom regulisani transkripcionim faktorima tipa bZIP (*basic leucin zipper protein*) AREB/ABF koji se vezuju za ABRE cis elemente u promotorima. Sakuma i saradnici (2006) ukazuju na postojanje i ABA nezavisnog puta kojim se aktiviraju geni za koji se vezuju transkripcioni faktori ERF/AP2 tipa, kao što su familije DREB1/CBF i DREB2.

Kada se govori o ekspresiji gena, odgovor biljaka na ovakve uslove je sinteza funkcionalnih proteina koji direktno učestvuju u reakciji na vodni stres i tu spadaju enzimi biosinteze osmolita (prolin, betain, glicin-betain), enzimski i neenzimski

antioksidanti, dehidrini, vodeni i jonski kanali i proteini koji štite makromolekule (čaperoni, LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) proteini) (Bandurska i sar., 2013). Pored funkcionalnih proteina dolazi do sinteze i regulatornih proteina koji su uglavnom komponente signalnog puta (razni transkripcioni faktori i protein kinaze).



Slika 2.3. Pojednostavljen model pokazuje signalne puteve kod odgovora biljaka na deficit vode. Skraćenice: ATHK1, transmembranska histidin kinaza; AREB/ABF, MYC/MYB/NAC, DREB/NAC, transkripcioni faktori; ABA, abscisinska kiselina; Et, etilen; JA, jasmonska kiselina; SA, salicilna kiselina; ROS, reaktivne vrste kiseonika; NO, azot oksid (preuzeto iz Bandurska i sar., 2013)

Brojna istraživanja pokazuju da, kada se govori o tolerantnosti biljaka na vodni stres, važnu ulogu ima antioksidantni sistem zaštite. Pri blažem nedostatku vode, ABA je ključni pokretač antioksidantne odbrane preko aktivacije NADPH oksidaze koja dovodi do vodonik peroksid zavisnog nastanka NO koji pokreće mitogen-aktivirane protein kinazne kaskade koje dovode do aktivacije antioksidantnih enzima (Zhang i sar., 2007). Pri jačem stresu, kao i pri dugotrajnoj umerenoj suši, efikasnost antioksidantnog sistema opada što dovodi do značajne produkcije ROS, oksidativnih oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina, poremećaja metaboličkih procesa koji ubrzavaju starenje i ćelijsku smrt (Sharma i sar., 2012). Dalje, jaka suša dovodi do destabilizacije

membrana i unosa  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmu. Povišen sadržaj  $\text{Ca}^{2+}$  pokreće fosfolipidni signalni sistem. Glavni molekuli ovog sistema tokom dehidratacije su inozitol trifosfat, diacilglicerol i fosfatidinska kiselina. Alarmirajuća reakcija pokrenuta povećanjem JA i etilena pokreće aktivaciju odbrambenih mehanizama ili ubrzava starenje i smrt (Wasternack, 2007).

### 2.1.1.3. Otpornost na nedostatak vode - mehanizmi adaptacije na sušu

Biljke na vodni stres odgovaraju vrlo kompleksnim mehanizmima reakcija, koje se mogu podeliti u tri osnovne grupe: izbegavanje suše, odlaganje suše i tolerantnost prema suši (Turner, 1979).

- ✓ Izbegavanje suše definiše se kao sposobnost biljke da završi svoj razvojni ciklus pre nego što dođe do značajnog deficita vode u zemljištu i biljci.
- ✓ Odlaganje suše je sposobnost biljke da zadrži relativno visok vodni potencijal tkiva, iako je vlažnost zemljišta smanjena i uključuje mehanizme koji smanjuju gubitak vode preko listova, kao što su uvijanje listova, razvoj manjeg broja listova sa manjom površinom kao i zatvaranje stoma. Štaviše, tu su i mehanizmi koji olakšavaju unos vode preko korena i transport ka listovima kao što je stimulacija rasta korena i poboljšanje korenove hidraulične provodljivosti.
- ✓ Tolerantnost na sušu se definiše kao sposobnost ćelija biljke da održe metaboličke procese u uslovima niskog vodnog potencijala i podrazumeva održavanje turgora kroz *osmotsko prilagođavanje* (proces koji omogućava nagomilavanje materija u ćeliji), povećanje elastičnosti ćelije, smanjenje veličine ćelije i tolerantost na isušivanje (desikaciju).

Većina mehanizama za izbegavanje promena izazvanih vodnim stresom su zavisni od hormona ABA, koja reguliše biljni vodni status na razne načine. ABA indukuje ekspresiju gena odgovornih za sintezu akvaporina i poboljšanje korenove hidraulične provodljivosti. Takođe, ABA-om je regulisana produkcija etilena i proces transporta prolina do vrha korena za koji se smatra da ima ključnu ulogu u održanju korenove elongacije (Sharp i sar., 2004). Međutim, procesi nezavisni od ABA se takođe odigravaju i tu spada aktivacija enzima uključenih u razgradnju ćelijskog zida (Wu i sar., 2001). Slično JA i za SA se smatra da pokreće mehanizme izbegavanja dehidratacije u listovima kao što je zatvaranje stoma i osmotsko prilagođavanje (Chaves i sar., 2003).

Mehanizmi tolerancije na vodni deficit uključuju i sintezu proteina i jedinjenja koja štite ćelijske strukture i enzime od štetnih delovanja dehidracije i nastanka ROS. Poliamini, proteini temperaturnog šoka, čaperoni, dehidrini, prolin, glicin-betain, svi oni imaju zaštitnu ulogu. Sinteza niskomolekularnih antioksidanata (askorbinske kiseline, glutaciona) i aktivacija antioksidantnih enzima takođe pruža toleranciju na vodni deficit (Ramanjulu i Bartels, 2002).

#### 2.1.1.3.1. Osmotsko prilagođavanje u uslovima vodnog deficita

Tolerantnost na sušu predstavlja zapravo tolerantnost na promene koje suša izaziva na nivou ćelija i molekula. U širem smislu biljke se adaptiraju na sušu smanjenjem gubitka vode (zatvaranjem stoma) ili održavanjem unosa vode. Kako se zemljište suši tako njegov matriks potencijal postaje sve negativniji. Biljke mogu i dalje usvajati vodu sve dok je njihov vodni potencijal niži od potencijala vode u zemljištu. Stalan unos vode je omogućen *osmotskim prilagođavanjem* - biohemijskim mehanizmom koji pomaže biljci da se aklimatizuje na suve i slane uslove. Osmotsko prilagođavanje predstavlja nagomilavanje ili *de novo* sintezu brojnih rastvorenih komponenata, osmolita, u biljnoj ćeliji koje dovodi do promene ćelijskog osmotskog potencijala (Boyer i sar., 2008). Ovakva aktivna akumulacija raznih osmolita u ćeliji stvara negativniji osmotski potencijal, koji omogućuje da se procesi koji zavise od turgora nastave u stresnim uslovima. Jedinjenja uključena u osmotsko prilagođavanje razlikuju se kod različitih vrsta, a mogu biti organske ili neorganske (neorganski joni) prirode. Od neorganskih jona, za osmotsko prilagođavanje kod mnogih biljaka vrlo je važan kalijum ( $K^+$ ). Kako citosolni enzimi biljnih ćelija mogu biti značajno inhibirani visokim koncentracijama jona, akumulacija jona tokom osmotskog prilagođavanja je ograničena samo na vakuole. Da bi se unutar ćelije održao vodni potencijal u ravnoteži, drugi rastvorci se akumuliraju u citosolu (Taiz i Zeiger, 2010). Ti drugi rastvorci, nazvani *kompatibilni rastvorci* (ili kompatibilni osmoliti) su organska jedinjenja koja ne ometaju funkcije enzima, veoma se dobro rastvaraju u vodi i ne utiču na ćelijski metabolizam čak i pri visokim koncentracijama (Chen i Murata, 2008). Takođe, ova jedinjenja ne narušavaju ili u veoma maloj meri utiču na interakcije između makromolekula i rastvarača i imaju sklonost da se isključe iz hidratacionog omotača proteina i time stabilizuju njegovu strukturu. Dele se u tri grupe: (1) aminokiseline npr. prolin, (2) kvaternerna amonijumova jedinjenja kao što su betain, poliamini i proteini; (3) ugljeni hidrati poput šećernih alkohola (manitol,

sorbitol), monosaharida (glukoza, fruktoza), oligosaharida (saharoza, trehaloza) i polisaharida (npr. fruktan) (McCue i Hanson, 1990; Singh i sar., 2015).

#### 2.1.1.4. Uloga prolina i glicin-betaina

##### 2.1.1.4.1. Prolin

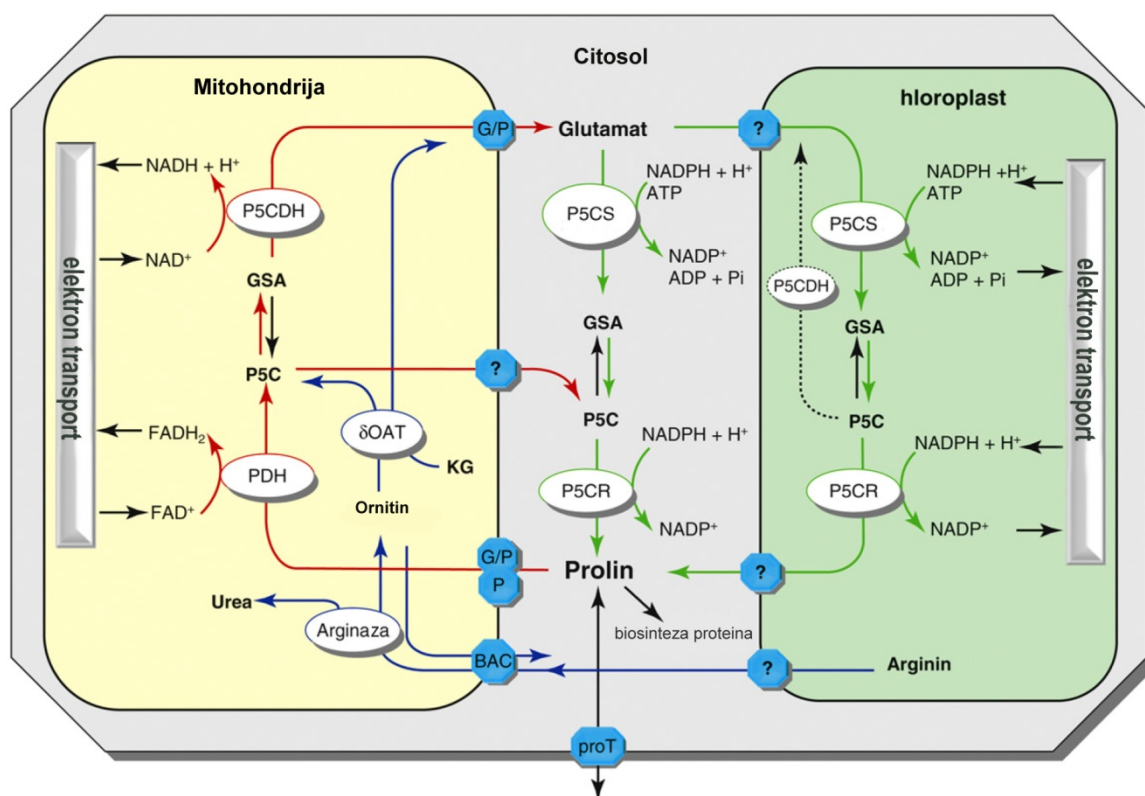
Već dugo godina, sposobnost biljaka da akumuliraju prolin se povezuje sa tolerancijom na stres (Barnett i Naylor, 1966; Singh i sar., 1972). Davne 1954. godine Kemble i MacPherson su zapazili fenomen nagomilavanja prolina u biljnom tkivu. Od tada je i za mnoga druga jedinjenja dokazano da se nagomilavaju u osmotski stresiranim biljkama, uključujući glicin-betain (McCue i Hanson, 1990) i različite poliole: glicerol, manitol, sorbitol i pinitol (Handa i sar., 1983; Binzel i sar., 1987; Brown i Hellebust, 1978).

Prolin je nenaelektrisana amino kiselina pri neutralnom pH i veoma se dobro rastvara u vodi. U biljkama i životinjama prolin nastaje iz ornitina (Hu i sar., 1992), a kod bakterija (Leisinger, 1996) i osmotski stresiranih biljaka primarni prekursor je glutaminska kiselina (Delauney i sar., 1993). Biosinteza prolina se odvija u citoplazmi i plastidima, a razgradnja u mitohondrijama (*Slika 2.4*).

Vogel i Davis su 1952. godine opisali biosintezu prolina u bakteriji *Escherichia coli*. Ipak, definitivna potvrda ovog opisa je došla mnogo kasnije zbog velike nestabilnosti prvog intermedijera,  $\gamma$ - glutamil fosfata ( $\gamma$ -GP) (Leisinger, 1987). Ključni enzim biosinteze prolina iz glutamata kod viših eukariota je  $\Delta$ -1-pirolin-5-karboksilat sintetaza (P5CS) (Hu i sar., 1992). P5CS je bifunkcionalan enzim koji prvo katalizuje aktivaciju glutamata fosforilacijom, a zatim redukciju nastalog međuproizvoda,  $\gamma$ - glutamil fosfata u glutamat semialdehid (GSA) (P5CS:  $\gamma$ -glutamil kinaza (GK) EC: 2.7.2.11 i glutamat-5-semialdehid dehidrogenaza (GSDH) ili  $\gamma$ - glutamil fosfat reduktaza (GPR) EC: 1.2.1.41). Spontanom ciklizacijom nastaje glavni intermedijer pirolin-5-karboksilat (P5C). Redukcijom intermedijera P5C u citoplazmi nastaje L-prolin dejstvom enzima P5C reduktaze (P5CR: EC: 1.5.1.2.) (*Slika 2.4*).

U mnogim biljkama je tokom stresa zapažena povećana ekspresija enzima P5CS (Delauney i sar., 1993; Silva-Ortega i sar., 2008). Gen *p5cs* je izolovan iz nekoliko biljaka (Hu i sar., 1992; Savouré i sar., 1995; Fujita i sar., 1998; Ginzberg i sar., 1998), a u nekim vrstama je pokazana korelacija između indukcije gena *p5cs* i nagomilavanja prolina (Yoshida i sar., 1995).

Alternativnim putem, P5C nastaje iz ornitina, dejstvom mitohondrijalne ornitin- $\delta$ -aminotransferaze ( $\delta$ -OAT; EC 2.6.1.13) (Delauney i sar., 1993; Verbruggen i Hermans, 2008). Ovaj put je dominantan u uslovima velikog snabdevanja biljke azotom, dok je glutaminski put aktivniji u uslovima osmotskog stresa i nedostatka azota (Sánchez i sar., 2001; Saibi i sar., 2015). Smatra se da  $\delta$ -OAT ubrzava kruženje azota od arginina do P5C koji je potom preveden u glutamat dejstvom P5CDH (Funck i sar., 2008). Nedavno je opisan P5C-prolin ciklus kojim je pokazano da P5C nastao u mitohondrijama može preći u citoplazmu i redukovati se do prolina pomoću enzima P5CR. Kada je aktivnost P5CDH ograničena, ciklusom P5C-prolin se može preneti više elektrona na elektron transportni lanac i stvoriti reaktivne kiseonične vrste (ROS) (Szabados i Savoure, 2010).



Slika 2.4. Metabolizam prolina prema Szabados i Savoure (2010)

Katabolizam prolina se odvija u mitohondrijama. Delovanjem prolin-dehidrogenaze (PDH, EC: 1.5.99.8) iz prolina nastaje P5C, koji podleže neenzimskoj hidrolizi koja dovodi do otvaranja prstena i nastajanja GSA (Adams i Frank, 1980). PDH je FAD-zavisan enzim lokalizovan u unutrašnjoj membrani mitohondrija koji tokom oksidacije prolina direktno vrši prenos elektrona na mitohondrijalni elektron transportni lanac (Tanner, 2008). Delovanjem P5C dehidrogenaze (P5CDH, EC: 1.5.1.12) GSA prelazi u



glutamat u prisustvu  $\text{NAD}^+$ . Enzimi uključeni u katabolizam prolina, PDH i P5CDH, su visoko konzervirani (očuvani) kod prokariota i eukariota sa jedinom razlikom da li se javljaju kao domeni na jednom zajedničkom polipeptidnom lancu i tako čine bifunkcionalni enzim označen kao PutA, ili se javljaju kao dva monofunkcionalna enzima (kod Gram-pozitivnih bakterija i u eukariotskim ćelijama) (White i sar., 2007). U svim do sada opisanim studijama, transkripcija i enzimska aktivnost PDH se smanjuje tokom stresa, a tokom perioda oporavka naglo raste. Ovakve promene su u obrnutoj korelaciji sa nivoom slobodnog prolina u ćeliji (Miller i sar., 2009).

U većini biljaka, stresom indukovana akumulacija slobodnog prolina je rezultat povećane biosinteze i smanjene degradacije prolina (Miller i sar., 2005; Szabados i Savoure, 2010). Dok je biosinteza prolina stimulisana u uslovima visokog intenziteta svetlosti i osmotskog stresa, katabolizam prolina je aktiviran u mraku i pri oporavku od stresa i kontrolisan je enzimima PDH i P5CDH (Saibi i sar., 2015).

Prolin je amino kiselina sa mnogim ulogama u biljkama. Nagomilava se u mnogim biljnim vrstama kao odgovor na različite stresne uslove uključujući sušu, soli i teške metale. Dugo vremena se smatralo da je inertan kompatibilni osmolit koji štiti ćelijske strukture i makromolekule u uslovima osmotskog stresa. Međutim, akumulacija prolina može da utiče na toleranciju na više načina. Pokazalo se da prolin ima ulogu molekuskog čaperona sposobnog da štiti integritet proteina i povećava aktivnost različitih enzima. U uslovima dehidratacije omogućava ćelijskim proteinima održavanje hidratisanog stanja. Zaštita nitrat reduktaze pri osmotskom stresu i u prisustvu teških metala (Sharma i Dubey, 2005b), kao i stabilizacija ribonukleaza i proteaza pri izlaganju teškim metalima su još neke od uloga prolina (Mishra i Dubey, 2006). Prolin igra važnu ulogu u zaštiti fotosintetičke aktivnosti. Poznato je da se u uslovima stresa smanjuje karboksilazna aktivnost Rubisca i povećava oksigenazna aktivnost, ali u prisustvu prolina ova pojava je redukovana. Hamilton i Heckathorn (2001) navode da je fotosintetički kompleks I zaštićen antioksidantima i *heat shock* proteinima, a kompleks II prolinom i betainom u uslovima sonog stresa.

Sinteza prolina je uključena i u regulaciju pH i redoks statusa u ćeliji. Odvijanje biosinteze i razgradnje prolina u različitim delovima ćelije povezuje metabolizam prolina sa drugim procesima u ćeliji. Tokom biosinteze prolina u hloroplastima koristi se višak redukjućeg potencijala (u vidu NADPH) nastao u zasićenom elektron transportnom lancu i na taj način se doprinosi održanju redoks ravnoteže (odnosa  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ) i

ćelijske homeostaze (Taiz i Zeiger, 2010). Katabolizam prolina u mitohondrijama je povezan sa oksidativnom respiracijom i snabdevanjem biljke energijom u periodima oporavka od stresa. Prolin se tokom stresa nagomilava u vakuoli i citoplazmi gde štiti ćeliju od hidroksil radikala ( $\text{HO}^\bullet$ ) i singlet kiseonika ( $^1\text{O}_2$ ) (Matysik i sar., 2002). Gašenjem singlet kiseonika ili direktno hvatanjem hidroksil radikala, prolin štiti proteine, DNK i membrane (Smirnoff i Cumbes, 1989; Matysik i sar., 2002). Pored direktnog hvatanja  $\text{HO}^\bullet$  prolin može da helira redoks aktivne jone i tako štiti tkiva od štete nanete formiranjem  $\text{HO}^\bullet$  (Matysik i sar., 2002). Vendruscolo i saradnici (2007) su objavili da je transgena pšenica koja je akumulirala više prolina u odnosu na divlji tip imala manji intenzitet LP tokom suše što ukazuje na antioksidantnu ulogu prolina. Tokom sinteze prolina, NADH se koristi za redukciju glutamata, što povećava  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  odnos, koji prevenira poremećaje redoks osetljivih puteva tokom stresa suše i soli (Hare i Cress, 1997). Pokazano je da prolin štiti fotohemijsku efikasnost PSII i sprečava LP tokom suše (Molinari i sar., 2007). Ovi rezultati ukazuju na to da prolin deluje indirektno na PSII kao i direktno na ROS tokom suše.

Poznato je da su stresom indukovane promene u biosintezi i degradaciji prolina konzervisane i služe za pokretanje esencijalnih signalnih puteva, kao što je kod sisara p53-zavisna apoptoza ili osmoregulacija u biljkama i bakterijama (Csonka, 1989; Hare i Cress, 1997; Hu i sar., 2007). Smatra se da prolin deluje kao signal koji reguliše metaboličke rezerve i utiče na rast i razvoj biljke (Verbuggen i Hermans, 2008). Biosinteza prolina bi mogla biti jedan od najranijih metaboličkih odgovora pokrenutih u signalnom putu koji povezuje percepciju mnogih stresova iz okoline i deo je fiziološkog odgovora na različite abiotičke stresove na ćelijskom nivou (Song i sar., 2005). Da li su promene u sadržaju prolina zaista signalne komponente i kako regulišu ekspresiju gena i prilagođavanje metaboličkih procesa su pitanja koja zahtevaju dalja ispitivanja.

Iako postoji veliki broj radova sa pozitivnom korelacijom između akumulacije prolina i adaptacije na osmotski stres postoje i oni koji ne podržavaju ovu korelaciju (Tabela 2.2). Stoga se nameće pitanje da li akumulacija prolina predstavlja adaptivnu prednost biljaka pri osmotskom stresu ili je to samo slučajna posledica stresom indukovanih promena u metabolizmu. Najkompletniji i najpouzdaniji dokazi da je akumulacija prolina zaista integralna komponenta ćelijske adaptacije na osmotski stres dobijeni su iz studija osmoregulacije kod bakterija. Kod bakterija je dokazano da je prolin moćan osmoprotektant, a mutanti *Escherichia coli* sa povećanom sintezom prolina su

pokazali značajno povećanu toleranciju na osmotski stres (Csonka, 1989). Ova zapažanja su dala nagoveštaj da bi i kod biljaka takođe akumulacija prolina mogla imati direktnu adaptivnu ulogu u suprotstavljanju efektima osmotskog stresa. Odsustvo pozitivne korelacije između akumulacije prolina i tolerancije na osmotski stres kod nekih vrsta ne negira adaptivnu ulogu prolina; to bi moglo ukazati na dominantnost nekih drugih mehanizama adaptacije kod tih vrsta, kao što su morfološki ili fiziološki mehanizmi pre nego osmoregulatorni mehanizmi. Ovi rezultati se mogu objasniti ako se uzme u obzir da osmooprtektivna uloga prolina uključuje i minimiziranje efekata ćelijskih oštećenja, a ne samo jednostavno unutarćelijsko prilagođavanje osmotskog potencijala. Na ovo ukazuju i zapažanja da su kod bakterija prolin i glicin-betain uticali na povećanje stabilnosti proteina i membrana u uslovima suše ili visokih temperatura (Csonka, 1989).

**Tabela 2.2.** Pregled literature o akumulaciji prolina u uslovima vodnog stresa

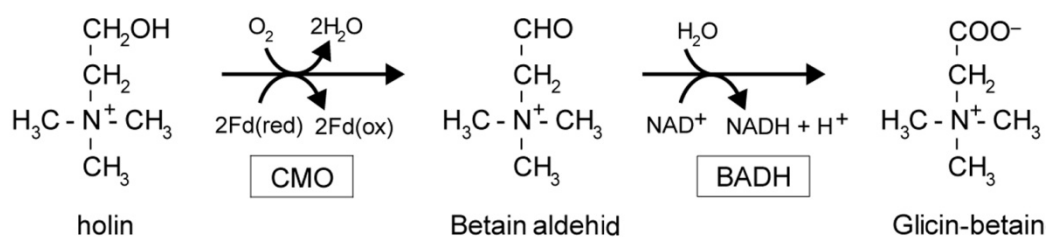
Vrsta	stresni uslovi	referenca
<i>Spinacia oleracea</i> L.	-2 mPa	Huang i Cavalleri, 1979
<i>Solanum Tuberosum</i> L.	10% PEG	Corcuera i sar., 1989
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	25% PEG	Handa i sar., 1983; Rhodes i sar., 1986; Claussen, 2005
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. <i>Counter</i>	11 x jači hranljivi rastvor	
<i>Helianthus tuberosum</i> L.	1 M sorbitol	Wrench i sar., 1980
<i>Vicia faba</i> L.	2 dana suše	Venekamp i Koot, 1988
<i>Glycine max</i> L.	2 dana suše	Kohl i sar., 1991
<i>Triticum aestivum</i> L.	-3,6 mPa	Munns i sar., 1979
<i>Hordeum vulgare</i>	-1,5 mPa	Bogges i sar., 1976
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	85 % suša	Askari i Ehsanzadeh, 2015
<i>Pinus pinea</i> L.	nezalivanje	Deligoz i Gur, 2015
<i>Malus domestica</i> Borkh.	5% i 10% PEG	Kautz i sar., 2015

#### 2.1.1.4.2. Glicin-betain

Glicin-betain (GB) (N,N,N trimetilglicin) je potpuno N-metil supstituisani derivat L-glicina koji se nalazi u mnogim mikroorganizmima, višim biljkama i životinjama. Na fiziološkom pH je dipolaran, elektroneutralan molekul. Nagomilavanje i biosinteza GB je veoma istražena kod halofita (Rhodes i Hanson, 1993; Hanson i sar., 1995; Yu-Mei i sar., 2004). Glavna uloga u biljkama izloženim visokim koncentracijama soli je zaštita ćelije

osmotskim prilagođavanjem, stabilizacija proteina (Rubisco) i fotosintetičkog aparata (Gadallah, 1999; Mäkelä i sar., 2000; Heuer, 2003; Allakhverdiev i sar., 2003).

Glicin-betain je kvaternerno amonijumovo jedinjenje koji postoji u različitim biljkama, ali je njegova distribucija među biljkama sporadična. Mnoge poljoprivredne kulture ne akumuliraju GB. Zapaženo je da kod biljaka sposobnih za sintezu GB dolazi do akumulacije ovog jedinjenja u uslovima abiotičkog stresa kao što je hladnoća, suša, stres soli (Rhodes i Hanson, 1993; Chen i Murata, 2008). U višim biljkama GB se sintetiše u hloroplastima iz holina preko betain aldehida (Slika 2.5) dejstvom holin monooksigenaze (CMO EC: 1.14.15.7.) i NAD(P)<sup>+</sup> zavisne betain aldehyd dehidrogenaze (BADH EC: 1.2.1.8.) (Ashraf i Foolad, 2007). Iako su poznati i drugi putevi biosinteze, kao na primer N-metilacija glicina, biosinteza iz holina je identifikovana u svim GB akumulirajućim biljkama.



Slika 2.5. Biosinteza GB u višim biljkama (preuzeto iz Chen i Murata, 2002)

Uvođenjem gena za sintezu glicin-betaina u biljke koje ga neakumuliraju poboljšava se sposobnost biljke da toleriše uslove abiotičkog stresa, što ukazuje na pozitivnu ulogu GB u toleranciji na stres (Hayashi i sar., 1997; Sakamoto i Murata, 1998, 2000; Quan i sar., 2004; Park i sar., 2004; Lv i sar., 2007; Khan i sar., 2009). Međutim, u odnosu na biljke koje prirodno nagomilavaju GB, zapaženo je da je kod transgenih biljaka količina GB bila mnogo manja, što se objašnjava ili malom količinom supstrata ili smanjenim transportom holina u hloroplaste gde se odvija biosinteza GB (Nuccio i sar., 1998; Huang i sar., 2000; McNeil i sar., 2000). Kao alternativa genetskom inženjeringu, postoji mogućnost egzogene primene GB, koji lako prodire u list i može se preneti do drugih tkiva i organa. Kako ne postoji mogućnost razgradnje GB u biljkama iz biljaka koje ga akumuliraju u velikim količinama (na pr. šećerna repa), GB se može relativno jeftino izolovati kao nus proizvod (Rhodes i Hanson, 1993). Ovo čini ekstrakciju i spoljnu

primenu GB ekonomski isplativim pristupom za povećanje produktivnosti poljoprivrednih kultura u štetnim uslovima.

U biljkama tolerantnim na soni stres GB se može akumulirati do osmotski značajnih nivoa (Rhodes i Hanson, 1993). Smatra se da GB štiti fotosistem II, stabilizuje membrane i smanjuje oksidativnu štetu (Chen i Murata, 2011). Mnogi *in vitro* eksperimenti su pokazali da GB deluje kao osmoprotektant tako što stabilizuje kvaternernu strukturu proteina i visoko uređene strukture membrana tokom stresa uzrokovanog visokim temperaturama ili visokim koncentracijama soli (Gorham, 1995). Jedna od najistaknutijih uloga GB je posredovanje u osmotskom podešavanju uključujući i zaštitu enzima i konzistentnost membrane, što značajno doprinosi toleranciji biljaka na osmotski stres.

## 2.2. Biljke i oksidativni stres

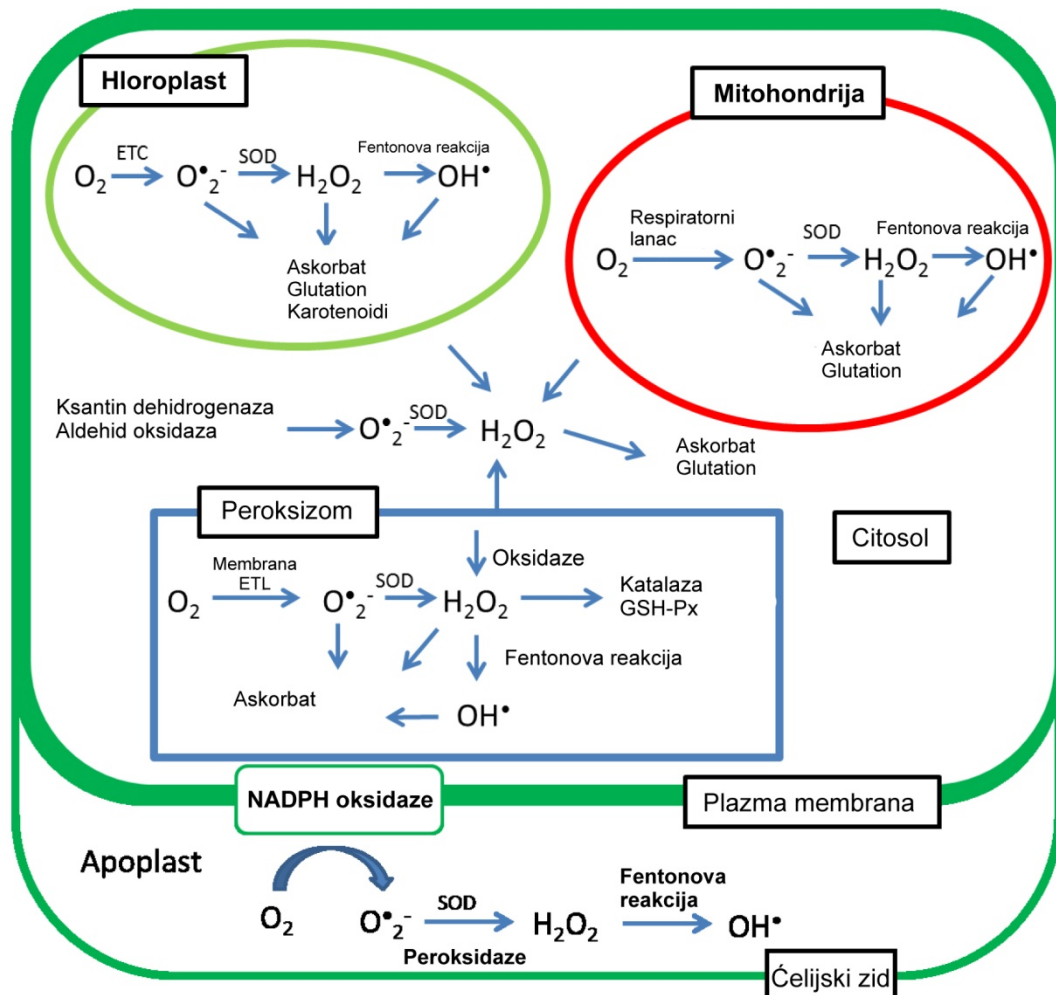
Danas je uveliko prihvaćena činjenica da vodni stres izaziva oksidativni stres kod biljaka (Noctor i sar., 2014). To znači da, kao i drugi abiotički stresovi, smanjena dostupnost vode dovodi do promena u ravnoteži između nastanka (stvaranja) i uklanjanja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), pri čemu nastaju različita oštećenja struktura i funkcije ćelijskih biomolekula (lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina). Veliki broj radova se odnosi na značaj oksidativnog stresa u odgovoru biljaka na sušu, od oksidativne štete do uloge ROS u lokalnoj i sistemske reakciji i signalingu (pogledati radove Smirnof 1993, Miller i sar., 2010, Cruz de Carvalho, 2008).

### 2.2.1. ROS i markeri oksidativnog stresa

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u zadnjoj molekulskoj/atomskej orbitali. Prisustvo nesparenog elektrona čini ih vrlo reaktivnim, što omogućava da oštete sve klase biomolekula u ćeliji (Halliwell i Gutteridge, 2007). Reaktivne vrste podrazumevaju sva ona jedinjenja koja imaju karakter slobodnih radikala, mada po svojoj strukturi to ne moraju biti: superoksid anjon radikal ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroksil radikal ( $HO^{\bullet}$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\bullet}$ ), alkoksil radikal ( $RO^{\bullet}$ ) i hidroperoksil radikal ( $HOO^{\bullet}$ ), kao i jedinjenja koja nisu slobodni radikali ali su lako podložna redukciji ili autooksidaciji pa se takođe smatraju reaktivnim vrstama kao što su vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), singletni kiseonik ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), hipohloritna kiselina ( $HClO$ ) i hidroperoksidi ( $ROOH$ ). Uobičajna pojava je da se kod biljaka koje su izložene abiotičkom ili biotičkom stresu javi povećan nivo ROS u različitim delovima ćelije (Slika 2.6).

Tokom vodnog deficita biljne ćelije su izložene različitim uticajima te kako bi održale integritet i fluidnost membrana dolazi do promena u sastavu lipida u ćelijskim membranama (Repellin i sar., 1997; Gigon i sar., 2004; Torres-Franklin i sar., 2007). Promene se svode na dva fenomena: prvi uključuje promene u proporciji polarnih grupa fosfolipida u smislu povećanja udela šećera koji je u skladu sa povećanjem tolerancije na sušu i niske temperature. Drugi fenomen se odnosi na promene u nivou zasićenosti i dužini lanca masnih kiselina koje formiraju fosfolipidni dvosloj. Zasićene masne kiseline smanjuju fluidnost membrane dok je polinezasićene masne kiseline povećavaju. Ovi

odnosi utiču na održavanje funkcije transmembranskih proteina i fotosintetičku aktivnost (Perlikowski i sar., 2016).



Slika 2.6. Nastajanje i uklanjanje ROS u biljnoj ćeliji. Fentonova reakcija (razlaganje  $H_2O_2$  u prisustvu  $Fe^{2+}$ ), ETL (elektron transportni lanac) (preuzeto iz Jajic i sar., 2015)

Međutim, u uslovima vodnog stresa često je povećan nivo MDA koji ukazuje na povećan nivo ROS koji dovodi do peroksidacije lipida u membranama koje sadrže polinezasićene masne kiseline. Lipidna peroksidacija predstavlja negativan fenomen delovanja slobodnih kiseoničnih vrsta, koji je autokatalitički i najčešće ireverzibilan. Za inicijaciju ovog procesa odgovoran je hidroksil radikal ili vodonik-peroksid. Karakteriše se peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina što vodi ka razgradnji biomembrana i poremećajima biološke organizacije ćelije. Visoko reaktivni sekundarni produkti lipidne peroksidacije reaguju sa slobodnim -SH i -NH<sub>2</sub> grupama amino kiselina, peptida, proteina i nukleotida, što modifikuje funkcije ovih makromolekula.

Inicijacija lipidne peroksidacije može biti prouzrokovana adicijom nekog radikala ili mnogo češće oduzimanjem atoma vodonika metilenske grupe neke polinezasićene masne kiseline od strane radikala. Na primer, visoko reaktivna radikalska kiseonična vrsta, hidroksil radikal  $\text{HO}^\bullet$  može da se adira na dvostruku vezu ili da apstrahuje atom vodonika. U oba slučaja nastaje lipidni slobodni radikal koji može dalje da vrši degradaciju masnih kiselina (Halliwell i Gutteridge, 2007). Što je veći broj dvostrukih veza u strukturi masne kiseline atom vodonika će biti lakše uklonjen i to je razlog zašto su polinezasićene masne kiseline posebno osetljive na delovanje slobodnih radikala (Halliwell i Chirico, 1993).

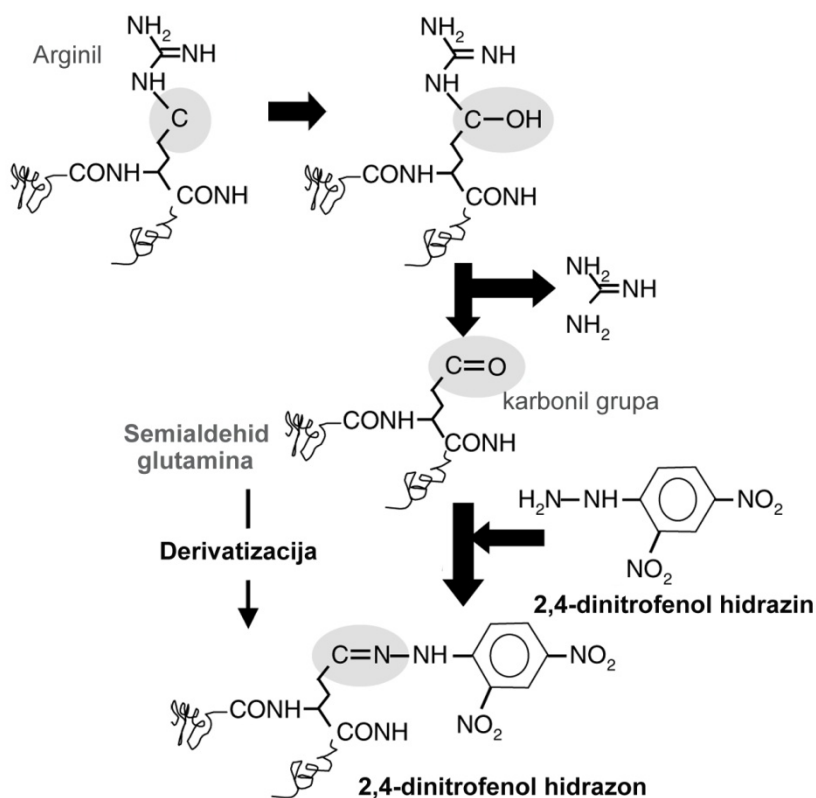
Nastali lipidni slobodni radikal se stabilizuje intramolekulskom preraspodelom u konjugovani dien i potom može imati nekoliko različitih sudbina. U aerobnim uslovima gde je koncentracija kiseonika velika, kakvi su u samoj ćeliji, najverovatnije je da će lipidni slobodni radikali reagovati sa molekulom kiseonika pri čemu će nastati peroksil radikal  $\text{ROO}^\bullet$  (Halliwell i Chirico, 1993). Niske koncentracije kiseonika mogu favorizovati međusobne reakcije dva lipidna radikala ili reakcije sa drugim komponentama membrane, npr. sa SH grupama proteina. Samim tim koncentracija kiseonika utiče na put propagacije lipidne peroksidacije (Halliwell i Gutteridge, 2008). Nastali  $\text{ROO}^\bullet$  može da oduzme alilni vodonik sa susednog molekula nezasićene masne kiseline pri čemu će se formirati lipidni hidroperoksid  $\text{ROOH}$  i novi lipidni alkil radikal koji nastavlja radikalsku lančanu reakciju. Ovako pokrenut lanac reakcija slobodnih radikala ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta. Ova propagacija se ogleda u nastanku sekundarnih slobodnih radikala koji nastavljaju da šire kaskadu lančanih reakcija. Dužina propagacije zavisi od mnogo faktora: odnosa količine lipida i proteina u membrani (šanse da radikal reaguje sa membranskim proteinom se povećavaju što je sadržaj proteina u membrani veći), sastava masnih kiselina, koncentracije kiseonika i prisustva antioksidanasa u membrani koji prekidaju lančane reakcije pribavljanjem lako-donirajućeg H peroksilnim radikalima (Halliwell i Chirico, 1993).

Lančana radikalska reakcija se prekida sjedinjavanjem dva radikala u neutralni molekul i to se naziva terminacija. Iako se terminacijom prekida lančana reakcija, proizvodi nastali terminacijom mogu biti vrlo reaktivni sami po sebi.

Lipidna peroksidacija dovodi do promena u fluidnosti i permeabilnosti membrane i stvaranja reaktivnih metabolita (MDA, hidroksinonenala, izoprostana), ali svakako nije



jedina posledica oksidativnog stresa nastalog u ćeliji pri poremećenoj ravnoteži stvaranja i eliminacije slobodnih radikala. Oksidacija proteina je još jedna negativna posledica oksidativnog stresa koja utiče na brojne ćelijske funkcije, jer oksidativna oštećenja u proteinima dovode do smanjenja efikasnosti i preciznosti različitih biohemijskih procesa. Najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina predstavlja karbonilacija proteina, kada se oksiduju izloženi bočni lanci amino kiselina, posebno prolina, arginina, lizina i treonina (Slika 2.7). Različite metode su razvijene za određivanje karbonilnih grupa proteina i većina uključuje derivatizaciju karbonil grupe sa 2,4-dinitrofenil-hidrazinom i detekciju nastalog stabilnog proizvoda različitim metodama (spektrofotometrijski, HPLC, i dr.) (Dalle-Donne i sar., 2003).



Slika 2.7. Karbonilacija i derivatizacija izloženog aminokiselinskog bočnog lanca (preuzeto iz Nyström, 2005)

### 2.2.2. RNS i biološka uloga NO

Uz ROS veliku važnost imaju i reaktivne azotne vrste (RNS- eng. *Reactive Nitrogen Species*) u koje se ubrajaju azot (II) oksid, azot (IV) oksid, peroksinitrit i nitrozilni katjon. Azot (II) oksid (azot monoksid) predstavlja važnu komponentu signalnog sistema u

biljkama i životinjama. U biljkama reguliše različite fiziološke procese i tako omogućava adaptaciju u stresnim uslovima (Mur i sar., 2013). Biosinteza azot monoksida iz L-arginina, pod dejstvom enzima azot oksid sintaze (NOS) odigrava se u skoro svim ćelijama kod sisara. Međutim, do sada u biljkama nije otkriven enzim NOS, već se samo pretpostavlja da biljke sadrže slične enzime koji se nalaze u citoplazmi, hloroplastima, mitohondrijama i peroksizomima (Wilson i sar., 2008; Groß i sar., 2013). Mogući izvori NO su NADPH-zavisna nitrat-reduktaza (NR; EC 1.6.6.1) koja redukuje nitrat do nitrita i potom do azot oksida kao i enzim ksantin-oksidaza. Takođe, NO može nastati neenzimskim reakcijama, spontanom redukcijom nitrita u kiseloj sredini (Stöhr i Ullrich, 2002), zatim redukcijom NO<sub>2</sub> do NO karotenima na svetlosti, kao i oksidacijom hidroksil amina i salicil hidroksilamata (Cooney i sar., 1994; Mur i sar., 2013, Procházková i sar., 2014).

Stvoreni gas, NO, je mali, električno neutralan molekul, koji je zapravo slobodni radikal jer sadrži jedan nespareni elektron. Zahvaljujući svojoj lipofilnoj prirodi, može da difunduje kroz ćelijske membrane bez specifičnih membranskih transportera i funkcioniše kao intra- i inter-ćelularni glasnik. Kako je veoma reaktivan, efekat koji NO ispoljava je uglavnom lokalnog karakera uz veoma kratak poluživot (5 do 10 sekundi). *In vivo* može da formira S-nitroso jedinjenja, što produžava njegovu biološku aktivnost na 1-2 minuta. Lako reaguje sa sulfhidrilnim grupama biomolekula, jonima metala, vezuje se za enzime/proteine koji sadrže hem ili Fe-S aktivna mesta, što omogućava da utiče na brojne biološke funkcije u organizmu (Neill i sar., 2008; Wilson i sar., 2008). U reakciji sa superoksidnim anjonom nastaje reaktivan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), koji se može transformisati u kiseloj sredini u peroksinitritnu kiselinu, a potom dalje u hidroksil radikal.

Pre više od 20 godina azot monoksid se smatrao zagađivačem vazduha i inhibitorom rasta biljaka (Siddiqui i sar., 2011). Sa otkrićem emisije NO od strane biljaka, NO postaje predmet mnogih istraživanja, ali tek 90-tih godina prošlog veka, nakon što je ga časopis "Science" (1992) proglasio molekulom godine, na NO se gleda kao na signalni molekul sa velikim biološkim značajem (Klepper, 1979). Nobelova nagrada je dodeljena 1998. godine za otkriće NO kao signalnog molekula u kardiovaskularnom sistemu.

Pored već dobro poznatih uloga kod sisara, NO ima mnoge važne uloge kod biljaka koje su opisane u mnogim preglednim radovima (Bolwell, 1999; Beligni i Lamattina, 1999a; 1999b; 2001; García-Mata i Lamattina, 2001; Stöhr i Ullrich, 2002; Neill i sar.,

2003; Bethke i sar., 2004; Arasimowicz i Floryszak-Wieczorek, 2007). NO utiče na odbrambene reakcije biljaka pri napadu patogena (Mur i sar., 2006), ima ulogu u indukciji klijanja i smanjenju mirovanja semena (Bethke i sar., 2006; Arc i sar., 2013), regulaciji sazrevanja biljke i senescenciji (Liu i Guo, 2013). NO je uključen u pokrete stoma (García-Mata i Lamattina, 2001), gravitropizam korena (Hu i sar., 2005), regulaciju cvetanja (Simpson, 2005), kontrolu organogeneze, razvoj bočnih korenova i korenskih dlaka (Mur i sar., 2013).

U mnogim studijama je u stresnim uslovima, kao što je stres suše, soli, ekstremne temperature, UV-B zračenje kao i stres teških metala dokazana akumulacija NO u biljkama (Zhang i sar., 2007; Arasimowicz-Jelonek i sar., 2009; Hasanuzzaman i sar., 2010; Xiong i sar., 2012; Saxena i Shekhawat, 2013). Naglo povećanje količine NO ukazuje na esencijalnu umešanost u nekoliko fizioloških procesa; ipak, postoji mnogo objavljenih rezultata gde u uslovima stresa nije zabeležena akumulacija NO. Ovi podaci u literaturi ukazuju na to da se NO ne može smatrati opštim signalom stresa (Siddiqui i sar., 2011; Groß i sar., 2013). Neophodna su dalja ispitivanja u cilju rasvetljavanja biološke pozadine regulacije endogenog nivoa NO kod različiti biljnih vrsta u uslovima stresa, kao i njegove uloge u toleranciji na stres. Pokazano je da primena egzogenih NO donora (natrijum nitroprusid (SNP),  $\text{NaNO}_2$ ) poboljšava toleranciju na stres, uporedo smanjujući nivo  $\text{H}_2\text{O}_2$  i MDA. Ova pojava je zabeležena čak i u slučajevima kada je endogeni nivo NO bio smanjen, što ukazuje na to da nije neophodno da ispitani NO donori imitiraju funkcije NO u prirodnim uslovima (Groß i sar., 2013).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da NO poseduje antioksidantna svojstva i može delovati kao signal za aktiviranje antioksidantnih enzima pri abiotičkom stresu (Siddiqui i sar., 2011). NO inhibira oksidativnu štetu kod biljaka regulišući opšte mehanizme ćelijske redoks homeostaze i promovišući transformaciju  $\text{O}_2^{\bullet -}$  u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$  i takođe povećavajući aktivnost peroksidaza iako i on sam poseduje antioksidantna svojstva. NO brzo reaguje sa kiseonikovim jedinjenjima, hemom, tiolima, i proteinima i stvara biohemijski signal kojim direktno ili indirektno reguliše enzimsku aktivnost. Efekti zavise od mesta i koncentracije, tako da NO ispoljava dvojake efekte. Pri niskim koncentracijama (nanomolarne ili mikromolarne), ima zaštitnu ulogu, prekida lipidnu peroksidaciju (interaguje sa lipidnim alkoksi i peroksi radikalima) i indukuje ekspresiju antioksidantnih enzima i neutrališe  $\text{O}_2^{\bullet -}$  i slobodne radikale. Nasuprot ovome, u milimolarnim ili

molarnim koncentracijama NO prouzrokuje oksidativni i nitrozativni stres i ćelijsku smrt (Santisree i sar., 2015).

U mnogim studijama je pokazano da se pri suši povećava produkcija NO kod biljaka (Tabela 2.3). Kako je ova pojava zabeležena kod različitih biljnih vrsta, smatra se da je NO neophodan tokom suše u prenosu signala. Akumulacija zavisi od trajanja i intenziteta nametnutog stresa, kao što je primećeno kod vrste *Cucumis sativus* gde su kod korena zabeležene male promene u sintezi NO nakon desetočasovnog stresa, dok je mnogo veće povećanje zabeleženo pri stresu u trajanju od 17h (Arasimowicz-Jelonek i sar., 2009, Arasimowicz-Jelonek i sar., 2009b). NO pored indukcije antioksidantnih enzima indukuje ekspresiju gena koji kodiraju saharoza-fosfat sintazu i P5CS, (Uchida i sar., 2002).

Tabela 2.3. Pregled podataka iz literature o metodama za detekciju NO u biljkama u uslovima osmotskog stresa

Vrsta	Sistem	Metoda	Referenca
<i>Pisum sativum</i>	dehidracija 24 h	NO specifična proba	Leshem i Haramaty, 1996
<i>Oryza sativa</i>	15% PEG tokom 24h; 200 mM manitol 24h	fluorometrijski (DAF-2DA)	Cai i sar., 2015; Xiong i sar., 2012
<i>Zea mays</i>	12% PEG 10 dana	Gris reagens	Hao i sar., 2008; Zhang i sar., 2012
<i>Ailanthus altissima</i>	nezalivanje 14 dana	Gris reagens	Filippou i sar., 2014
<i>Medicago truncatula</i>	nezalivanje 9 dana	Gris reagens	Filippou i sar., 2011
<i>Cucumis sativus</i>	nezalivanje 5-17h	fluorometrijski (DAF-2DA)	Arasimowicz-Jelonek i sar., 2009, 2009b
<i>Poncirus trifoliata</i>	dehidracija 6h	NO test kit	Fan i Liu, 2012
<i>Arabidopsis thaliana</i>	nezalivanje 21 dan	hemoglobin test	Lozano-Juste i León 2010; Shen i sar., 2014
<i>Vitis vinifera</i>	nezalivanje 7 dana	fluorometrijski	Patakas i sar., 2010
<i>Citrus aurantium</i>	13% PEG 12 dana	Gris reagens	Ziogas i sar., 2013
<i>Guzmania monostachia</i>	30% PEG 7 dana	spektrofotometrijski (DAR4M)	Mioto i Mercier, 2013
<i>Nicotiana tabacum</i>	250 mOsm sorbitol 30 min	fluorometrijski (DAF-2DA)	Gould i sar., 2003
<i>Pisum sativum</i> , <i>Triticum aestivum</i>	PEG (400 mOsm)	(DAF-2DA)	Kolbert i sar., 2005

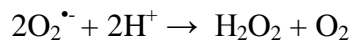
### 2.2.3. Antioksidantni sistem biljaka

Velika toksičnost kiseoničnih radikala usloвила je tokom evolucije razvoj vrlo efikasnih sistema antioksidantne zaštite. Biljke poseduju dobro organizovane i razvijene odbrambene sisteme antioksidantne zaštite koji delujući zajedno kontrolišu tok oksidacija u različitim stresnim uslovima i na taj način štite ćelije od oksidativnog oštećenja. Glavni mehanizmi zaštite obuhvataju enzimske antioksidante, enzime i metabolite askorbat-glutation ciklusa i neenzimske antioksidante (Cruz de Carvalho, 2008). Prema prirodi i načinu delovanja, antioksidanti se mogu podeliti na enzimska i neenzimska jedinjenja. Ova jedinjenja su rasprostranjena u biljnoj ćeliji, u ćelijskim organelama, citoplazmi i apoplastu. Izuzetak je enzim katalaza koja se nalazi samo u peroksizomima. Enzimski antioksidanti predstavljaju tzv. prvu liniju antioksidantne zaštite i uključuju superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT), gvajakol-peroksidazu (GPx), askorbat-peroksidazu (ASC-Px), glutation-peroksidazu (GSH-Px), i dr. Glavni neenzimski antioksidanti biljaka su askorbinska kiselina, glutation, karotenoidi, tokoferoli i fenolna jedinjenja (Slika 2.8).

#### 2.2.3.1. Antioksidantni enzimi

Enzimski sistem antioksidantne zaštite se ostvaruje dejstvom enzima. Tako superoksid-dismutaza redukuje  $O_2^{\bullet -}$  do vodonik peroksida, zatim peroksidaze, katalaza, askorbat-peroksidaza, glutation-reduktaza, monodehidroaskirbat-reduktaza i dehidroaskorbat-reduktaza razlažu vodonik peroksid do vode na različitim mestima u ćeliji (Asada, 1999; Mittler, 2002).

**Superoksid-dismutaza** (SOD; EC 1.15.1.1.) katalizuje reakciju dismutacije  $O_2^{\bullet -}$  u prisustvu donora vodonika do  $H_2O_2$  i  $O_2$ , pri čemu se jedan molekul  $O_2^{\bullet -}$  oksiduje u  $O_2$  a drugi redukuje u  $H_2O_2$ :



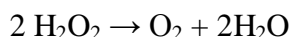
Brzina enzimske reakcije je za oko 10000 puta veća od spontane dismutacije superoksid anjon radikala. Kod biljaka su prisutne tri izoenzimske forme SOD: Cu/Zn – SOD, Mn – SOD, Fe – SOD.

**Bakar/cink zavisna SOD** se najvećim delom nalazi u citosolu ćelije. Ovaj enzim je po strukturi homodimer u kome svaka subjedinica sadrži po jedan atom  $Cu^{2+}$  i jedan atom  $Zn^{2+}$ . Joni bakra čine aktivni centar, a joni cinka stabilizuju prostornu konfiguraciju enzima. Katalitička aktivnost ovog enzima vezana je za bakar, koji je odgovoran za reakciju dismutacije u kojoj menja svoju valencu, primanjem ili otpuštanjem elektrona.

*Mangan zavisna SOD* se nalazi u matriksu peroksizoma. Ovaj enzim je tetramer koji sadrži dva do četiri atoma mangana. U toku reakcije dismutacije koju katalizuje SOD, mangan menja svoju valencu.

*Gvožđe zavisna SOD* se često ne detektuje u biljkama, ali kada se detektuje onda se nalazi u hloroplastima (Sharma i sar., 2012).

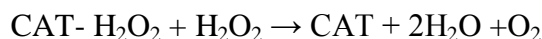
**Katalaza** (CAT; EC 1.11.1.6.) je jedan od najrasprostranjenijih enzima u prirodi, čija je osnovna biološka uloga razlaganje toksičnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



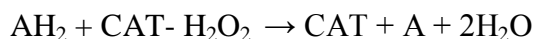
Ona razgrađuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do vode i molekuskog kiseonika, pri čemu se u zavisnosti od koncentracije supstrata, odvija katalazni ili peroksidazni tip reakcije. U oba slučaja reakcija počinje obrazovanjem kompleksa I između katalaze i molekula H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



U katalaznom tipu reakcije, kompleks I kao donor vodonika koristi drugi molekul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pri čemu nastaju voda i molekulski kiseonik:

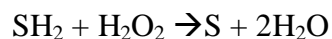


U peroksidaznom tipu reakcije, donori vodonika ili elektrona mogu biti različita organska i neorganska jedinjenja (etanol, metanol, formaldehid i dr.) sa kojima reaguje kompleks I, a iz reakcije izlazi nativni enzim, oksidovani kosupstrat i voda:



Katalaza je hemoproteid, sastavljen od četiri identične subjedinice, u čijem se sastavu nalazi po jedan hem, sa jonom Fe<sup>3+</sup> u centru. Prisustvo katalaze u peroksizomima, gde pod uticajem peroksizomalnih enzima nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, omogućava zaštitu ovog dela ćelije, dok u drugim delovima ćelije ima manje katalaze, pa ulogu u detoksikaciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preuzimaju drugi enzimi (peroksidaze).

**Peroksidaze** (Px; EC 1.11.1.7) su enzimi koji spadaju u grupu oksido-reduktaza i katalizuju reakcije oksidacije različitih supstrata u prisustvu vodonik-peroksida:

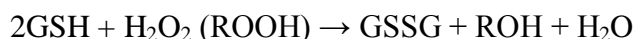


Reakcije koje katalizuju peroksidaze su: sinteza lignina, reakcije oksidacije fenolnih jedinjenja estarski vezanih za polisaharide ćelijskog zida, formiranje mostova izoditirozina za koje se pretpostavlja da povezuju strukturne molekule proteina, učestvuju u metabolizmu auksina i dr. (Passardi i sar., 2004; Tenhaken, 2015). Supstrati peroksidaza mogu biti veštački sintetisane supstance (poput gvajakola). Rezultati istraživanja većeg broja autora su pokazali i da peroksidaza ćelijskog zida ima ulogu u

biohemijskoj inhibiciji rasteinja ćelija u sušnim uslovima (Bacon i sar., 1997; Csiszár i sar., 2008; Sečenji i sar., 2010).

**Askorbat-peroksidaza** (ASC-Px; EC 1.11.1.11.) predstavlja enzim koji učestvuje u uklanjanju  $H_2O_2$ , ali za razliku od katalaze, ASC-Px zahteva askorbat kao redukujće sredstvo i ima viši afinitet ka  $H_2O_2$  od katalaze (Sharma i sar., 2012). To dovodi do hipoteze da ASC-Px, kao enzim koji je prisutan u svim ćelijskim delovima utiče na finu regulaciju unutarćelijskog nivoa ROS, verovatno neophodnog za signalne svrhe, dok katalaza koja je locirana isključivo u peoksizomima verovatno funkcioniše u uslovima stresa kada su mnogo veći nivoi  $H_2O_2$ . Sastavni deo je askorbat-glutation ciklusa koji ima ključnu ulogu u redukciji  $H_2O_2$  u uslovima abiotičkog stresa (*Slika 2.8*) (Asada, 2006). U biljnim ćelijama se nalazi u stromi, tilakoidnim membranama hloroplasta, mikrozomima i citosolu. Svaki od ovih ćelijskih odeljaka može da sadrži jednu ili više izoformi ovog enzima (Gill i Tuteja, 2010).

**Glutation-peroksidaze** (GSH-Px; EC 1.11.1.9.) čine familiju enzima koji katalizuju reakciju  $H_2O_2$  ili organskih hidroperoksida u odgovarajući alkohol, koristeći redukovani glutacion kao donor vodonika:



Na osnovu supstratne specifičnosti i zahteva za selenom, identifikovane su seleno-zavisne i seleno-nezavisne glutacion-peroksidaze. Seleno-nezavisne glutacion peroksidaze imaju manji afinitet za  $H_2O_2$ , ali su efikasne u redukciji organskih hidroperoksida.

*Klasična selen-zavisna GSH-Px* je tetramer u kome svaka subjedinica sadrži po jedan atom selena u formi selenocisteina. GSH-Px redukuje lipidne hidroperokside do odgovarajućih hidroksi-masnih kiselina, a zatim regeneriše svoju nativnu formu pomoću redukovanog glutaciona. Razlika u kinetičkim svojstvima GSH-Px i katalaze uslovljava veći afinitet GSH-Px za supstrat ( $H_2O_2$ ) u odnosu na katalazu kada je  $H_2O_2$  prisutan u malim koncentracijama u ćeliji. Međutim, kada je koncentracija  $H_2O_2$  u ćelijama visoka, katalaza je efikasnija u njegovoj detoksikaciji od GSH-Px.

**Glutation-reduktaza** (GR; EC 1.6.4.2.) je važan enzim antioksidantne zaštite i predstavlja poslednji enzim askorbat-glutation ciklusa. Aktivnošću glutacion-reduktaze vrši se stalna regeneracija redukovanog glutaciona:



Održavanje visokog odnosa GSH/GSSG u ćeliji je vrlo važno (Meister i Anderson, 1983). GR ima glavnu ulogu u održavanju i obnavljanju GSH u uslovima biotičkog i

abiotičkog stresa (Romero-Puertas i sar., 2006). Ovaj enzim katalizuje reakciju koja je esencijalna za stabilnost i integritet ćelije, jer konvertuje oksidovani glutation (GSSG) u redukovani glutation (GSH), pri čemu kao redukujući ekvivalent koristi NADPH. Redukovani GSH učestvuje u velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija koje su od presudnog značaja za funkcionisanje ćelije, pri čemu prelazi u svoju oksidovanu GSSG formu. Enzim GR je zaslužan za održavanje rezervi glutaciona uglavnom u redukovanom stanju, tako da ima značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji (Dickinson i Forman, 2002).

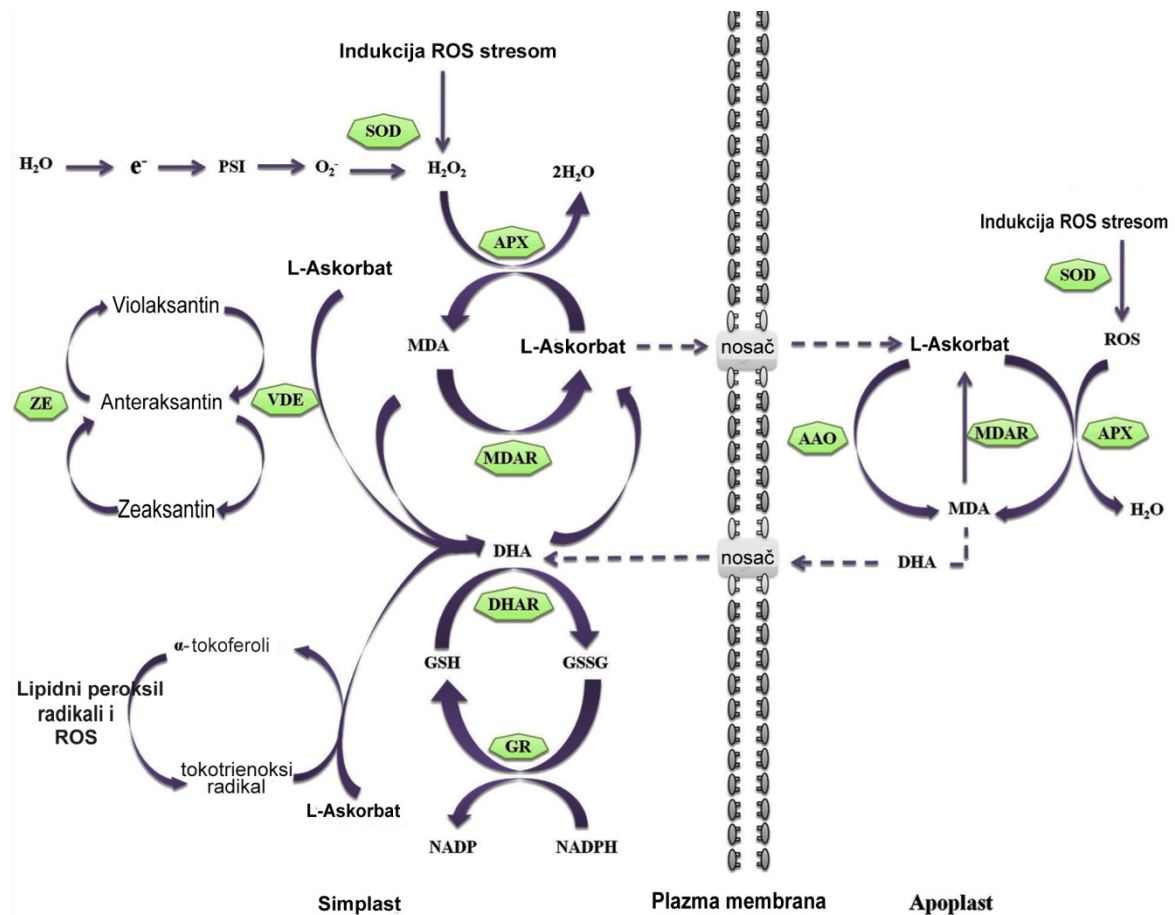
### 2.2.3.2. Neenzimski antioksidanti

Neenzimske antioksidante čine jedinjenja različite hemijske strukture, a prema afinitetu i rastvorljivosti u lipidima dele se na liposolubilne i hidrosolubilne.

**Askorbinska kiselina** (ASC) je najzastupljeniji hidrosolubilni antioksidant u biljkama (Foyer i Noctor, 2003). Predstavlja kofaktor enzima uključenih u fotosintezu, biosintezu hormona, kao i u regeneraciju antioksidanasa kao što je  $\alpha$ -tokoferol (Slika 2.8). U ksantofilskom ciklusu, askorbat je reduktant enzima violaksantin-deepoksidaze (VDE) koji prevodi violaksantin u zeaksantin. Askorbat je u stanju da neenzimski gasi  $^1\text{O}_2$  i da direktno redukuje  $\text{O}_2^{\bullet -}$  i  $\bullet\text{OH}$  (Smirnoff, 2008). U biljkama nastaje u mitohondrijama odakle se transportuje do drugih delova biljke (Wheeler i sar., 1998). Zauzima važno mesto u fiziologiji biljaka, uglavnom zbog svojih antioksidantnih i redukujućih osobina, ali i zbog uloga u rastu i razviću biljaka kao i pri regulaciji ćelijskih mehanizama na stresove iz životne sredine (Shao i sar., 2008). U ćeliji su prisutni i proizvodi oksidacije ASC; gubitkom jednog elektrona nastaje rezonantno stabilan radikal monodehidroaskorbat (MDA) koji se spontano disproporcioniše na ASC i dehidroaskorbat (DHA). Nestabilni oblik DHA se mora brzo redukovati jer u suprotnom se potpuno razgradi. Održavanje homeostaze nivoa askorbinske kiseline se postiže regulacijom procesa sinteze, recikliranja i razgradnje kao i unutarćelijskim i međućelijskim transportom (Venkatesh i Park, 2014).

Centralnu ulogu u tzv. askorbat-glutation redoks ciklusu imaju ASC i redukovani glutation, GSH. Pored njih tu su i enzimske komponente: glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-S-transferaza (GST), glutation-reduktaza (GR) i NADPH. Regeneracija askorbinske kiseline se vrši pomoću enzima monodehidroaskorbat-reduktaze (MDAR) i dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR) i predstavlja veoma važan proces zbog nestabilnosti oksidovanog oblika – dehidroaskorbinske kiseline (DHA) (Polle, 2001).





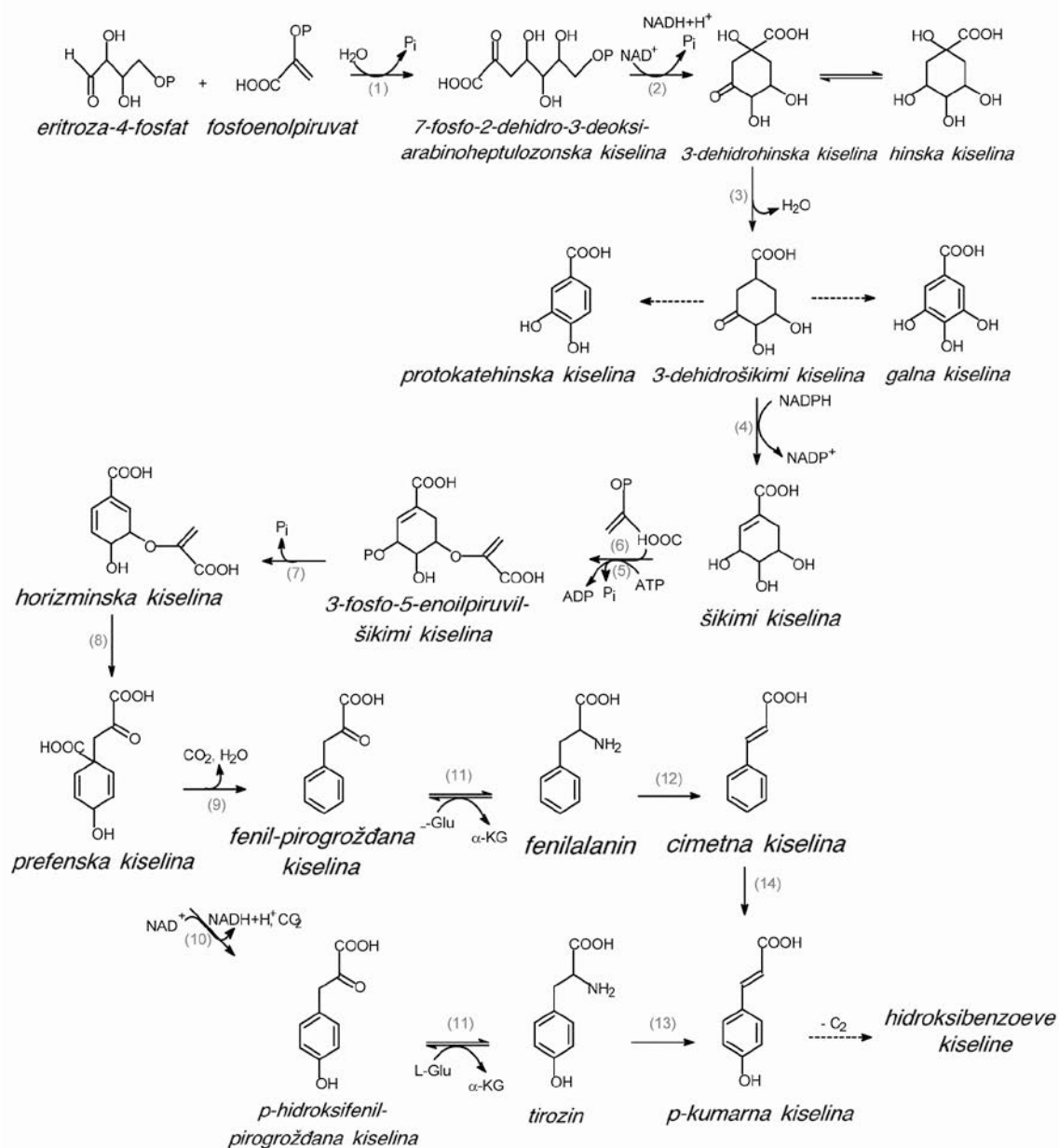
Slika 2.8. Mnogobrojne uloge L-askorbinske kiseline u biljkama i askorbat-glutation ciklus (Venkatesh i Park, 2014)

**Glutation** (GSH) je tripeptid koji služi u biološkim sistemima kao sulfhidrilni pufer i većina njegovih funkcija u ćeliji povezana je sa njegovim redoks stanjem. Pored aktivnosti enzima GR u okviru askorbat-glutation ciklusa, koncentracija GSH u ćeliji regulisana je i *de novo* sintezom, koja se dešava u citosolu ćelija. GSH se sintetiše iz aminokiselina koje ga čine (L-glutamat, L-cistein i glicin) i to aktivnošću dva ATP zavisna enzima:  $\gamma$ - glutamilcistein-sintetaze ( $\gamma$ -GCS; EC: 6.3.2.2) i glutation sintetaze (GS; EC: 6.3.2.3.) (Noctor i sar., 2002). GSH u antioksidantnoj zaštiti funkcioniše na više nivoa. Pored toga što je kofaktor pojedinih antioksidantnih enzima, GSH direktno uklanja slobodne radikalne vrste  $O_2^{\bullet -}$ ,  $HO^{\bullet}$  i  $ONOO^-$ , kao i lipidne radikale i hidroperokside, regeneriše važne neenzimske antioksidante (askorbinska kiselina,  $\alpha$ -tokoferol) do njihovih aktivnih formi i indirektno utiče na mnoge osnovne ćelijske procese (Noctor i sar., 2002; Shao i sar., 2008). Kao posledica izlaganja ćelija različitim oksidansima dolazi do akumulacije oksidovanog glutationa (GSSG), zbog toga se merenje njegove koncentracije može koristiti kao indikator postojanja oksidativnog stresa ili kao parametar preko koga se može pratiti efikasnost antioksidativne odbrane.

**Tokoferoli** predstavljaju najznačajnije liposolubilne antioksidante u biljkama. Od četiri prirodna tokoferola ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ),  $\alpha$ -tokoferoli poseduju najveću biološku aktivnost zbog prisustva tri metil grupe u svojoj molekularnoj strukturi (Sharma i sar., 2012). Antioksidantno dejstvo  $\alpha$ -tokoferola se ogleda u inhibiciji lipidne peroksidacije eliminacijom lipidnih peroksilnih radikala. Takođe, tokoferoli su veoma moćni i u uklanjaju singletnog kiseonika u fotosintetičkim membranama (Smirnoff, 2008).

**Karotenoidi** su pigmenti koji se sintetišu u biljkama i bakterijama sa glavnom funkcijom apsorpcije i prenosa svetlosti do hlorofila (Demmig-Adams i sar., 1996). Poznato je oko 600 jedinjenja iz ove grupe. Po strukturi su izoprenoidi. Glavni karotenoidi kod viših biljaka su karoteni ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) i ksantofili (zeaksantin, violaksantin, neoksantin). Najrasprostranjeniji u biljnom svetu je  $\beta$ -karoten. Osnovno antioksidantno svojstvo karotenoida se ogleda u gašenju tripletnog stanja hlorofila kao i uklanjanje  $^1\text{O}_2$  i drugih slobodnih radikala, kao i njihovo zajedničko dejstvo sa polifenolima. Poznato je da karotenoidi mogu da uklanjaju peroksi radikale mnogo efikasnije od drugih ROS i na taj način sprečavaju lipidnu peroksidaciju (Stahl i Sies, 2003).

**Fenolna jedinjenja** predstavljaju jednu od najvažnijih grupa sekundarnih biomolekula u biljkama. Karakteriše ih prisustvo bar jednog aromatičnog prstena sa najmanje jednom hidroksilnom grupom. Većina fenolnih jedinjenja se sintetiše iz cimetine kiseline koja se formira iz fenil-alanina dejstvom enzima fenilalanilamonijum-lijaze (PAL, EC 4.3.1.5), koji predstavlja tačku grananja između primarnog (šikimatni put) i sekundarnog metabolizma (fenilpropanoidni put) (Dixon i Paiva, 1995). Fenoli se na osnovu strukture dele u nekoliko grupa: jednostavni fenoli, benzojeve kiseline, fenilpropanoidi i flavonoidi, a za veliku raznolikost jedinjenja odgovorni su mnogi enzimi koji učestvuju u reakcijama biosinteze (hidroksilaze i oksigenaze iz porodice Cyt P450, ligaze, transferaze, oksidoreduktaze itd.) (Slika 2.9) (Petruša i sar., 2013).



Slika.2.9. Fenilpropanoidni put biosinteze. (1) enzimski kompleks, (2) 3-dehidrohinat-sintetaza, (3) 3-dehidrohinat- dehidrataza, (4) šikimat-dehidrogenaza, (5) šikimat-kinaza; (6) 3-fosfošikimat-1-karboksivinil-transferaza (EPSP-sintetaza); (7) horizmat-sintetaza; (8) horizmat-mutaza; (9) prefenat-dehidrataza; (10) prefenat-dehidrogenaza; (11) tirozin-transaminaza; (12) fenilalanil-amino-liaza (PAL); (13) tirozin-amino-liaza (TAL); (14) cinamat-4-hidroksilaza (C4H) (Dewick, 2009)

Antioksidantna aktivnost fenolnih jedinjenja u velikoj meri zavisi od njihove hemijske strukture. U mnogim *in vitro* antioksidantnim testovima polifenolna jedinjenja su nadmašila dobro poznate antioksidante kao što je askorbinska kiselina i  $\alpha$ -tokoferol zahvaljujući svojim sposobnostima da doniraju elektron ili atom vodonika. Polifenoli mogu da heliraju prelazne metalne jone, inhibiraju lipidnu peroksidaciju i deluju kao

skevindžeri različitih slobonih radikala (Halliwell i Gutteridge, 2008; Sharma i sar., 2012).

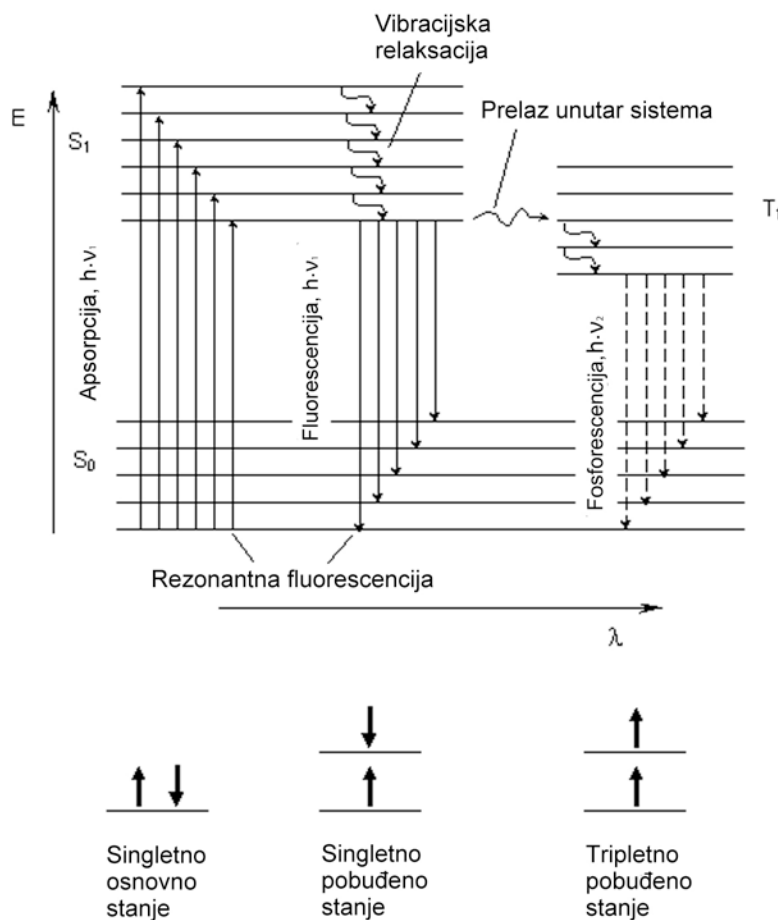
#### 2.2.4. Fluorescentne metode detekcije ROS/RNS

##### 2.2.4.1. Fluorescencija

Luminescencija je pojava emisije svetlosti koja sledi nakon pobuđivanja supstance nekom vrstom spoljašnje energije, koja nije toplota. Pod ovim terminom se podrazumeva više različitih pojava emisije svetlosti. Ukoliko je pobuđivanje izazvano apsorpcijom elektromagnetnog zračenja radi se o fotoluminescenciji, dok se kod hemiluminescencije pobuđeni molekul formira u hemijskoj reakciji. Ukoliko se ovaj proces odvija u živim organizmima energijom metaboličkih reakcija radi se o bioluminescenciji.

Fotoluminescenciju je prvi put objasnio naučnik Stoks (*Sir Geoge Gabriel Stokes*), sredinom 19. veka kada je primetio da mineral fluorit fluorescira kada se osvetli ultraljubičastom svetlošću. Svetlost koja je emitovana bila je veće talasne dužine i manje energije od ekscitovane kojom je objekat bio osvetljen. To je tzv. Stoksovo pravilo. Naziv luminescenca je prvi put uveo nemački naučnik Wiedemann 1888. godine kao zajednički naziv za flouescencu i fosfoescencu. Mehanizam fotoluminescencije se objašnjava najlakše pomoću dijagrama Jablonskog (*Slika 2.10*).

Apsorpcijom kvanta UV-svetlosti molekul prelazi iz osnovnog singletnog stanja  $S_0$  u pobuđeno singletno stanje  $S_1$ . Molekul teži da se vrati u osnovno stanje i to putem različitih mehanizama: vibracionih relaksacija, unutrašnjih energijskih relaksacija, fluorescencijom, kao i singletnim gašenjem. Međutim, u nekim slučajevima molekul može da pređe u stabilnije tripletno elektronsko stanje iz kojeg u osnovno stanje prelazi takođe vibracionim relaksacijama i fosfoescencijom. Osnovna raznika između fluorescencije i fosfoescencije je ta da je kod fluorescencije pobuđeni elektron u singlet stanju pa je njegov povratak u osnovno stanje brz, dok je kod fosfoescencije povratak elektrona u osnovno stanje znatno sporiji zbog čega fosfoescencija ima znatno duže trajanje nego fluorescenca. Na dijagramu Jablonskog se jasno vide razlike između energetske stanja elektrona kod ove dve pojave.



Slika 2.10. Dijagram Jablonskog

#### 2.2.4.2. Fluorescentna mikroskopija

Fluorescentni mikroskop je konstruisan na početku 20. veka zahvaljujući radovima više naučnika, a u prvom redu Kelera, Rajherta i Lemana. Za fluorescentnu mikroskopiju je veoma značajna upotreba jedinjenja koja emituju svetlost jakog intenziteta. Ta jedinjenja se nazivaju fluorohromi ili fluorofore. Koriste se za bojenje objekata koji ne fluoresciraju, pri čemu se tako dobijena fluorescencija naziva sekundarna fluorescencija. Fluorescentni mikroskopi dobijaju više na značaju posle pedesetih godina 20. veka kada su Kuns i Kaplan uveli metodu fluorescentnih antitela za lokalizaciju antigena u tkivu (Obradović, 2002).

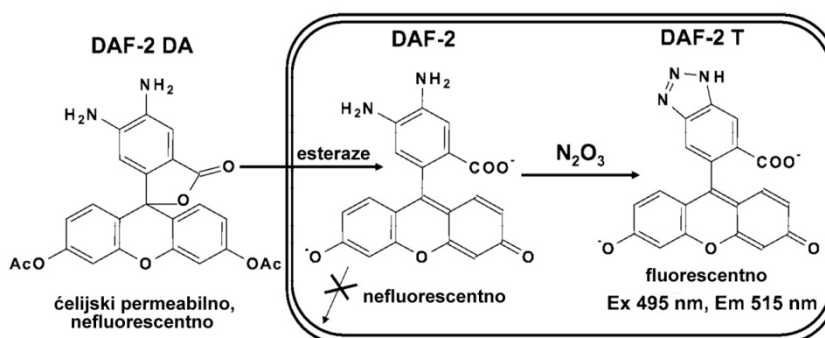
Fluorescentni mikroskop ima manu da pod određenim uslovima može da oslabi intenzitet emitovane svetlosti. Slabljenje se često naziva bleđenje ili gašenje (eng. *quenching*) i nastaje kao rezultat prenosa energije na obližnji molekul ili jon (kiseonik je

efikasan kvenčer), te nekoliko neradijativnih procesa relaksacije je u konkurenciji sa radijativnim. Verovatnoća za pojavu gašenja zavisi od vrste i koncentracije kvenčera, i što je ona veća, manja je verovatnoća radijativnih prelaza.

Budući da slobodni radikali imaju važne uloge u različitim procesima u biološkim sistemima (inflamacija, signalna transdukcija, razni patološki procesi), razvoj osetljivih i specifičnih metoda za određivanje slobodnih radikala u biološkim sistemima je neophodan. Fluorescentne probe zasnovane na malim organskim molekulima predstavljaju neophodan alat u modernoj biologiji, koji obezbeđuje informacije o mestu i količini bioloških molekula od interesa. U poređenju sa drugim tehnikama kao što su obeležavanje radioizotopima, ESR, i elektrohemijska detekcija fluorescentni imidžing ima mnogo prednosti jer omogućuje visoko osetljivu, manje invazivnu i bezbedniju detekciju uz pomoć već dostupnih instrumenata (Nagano, 2009). Fluorofore najčešće sadrže aromatični prsten, odnosno imaju više konjugovanih dvostrukih veza i više rezonantnih struktura. Poseduju karakteristične ekscitacijske i emisione spektre ili kvantne tačke. Važna osobina svake fluorofore koji se koristi u istraživanjima je i kvantni prinos fluorescencije, koji predstavlja odnos emitovanih i apsorbovanih fotona. Što je veći kvantni prinos, to molekul ima veću emisionu efikasnost, odnosno više fluorescira. Pri odabiru fluorescentnih proba u istraživanjima, prednost imaju fluorofore s visokim kvantnim prinosom (Lakowicz, 2013). U daljem tekstu, biće prikazan sažet pregled osnovnih principa na kojima se zasnivaju neke od ovih fluorifora. Najčešće korišćene fluorofore su molekuli u čijoj je osnovi florescein.

Fluorescentna boja 2',7'- dihlorodihidrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) je proba koja se široko upotrebljavala za određivanje nivoa unutarćelijskog  $H_2O_2$  i oksidativnog stresa. Lako prodire u ćelije gde se hidrolizuje unutarćelijskim esterazama do karboksilatnog anjona čiji je transport iz ćelije onemogućen. Dvoelektronskom oksidacijom ovog jedinjenja nastaje fluorescentni 2',7'- dihlorofluorescein (DCF) koji se može meriti različitim tehnikama zasnovanim na fluorescenciji (npr., mikroskopija, protočna citometrija). U radu Kalyanaraman i saradnika (2012) dat je pregled sporednih reakcija i ograničenja koja bi trebalo uzeti u obzir kada se tumače rezultati dobijeni sa ovom probom (*Tabela 2.4*). Isti autori ističu da DCFH-DA ne reaguje sa  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ , kao ni NO, već je nastala fluorescencija DCF rezultat oksidacije sa moćnim oksidantima kao što su oni nastali u reakcijama katalizovanim metalnim jonima ili peroksidazama i proton ili ugljen-dioksid katalizovanom razgradnjom peroksinitrita.

Diaminofluorescini (DAF) predstavljaju grupu jedinjenja razvijenih za detekciju NO u fiziološkim uslovima (Kojima i sar., 1998). U reakciji DAF i NO formira se triazolni oblik i dolazi do malog pomeranja maksimuma apsorpcije i do velikog povećanja kvantog prinosa fluorescencije. Smatra se da jedinjenja DAF poseduju sva svojstva potrebna za primenu u ćelijskom imidžingu, posebno jer je ekscitaciona talasna dužina u vidljivom delu svetlosti što manje šteti ćelijama i uzorak nije podložan autofluorescenciji. Povećanje intenziteta fluorescencije je zavisno od koncentracije NO. Fluorinovani derivati DAF imaju još veću otpornost na fotobleđenje. Osetljivost 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetata (DAF-FM DA) je 1,4 puta veća od nefluorovanog analoga 4,5-diaminofluorescein diacetata (DAF-2 DA), koji predstavlja široko rasprostranjenu boju za detekciju NO (Slika 2.11) (Nagano, 2009).



Slika 2.11. Fluorimetrijska detekcija NO pomoću diaminofluorescein-2 diacetata (DAF-2 DA). DAF-2 DA difunduje u ćelije i tkiva gde nespecifične esteraze vrše hidrolizu diacetatnih grupa, čineći nastali DAF-2 zarobljenim u ćeliji. NO-derivatizovani nitrozilujući agensi kao što je N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reaguju sa DAF-2 i nastaje fluorescentni proizvod DAF-2 triazol (DAF-2 T)

Fluorescentno snimanje u biljkama ima jedinstvene izazove i metodologije. Bojenje je kod biljaka komplikovanije zbog endogene autofluorescencije biljnih tkiva, uz nepropusnost zida biljnih ćelija za probe zasnovane na proteinima. Autofluorescencija proizilazi iz osobina raznovrsnih biljnih biomolekula, uključujući hlorofil, karotene i ksantofile. Hlorofil, koji najviše doprinosi autofluorescenciji, apsorbuje u plavom delu vidljivog spektra sa visokim koeficijentom ekstinkcije, i proizvodi značajan doprinos fluorescenciji iznad 600 nm kada je pobuđen na talasnim dužinama između 420 i 460 nm. Pored toga, nepropustljivost celuloznih ćelijskih zidova za protein-zasnovane probe, kao što su antitela mogu da predstavljaju značajne izazove za bojenje biljaka (Talamond i sar., 2015).

Na sreću, razvijene su metode kojima se prevazilaze ovi problemi i bojenje biljnih ćelija se uspešno obavlja uz primenu ovih adekvatnih metoda, kao što je enzimska razgradnja ćelijskog zida ili primena hemijskog tretmana sa bakar-sulfatom ili natrijum-borhidratom. Uklanjanjem autoflorescencije omogućena je upotreba boja sa apsorbcijom u crvenom delu spektra, mada ukoliko ovo nije izvodljivo koriste se boje čiji se emisijski spektar ne poklapa sa autoflorescentncijom, kao što su rodamini ili fluoresceini itd. Takođe, upotreba filtera u mikroskopiji blokira eksitaciju u oblasti od 420-460 nm što je dovoljno da se onemoćuci signal koji potiče od autoflorescencije hlorofila. Sa velikom mogućnosti primene fluorescencije u biologiji i drugim prirodnim naukama razvijena je i velika potreba za usavršavanjem i razvojem fluorofora. U budućnosti će se primenjivati inteligentne fluorifore koje bi se koristile i za bojanje i kao terapijski agensi *in vivo* (Nagano, 2009).



Tabela 2.4. Pravilna upotreba fluorescentnih proba

Fluorescentna proba	Prednosti	Nedostaci	Preporuke
Hidroetididin (HE)	Reaguje sa $O_2^{\bullet-}$ i daje 2-OH- $E^+$ , dok sa drugim oksidansima ( $\cdot OH$ , $ONOO^-$ ) formira $E^+$ i dimere. Intermedijski oblici HE-radikala ne reaguju sa kiseonikom i ne formiraju $O_2^{\bullet-}$ i $H_2O_2$ .	2-OH- $E^+$ i $E^+$ imaju slične spektralne karakteristike. Dalja ekstrakcija i HPLC analiza je potrebna za odgovarajuću identifikaciju.	Detekcija unutarćelijskog $O_2^{\bullet-}$ , oksidansa (gvožđe, $H_2O_2$ , citohrom c). Ipak, merenje crvene fluorescencije fluorescentnim ili konfokalnim mikroskopom ne može se praviti razlika između $E^+$ i 2-OH- $E^+$ .
DCFH-DA	Lak za upotrebu, prodire u ćelije, prati promene u unutarćelijskom signalingu gvožđa kao i povećane aktivnosti peroksidaze.	Lažno povećanje intenziteta fluorescencije zbog mehanizma redoks ciklusa u koji je uključen intermedijski radikal $DCF^{\cdot}$ .	Ne koristiti za merenje unutarćelijskog $H_2O_2$ i drugih oksidansa, ali može se koristiti kao redoks indikator za otkrivanje novih redoks mehanizama.
Dihidrorodamin (DHR)	Lak za upotrebu, prodire u ćelije, prati kogenerisani $NO$ i $O_2^{\bullet-}$ putem predvidive radikal hemije.	Lažno povećanje intenziteta fluorescencije zbog mehanizma redoks ciklusa u koji je uključen intermedijski radikal $DCR^{\cdot}$ .	Ne koristiti za merenje unutarćelijskog $ONOO^-$ i drugih oksidansa, ali može se koristiti kao nespecifični indikator za unutarćelijski $ONOO^-$ i oksidanse nastale iz njega.
Kumarin-borat	Reaguje brzo i stehiometrijski sa $ONOO^-$ .	Dalji metabolizam proizvoda i moguća ekskrecija iz ćelija može biti prepreka.	Koristiti za merenje vanćelijskog nastajanja $ONOO^-$ . Pošto reaguje i sa $H_2O_2$ (mada sporo) trebaju se koristiti odgovarajući inhibitori.
Ampleks-crveno	HRP/ $H_2O_2$ zavisna oksidacija ampleks crvenog do rezorufina je veoma efikasna. Intermedijski radikal ne reaguje sa $O_2$ , ali reaguje sa $O_2^{\bullet-}$ i smanjuje nastajanje rezorufina. Redukujući agensi i supstrati peroksidaza inhibiraju formiranje rezorufina.	Lažno povećano stvaranje $H_2O_2$ zbog svetlošću potpomognute fotohemijske oksidacije rezorufina u prisustvu GSH, NAD(P)H, ili askorbata. Intermedijski radikal može brzo da reaguje sa $O_2^{\bullet-}$ i inhibira formiranje proizvoda.	Koristiti za merenje vanćelijskog $H_2O_2$ u uslovima kada je ograničena sporedna reakcija indukovana rezorufinom.

### 2.3. Osobine roda *Populus*

**R**od *Populus* pripada porodici Salicaceae Lindl. (vrbe) i obuhvata oko 29 vrsta, među kojima u Srbiji prirodno rastu bela topola - *Populus alba*, crna topola - *Populus nigra* i siva topola - *Populus canescens* (Jovanović, 1967; Eckenwalder, 1996). Većina *Populus* vrsta su dvodome biljke mada postoje i neki hermafroditi. Kako imaju sposobnost spontane i kontrolisane hibridizacije unutar i između sekcija topoli stvoren je veliki broj podvrsta i prelaznih formi kao i jednostrukih i višestrukih hibrida.

*Populus* u prevodu sa latinskog jezika znači ljudi, narod, nacija, ili mnoštvo, što ukazuje kako na odliku ovog roda da stvara veliki broj podvrsta i prelaznih formi tako i na blisku povezanost sa istorijom ljudskog roda (Dickmann, 2001). Topola se smatra osnivačkom vrstom zbog svoje sposobnosti da brzo naseli narušene lokacije i stvori stabilne uslove za naseljavanje drugih vrsta (Bradshav i sar., 2000; Whitham i sar., 2006). Istorijski i ekonomski je značajna vrsta za proizvodnju celuloze i papira. Topole takođe imaju potencijal za upotrebu u proizvodnji biogoriva. Slično vrbama i vrste roda *Populus* spp. stvaraju veliku biomasu i dobro usvajaju teške metale. U fitoremedijaciji su mnogo uspešniji različiti klonovi topola nego pojedinačne vrste od kojih su klonovi dobijeni (Gawronski i Gawronska, 2007).

Vrste ovog roda su široko rasprostranjene na severnoj hemisferi (u Evropi, Severnoj Americi i Aziji). Kako uglavnom naseljavaju umerene geografske širine, smatralo se da su topole osetljive na sušu (Demeritt, 1990). Kod vrsta *P. tremuloides* i *P. deltoides* u uslovima suše primećeno je sušenje mladih grana (Tyree i sar., 1992; Rood i sar., 2000). Međutim, kod nekih hibrida topola su primećene osobine tolerantnosti i adaptacije u sušnim uslovima (Demeritt, 1990). Ovakve varijacije ukazale su na potencijal za selekciju klonova topole koji su tolerantni na sušu.

*Populus* vrste i hibridi sa svojstvima izrazito brzog rasta i mogućnostima lakog vegetativnog razmnožavanja, predstavljaju model drvenastih biljaka u različitim studijama širom sveta. Na 21. zasedanju Međunarodne komisije za topolu (eng. IPC–International Poplar Commission) održanom u Portlandu 2000. godine topola je okarakterisana kao „drvo za ljude, za komercijalu, za budućnost, drvo koje koevoluirala sa ljudima hiljadama godina“, čime je istaknuta velika uloga ovih vrsta u zaštiti životne sredine, regulaciji vode i odnosa gasova u atmosferi. Usledilo je veliko interesovanje za

razotkrivanjem redosleda gena što je i rezultiralo u objavljivanju dešifrovanog celog genoma zapadne crne topole *Populus trichocarpa* 2006. godine (Tuskan i sar., 2006).

### 2.3.1. Topola kao model drvo

Topola je model drvenastih biljaka u genetici. *Populus trichocarpa* je treća biljna vrsta i prva drvenasta vrsta čiji je genom sekvencioniran u potpunosti (Tuskan i sar., 2006). Kako ima relativno mali genom (450Mb), brzo raste i ima kratak životni ciklus, topole su veoma korisne u eksperimentalnom smislu jer se mogu lako vegetativno razmnožavati i gajiti u kulturi tkiva. Sve ove osobine čine topolu idealnom model vrstom, posebno u oblasti genetskog inženjeringa. Biljke sa većom otpornošću na patogene se mogu razviti kroz manipulaciju metaboličkih puteva. Takođe, ovako izmenjene biljke mogu imati veći prinos biomase i smanjen sadržaj lignina što je značajno u proizvodnji biogoriva (Sannigrahi i sar., 2010). Važna osobina ovih vrsta je da brzo rastu što omogućava proučavanje odgovora na različite faktore abiotičkog i biotičkog stresa u razumnom vremenskom periodu (Bradshaw i sar., 2000).

### 2.3.2. Privredni značaj

Hibridi topola se u principu selekcionišu i proizvode kao profitabilne biljke za proizvodnju celuloznog drveta i kao obnovljivi izvor energije, ali zbog njihovog brzog rasta i visoke evapotranspiracije, one predstavljaju idealne kandidate za fitoremedijaciju (Trudić i sar., 2012; Kebert, 2014; Kebert i sar., 2017). Prema Chappell-u (1997), prednosti roda *Populus* u fitoremedijaciji su veliki broj vrsta, visok prirast (3-5 m/god), visok intenzitet transpiracije (do 100 L/dan) i ne pripadanje lancu ishrane. Zahvaljujući njihovoj vezi (interakciji) sa podzemnom vodom topole se sade kao buferne pruge u vidu drvoreda da bi kontrolisali širenje nitrata i njihov dotok iz podzemnih u tekuće vode.

### 2.3.3. Odabrani klonovi topole

Izbor klonova topole je izvršen po principu taksonomske i genetičke divergentnosti, stoga je izbor sveden na tri klona, koja pripadaju dvema vrstama *Populus x euramericana* Dode (Guinier) i *Populus deltoides* Bartr. (Slika 2.12).

Hibridni klon M1, Pannonia, je klon *Populus x euramericana* Dode (Guinier) vrste, poreklom iz Mađarske. Nastao je ukrštanjem *P. deltoides* i *P. nigra*. U zbirku klonova Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu iz Novog Sada, dospeo je iz

međunarodne razmene 1977. godine. Odlikuje se crvenkastom bojom kore, izbojaka, sadnica i mlađih stabala kao i specifičnim habitusom sa tankim granama i kožastim lišćem sjajno zelene boje. Karakteriše ga visok procenat prijema sadnog materijala, odlična sposobnost ožiljavanja reznica i slaba osetljivost na rak kore topola (*Dothichiza populea*). Od 1998. je odobrena njegova upotreba u R. Srbiji. Zahvaljujući adaptabilnosti na različite vrste zemljišta i odličnim regenerativnim sposobnostima, u periodu od 2011.-2016. godine se ovaj hibridni klon zajedno sa klonom I-214 koristio za pošumljavanje u Vojvodini. Takođe, u *in vitro* uslovima klon M-1 je pokazao izuzetan potencijal i konformnost za istraživački rad (Popović i sar., 2017).



Slika 2.12. Izgled vrsta topole: *Populus x euramericana* Dode (Guinier) (levo),  
*Populus deltoides* Bartr. (desno)

([http://www.bomengids.nl/pics/Canada\\_populier\\_\\_Populus\\_x\\_canadensis\\_\\_Carolina\\_poplar@populiercanada@1@boomtree@img\\_3386.jpg](http://www.bomengids.nl/pics/Canada_populier__Populus_x_canadensis__Carolina_poplar@populiercanada@1@boomtree@img_3386.jpg) i  
[https://www.geocaching.com/geocache/GC219J0\\_giant-eastern-cottonwood-tree-virtual](https://www.geocaching.com/geocache/GC219J0_giant-eastern-cottonwood-tree-virtual))

Klon B-229 i klon PE 19/66 su nastali selekcijom u Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu i još uvek su u fazi ispitivanja u cilju potpunog priznavanja kao nove

sorte. Predstavljaju klonove američke crne topole (vrste *Populus deltoides* Bartr.) koja je iz Amerike donesena u Francusku u 17. veku (Niggerman, 2009). Karakterišu ih bujan porast, visok prinos drvne mase, dobra sposobnost ožiljavanja i srednja otpornost na patogene (Pilipović, 2005).

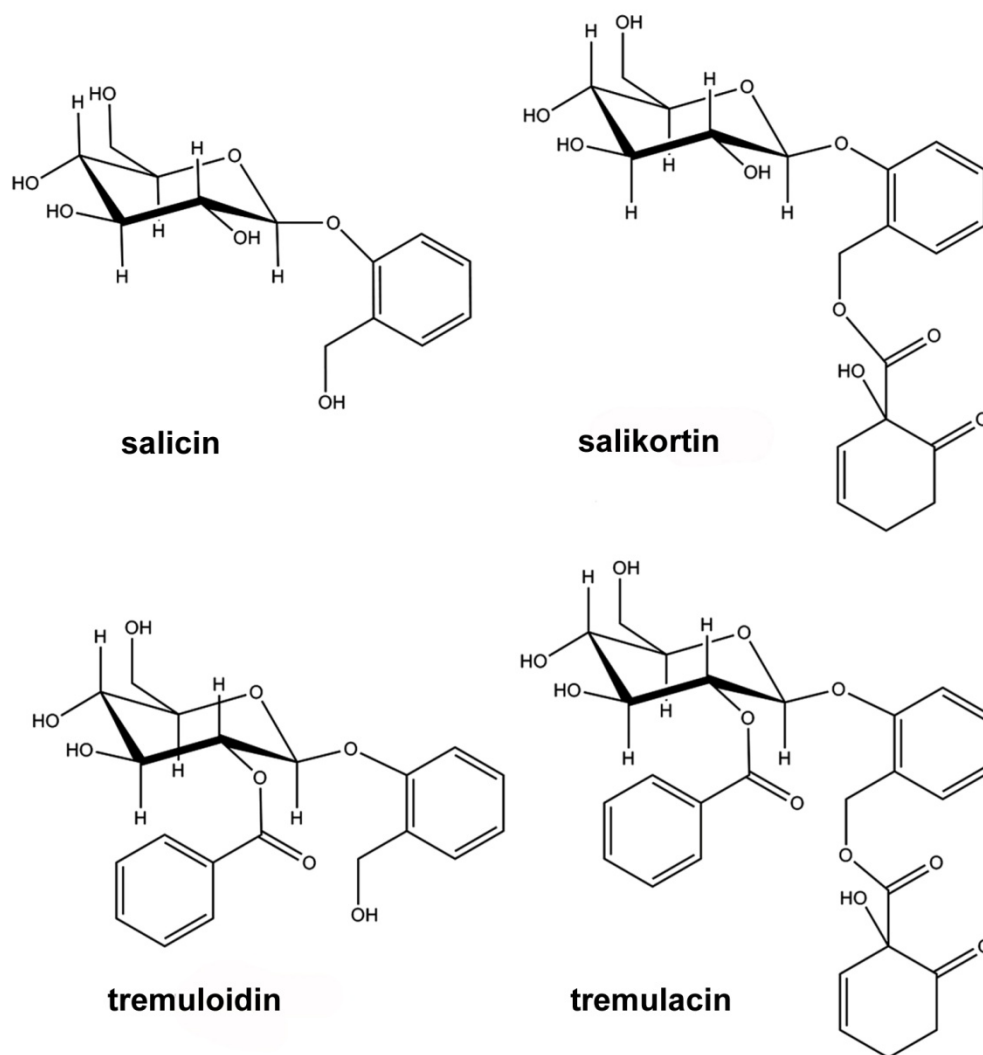
#### 2.3.4. Fenolna jedinjenja u vrstama roda *Populus*

*Populus* vrste sadrže veliku količinu fenolnih jedinjenja koja mogu da čine i do jedne trećine suve mase lista topole (Tsai i sar., 2006). Značajne grupe iz ove klase jedinjenja predstavljaju kondenzovani tanini (proantocijanidini), derivati hidroksicimetne kiseline i salicinoidni fenolni glikozidi (Constabel i Lindroth, 2010). U mnogim studijama su ispitivani različiti ekološki uticaji (povišen ozon, ugljen-dioksid, suša, kao i uticaj herbivora) na sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima *Populus* vrsta (Holton i sar., 2003; Agrell i sar., 2005; Häikiö i sar., 2009; Barchet i sar., 2014).

##### 2.3.4.1. Salicinoidi

Grupa jedinjenja nazvana salicinoidi, poznata još i kao fenolni glukozidi ili salicilati su dominantni bioaktivni prirodni proizvodi koji se mogu naći u velikim koncentracijama u listovima, kori drveta, pupuljcima kao i nektaru lista biljaka iz porodice Salicaceae (Constabel i Lindroth, 2010). U strukturi salicinoida je skelet salicina, odnosno glukoza i salicil alkohol, za koji su estarski vezane fenolne ili hidroksi-cimetne kiseline. Poznato je oko 20 jedinjenja ove strukture, a najčešća su: salicin, salikortin, tremuloidin i tremlacin (Slika 2.13) (Boeckler i sar., 2011). Poznato je da postoje velike genotip-specifične varijacije u fitohemijskom sastavu *Populus* vrsta. *Populus* vrste sadrže uglavnom fenolne glikozide sa esterifikovanim salicinom, nastalim iz salicilne kiseline.

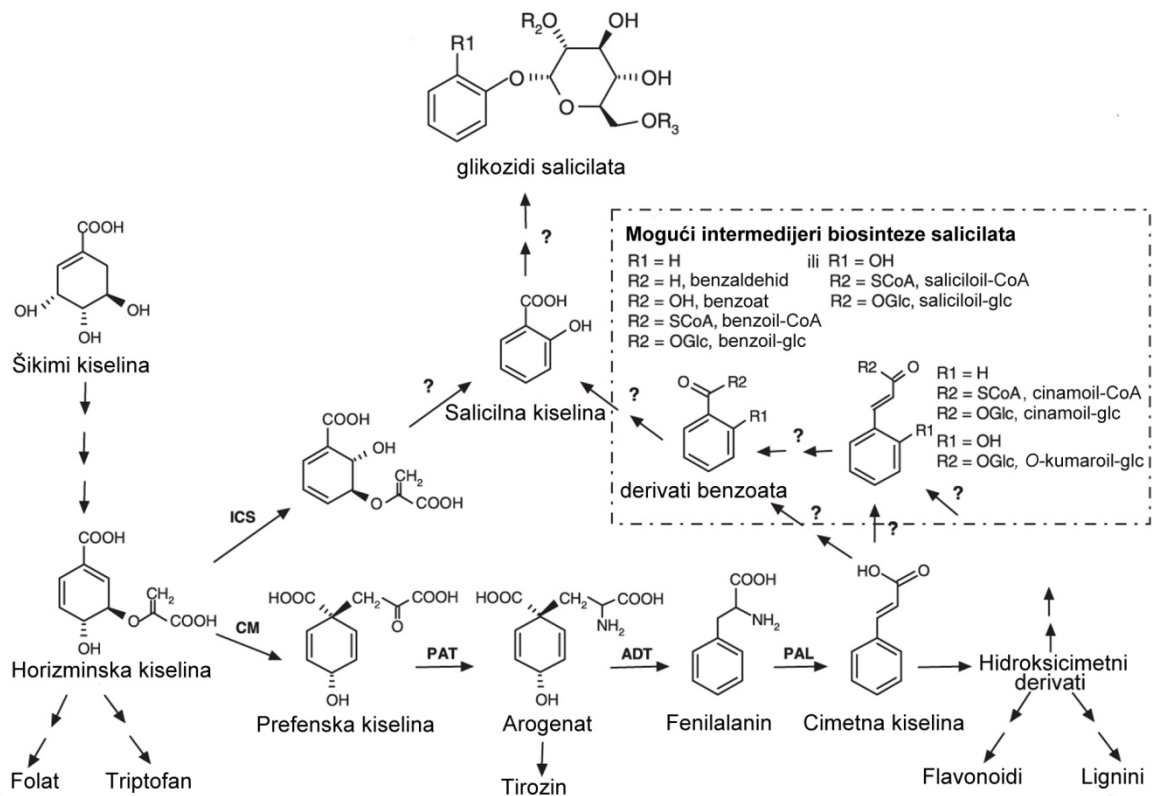
Salicilna kiselina (SA) je važan biljni hormon koji reguliše odbranu protiv patogena i često je prvi hemijski signal indukovano tokom odgovora. Salicilna kiselina se javlja u biljkama kao slobodna kiselina ili u obliku konjugovanih derivata, nastalih glikozilacijom ili metilacijom. Glikozilacija se odvija ili na hidroksilnoj ili na karboksilnoj grupi i tada nastaju SA glikozid (2-O-β-D-glukozid) - glavni metabolit i SA - glukoza estar. Metilacijom nastaje metil salicilat. U višim biljkama SA se sintetiše preko izohorizonta ili preko L-fenilalanina. Oba jedinjenja nastaju u šikimatnom putu. Kod stresiranih biljaka SA se uglavnom sintetiše preko izohorizonta u hloroplastima, dok preko drugog prekursora nastaje mnogo manja količina SA (Catinot i sar., 2008).



Slika 2.13. Salicin i njegovi derivati u vrstama roda *Populus*. Chedgy i sar., 2015

Biosinteza salicinoida još uvek nije u potpunosti razjašnjena (Tsai i sar., 2006; Morse i sar., 2007; Chen i sar., 2009b; Babst i sar., 2010). Ipak, objavljeno je nekoliko rezultata iz studija sa izotop obeleženim molekulima, te neki uvid u biosintezu ovih jedinjenja postoji. Smatra se da salicinoidi nastaju fenilpropanoidnim putem (odnosno nastaju iz šikimi kiseline), ali tačan redosled reakcija i molekula u biosintezi kao i njihovih odgovarajućih intermedijernih oblika je još uvek nepoznat (Caseys i sar., 2012). Moguće je da se salicinoidi ne sintetišu jednim linearnim putem već da je u pitanju mreža međusobno povezanih reakcija. Prema Babst i saradnicima (2010), ključni intermedijer koji vodi ka sintezi salikortina je benzil-benzoat. Do danas, nijedan specifičan enzim za salicinoidni metabolizam nije okarakterisan. Kao što je prikazano na Slici 2.14. salicilna kiselina nastaje preko dva moguća puta, jedan je fenilalaninamonijum-lijaza (PAL) zavisni fenilpropanoidni put, a drugi je izohorizat sintaza zavisni put. Biosinteza SA je

prvo proučavana u listu duvana i tada je otkriven fenilpropanoidni put u citoplazmi. Dejstvom enzima PAL, fenilalanin prelazi u *trans*-cimetnu kiselinu koja potom prelazi u benzoevu kiselinu iz koje hidroksilacijom nastaje SA. Skraćivanje propil niza i nastajanje benzoeve kiseline iz *trans*-cimetne kiseline se odvija najverovatnije procesom  $\beta$ -oksidacije koji je analogan  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina (Chen i sar., 2009b). Hidroksilacija benzove kiseline je katalizovana najverovatnije monooksigenazama koje zahtevaju NADPH ili metil violagen kao elektron donora. Iako su Leon i saradnici 1995. godine objavili aktivnost benzoeva kiselina-2-hidroksilaze u listu duvanu, do danas ne postoji nijedan sveobuhvatan biohemijski i molekularni dokaz koji bi potvrdio postojanje enzima neophodnih za pretvaranje cimetne kiseline u SA. Serino i saradnici su 1995. godine objavili biosintezu SA iz horizminske kiseline u bakterijama dejstvom izohorizmat-sintaze i izohorizmat piruvat lijaze, a kasnije je u *Arabidopsis* biljci otkriveno je da SA može nastati u hloroplastima iz horizminske kiseline, preko intermedijera izohorizminske kiseline (Catinot i sar., 2008).



Slika 2.14. Mogući putevi biosinteze salicilne kiseline

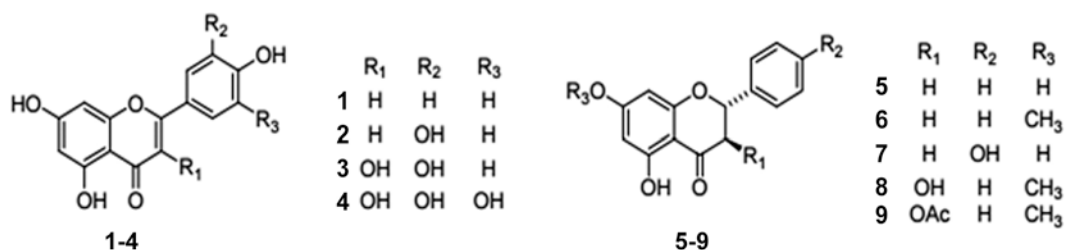


### 2.3.4.2. Fenolne kiseline i derivati

Niz literaturnih podataka ukazuje na visoki sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim vrstama roda *Populus* (Häikiö i sar., 2009; Houda i sar., 2016; Ma i sar., 2016). Značajnu grupu ove klase jedinjenja prisutnih u vrstama roda *Populus* predstavljaju fenolne kiseline i hidroksicimetni derivati koji mogu da čine i do 8% suve mase (Tsai i sar., 2006). Kvantitativno značajni hidroksicimetni derivati, većinom izomeri hlorogenske kiseline i kumaril-šikimat/hinat estri, imaju sposobnost „hvatanja” (eng. *scavenge*) slobodnih radikala, služe kao intermedijeri u biosintezi lignina i imaju ulogu u formiranju veza sa proteinima koji služe za odbranu (Grace i Logan 2000; Boerjan i sar., 2003). Specifična akumulacija hidroksicimetnih derivata među *Populus* vrstama čini i osnov za njihovu hemotaksonomsku klasifikaciju (Greenaway i sar., 1991, 1992). Pored antioksidantne aktivnosti hidroksicimetni derivati poseduju antimikrobnu, antifungalnu, imunomodulatornu i antigenotoksičnu aktivnost (Ravn i sar., 1989; Ferguson i sar., 2005; Dudonné i sar., 2011).

U ekstraktima pupuljaka *Populus* vrsta utvrđeno je prisustvo fenolnih kiselina i njihovih estara, flavonoida i halkona (Rubiolo i sar., 2013; Yang i sar., 2016). Zbog velikog potencijala i primene u terapeutske svrhe, kod nekoliko *Populus* vrsta ispitan je sastav, antioksidantni i antiinflamatorni potencijal pupoljaka, kao i propolisa nastalog od ekskudata *Populus* vrsta (Greenaway i sar., 1989; English i sar., 1991; Amoros i sar., 1992; Park i sar., 2002). Najzastupljeniji od flavanona su pinocembrin i pinostrombin, zatim od flavonola galangin, kvercetin i kemferol, zatim flavoni hrisin i apigenin, kao i estri fenolnih kiselina (*Slika 2.15*) (Bankova i sar., 1988; Vardar-Unlu i sar., 2008; Falcao i sar., 2010). Dudonné i saradnici (2011) kao dominantne komponente ekstrakta *P. nigra* navode *p*-kumarnu kiselinu, salicin i kafenu kiselinu. Isti autori su identifikovali sledeće komponente: fenolne kiseline (kafena, *p*-kumarna, ferulna, izoferulna, cimetna i *O*-metilkafena kiselina), salicin i flavonoidne aglikone (pinobaksin 5-metiletar, pinobaksin i pinocembrin).





Slika 2.15. Strukture aglikona flavonoida: apigenin (1), luteolin (2), kvercetin (3), miricetin (4), naringenin (5), pinocembrin (6), pinostrombin (7), pinobaksin (8), *O*-acetilpinobaksin (9).

*Populus* vrste sadrže osam glavnih klasa flavonoida: halkone, dihidrohalkone, flavanone, flavone, dihidroflavonole (flavononole), flavonole, antocijanine i proantocijanidine čiji su prekursori flavan-3-oli. Leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli) i antocijanidini, prekursori antocijanina i proantocijanidina se retko kad nalaze u nivou detekcije kod angiospermi (Harborne, 1977). Kao i hidrosicimetni derivati tako i koncentracija flavonoida varira među *Populus* vrstama i klonovima, a koncentracija kondenzovanih tanina (KT) varira i među vegetativnim tkivima (Greenaway i sar., 1992). Najveća koncentracija KT je određena u mladom lišću i vrhovima korena (100 µg/mg s.m.), a mnogo niža u zelenim granama i ksilemu (< 4 µg/mg s.m.) (Tsai i sar., 2006). U listu *Populus* vrsta se akumulira širok spektar različitih hidroksicinamoilhinat estara i mnogo veći broj flavonoida. Kod evropskih *Populus* vrsta neki flavonoidi, posebno glukuronid i rutinozid derivati predstavljaju specifičnost vrste (Caseys i sar., 2012). Nivo fenolnih glikozida kod *Populus* vrsta se menja u zavisnosti od fenotipa, razvojnih i ekoloških faktora kao što su starost, CO<sub>2</sub>, količina hranljivih materija u zemljištu kao i oštećenja lista (Scioneaux i sar., 2011).

*Populus* vrste ne proizvode hidrolizujuće tanine i akumulacija malih fenolnih glikozida se odvija metaboličkim putem različitim od flavonoidnog metabolizma koji vodi ka proantocijanidinima (Tsai i sar., 2006). Kondenzovani tanini ili proantocijanidini su polifenolna jedinjenja velike molekulske mase nastali polimerizacijom flavan-3-ola, širokog spektra su struktura i bioloških aktivnosti koje nisu uočene u *Arabidopsis* biljci, stoga ukazuju na razlike u složenosti ili regulaciji puta biosinteze flavonoida. Biološka aktivnost KT uglavnom zavisi od udela prodelphinidina i procijanidina, stepena polimerizacije i konfiguracije polimera (Zucker, 1983; Ayres i sar., 1997; Behrens i sar., 2003). Scioneaux i saradnici (2011) su pristupili kvalitativnoj analizi različitih *Populus* vrsta i klonova i utvrdili genetsku određenost sastava jedinica polimera kao i u dužine

lanca. Ekološki činioci imaju mnogo manji uticaj na sastav KT, dok je kvantitet KT pod uticajem razvojnih faktora, ali i genetike i sredine (Rehill i sar., 2006). Poznati su po sposobnosti da snažno vežu proteine i tako smanjuju digestiju proteina kod biljojeda (Ayres i sar., 1997; Barbehenn i Constabel, 2011). Ova pojava se zasniva na prisustvu mnogo hidroksilnih grupa koje imaju afinitet ka vezivanju za proteine i formiranju stabilnih kompleksa koji dovode do precipitacije proteina. Vezivanjem proteina, utiču na digestiju proteina, odnosno inhibiraju je i na taj način ispoljavaju i toksično dejstvo na herbivore, a mehanizam dejstva je da ingestovani KT dovode do nastanka ROS koji nanose direktnu štetu u tkivima herbivora i dovode do smanjenja rasta (Barbehenn i Constabel, 2011). U uslovima abiotičkog i biotičkog stresa, pokazano je da se indukuje sinteza KT. Dokazano je da KT utiču na razlaganje opalog lišća, ali i na mineralizaciju zemljišta azotom i ugljenikom (Schimel i sar., 1996; Schweitzer i sar., 2004).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Ogljed u kulturi tkiva

**Z**a gajenje *in vitro* tkiva topole korišćene su podloge MS (Murashige i Skoog, 1962, SERVA, Heidelberg, Germany), pH 5.8 sastava. Posude za razlivanje podloge su sterilisane u autoklavu. Izdanci klona M-1 su pažljivo površinski sterilisani i postavljeni u posude sa 50 mL hranljive podloge za indukciju kalusa, pH 5.8 koja je sadržavala 4 g/L MS medijuma, 10 g/L saharoze, 3 g/L agar-agara, 0.5 g/L gerlita, uz dodatke regulatora rasta (10  $\mu$ M 6-benziladenin (BA), 10  $\mu$ M zeatin (ZEA), 1  $\mu$ M naftil-sirćetna kiselina (NAA), 1.28 mM 2-(N-morfolino) etansulfonska kiselina (MES)). Nakon 3 nedelje iz razvijenih kalusa kultura su presađeni eksplantati u aseptičkim uslovima u laminaru u takozvani medijum za elongaciju sastava: 4 g/L MS medijum, 10 g/L saharoze, 3 g/L agar-agara, 0.5 g/L gerlita, 0.2 mg/L BA, 1.28 mM MES, pH 5.8. Nakon razvijanja najmanje dva nodusa (čvora), pojedinačni izdanci su propagirani (presađeni) i preneseni u medijum za ožiljavanje sastava: 4 g/L MS medijuma, 10 g/L saharoze, 0.1 mg/L indol-3-buternom kiselinom (IBA), pH 5.8. Na ovoj podlozi izdanci su kultivisani tri nedelje. Ožiljene, razvijene biljke su zatim podvrgnute tretmanu sa PEG 6000 u koncentraciji od 100 g/L i 143 g/L (Slika 3.1.).

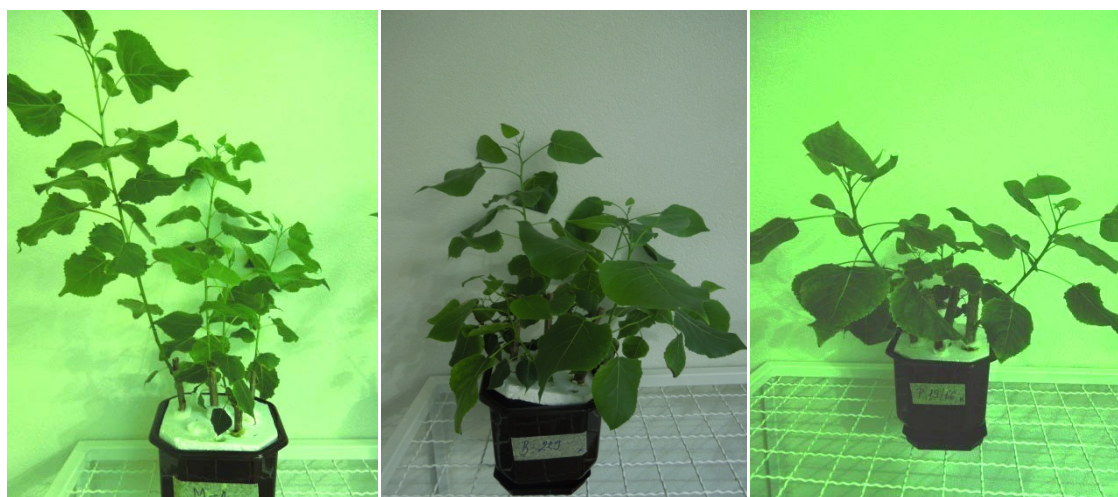


Slika 3.1. Eksperiment *in vitro* kultura tkiva M-1 klona

### 3.2. Ogled u hidroponima

U istraživanju su korišćeni klonovi topole sa Instituta za nizijsko šumarstvo i zaštitu životne sredine Univerziteta u Novom Sadu:

- ✓ *Populus deltoides* x *Populus nigra* – klon M-1,
- ✓ *Populus deltoides* Bartr. – klon B-229,
- ✓ *Populus deltoides* Bartr. – klon PE 19/66 (Slika 3.2).



Slika 3.2. Reznice topole: klon M-1 (levo), B-229 (u sredini) i PE 19/66 (desno)

Biljke su gajene u sobi za gajenje biljaka sa kontrolisanim uslovima temperature i vlažnosti vazduha, pri svetlosti intenziteta  $281.7 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sa 16 h svetla i 8h mraka i temperaturom između  $20\text{--}22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  u sudovima zapemine 3 L metodom hidroponskih kultura (Slika 3.3) (Popović i sar., 2016).



Slika 3.3. Reznice topole u hidroponskom eksperimentu

Za eksperiment su izabrane zdrave reznice topole, približno jednake veličine (oko 15 cm dužine). Reznice su bile potopljene u vodu sa česme tokom 24h. Nakon toga su prebačene u sudove sa deset puta razblaženim rastvorom Hoaglanda (Hoagland i Aron, 1950) i gajene u ovim uslovima tokom 4 nedelje, nakon čega su snabdevane sa punim Hoaglandovim rastvorom, tokom još dve nedelje. Hranljivi rastvor je aerisan i menjan nedeljno. Šest nedelja nakon potapanja biljke su podvrgnute tretmanu sa polietilen glikolom 6000 (po proceduri Michel i Kauffman, 1973). Sem kod kontrolnih biljki, PEG 6000 je dodat u hranljive rastvore u koncentraciji 100 g/L i 143 g/L. Koncentracije PEG 6000 su odgovarale osmotskom potencijalu od 100 mOsm i 200 mOsm koji je izmeren automatskim osmometrom (Roebing, tip 12/12 DR, Nemačka). Primena tretmana trajala je 6 dana.

Tabela 3.1. Priprema rastvora PEG 6000

potencijal rastvora (mOsm)	masa PEG 6000 u 1000 mL (g)
100	100
200	143

### 3.3. Metode ispitivanja

#### 3.3.1. Priprema ekstrakata

Antioksidantni enzimi ekstrahovani su iz 0.3 g biljnog materijala, homogenizovanog u 10 mL pufera u prethodno ohlađenom porcelanskom avanu u toku 2–3 minuta. Za ekstrakciju je korišćen je 0.1 M Na-fosfatni pufer pH 7.0 (Quy Hai i sar., 1975).

Homogenat je centrifugiran 15 minuta na 12000 g i 4 °C. Dobijeni supernatant je prebačen u čiste tubice, čuvan na -20 °C i korišćen za merenja (određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima kao i sadržaja rastvorljivih proteina).

Metanolni ekstrakti dobijeni su ekstrakcijom 1 g suvog biljnog materijala sa 25 mL 50% MeOH u prisustvu 0.1 M HCl na ultrazvučnom kupatilu, 30 minuta, na 25 °C. Ekstrakti su ostavljeni preko noći u mraku i potom su stavljeni još pola sata na ultrazvučno kupatilo na 25 °C. Ekstrakti su proceđeni kroz kvalitativni filter papir (Whatman No 41). Ovi ekstrakti su korišćeni za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i antioksidantnog potencijala (FRAP metodom, DPPH metodom i  $O_2^{\bullet-}$  skevindžer aktivnosti).

#### 3.3.2. Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je metodom po Bradfordu (1976) koja se zasniva na vezivanju boje Coomassie brilliant blue G-250 za bazne i aromatične ostatke aminokiselina u proteinu, pri čemu se apsorbcioni maksimumom pomera sa 465 nm (katjonska forma) na 595 nm (stabilan neprotonovani oblik plave boje). Metoda interferira sa nekim neproteinskim supstancama koje stabilišu neutralnu formu (zeleni), bilo direktnim vezivanjem ili promenom pH, zbog čega se koristi i relativni proteinski standard, albumin goveđeg seruma (BSA, eng. *bovine serum albumin*). Supernatant dobijen ekstrakcijom u 0.1 M kalijum-fosfatnom puferu korišćen je kao sirovi ekstrakt u kojem je određena koncentraciju proteina. Reakcioni medijum činilo je 1 mL 0.07 M rastvora boje Coomasie brilliant blue u 3%  $HClO_4$ , 1 mL  $dH_2O$  i 25  $\mu L$  uzorka (supernatanta) ili standarda sa različitim koncentracijama rastvora BSA. Nakon 5 minuta očitana je apsorbanca uzorka i različitih koncentracija standarda na  $\lambda = 595$  nm. Koncentraciju proteina u svakom uzorku odredili smo očitavanjem sa kalibracione krive koja je dobijena merenjem apsorbanacije rastvora standarda u opsegu koncentracija od 0.0

mg/mL do 1.0 mg/mL. Koncentracija proteina u uzorku izražena je kao mg proteina po gramu svežeg biljnog materijala (mg proteina/g sv. m).

### 3.3.3. *Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze*

Ukupna aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) određena je na osnovu inhibicije fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijuma (NBT) u kojoj nastaje formazan, plavi proizvod redukcije NBT sa  $O_2^{\bullet-}$  (Giannopolitis i Ries, 1977). Reakcioni medijum je dobijen mešanjem 2.6 ml 50 mM Na-fosfatnog pufera (pH 7.8), 100  $\mu$ L 13 mM metionina, 100  $\mu$ L 75  $\mu$ M NBT, 100  $\mu$ L 0.1 mM EDTA i 50  $\mu$ L 2  $\mu$ M riboflavina. Radna proba je dobijena dodatkom enzimskog ekstrakta (10-50  $\mu$ L) u reakcioni medijum. Slepa proba je dobijena tako što je u reakcioni medijum umesto enzimskog ekstrakta dodata ista zapremina Na-fosfatnog pufera (pH 7.8). Rastvor u epruvetama je dobro promešan i epruvete su postavljene ispred svetlosnog izvora, 4 minuta. Jedinica aktivnosti SOD je definisana kao količina enzima koja inhibira redukciju NBT za 50% na 25 °C i 560 nm. Aktivnost SOD izražava se kao 1 Unit (U) SOD potreban za 50% inhibicije NBT redukcije, a u ovoj disertaciji je izražen kao broj U po mg proteina (U/mg proteina).

### 3.3.4. *Određivanje aktivnosti katalaze*

Aktivnost katalaze (CAT) je određena praćenjem razgradnje vodonik peroksida na 240 nm (ekstinkcioni koeficijent 39.4  $mM^{-1} cm^{-1}$ ) tokom minute (Aebi, 1984). Radna proba je dobijena mešanjem 1.9 mL 50 mM rastvora fosfatnog pufera, pH 7, 100  $\mu$ L ekstrakta enzima i 1.0 ml sveže napravljenog rastvora  $H_2O_2$ , koji se dobija rastvaranjem 0.17 mL 30%  $H_2O_2$  u 50 mL 50 mM fosfatnog pufera, pH 7 i dodaje neposredno pred merenje. Slepa proba je dobijena mešanjem 100  $\mu$ L ekstrakta enzima i 2.9 mL 50 mM rastvora fosfatnog pufera pH 7, kao reakcionog medijuma. Aktivnost katalaze je određena na osnovu smanjenja absorbancije  $H_2O_2$  u prisustvu ekstrakta enzima na 240 nm. Jedinica aktivnosti katalaze (U/mg proteina) je ona količina enzima koja izaziva razgradnju 1  $\mu$ mol  $H_2O_2$  u minuti na 25 °C, izraženo po miligramu proteina (specifična aktivnost).

### 3.3.5. *Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze*

Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPx, EC 1.11.1.7) određena je na osnovu oksidacije gvajakola u tetragvajakol (ekstinkcioni koeficijent,  $\epsilon = 26,6 mM^{-1} cm^{-1}$ ) u toku 1 minuta (Polle i sar., 1994). Uzorak (10  $\mu$ L) je dodat u radnu probu koja sadrži 100 mM



K-fofatni pufer (pH 7.0), 20.1 mM gvajakol i 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Promena absorbancije merena je spektrofotometrijski na 436 nm. Aktivnost GPx izražena je brojem U ("unit") po miligramu proteina. Jedinica aktivnosti GPx je ona količina enzima koja izaziva transformaciju 1 μmol gvajakola u toku 1 minuta na 25 °C.

### 3.3.6. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Glutation-peroksidazna aktivnost (GSH-Px) je određena pomoću kumenhidroperoksida i GSH kao supstrata (Chiu i sar., 1976). Slepa i radna proba su dobijene mešanjem 0.1 mL ekstrakta enzima i 0.7 mL 50 mM TRIS-pufera, pH 7.6 (koji sadrži 1.3 mM EDTA). Posle 5 minuta inkubacije u slepu probu je dodato 0.1 mL 2mM GSH, a u radnu probu 0.1 mL GSH i 0.1 mL kumenhidroperoksida (0.005 mL kumenhidroperoksida u 10 mL TRIS-pufera pH 7.6). Nakon inkubacije na 37 °C od 10 minuta u slepu i radnu probu je dodato 1.0 mL 20% trihlorsirćetne kiseline, dok je samo u slepu probu dodato 0.1 mL rastvora kumenhidroperoksida. Zatim je smeša centrifugirana 15 minuta na 5000 g na 4 °C. Nakon toga je iz slepe i radne probe odmereno po 1.0 mL i pomešano sa 2.0 mL 0.4 M TRIS-pufera, pH 8.9 i 0.1 mL 10 mM rastvora 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoeeve kiseline (DTNB) u metanolu. Aktivnost GSH-Px je određena merenjem promene absorbancije na 412 nm i izražena kao U/mg proteina. Jedinica aktivnosti GSH-Px je ona količina enzima koja izaziva oksidaciju 1 μmol GSH u toku 1 minuta na 25 °C.

### 3.3.7. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost glutation-reduktaze (GR) je određena praćenjem oksidacije NADPH na 340 nm ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) tokom pet minuta (Halliwell i Foyer, 1978). Oksidacija NADPH do NADP<sup>+</sup> je praćena padom apsorbance merene na 340 nm i direktno je proporcionalna GR aktivnosti uzorka. Slepa proba je dobijena mešanjem 200 μL ekstrakta enzima i 2.1 mL 0.24 M rastvora TRIS-pufera, pH 7.8 kao reakcionog medijuma. Radna proba je dobijena mešanjem 2 ml 0.24 M rastvora TRIS-pufera pH 7.8, 200 μL ekstrakta enzima i 0.1 mL 12 mM rastvora GSSG. Na ovako pripremljene radne i slepe probe posle inkubacije od 10 minuta na temperaturi od 37 °C je dodato 0.1 mL 4.8 mM rastvora NADPH i odmah potom započeto merenje promene apsorbancije na 340 nm u toku 5 minuta. Jedinica aktivnosti GR (U/mg proteina) je ona količina enzima koja izaziva razgradnju 1 μmol NADPH u periodu od 1 min na 25 °C, izraženo po miligramu proteina (specifična aktivnost).



### 3.3.8. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Aktivnost askorbat-peroksidaze je određena prema Nakano i Asada (1981) primenom reakcione smeše koja je sadržavala 0.2 M Tris/HCl pufer (pH 7.8), 0.25 mM askorbat, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 20 µL ekstrakta enzima. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zavisna oksidacija je praćena smanjenjem apsorbance na 290 nm. Aktivnost ASC-Px je određena praćenjem oksidacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ekstinkcioni koeficijent 2.8 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) na 290 nm tokom pet minuta. Jedinica aktivnosti askorbat-peroksidaze (U/mg proteina) je ona količina enzima koja izaziva razgradnju 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u periodu od 1 min na 25 °C, izraženo po miligramu proteina.

### 3.3.9. Određivanje količine redukovano glutationa

Količina GSH merena je na osnovu bojene reakcije neproteinskih tiolnih (-SH) grupa, u prisustvu DTNB (Sedlak i Lindsay, 1968). Absorbancija nastalog obojenog proizvoda je očitana nakon 5 minuta spektrofotometrijski na 412 nm. Količina GSH određena je u radnim probama u odnosu na slepu probu. Svež biljni materijal (0.5 g) homogenizovan je sa 4 mL 5% rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA) i centrifugiran 10 minuta na 3500 g. Supernatant (0.1 mL) je dodat u reakcioni medijum koji je sadržavao 2.0 mL 0.4 M TRIS-HCl pufera pH 8.9, 0.9 mL H<sub>2</sub>O i 0.1 mL 6 mM rastvor DTNB u metanolu. Količina GSH izražen je brojem µmol GSH/g sv. m. na osnovu kalibracione krive.

### 3.3.10. Određivanje količine malonildialdehida

Intenzitet LP određuje se na osnovu količine malonildialdehida (MDA) ekstrahovanog iz svežeg biljnog materijala pomoću smeše tiobarbiturine (TBA) i trihlorsirćetne (TCA) kiseline (Heath i Packer, 1968). Svež biljni materijal (0.5 g) homogenizovan je sa 4.5 mL rastvora za ekstrakciju MDA (10 mL 10% perhlorne kiseline zasiti se na hladno sa TBA i doda se 30 mL 20% TCA). Homogenat je zagrevan 20 minuta na 95 °C, ohlađen i centrifugiran 10 minuta na 4000 g. Absorbance je očitana na 532 nm i 600 nm. Količina MDA se računa na osnovu promene absorbancije u odnosu na slepu probu (oduzimajući nespecifičnu apsorbancu na 600 nm od absorbance na 532 nm) i pomoću ekstinkcionog koeficijenta 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Intenzitet LP izražen je brojem nmol MDA/g sv. m.

### 3.3.11. Određivanje intenziteta oksidacije proteina

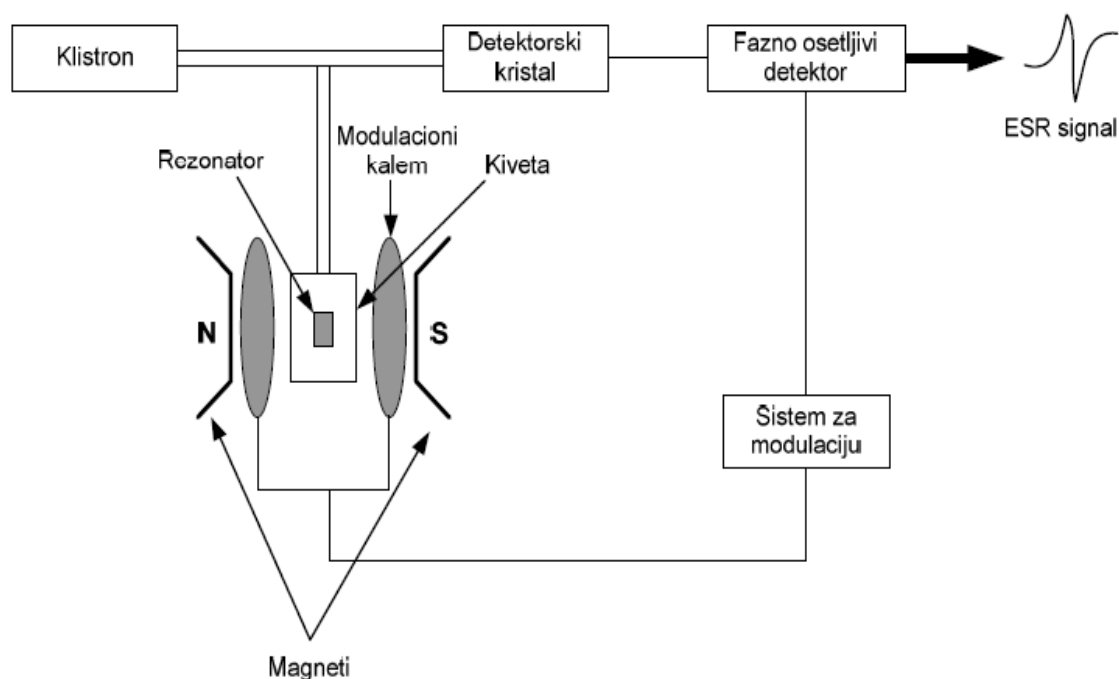
Intenzitet oksidacije proteina se određuje na osnovu reakcije karbonilnih grupa sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) kada nastaje žuto obojeni kondenzacioni proizvod sa maksimumom apsorpcije na 370 nm (Levine i sar., 1990). Oksidativno modifikovani proteini su određeni iz puferskog ekstrakta. Na 900  $\mu$ l uzorka dodato je 100  $\mu$ l streptomycin-sulfata (10% u 50 mM HEPES, pH=7.2). Reakciona smeša je držana u frižideru 15 minuta, a zatim je talog odvojen centrifugiranjem (11000 g, 15 minuta). Uzeto je 950  $\mu$ L supernatanta i na njega je dodato 900  $\mu$ L 20% TCA. Nakon centrifugiranja (11000 g, 5 minuta), odbačen je supernatant, a na talog je dodat 1 mL 10 mM DNPH rastvorenog u 2 M HCl. Reakciona smeša je inkubirana 1h na sobnoj temperaturi u mraku uz povremeno energično mešanje (vortex). Nakon toga su proteini istaloženi sa 900  $\mu$ L 20% TCA i talog je odvojen centrifugiranjem (4000 g, 5 minuta). Supernatant je uklonjen, a talog ispran 3 puta sa 1 mL smeše etanol:etilacetat, 1:1 (v:v) i odvojen centrifugiranjem od rastvora. Na talog je na kraju dodato 1200  $\mu$ L gvanidina (6 M u 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.3), i ostavljen je da se rastvori na vodenom kupatilu (15 min, 37 °C). Posle centrifugiranja (1 minut), supernatant je razblažen sa 1.5 mL fosfatnog pufera (pH 2.3), a sadržaj karbonila određen je merenjem absorbanca na 370 nm i primenom ekstinkcionog koeficijenta za alifatične hidrazone ( $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ukupna količina karbonil-grupa izražena je u nmol/mg proteina.

### 3.3.12. Određivanje količine vodonik peroksida

Količina  $\text{H}_2\text{O}_2$  određena je po FOX metodi Wolff-a (1994). Metoda se zasniva na reakciji sorbitola i peroksida u kojoj sorbitol prevodi vodorastvorne peroksida iz uzorka u peroksil radikale, koji oksiduju  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$ . Potom  $\text{Fe}^{3+}$  reaguje sa ksilenol-oranžom u kiselj sredini i stvara se obojeni proizvod čija se absorbanca meri na 560 nm. Metoda je izuzetno osetljiva i koristi se za određivanje vodorastvornih hidroperoksida. Radna proba sadrži 750  $\mu$ L razblaženog puferskog ekstrakta i 750  $\mu$ L FOX reagensa (250  $\mu$ M gvožđe amonijum sulfat, 100 mM sorbitol i 100  $\mu$ M ksilenol orandž i 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). U korekcije se ne dodaje gvožđe amonijum sulfat i radi se zbog gvožđa iz uzorka. Apsorbanca se očitava nakon 45 minuta. Sadržaj peroksida u uzorku se određuje na osnovu kalibracione krive sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  u opsegu koncentracija od do i izražen je brojem  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g sv. m.}$

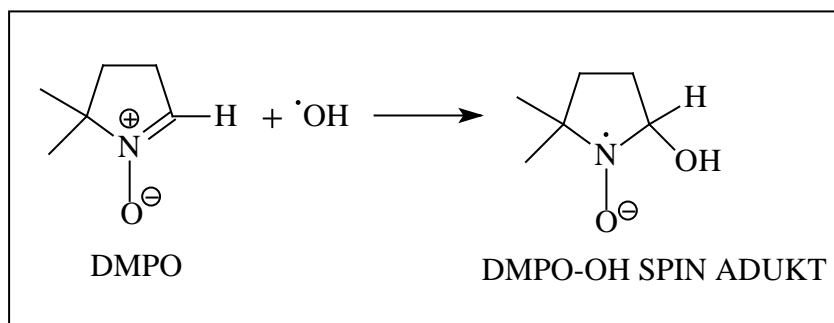
### 3.3.13. ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala

Antiradikalska aktivnost ekstrakata određena je i elektron-spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom. Elektron-spin rezonancija je spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. ESR spektroskopijom se mogu detektovati koncentracije slobodnih radikala niže od  $10^{-10}$  M, pod uslovom da su radikali stabilni u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju (Čanadanović-Brunet, 1998). Homogeno magnetno polje promenljive jačine se proizvodi elektromagnetom sa precizno izrađenim polovima. Blok šema ESR spektrometra prikazana je na Slici 3.4.



Slika 3.4. Blok šema ESR spektrometra

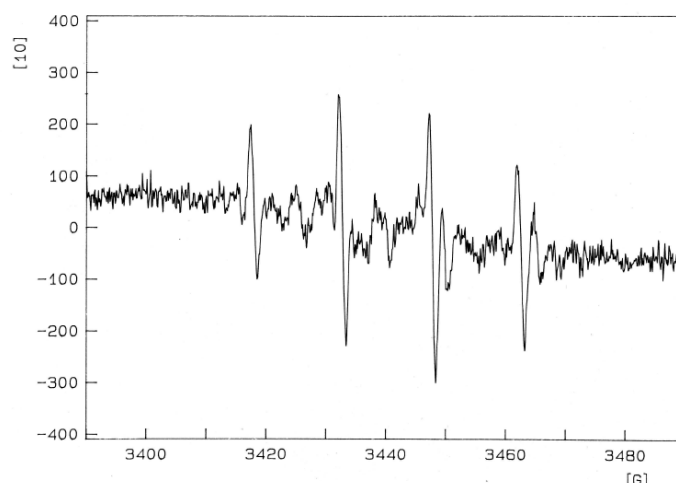
Za analizu nestabilnih hidroksil, alkoksi i peroksi radikala najčešće se primenjuje metoda hvatanja radikala, tzv. “spin-trapping” metoda. Hidroksil radikali, nastali u ispitivanim reakcionim sistemima, su kratkog vremena života ( $\ll 1$  ms) i male koncentracije ( $< 10^{-7}$  M). U sistemu sa reaktivnim radikalima dodaju se jedinjenja poznata kao “spin-trap”-ovi (hvatači) radikala. Na taj način nastaju relativno stabilni “spin-adukti”, pogodni za detekciju ESR spektroskopijom. U ovom radu korišćen je 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO) u funkciji “spin-trap-a”. Stabilni nitroksil-radikali (DMPO-OH spin-adukti) nastaju sledećom reakcijom DMPO i  $\cdot\text{OH}$ :



Slika 3.5. Reakcija nastajanja DMPO-OH spin adukta

ESR ispitivanje ekstrakata topole vršeno je u Fentonovom model sistemu koji je dobijen mešanjem 0.5 mL 10 mM FeCl<sub>2</sub>, 0.5 mL 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0.5 mL 0.3 M DMPO. Radna proba je dobijena tako što je u Fentonov model sistem dodato 0.1 mL uzorka. Snimanje spektara vršeno je 5 minuta nakon dobijanja smeše. Za ESR analizu korišćeni su fosfatno-puferski ekstrakti lista topole.

ESR spektri su snimljeni nakon mešanja i prenošenja u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvore, na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Germany), pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije 100 kHz, amplituda modulacije 0.222 G, vremenska konstanta 81.92 ms, vremenski opseg merenja 335.544 s, centar polja 3480.00 G, ukupan opseg merenja 100.00 G, frekvencija mikrotalasnog područja 9.64 GHz, jačina struje  $5.00 \times 10^5$ , snaga mikrotalasnog područja 20 mW, temperatura merenja 23 °C. Na Slici 3.6. prikazan je ESR spektar hidroksil radikala u Fentonovom model sistemu u prisustvu DMPO kao „spin-trapa“ (slepa proba). Hiperfina struktura spektra predstavljena je sa četiri linije, relativnog odnosa intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti cepanja za jedan <sup>14</sup>N-atom (I=1)  $a_N=14.9$  G, i jedan <sup>1</sup>H-atom (I=1/2)  $a_H^\beta=14.9$  G.



Slika 3.6. ESR spektar hidroksil-radikala u Fentonovom model sistemu u prisustvu DMPO kao „spin-trapa“ (slepa proba).

Antiradikalaska aktivnost ( $AA_{OH}$ ) na hidroksil radikal je definisana kao:

$$AA_{OH} = (h_o - h_x)/h_o \times 100 (\%)$$

gde je:  $h_o$  – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

$h_x$  – visina drugog pika ESR signala radne probe (uzorka)

Smanjenje intenziteta signala radne probe u odnosu na slepu probu predstavlja antiradikalasku aktivnost radne probe, međutim rezultati u ovoj disertaciji su izraženi kao promene relativnog intenziteta (RI) signala topole tretirane PEG-om i upoređeni su sa kontrolom.

$$\text{Promena RI } (\pm \%) = 100 \cdot (RI_{\text{topole izložene vodnom stresu}} - RI_{\text{kontrola}}) / RI_{\text{kontrola}}$$

### 3.3.14. Određivanje pigmenata

Određivanje koncentracije pigmenata hloroplasta vršeno je merenjem apsorbance pri odgovarajućim talasnim dužinama (662, 644 i 440 nm) čistog acetonskog ekstrakta suvog biljnog materijala koncentracije 0.02 g/mL (Wellburn, 1994). Svakoj vrsti pigmenata u acetonskom ekstraktu odgovaraju specifični molarni apsorpcioni koeficijenti (Holm, 1954; Wettstein, 1975). Koncentracije pigmenata su određene na osnovu sledećih obrazaca:

$$c_{Chla} = 9.784 \cdot A_{662} - 0.990 \cdot A_{644}$$

$$c_{Chlb} = 21.426 \cdot A_{644} - 4.650 \cdot A_{662}$$

$$c_{Car} = 4.695 \cdot A_{440} - 0.268 \cdot (c_{Chla} + c_{Chlb})$$

### 3.3.15. *Određivanje prolina*

Sadržaj slobodnog prolina u listovima topole određen je spektrofotometrijski, metodom prema Bates i sar. (1973), koja se zasniva na reakciji prolina i ninhidrina. Sitno narezan biljni materijal (oko 0.25 g) usitnjen je do finog praha u porculanskom avanu (korištenjem tečnog azota) i ekstrahovan sa 5 ml hladne 3%-tne (w/v) sulfosalicilne kiseline za taloženje proteina, uz dodatak kvarcnog peska. Nakon centrifugiranja (15 minuta na 3500 g) na 2 mL odvojenog supernatanta dodano je 2 mL glacijalne sirćetne kiseline i 2 mL sveže pripremljenog kiselog ninhidrinskog reagensa (1.25 g ninhidrina rastvori se u 30 mL glacijalne sirćetne kiseline i 20 mL 6M ortofosforne kiseline uz lagano zagrevanje). Ovako pripremljeni uzorak se inkubira 1h na ključalom vodenom kupatilu prilikom čega nastaje obojeni kompleks. Reakcija se zaustavlja premeštanjem uzorka u ledeno kupatilo, nakon čega se dodaje 4 ml toluena. Mešanjem na vorteksu 15 - 20 sekundi nastali obojeni kompleks rastvoren je u toluenu. Nakon prilagođavanja sobnoj temperaturi toluenski sloj s prolinom odvojen je u staklenu kivetu i spektrofotometrijski je merena apsorbanacija pri talasnoj dužini od 520 nm. Kao slepa proba korišćen je čist toluen. Koncentracija prolina ekstrahovanog iz tkiva se računa iz standardne krive pripremljene s poznatim koncentracijama L-prolina (0 - 800  $\mu\text{M}$ ), na isti način kao uzorak. Konačni sadržaj prolina izražen je kao  $\mu\text{mol}$  po gramu sveže materije.

### 3.3.16. *Određivanje aktivnosti prolin-dehidrogenaze*

Aktivnost prolin-dehidrogenaze (PDH) određena je metodom Rena i Splittstoesser (1975). Svež biljni materijal (0.5 g) je usitnjen i u avanu ekstrahovan sa 1.5 mL fosfatnog pufera 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.0) koji sadrži 0.1 mM cistein i 0.1 mM EDTA. Ekstrakt je centrifugiran 10 minuta na 15000 g na 4 °C i supernatant je do analize čuvan na -70 °C. Pripremljen ekstrakt je pomešan sa  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  puferom koji sadrži 10 mM NAD i 20 mM prolin i PDH zavisna NAD redukcija je praćena na 340 nm tokom tri minuta. Izračunavanje je vršeno pomoću ekstinkcionog faktora za NADH ( $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedinica aktivnosti PDH je definisana kao količina enzima koja katalizuje formiranje 1  $\mu\text{mol}$  NADH u periodu od 1 min na 25 °C po mg proteina i izražena je u U/mg proteina.

### 3.3.17. *Određivanje glicin-betaina*

Određivanje glicin-betaina (GB) je urađeno po metodi Grieve i Grattan (1983). Suv biljni materijal (1 g) je mehanički mešan sa 20 mL dejonizovane vode tokom 24h na

sobnoj temperaturi. Potom su uzorci profiltrirani i filtrati su razblaženi (1:1) sa 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Alikvot (0.5 mL) je prenesen na led i držan tokom 1h. Potom je dodat KI-I reagens, promešan i ostavljen da stoji 16h na temperature od 4 °C. Nakon centrifugiranja na 10000 g tokom 15 minuta na 0 °C, supernatant je pažljivo usisan sa pipetom, a trijodidni kristali su rastvoreni u 9 mL 1,2-dihlorešana. Apsorbanca je merena na 365 nm. Sadržaj GB je određen na osnovu kalibracione krive GB (50-200 mg/mL) pripremljenog u 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i izražen kao μmol po gramu sveže materije.

### 3.3.18. Merenja fluorescentnim mikroskopom

Merenja fluorescencije su vršena na mikroskopu Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Germany) snabdevenim sa odgovarajućim filterima i kamerom visoke rezolucije (AxioCam HR, HQ CCD). Intenzitet fluorescencije analiziran je u softverskom programu Axiovision Rel. 4.8, (Carl Zeiss Pty. Ltd.). Intenzitet svakog parametra je izražen u relativnim jedinicama intenziteta piksela. Najmanje 10 ponavljanja merenja je urađeno za svaki tretman.

#### 3.3.18.1. Određivanje nivoa ukupnih unutarćelijskih ROS

Za detekciju ukupnih unutarćelijskih ROS korišćen je 2'-7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) po metodi Pető i saradnika (2013). Uzorci lista iz kulture tkiva su inkubirani 15 minuta u prisustvu DCFH-DA na 37 °C. Nakon tretmana boja je uklonjena ispiranjem segmenta lista sa 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina (MES) puferom 4 puta. Uzorci su postavljeni na predmetno staklo, prekriveni sa MES puferom i pokrovnim stakalcem.

#### 3.3.18.2. Određivanje nivoa NO

Za detekciju nivoa NO korišćena je NO specifična fluorescentna boja 4-amino-5-metilamino-2', 7-difluorofluorescein diacetat (DAF-FM DA) (Kolbert i sar., 2012). Uzorci lista iz kulture tkiva su inkubirani sat vremena u prisustvu DAF-FM DA na 25 °C. Nakon tretmana boja je uklonjena ispiranjem segmenta lista sa MES puferom 4 puta. Uzorci su postavljeni na predmetno staklo, prekriveni sa MES puferom i pokrovnim stakalcem.

### 3.3.18.3. *Određivanje nivoa ONOO<sup>-</sup>*

Peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) je detektovan pomoću 3'-(p-aminofenil) fluoresceina (APF) (Corpas i sar., 2009). Uzorci lista iz kulture tkiva su inkubirani sat vremena na 25 °C, u mraku, u prisustvu 10 μM rastvora APF pripremljenog u 10 mM Tris-HCl puferu (pH 7.4). Potom su uzorci isprani dva puta sa istim Tris-HCl puferom u trajanju od 20 minuta i postavljeni na predmetno staklo.

### 3.3.18.4. *Određivanje vijabilnosti ćelija FDA metodom*

Fluorescein diacetat (FDA) je korišćen za određivanje ćelijske vijabilnosti (Lehotai i sar., 2011). Uzorci lista iz kulture tkiva su inkubirani pola sata na 25 °C u prisustvu 10 μM rastvora FDA pripremljenog u 1 mM MES/KCl puferu (pH 6.15). Potom su uzorci isprani četiri puta sa istim MES/KCl puferom u trajanju od 15 minuta i postavljeni na predmetno staklo, prekriveni sa MES puferom i pokrovnim stakalcem.

### 3.3.19. *HPLC analiza fenolnih komponenti topole*

Sadržaj fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima kontrolnih i tretiranih uzoraka lista i korena odabranih klonova topole određen je tehnikom tečne hromatografije visoke rezolucije (HPLC- *eng. High Performance Liquid Chromatography*) po metodi Čanadanović-Brunet i saradnika (2013) uz neke proceduralne razlike. Izmereno je 0.1 g samlevenog uzorka lista ili korena topole na analitičkoj vagi i ekstrahovano sa 10 mL 50% MeOH na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta. Nakon maceracije od 24h ekstrakt je ostavljen još pola sata u utrazvučnom kupatilu. Ekstrakt je odvojen filtriranjem kroz kvalitativni filter papir (Whatman No 41) i uparen na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi nižoj od 30 °C. Suvi ostatak je rastvoren u 50% MeOH (HPLC stepena čistoće) u vodi korišćenjem ultrazvučnog kupatila i filtriran kroz membranske filtre veličine 0.45 μm (Millipore, Bedford, MA) pre analize. Kvantifikacija polifenolnih jedinjenja izvršena je na HPLC aparatu Shimadzu koji sadrži LC-20AT binarnu pumpu, CTO-20A termostat i SIL-20A autosampler (automatski dozator) povezan sa SPD-20AV UV/Vis detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). Hromatogrami su snimljeni na različitim talasnim dužinama za različita jedinjenja: 253 nm za salicin, 280 nm za hidroksibenzoevu kiselinu, katehin, epikatehin, hrisin i elagnu kiselina, 300 nm za salicilnu kiselinu, 320 nm za hidroksicimetnu kiselinu i 360 nm za flavonoide. Razdvajanje je izvršeno na Luna C-18 RP koloni, 5 μm, 250 x 4.6 mm (Phenomenex,



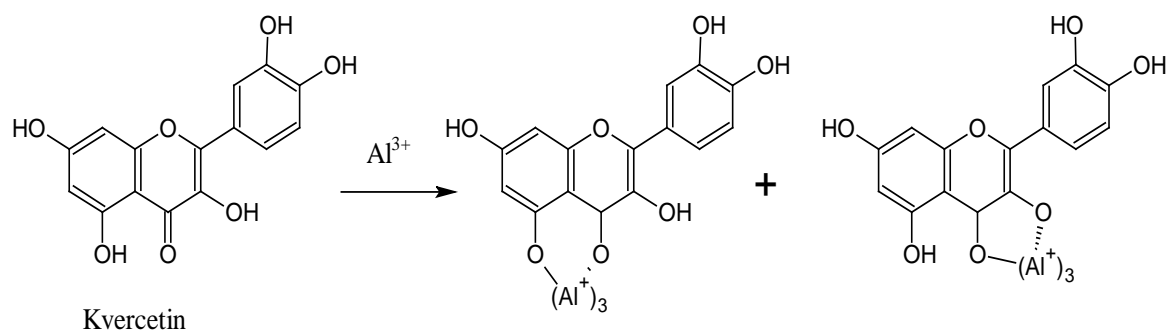
Torrance, CA, USA) sa C18 pretkolonom, 4 x 30 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Dve mobilne faze, A (acetonitril) i B (1% mravlja kiselina) su korišćene pri protoku od 1 ml/min i primenom sledećeg gradijenta: 0 - 10 min od 10 do 25% A; 10 - 20 min linearan porast do 60% A, i od 20 min do 30 min linearan porast do 70% A. Kolona je uravnotežena na početne uslove, 10% A, 10 min uz dodatnih 5 min za stabilizaciju. Standardi polifenolnih jedinjenja i uzorci su rastvarani/ekstrahovani u 50% metanolu. Identifikacija i kvantifikacija dobijenih pikova izvršena je sa LC Solution Software (Shimadzu, Kyoto, Japan). Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

### 3.3.20. *Određivanje sadržaja ukupnih fenola*

Ukupni fenoli u ekstraktima su određeni na osnovu reakcije fenola sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (Ainsworth i Gillespie, 2000). Ovaj test je zasnovan na transferu elektrona u baznoj sredini sa fenolnog jedinjenja na kompleks fosformolibdenove i fosforvolframove kiseline, čija se apsorbanca meri na 765 nm. Tada se razvija boja koja nastaje kao posledica redukcije kompleksa fosformolibdenove i fosforvolframove kiseline kada nastaju hromogeni u kojima metali imaju nižu valencu. U 1 ml folinovog reagensa (5%) dodato je 100  $\mu$ l uzorka. Reakcioni medijum je dobro promešan (vortex), ostavljen da stoji 5 minuta i zatim je dodato 0.8 ml 700 mM rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon 2 sata je izmerena apsorbanca na 765 nm. Izračunavanje je izvršeno na osnovu standardne krive (+)-galne kiseline, a rezultati izraženi kao mg EGK/g suvog materijala.

### 3.3.21. *Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida*

Sadržaj flavonoida određen je po spektrofotometrijskoj metodi Chang-a i saradnika (2002) koja se zasniva na osobini da flavonoidi i flavonglikozidi daju sa metalima odgovarajuće metalokomplekse. Naročito je značajan Al-kompleks (*Slika 3.7*), jer se  $\text{Al}^{3+}$  vezuje za ukupne flavonoide pa se sumarni apsorpcioni maksimum lako određuje.



Slika 3.7. Nastajanje obojenog kompleksa  $\text{Al}^{3+}$  jona i flavonoida.

Metanolni biljni ekstrakt (0.2 mL) je pomešan sa 0.8 mL metanola, 0.1 mL 0.83 M  $\text{AlCl}_3$  reagensa, 0.1 mL 0.1 M Na-acetata i 1.8 mL destilovane vode. Apsorbanca reakcione smeše je očitana nakon 30 minuta na 415 nm. Izračunavanje je izvršeno na osnovu standardne krive (+)-kvercetina, a rezultati izraženi kao mg ekvivalenata kvercetina po gramu suvog materijala.

### 3.3.22. Određivanje sadržaja ukupnih kondenzovanih tanina ili proantocijanidina

Proantocijanidini su određeni butanol-HCl metodom po Vermerrisu i Nicholsonu (2006) iz acetonskih ekstrakata dobijenih ekstrakcijom 0.1 g suvog materijala sa 10 mL acetonskog vodenog rastvora (70/30, V/V). Reakcioni medijum radne probe činio je 0.5 mL ekstrakta, 3 mL butanol-HCl reagensa (95:5, V/V) i 0.1 mL 2%-nog feri reagensa (2% gvožđe amonijum sulfat u 2 M HCl). Smeša se izmeša na vorteksu i inkubira se na 95 °C, 50 minuta. Nakon hlađenja se apsorbanca očitava na 550 nm u odnosu na slepu probu koja sadrži samo rastvarač umesto ekstrakta. Korekcija je ista kao radna proba samo što se ne zagreva, već se odmah očitava apsorbanca. Tretman sa butanol-HCl reagensom rezultuje u kiseloj konverziji leukoantocijanidina i proantocijanidina do cijanidina, čiji je maksimum na 550 nm u butanolu. Sadržaj proantocijanidina je izražen kao mg cijanidina/100 g suvog materijala koristeći molarni ekstinkcioni koeficijent cijanidina ( $\epsilon = 34700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i molarnu masu cijanidina 287.24 g/mol.

### 3.3.23. Određivanje PAL

Aktivnost fenilalaninamonijum-lijaze (PAL; EC. 4.3.1.5) određena je po metodi Gerasimova i sar. (2005). PAL aktivnost je određena spektrofotometrijski (290 nm) formiranjem *trans*-cimetne kiseline. Sadržaj reakcione epruvete je 1 mL ekstrakta, 1 mL

0.1 M boratnog pufera (pH 8.8) i 1 mL 60 mM L-fenilalanina. Smeša je inkubirana na 37 °C tokom 1 h. U kontrolu je umesto uzorka stavljen boratni pufer. Reakcija je stopirana dodatkom 0.5 mL 1 M trihlorsirćetne kiseline. Količina nastale cimetne kiseline (Cin) izračunata je na osnovu kalibracione krive. Jedinica aktivnosti PAL (U/mg proteina) je ona količina enzima koja izaziva nastajanje 1  $\mu$ mol Cin u toku 1 minuta na 37 °C.

### 3.3.24. Određivanje PPO

Polifenol-oksidaza (PPO; EC 1.14.18.1) je odedena u 3 mL reakcione smeše koja sadrži 50 mM kalijum fosfatni pufer (pH 6.5), 0.17 mM L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), 0.07 mM L-askorbinsku kiselinu, 0.065 mM EDTA i 0.1 mL enzimskog ekstrakta (Marumo i Waite, 1986). Nakon inkubacije na 25 °C promena absorbance na 265 nm je snimana tokom 5 min. Aktivnost je izračunata pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijent L-DOPA ( $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Jedinica aktivnosti PPO je definisana kao količina enzima koja katalizuje oksidaciju 1  $\mu$ mol L-DOPA u periodu od 1 min na 25 °C po mg proteina i izražena je u U/mg proteina.

### 3.3.25. Određivanje skevindžer aktivnosti ekstrakata DPPH-metodom

Skevindžer aktivnost ekstrakta određena je DPPH metodom spektrofotometrijski tako što je praćen nestanak ljubičaste boje na 515 nm (Sanchez-Moreno i sar., 1998, sa modifikacijama). Ovom metodom utvrđuje se kapacitet hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH).

Osnovni rastvor DPPH reagensa (0.4 mM) napravljen je rastvaranjem u ultrazvučnom kupatilu 0.0157 g čvrste supstance u 100 mL 96% EtOH. Na dan merenja, pravljen je radni rastvor (0.09 mM) koji se dobija mešanjem 22.5 mL osnovnog rastvora sa MeOH u sudu od 100 mL. Radne probe su pravljene mešanjem 2 mL DPPH rastvora sa 10  $\mu$ L – 50  $\mu$ L ekstrakata. Za svaki ekstrakt je merena korekcija, koja predstavlja apsorbancu samog uzorka rastvorenog u 2 mL rastvarača (MeOH). Svi uzorci su posle snažnog mešanja ostavljeni da se inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su apsorbance očitane na 515 nm. Skevindžer aktivnost ekstrakta (RSC) proporcionalna je promeni absorbancije, a izražena je u procentima u odnosu na kontrolu. Kapacitet „hvatanja“ slobodnih (DPPH) radikala (RSC, *radical scavenging capacity*) ekstrakata različitih koncentracija ( $RSC_{DPPH}$ ) je računat na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{kon}$  apsorbancija kontrolne, a  $A_{sp}$  apsorbancija slepe probe:

$$\text{RSC}_{\text{DPPH}\cdot} (\%) = (1 - A/(A_{\text{kon}} - A_{\text{sp}})) \times 100\%$$

Na osnovu  $\text{RSC}_{\text{DPPH}\cdot}$  vrednosti određene su  $\text{IC}_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $\text{RSC}_{\text{DPPH}\cdot}$  (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen pomoću ARP vrednosti koja predstavlja recipročnu  $\text{IC}_{50}$  vrednost i korišćena je za prikazivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakta.

### 3.3.26. Određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom

U cilju dobijanja potpunije informacije o antioksidantnim svojstvima ispitivanih klonova, u radu je testirana i ukupna antioksidantna aktivnost metodom FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*), (Benzie i Strain, 1999). Ovo je spektrofotometrijska metoda zasnovana na reakciji redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ , pod uticajem biljnog ekstrakta.

FRAP reagens je dobijen mešanjem tri rastvora, A, B i C u odnosu 10:1:1. Rastvor A je predstavljao 300 mM acetatni pufer pH 3.6; rastvor B, 10 mM 2,4,5-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mM HCl i rastvor C, 20 mM  $\text{FeCl}_3$ . U 1.7 mL FRAP reagensa je dodato 10  $\mu\text{L}$  uzorka. Svi antioksidanti prisutni u ekstraktu koji imaju dovoljno nizak redoks potencijal redukuju  $\text{Fe}^{3+}$ . Fero-joni, nastali na ovaj način, grade sa prisutnim ligandom plavo obojeni kompleks,  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (gvožđe-tripiridiltriazin).

Plava boja se očitava nakon 10 minuta na 593 nm u odnosu na destilovanu vodu. Rezultat se izračunava na osnovu standardne kalibracione krive sa askorbinskom kiselinom i izražava se kao ekvivalenti askorbinske kiseline po gramu suve mase (mg EAK/g s.m.).

### 3.3.27. Određivanje $\text{O}_2^{\cdot-}$ skevindžer aktivnost

Kapacitet „hvatanja“ superoksid anjon radikala ispitivanih ekstrakata određen je po istom principu kao što se određuje aktivnost enzima superoksid-dismutaze (*Poglavlje 3.3.2*) samo što se u ovom slučaju koriste metanolni ekstrakti umesto puferskih ekstrakata (Giannopolitis i Ries, 1977).

Skevindžer aktivnost ekstrakta (RSC) proporcionalna je promeni absorbancije, a izražena je u procentima u odnosu na slepu probu. Kapacitet „hvatanja“  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ekstrakata je računat na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{\text{kon}}$  apsorbancija kontrolne, a  $A_{\text{sp}}$  apsorbancija slepe probe:

$$\text{RSC}_{\text{SOA}} (\%) = (1 - A/(A_{\text{kon}} - A_{\text{sp}})) \times 100\%$$

Na osnovu  $RSC_{SOA}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $RSC_{SOA}$  (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen pomoću ARP vrednosti koja predstavlja recipročnu  $IC_{50}$  vrednost i korišćena je za prikazivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakta.

### 3.3.28. Statistička obrada podataka

Svi dobijeni rezultati predstavljeni su kao aritmetička sredina  $\pm$  SE (standardna greška). Statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti merenja utvrđene su pomoću softvera STATISTICA for WINDOWS version 13, StatSoft Inc (Dell Statistica) (ANOVA, Dunkun-test, za nivo značajnosti  $p < 0,05$ ). Regresiona analiza urađena je u istom programu. Koeficijenti korelacija ( $r$ ) su određeni između različitih parametara korišćenjem srednjih vrednosti. Analiza glavnih komponentata (*Principal component analysis-PCA*) primenjena na normalizovane rezultate, izvršena je korišćenjem istog programa.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Biohemijski odgovor kulture tkiva topole klona M-1 na vodni stres izazvan sa PEG 6000

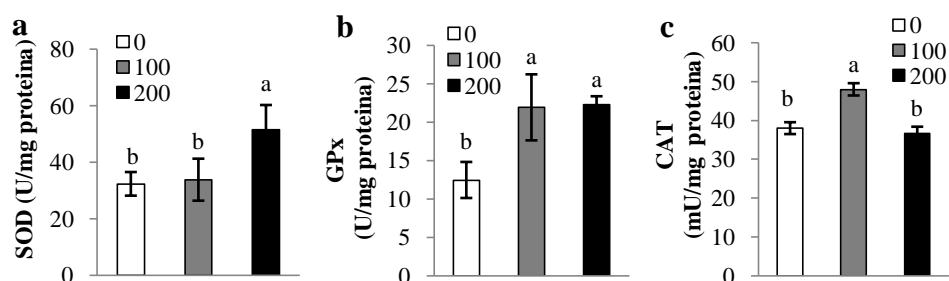
Poslednjih godina javilo se veliko interesovanje za studije u *in vitro* kulturi tkiva, jer je na ovaj način omogućeno proučavanje mnogih biljnih fizioloških i biohemijskih osobina i genetičkih procesa u kontrolisanom okruženju u kratkom vremenskom periodu. Mnogi selekcionari uz pomoć *in vitro* kulture traže odgovarajuće indikatore za skrining za toleranciju na sušu (Hasheminasab i sar., 2014). Za simulaciju vodnog stresa u *in vitro* kulturi se pored manitola najčešće koristi polietilen glikol (PEG). Zbog svojih osobina opisanih u *Poglavlju 2.1*, PEG 6000 je korišćen u mnogim istraživanjima za snižavanje vodnog potencijala medijuma u kulturi tkiva (Abouzaid i sar., 2016; El Rabey i sar., 2015; Manoj i Uday, 2005; Rao i Jabeen, 2013; Tsago i sar., 2013).

Do sada je dobro proučen biohemijski odgovor vrste *Arabidopsis thaliana* na različite vrste abiotičkog stresa (Obata i Fernie, 2012). Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima ukazuju na mnoge metaboličke promene u biljkama u uslovima abiotičkog stresa, koje nastaju usled inhibicije enzima, nedostatka supstrata, povećanih zahteva biljke ka specifičnim jedinjenjima ili kombinacijom svih ovih faktora. Stoga, metabolizam biljaka prolazi kroz razne promene kako bi se u izmenjenim uslovima sredine održale reakcije primarnog metabolizma i biljka što bolje prilagodila. Određivanje ključnih metabolita, enzimskih markera i odgovarajućih gena kod kojih dolazi do značajnih promena u uslovima stresa omogućuje rasvetljavanje mehanizama otpornosti biljaka. *In vitro* kultura ćelija i kultura tkiva mogu poslužiti kao korisno sredstvo za proučavanje različitih mehanizama tolerancije na stres s obzirom da dozvoljavaju relativno brz odgovor, kratko vreme regeneracije, kontrolisanje uslova spoljašnje sredine, što je posebno značajno kod drvenastih vrsta koje imaju duge reproduktivne cikluse. Iako je odgovor na vodni stres proučavan ranije kod vrsta *Populus euphratica*, *Populus deltoides* i *Populus euroamericana* (Gebre i sar., 1994; Watanabe i sar., 2000; Guerrier i sar., 2000), ekonomski najvažnija hibridna topola u Panonskom regionu, klon M-1, do sad nije ispitana. U skladu sa navedenim, u okviru ove teze ispitan je odgovor crne hibridne topole (*Populus deltoides* x *Populus nigra*; M-1 klon) u *in vitro* kulturi tkiva na vodni stres izazvan sa PEG 6000. Klon M-1 se izdvojio po superiornom regenerativnom

potencijalu, pa su odsecci listova *in vitro* regenerisanih biljaka ovog klona korišćeni kao izvor eksplantata. Antioksidantni status ispitan je kroz ključne antioksidantne enzime SOD, CAT, GPx, GSH-Px, GR, količinu glutaciona, sadržaj ukupnih fenola, enzima PAL, PPO, antioksidantnog kapaciteta (DPPH i FRAP test), količine RNOS, vijabilnosti ćelije, parametre oksidativnog stresa (količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA i sadržaj oksidovanih proteina), zatim parametre osmotskog stresa GB, prolin i enzim prolin-dehidrogenaza (PDH). Uzimajući u obzir dobijene rezultate, primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između određivanih parametara (Tabela 4.1) sa značajnosti  $p < 0.01$ .

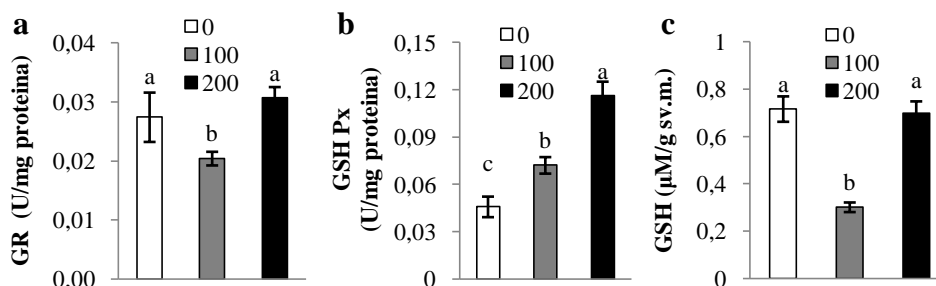
#### 4.1.1. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost antioksidantnih enzima

Na Slikama 4.1 i 4.2 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost antioksidantnih enzima i količinu glutaciona u listu kulture tkiva klona topole M-1. U kontroli aktivnosti enzima su iznosile: 32.37 U/mg proteina za SOD, 12.46 U/mg proteina za GPx; 38.0 mU/mg proteina za CAT; 0.027 U/mg proteina za GR; 0.046 U/mg proteina za GSH-Px i 0.716  $\mu$ mol/g sveže mase (sv.m.) za količinu glutaciona. Najveće i statistički značajne promene su zabeležene pod uticajem 200 mOsm stresa kod aktivnosti SOD (51.5 U/mg proteina, za 59.1% veća u odnosu na kontrolu), GPx (22.29 U/mg proteina, za 78.8% veća u odnosu na kontrolu) i GSH-Px (0.12 U/mg proteina, za 152.8% veća u odnosu na kontrolu). Manja, ali statistički značajna povećanja aktivnosti CAT i GSH-Px utvrđena su pod uticajem 100 mOsm stresa, kao i smanjenje aktivnosti GR za 25.5% u odnosu na kontrolu. Količina glutaciona se statistički značajno smanjila u odnosu na kontrolu kod tretmana 100 mOsm (za 57.8%).



Slika 4.1. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost superoksid-dismutaze (a), gvajakol-peroksidaze (b) i katalaze (c)

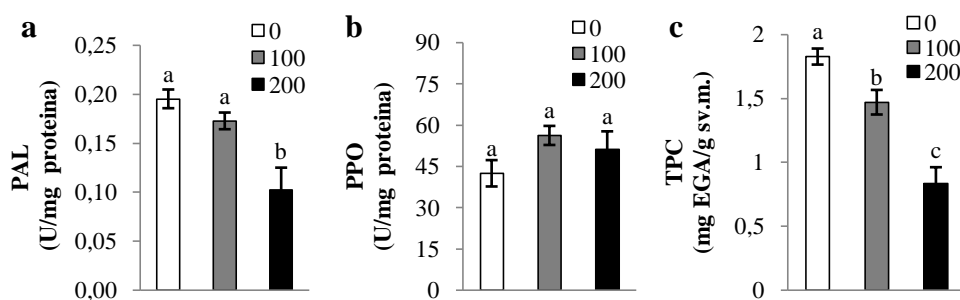
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )



**Slika 4.2.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost glutation-reduktaze (a), glutation-peroksidaze (b) i količinu GSH (c)  
Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

#### 4.1.2. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj fenola i antioksidantnu aktivnost ekstrakata

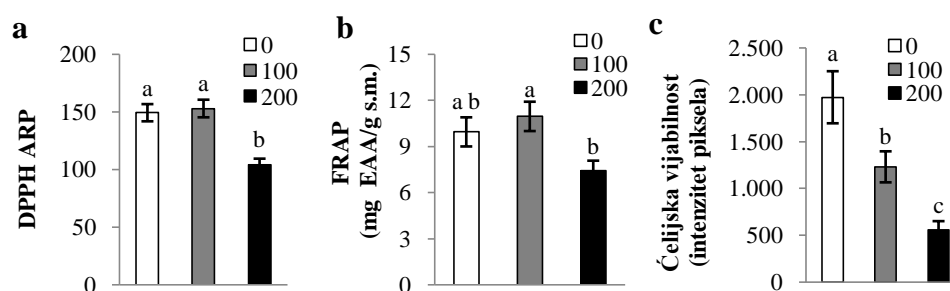
Rezultati ispitivanja aktivnosti PAL i PPO kao i ukupnog sadržaja fenola dati su na *Slici 4.3*. U kontroli aktivnosti enzima su iznosile: PAL 0.195 U/mg proteina i PPO 42.47 U/mg proteina, dok je sadržaj ukupnih fenola iznosio 1.83 mg ekvivalenta galne kiseline/g sveže mase (EGA/g sv.m.). Pod uticajem 200 mOsm stresa TPC i PAL su statistički značajno opali, za 54.1% i 47.5% redom. Aktivnost PPO se nije statistički značajno menjala pri tretmanima u odnosu na kontrolu.



**Slika 4.3.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost fenilalanin-amonijumlijaze (a), polifenol-oksidge (b) i sadržaj ukupnih fenola (c)  
Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na antioksidantnu aktivnost, redukcionu potencijal i ćelijsku vijabilnost prikazani su na *Slici 4.4*.



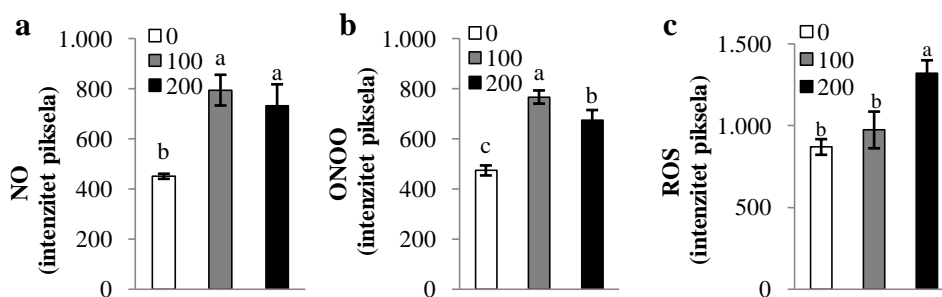


**Slika 4.4.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na DPPH antioksidantnu aktivnost (a), FRAP vrednost (b) i ćelijsku vijabilnost (c)  
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Antioksidantna aktivnost izražena je pomoću ARP vrednosti koja predstavlja recipročnu vrednost  $IC_{50}$  vrednosti i korišćena je za prikazivanje DPPH antiradikalne aktivnosti ekstrakta. Redukcioni potencijal određen je FRAP testom i izražen je u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suve mase (EAA/g s.m.) U kontroli su zabeležene sledeće vrednosti: 149.2 DPPH ARP, 9.95 mg EAA/g s.m. dok je ćelijska vijabilnost iznosila 1974.2. Pri 200 mOsm stresu antioksidantna aktivnost ekstrakta je opala za 25.5% (FRAP vrednost) i 30.2% (DPPH ARP). Takođe, sa stresom vijabilnost ćelija je opadala (pri 200 mOsm za 71.7%).

#### 4.1.3. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj RNOS i parametre oksidativnog stresa

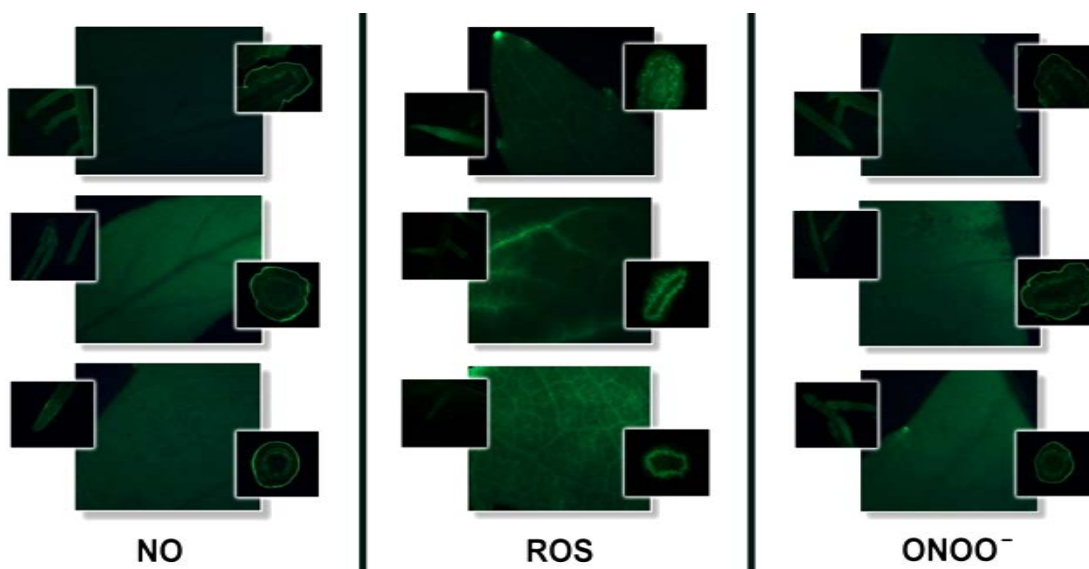
Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na nivo reaktivnih azotnih ( $NO^*$  i  $ONOO^-$ ) i kiseoničnih (ROS) vrsta u listu iz kulture tkiva topole M-1 određen je fluorescentnom detekcijom pomoću fluorescentnog mikroskopa i rezultati su prikazani na Slici 4.5. Kako bi rezultati snimljenih slika na mikroskopu (Slika 4.6) bili statistički obradivi i uporedivi, pomoću programa je izračunat intenzitet fluorescencije, odnosno broj piksela boje po slici. Dobijeni rezultati predstavljaju prosečnu vrednost nakon obrade 15 slika po svakom prosečnom uzorku.



Slika 4.5. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj NO• (a), ONOO<sup>-</sup> (b) i ROS (c)

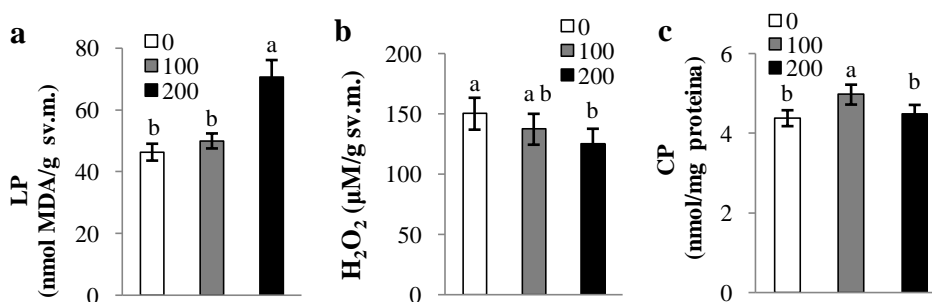
Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

U kontroli lista kulture tkiva topole M-1 određene su sledeće vrednosti za RNOS: 450.75 (za NO•), 474.19 (za ONOO<sup>-</sup>) i 869.74 (za ROS) izražene u relativnim jedinicama. Kao što se vidi na Slici 4.5. pod uticajem vodnog stresa pri 100 mOsm i 200 mOsm došlo je do povećanja svih ispitanih reaktivnih vrsta. Najveće povećanje ROS je zabeleženo pri najvećoj koncentraciji PEG 6000 (za 51.8%). Najveće povećanje reativnih azotnih vrsta je zabeleženo pri 100 mOsm stresu i to za 76.3% NO• i 61.7% za ONOO<sup>-</sup>.



Slika 4.6. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ROS, NO•, ONOO<sup>-</sup> u listu kontrolne (gore), pri 100 mOsm tretmanu (sredina) i pri 200 mOsm tretmanu (dole)

Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na parametre oksidativnog stresa (količinu malonildialdehida, količinu vodonik peroksida i količinu karbonil proteina) dat je na Slici 4.7.

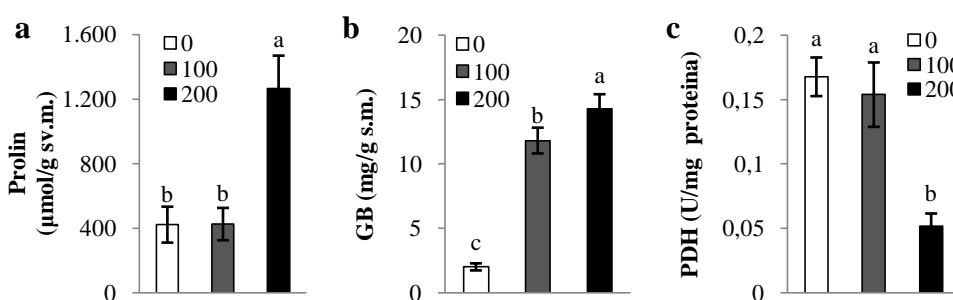


Slika 4.7. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na intenzitet lipidne peroksidacije (a), količinu vodonik peroksida (b) i intenzitet oksidacije proteina (c). Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

U kontroli lista kulture tkiva topole M-1 određene su sledeće vrednosti za MDA 46.37 nmol/g sv. m., za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150.41 μmol/g sv. m. i za oksidovane proteine 4.39 nmol karbonil proteina/mg proteina. Vodni stres doveo je do povećanja sadržaja MDA pri 200 mOsm stresu za 52.4%, zatim pri 100 mOsm stresu do povećanja karbonil proteina za 13.5%, dok je količina vodonik peroksida statistički značajno opala pri 200 mOsm tretmanu u odnosu na kontrolu za 16.6%.

#### 4.1.4. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na osmotske parametre

Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na osmotske parametre (količinu prolina, sadržaj GB i aktivnost enzima PDH) dat je na Slici 4.8.



Slika 4.8. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na količinu prolina (a), sadržaj glicin-betaina (b) i aktivnost prolina-dehidrogenaze (c). Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

U kontroli lista kulture tkiva topole M-1 određene su sledeće vrednosti: za prolin 422.37 μmol/g sv. m., zatim za glicin-betain 2.01 mg/g s.m. i aktivnost prolina

dehidrogenaze 0.168 U/mg proteina. Najveće i statistički značajno povećanje prolina i GB utvrđeno je pri 200 mOsm stresu i to za 199.3% i 611.0%, redom. Značajan pad aktivnosti PDH uočen je pri 200 mOsm stresu (za 69.2%).

#### 4.1.5. Korelaciona analiza analiziranih parametara

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između određivanih parametara (*Tabela 4.1*) sa značajnosti  $p < 0.01$ .

Regresiona analiza, primenjena na dobijene rezultate pokazuje da postoji visok stepen korelacije između SOD i GSH-Px ( $r = 0.914$ ), zatim između SOD i nivoa ROS ( $r = 0.988$ ), između SOD i LP ( $r = 0.814$ ) i između SOD i prolina ( $r = 0.989$ ). Enzim SOD katalizuje pretvaranje superoksid anjon radikala u  $H_2O_2$  i može biti indukovana povećanim nivoom ROS (*Slika 4.5. c*). Badiani i saradnici (1990) su takođe utvrdili povećanje aktivnosti SOD u pšenici pri vodnom stresu izazvanim sa PEG 6000. Značajna negativna korelacija utvrđena je između CAT i GSH ( $r = -0.827$ ), kao i visoka, ali nesignifikantna pozitivna korelacija između sadržaja GSH i aktivnosti GR. Rezultati Türkan i saradnika (2005) koji ukazuju na značajnu indukciju biljnih peroksidaza i manju osetljivost CAT u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 su u skladu sa rezultatima ove teze (*Slike 4.1 i 4.2*). GR ima važnu ulogu u uslovima oksidativnog stresa, jer prevodi oksidovani glutation GSSG u redukovanu formu GSH, koji predstavlja jedan od najvažnijih antioksidanta u ćelijama svih živih bića (Halliwell, 1989). Malo, ali značajno smanjenje aktivnosti GR je zabeleženo pri 100 mOsm stresu i u pozitivnoj je korelaciji sa smanjenjem nivoa GSH (*Slika 4.2.*). Rezultati Türkan i saradnika (2005) koji su povećanje aktivnosti GR zabeležili tek nakon 7 dana tretmana PEG 6000, su u skladu sa našim rezultatima. Mnogi drugi autori su utvrdili da vodni stres indukuje različite segmente antioksidantnog odgovora i povećava aktivnost antioksidantnih enzima (Egert i Tevini, 2002; Iqbal i Bano, 2009; Qi-lin i sar., 2009).

Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između TPC i PAL ( $r = 0.954$ ), kao i njihova pozitivna korelacija sa aktivnosti PDH ( $r = 0.928$  za TPC i  $r = 0.904$  za PAL). TPC i PAL su pokazali značajnu negativnu korelaciju ( $r \geq 0.9$ ) sa aktivnostima SOD i GSH-Px, ROS i prolinom. Barchet i saradnici (2014) su pri ispitivanju metaboličkog profila hibridnih topola u uslovima suše ukazali na promene određenih metabolita gde od fenolnih komponenti dolazi do povećanja katehina i kemferola. Povezanost aktivnosti

PAL i akumulacije polifenola u ćelijskoj suspenziji hibridne topole je prvi put zabeleženo od strane Matsumoto i saradnika (1973).

Značajna pozitivna korelacija je nađena za oba antioksidantna parametra ( $r = 0.820$ ). DPPH ARP je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ćelijskom vijabilnosti ( $r = 0.808$ ) i negativnoj sa aktivnosti enzima SOD ( $r = -0.902$ ) i GSH-Px ( $r = -0.803$ ). Visoke i pozitivne korelacije između FRAP i DPPH ARP parametara su povezane sa istim antioksidantnim mehanizmom na kojima se zasnove ove metode, a to je prenos jednog elektrona (Popović i sar., 2012). Smanjene vrednosti oba parametra u uslovima vodnog stresa se mogu objasniti smanjenim sadržajem polifenola koji su glavni „hvatači” ROS. Ćelijska smrt je sastavni deo rasta i razvoja biljaka i često se dešava kao reakcija na intenzivan stres, tokom nedostatka vode kao i pri akumulaciji ROS. Bojenje sa fluorescein diacetatom (FDA) predstavlja jednostavan način za vizuelizaciju i merenje vijabilnosti ćelije, odnosno živih ćelija sa celom plazma membranom (Kolbert i sar., 2012). Značajno smanjenje ćelijske vijabilnosti je povezano sa porastom intenziteta stresa i takođe sa akumulacijom RNOS i MDA (Slika 4c, 5, 7).

Nivoi  $\text{NO}^{\cdot}$  i  $\text{ONOO}^{-}$  su u značajnoj pozitivnoj korelaciji međusobno ( $r = 0.990$ ) kao i sa aktivnostima enzima GPx i sa GB ( $r > 0.8$ ). Nivo ROS je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa aktivnostima enzima SOD i GSH-Px i prolinom ( $r = 0.988, 0.945$  i  $0.963$ , redom) i u značajnoj negativnoj korelaciji sa aktivnosti enzima PAL ( $r = -0.948$ ), TPC parametrom ( $r = -0.978$ ), DPPH ARP ( $r = -0.855$ ), ćelijskom vijabilnosti ( $r = -0.901$ ) i aktivnosti enzima PDH ( $r = -0.955$ ). Poznato je da su RNOS, pored toksičnih efekata koje ispoljavaju, uključeni u signalne kaskade tokom različitih štetnih i normalnih uslova (Apel i Hirt, 2004). RNOS utiču na ekspresiju mnogih gena i na mnoge procese kao što su ćelijski ciklus, odgovori na abiotički stres, odbrana na patogene, rast i razvoj (Gill i Tuteja, 2010). Značajna pozitivna korelacija određenih RNOS sa nekim antioksidantnim enzimima kao što je SOD, GPx i GSH-Px kao i osmolitima GB i prolinom mogu biti povezani sa njihovom signalnom ulogom. Sa druge strane, negativna korelacija sa polifenolnim parametrima, antioksidantnom aktivnošću i PDH enzimom se može objasniti inhibitornim uticajem RNOS na pomenute parametre vodnog stresa.

Najveća i značajna korelacija je utvrđena između  $\text{H}_2\text{O}_2$  i ćelijske vijabilnosti ( $r = 0.914$ ). Takođe značajne pozitivne korelacije utvrđene su između  $\text{H}_2\text{O}_2$  i DPPH ARP ( $r = 0.813$ ), zatim između LP i aktivnosti SOD ( $r = 0.814$ ) i sadržaja prolina ( $r = 0.863$ ). Ispitivanje nivoa MDA u uslovima vodnog stresa je bilo predmet mnogih istraživanja

(Vendruscolo i sar., 2007; Yang i sar., 2009). Prema Chmielowska-Bąk i saradnicima (2015) proizvodi oksidacije lipida i proteina predstavljaju signale i regulatore ekspresije gena u biljkama i mogu pokrenuti aktivaciju esencijalnih odbrambenih mehanizama tokom stresa što može objasniti rezultate dobijene u ovoj tezi (pozitivnu korelaciju između LP, aktivnosti SOD i sadržaja prolina). Nasuprot očekivanjima, jedan od glavnih ROS, vodonik peroksid se smanjio pri stresu. Međutim, pozitivna korelacija između količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i važnih parametara kao što je ćelijska vijabilnost i DPPH ARP potvrđuju kompleksnu regulaciju unutarćelijskog nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri vodnom stresu.

Značajan pad aktivnosti PDH uočen je pri 200 mOsm stresu (za 69.2%) kao i značajna negativna korelacija između prolina i aktivnosti PDH enzima ( $r = -0.915$ ). Sadržaj prolina je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa SOD, GSH-Px, količinom ROS i LP ( $r = 0.989, 0.884, 0.963$  i  $0.863$ , redom) i u značajnoj negativnoj korelaciji sa PAL enzimom, TPC, DPPH ARP i ćelijskom vijabilnošću ( $r = -0.878, -0.904, -0.951$  i  $-0.843$ , redom). Nasuprot prolinu, PDH je u značajno negativnoj korelaciji sa SOD ( $r = -0.951$ ), GSH-Px ( $r = -0.840$ ), ROS ( $r = -0.955$ ), prolinom ( $r = -0.915$ ) i značajno pozitivnoj korelaciji sa TPC i PAL ( $r > 0.9$ ). Glicin-betain je u značajno pozitivnoj korelaciji sa GPx ( $r = 0.868$ ) i NO<sup>•</sup> i ONOO<sup>-</sup> ( $r = 0.880$  i  $0.817$ , redom) i u značajno negativnoj korelaciji sa ćelijskom vijabilnošću ( $r = -0.927$ ) i količinom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $r = -0.843$ ).

Prolin i kvaternerna amonijumova jedinjenja predstavljaju važne osmolite (Huang i sar., 2000). Prolin se akumulira u biljkama kod mnogih vrsta kao odgovor na različite stresne uslove. Uloga prolina je opisana u *Poglavlju 2.1.1.4.1*. Smatra se da prolin deluje kao osmolit, ROS skevindžer, čaperon koji stabilizuje strukturu proteina i inhibira programiranu ćelijsku smrt (Krasensky i Jonak, 2012). Nivo prolina je određen ravnotežom između biosinteze i katabolizma što objašnjava veoma negativnu korelaciju ( $r = -0.915$ ) između količine prolina i aktivnosti PDH koji je ključni enzim katabolizma (Szabados i Savoure, 2010). U mnogim radovima je utvrđen povećan nivo prolina u uslovima suše ili osmotskim stresom (Vendruscolo i sar., 2010; Szabados i Savoure, 2010; Krasensky i Jonak, 2012). Prema Szabados i Savoure (2010) prolin je multifunkcionalna amino kiselina i signalni molekul uključen u odgovor biljke na stres što u ovoj tezi može objasniti mnoge korelacije prolina sa drugim biohemijskim parametrima.

Kvaternerno amonijumovo jedinjenje, glicin-betain, je važan osmoprotektant koji se javlja u odgovoru na osmotski stres (Chen i Murata, 2011; Gorham, 1995; Manivannan i sar., 2007). I pored mnogo rada na tome da se stvore biljke sa povećanim nivoom prolina i GB, transgene biljke pokazuju ograničene mogućnosti proizvodnje ovih jedinjenja u dovoljnim količinama kako bi izbegle efekte stresa (Ashraf i Foolad, 2007). Sa druge strane, alternativni načini koji uključuju spoljašnje tretmane biljaka sa prolinom (Sorkheh i sar., 2012), GB (Ashraf i Foolad, 2007) i NO<sup>•</sup> donorima (Wang i sar., 2005) su pokazali velike varijacije između biljaka i odgovora na tretman. I dalje, ispitivanje akumulacije korisnih metabolita kod različitih genotipova pod uticajem vodnog stresa u saradnji sa selekcionarima predstavlja efikasan način kojim se dolazi do proizvodnje novih genotipova sa poboljšanom otpornosti na stres.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se reći da je kultura tkiva klona M-1 relativno osetljiva na vodni stres izazvan sa PEG 6000. Ovo je vidljivo po smanjenju ćelijske vijabilnosti i povećanju ROS kao i lipidne peroksidacije u uslovima stresa. Značajna biohemijska reakcija na vodni stres je manifestovana kroz akumulaciju osmolita prolina i glicin-betaina u velikim količinama što ukazuje na potencijal ovog hibrida topole da razvije toleranciju tokom vodnog stresa. Antioksidantni enzimi i redukovani glutation su slabo indukovani, a TPC i antioksidantna aktivnost se smanjuje tokom stresa. Na osnovu dobijenih rezultata odgovor kulture tkiva topole na vodni stres izazvan sa PEG 6000 se sastoji uglavnom u akumulaciji prolina i glicin-betaina. Neophodna su dalja ispitivanja kako bi se detaljno ispitali biohemijski mehanizmi otpornosti različitih klonova topole, kao i nastavili napori da se proizvede tolerantniji klon topole na vodni stres.

Tabela 4.1. Korelacioni faktor (r) između ispitanih parametara pri značajnosti  $p < 0.01$ 

	SOD	GPx	CAT	GR	GSH-Px	GSH	PAL	PPO	TPC	DPPH ARP	FRAP	FDA	NO'	ONOO	ROS	LP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CP	PRO	PDH	
SOD	1.000																				
GPx	0.526																				
CAT	-0.482	0.381																			
GR	0.526	0.143	-0.564																		
GSH-Px	<b>0.915</b>	0.650	-0.212	0.255																	
GSH	0.404	-0.414	<b>-0.827</b>	0.752	0.127																
PAL	<b>-0.930</b>	-0.570	0.263	-0.395	<b>-0.897</b>	-0.249															
PPO	0.060	0.304	0.239	-0.649	0.288	-0.577	0.037														
TPC	<b>-0.944</b>	-0.730	0.226	-0.423	<b>-0.920</b>	-0.157	<b>0.954</b>	-0.092													
DPPH ARP	<b>-0.902</b>	-0.424	0.529	-0.562	<b>-0.803</b>	-0.451	0.735	-0.118	0.772												
FRAP	-0.671	-0.131	0.441	-0.350	-0.616	-0.388	0.617	0.014	0.509	<b>0.820</b>											
FDA	<b>-0.852</b>	<b>-0.823</b>	0.055	-0.219	<b>-0.920</b>	0.077	<b>0.807</b>	-0.415	<b>0.907</b>	<b>0.808</b>	0.555										
NO	0.429	<b>0.886</b>	0.474	-0.247	0.644	-0.604	-0.547	0.531	-0.664	-0.227	-0.003	-0.756									
ONOO	0.306	<b>0.846</b>	0.564	-0.336	0.542	-0.687	-0.449	0.529	-0.565	-0.088	0.114	-0.657	<b>0.990</b>								
ROS	<b>0.988</b>	0.627	-0.363	0.440	<b>0.945</b>	0.271	<b>-0.948</b>	0.135	<b>-0.978</b>	<b>-0.855</b>	-0.605	<b>-0.901</b>	0.562	0.449							
LP	<b>0.814</b>	0.510	-0.349	0.396	0.708	0.265	-0.640	0.313	-0.732	<b>-0.907</b>	-0.618	<b>-0.828</b>	0.357	0.235	0.795						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.678	-0.729	0.014	-0.178	-0.758	0.117	0.561	-0.496	0.687	<b>0.813</b>	0.616	<b>0.915</b>	-0.588	-0.487	-0.705	<b>-0.845</b>					
CP	-0.121	0.443	0.637	-0.497	0.087	-0.683	-0.125	0.242	-0.165	0.467	0.559	-0.102	0.706	0.787	0.021	-0.326	0.155				
PRO	<b>0.989</b>	0.487	-0.539	0.562	<b>0.884</b>	0.448	<b>-0.878</b>	0.073	<b>-0.904</b>	<b>-0.951</b>	-0.719	<b>-0.843</b>	0.354	0.223	<b>0.963</b>	<b>0.863</b>	-0.721	-0.246			
PDH	<b>-0.951</b>	-0.500	0.492	-0.463	<b>-0.840</b>	-0.351	<b>0.904</b>	-0.057	<b>0.928</b>	0.751	0.466	0.768	-0.469	-0.367	<b>-0.956</b>	-0.701	0.509	-0.070	<b>-0.915</b>		
GB	0.656	<b>0.868</b>	0.176	-0.026	0.752	-0.366	-0.660	0.550	-0.796	-0.583	-0.315	<b>-0.927</b>	<b>0.880</b>	<b>0.817</b>	0.744	0.727	<b>-0.843</b>	0.331	0.636	-0.628	



## ***4.2. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na antioksidantni sistem, parametere oksidativnog stresa i metabolizam prolina i glicin-betaina u listu i korenu odabranih klonova topole***

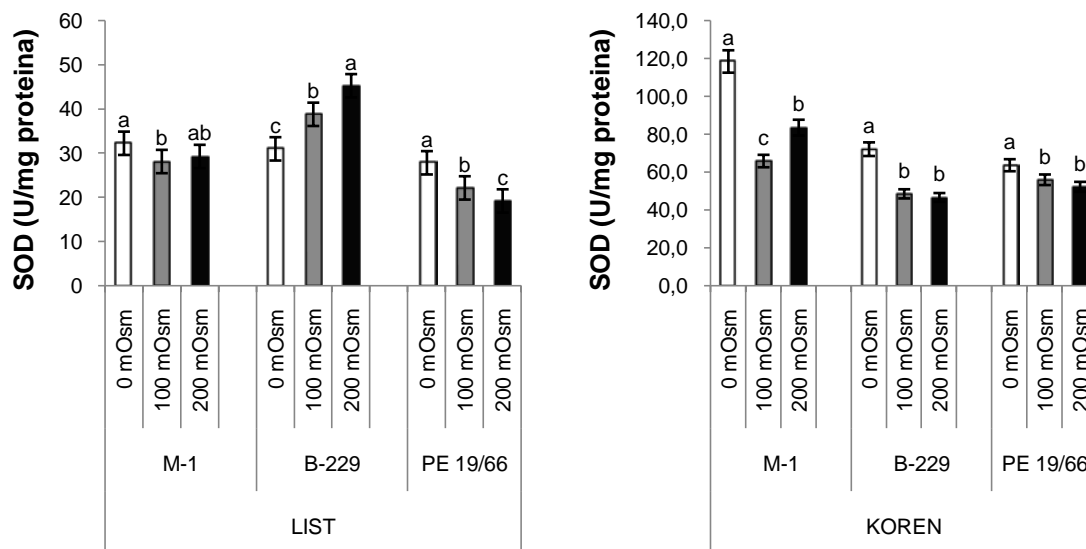
**T**okom vodnog stresa povećana je produkcija ROS koje mogu izazvati različita oštećenja u ćeliji (Kirakosyan i sar., 2004; Popović i Štajner, 2008; Łabanowska i sar., 2013). Naime, oksidativni stres, kao što je navedeno u *Poglavlju 2.2.*, se javlja kao reakcija na vodni stres usled promena u ravnoteži između nastanka i uklanjanja ROS, pri čemu se mogu oštetiti ćelijske membrane i makromolekuli. Da bi se zaštitile od štetnog uticaja ROS, ćelije poseduju razne mehanizme neutralizacije ROS, a koji od njih će biti aktiviran zavisi od uslova sredine, fizioloških uslova u biljci kao i od faze razvoja (Asada, 1999). U skladu sa navedenim, u okviru ove teze ispitana je aktivnost različitih komponenti antioksidantnog sistema zaštite u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 primenom različitih metoda.

### ***4.2.1. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost antioksidantnih enzima***

Na *Histogramu 4.1.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost superoksid-dismutaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost SOD je izražena u U/mg proteina i u kontrolama u listu iznosila je: 32.2 (M-1), 31.0 (B-229) i 27.8 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 28.1-29.3 U/mg proteina (M-1), 38.8-45.3 U/mg proteina (B-229) i 19.2-22.1 U/mg proteina (PE19/66). Aktivnost SOD se smanjivala pri tretmanima kod klona M-1, ali kod 200 mOsm tretmana nije utvrđena značajna promena u odnosu na kontrolu. Kod klona B-229 aktivnost se značajno povećavala pri svim tretmanima, a najizrazitije povećanje aktivnosti uočeno je kod 200 mOsm tretmana (za 46.2%). Kod klona PE19/66 aktivnost SOD se značajno smanjivala sa povećanjem stresa i to najviše kod tretmana 200 mOsm (za 31.1%).

Aktivnost SOD u korenu u kontrolama je iznosila: 118.5 (M-1); 72.1 (B-229) i 63.6 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 65.8-83.5 U/mg proteina (M-1), 46.6-48.5 U/mg proteina (B-229) i 52.2-55.9 U/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova, aktivnost SOD se značajno smanjivala pri vodnom

stresu, a najveće smanjenje je uočeno kod M-1 klona i iznosilo je 44.5% u odnosu na kontrolu, pri 100 mOsm tretmanu.



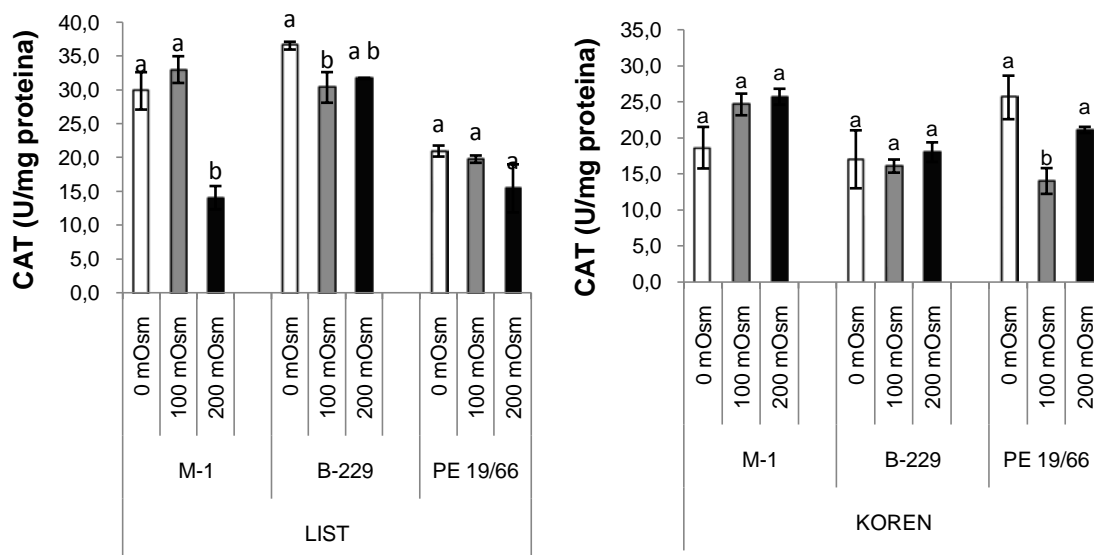
*Histogram 4.1.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost superoksid-dismutaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

Rezultat izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju prema Duncun-ovom testu ( $p < 0.05$ )

Superoksid-dismutaza ima važnu ulogu u enzimskom antioksidantnom sistemu jer reguliše nivo  $O_2^{\bullet -}$  u ćelijama i smanjuje mogućnost formiranja  $HO^{\bullet}$  radikala (Sofo i sar., 2005). Iz priloženih rezultata vidi se da vodni stres izazvan sa PEG 6000 dovodi do indukcije aktivnosti SOD samo u listovima topole klona B-229. U svim drugim slučajevima aktivnost SOD se smanjuje. Može se pretpostaviti da SOD igra važnu ulogu u razvijanju otpornosti pojedinih klonova topole na vodni i oksidativni stres u pojedinim organima. Ovo je u skladu sa rezultatima Lei i saradnika (2006) i Guo i saradnika (2010) koji su utvrdili da suša može izazvati povećanje aktivnosti SOD i da ovaj enzim doprinosi razvoju rezistentnosti na sušu kod topole. Slične rezultate dobili su i drugi autori koji su ispitali odgovor topole na abiotički stres (Xu i sar., 2008; Zhao i sar., 2009; Zhang i sar., 2010, 2011). Vodni stres izazvan sa PEG 6000 indukovao je aktivnost SOD kod mente, dok je stres izazvan vodom u višku izazvao smanjenje aktivnosti SOD što se objašnjava smanjenom dostupnošću kiseonika, jer je u vodi smanjena difuzija i rastvorljivost kiseonika (Candan i Tarhan, 2012). Rezultati koji se odnose na smanjenu aktivnost SOD u korenu u uslovima vodnog stresa su u skladu sa tvrdnjama i drugih autora koji objašnjavaju da je SOD mnogo osetljivija u odnosu na druge antioksidantne enzime u uslovima suše (Liang i sar., 2016; Zhang i sar., 2016). Drugi autori su smanjenje aktivnosti SOD u uslovima oksidativnog stresa, izazvanog deficitom vode i sonim

stresom objasnili formiranjem  $H_2O_2$  koji je inhibitor određenih izoformi enzima SOD (Huseynova i sar., 2014).

Na *Histogramu 4.2.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost katalaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost CAT izražena je u U/mg proteina i u listu u kontrolama iznosila je: 29.8 (M-1), 36.5 (B-229) i 20.9 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost CAT se menjala u opsegu od: 14.1-33.0 U/mg proteina (M-1), 30.4-31.7 U/mg proteina (B-229) i 15.4-19.8 U/mg proteina (PE19/66). Kod klonova B-229 i PE19/66 pri tretmanima sa PEG 6000 došlo je do smanjenja aktivnosti CAT u odnosu na kontrole, ali samo kod klona B-229 kod 100 mOsm tretmana utvrđena promena je statistički značajna. Aktivnost CAT se kod klona M-1 pri 200 mOsm tretmanu statistički značajno smanjila (za 52.9%), dok je pri 100 mOsm tretmanu bila neznatno viša od kontrole.



*Histogram 4.2.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost katalaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

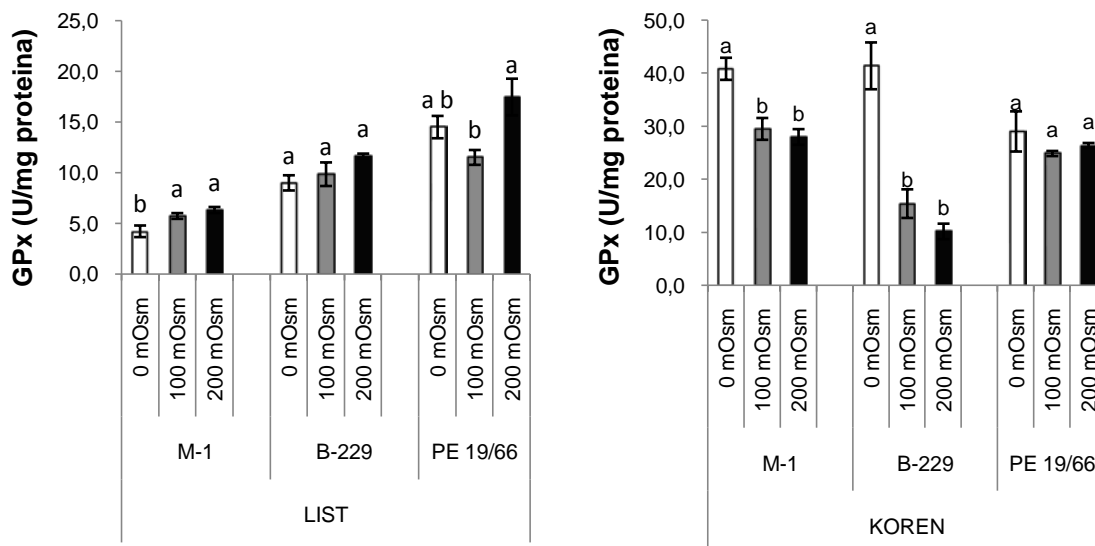
Rezultat izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Aktivnost CAT izražena u U/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 18.6 (M-1), 17.0 (B-229) i 25.6 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 24.6-25.7 U/mg proteina (M-1), 16.1-18.0 U/mg proteina (B-229) i 14.0-21.1 U/mg proteina (PE19/66). Kod klona M-1 aktivnost CAT se povećavala pri vodnom stresu, ali utvrđene promene nisu bile statistički značajne. Takođe, kod klona B-229 nema statistički značajnih promena u odnosu na kontrolu. Kod klona PE19/66 aktivnost CAT se smanjivala sa povećanjem stresa i to najviše kod 100 mOsm tretmana (za 45.3%).

Liu i saradnici (2010) su utvrdili postepeno povećanje aktivnosti CAT sa povećanjem intenziteta suše kod četiri vrste drveća (*Broussonetia papyrifera*, *Cinnamomum bodinieri*, *Platycarya longipes* i *Pteroceltis tatarinowii*), ali pri dužem izlaganju i najintenzivnijem stresu zabeležen je pad aktivnosti kod dve vrste (*Cinnamomum bodinieri* i *Pteroceltis tatarinowii*), što je u skladu sa našim rezultatima. Podaci o delovanju suše na aktivnost CAT variraju u zavisnosti od biljne vrste. Tako su Zhang i Kirkham (1996) zabeležili da aktivnost katalaze u suncokretu i sirku opada pri suši. Međutim, Sayfzadeh i Rashidi (2011) su zabeležili povećanje aktivnosti CAT u listovima kod tri sorte šećerne repe.

Na *Histogramu 4.3.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost GPx izražena je u U/mg proteina i u listu u kontrolama je iznosila: 4.2 (M-1), 9.0 (B-229) i 14.5 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost GPx se menjala u opsegu od: 5.7-6.3 U/mg proteina (M-1), 9.8-11.6 U/mg proteina (B-229) i 11.5-17.5 U/mg proteina (PE19/66). Samo kod klona M-1 su utvrđene značajne promene aktivnosti u odnosu na kontrolu pri 100 mOsm i 200 mOsm tretmanima, i to povećanja za 36% i 50.1%, redom. Kod klona PE19/66 i B-229 promene aktivnosti GPx pri tretmanima nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu.

Aktivnost GPx izražena u U/mg proteina u korenu u kontrolama je iznosila: 40.9 (M-1), 41.4 (B-229) i 29.0 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost GPx se menjala u opsegu od: 28.0-29.5 U/mg proteina (M1), 10.1-15.4 U/mg proteina (B-229) i 24.9-26.4 U/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova, aktivnost GPx se smanjivala pri vodnom stresu, a najizrazitije smanjenje aktivnosti uočeno je kod B-229 klona kod 200 mOsm tretmana (za 75.5%). Kod klona PE19/66 nisu zabeležene statistički značajne promene.



*Histogram 4.3.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost gvajakol-peroksidaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

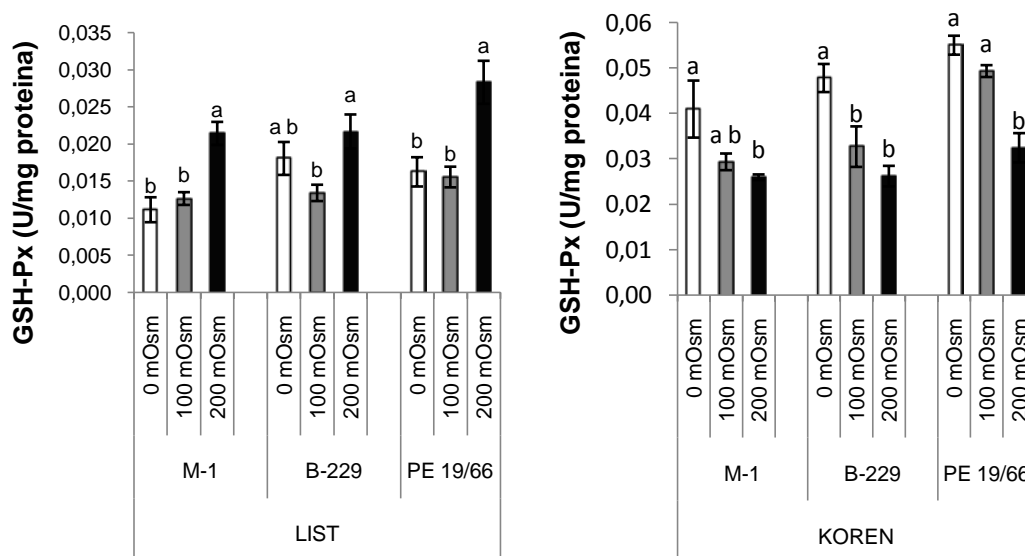
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Može se zaključiti da vodni stres izazvan sa PEG 6000 dovodi do indukcije aktivnosti GPx u listovima ispitanih klonova topola, dok u korenu dolazi do smanjenja aktivnosti ili nema promene u odnosu na kontrolu. I drugi autori navode da vodni stres utiče na promenu aktivnosti GPx kod biljaka (Sofa i sar., 2005; Türkan i sar., 2005). Kumar i saradnici (2011) ukazuju da biljke kod kojih je utvrđena veća aktivnost GPx pokazuju i veću otpornost na delovanje vodnog i oksidativnog stresa. Guo i saradnici (2010) su zabeležili povećanje aktivnost GPx u uslovima vodnog deficita kod tri hibridne topole.

Na *Histogramu 4.4.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost glutation-peroksidaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost GSH-Px izražena u U/mg proteina je u listu u kontrolama iznosila: 0.011 (M-1), 0.018 (B-229) i 0.016 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost GSH-Px se menjala u opsegu od: 0.013-0.021 U/mg proteina (M-1), 0.013-0.022 U/mg proteina (B-229) i 0.016-0.028 U/mg proteina (PE19/66). Kod klonova M-1 i PE19/66 utvrđena su statistički značajna povećanja aktivnosti kod 200 mOsm tretmana, za 92.5% i 74.4%, redom. Kod klona B-229 pri 100 mOsm tretmanu aktivnost se smanjila, a pri 200 mOsm povećala, međutim zabeležene promene nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu.

Aktivnost GSH-Px izražena u U/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 0.041 (M-1), 0.048 (B-229) i 0.055 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000

aktivnost GSH-Px se menjala u opsegu od: 0.026-0.029 U/mg proteina (M-1), 0.026-0.033 U/mg proteina (B-229) i 0.032-0.049 U/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova, aktivnost GSH-Px se smanjivala pri vodnom stresu, a najizrazitija smanjenja aktivnosti uočena su pri 200 mOsm tretmanu (kod M-1 klonu za 36.6%, kod B-229 klonu za 45.2% i kod PE19/66 klonu za 41%).



*Histogram 4.4.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost glutatión peroksidaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

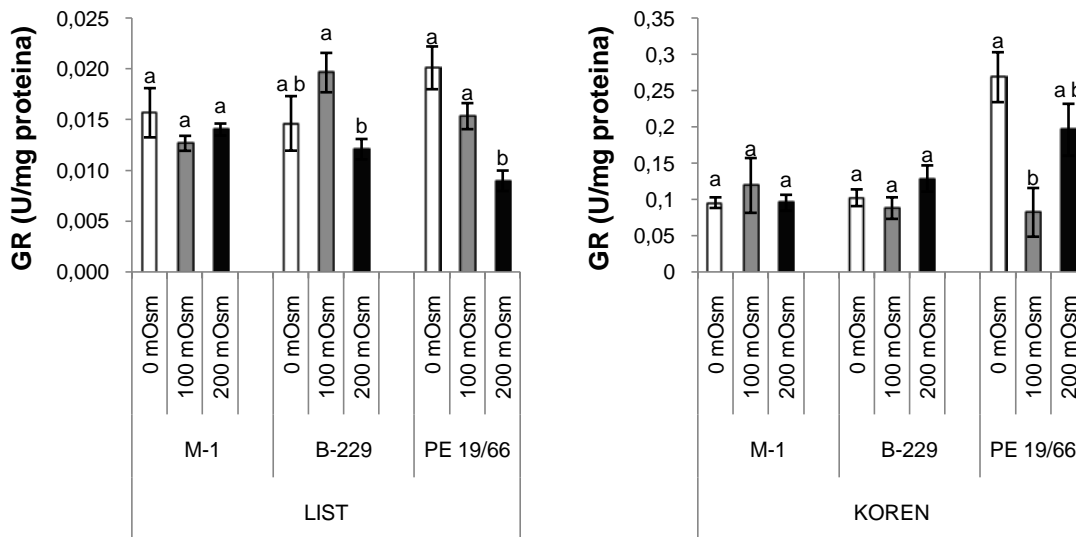
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Yang i saradnici (2009) ukazuju da biljke kod kojih je određena veća aktivnost antioksidantnih enzima u uslovima suše, među kojima je i GSH-Px pokazuju i veću otpornost na delovanje vodnog stresa. Ahmed i saradnici (2013) su zabeležili povećanje aktivnost GSH-Px u uslovima vodnog deficita kod tri genotipa graška.

Na *Histogramu 4.5.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost glutatión-reduktaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost GR izražena u U/mg proteina je u listu u kontrolama iznosila: 0.016 (M-1), 0.015 (B-229) i 0.020 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost GR se menjala u opsegu od: 0.013-0.014 U/mg proteina (M-1), 0.012-0.020 U/mg proteina (B-229) i 0.009-0.015 U/mg proteina (PE19/66). Kod klonova M-1 i B-229 nisu utvrđene značajne promene kod tretmana u odnosu na kontrolu, dok je kod klonu PE19/66 pri 200 mOsm tretmanu aktivnost značajno opala u odnosu na kontrolu (za 55.4%).

Aktivnost GR izražena u U/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 0.095 (M-1), 0.102 (B-229) i 0.269 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost

GR se menjala u opsegu od: 0.095-0.119 U/mg proteina (M-1), 0.088-0.129 U/mg proteina (B-229) i 0.082-0.196 U/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova pri svim tretmanima aktivnost GR se nije statistički značajno menjala, sem kod 100 mOsm tretmana kod klona PE19/66, gde se aktivnost smanjila za 69.5%.



*Histogram 4.5.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost GR u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

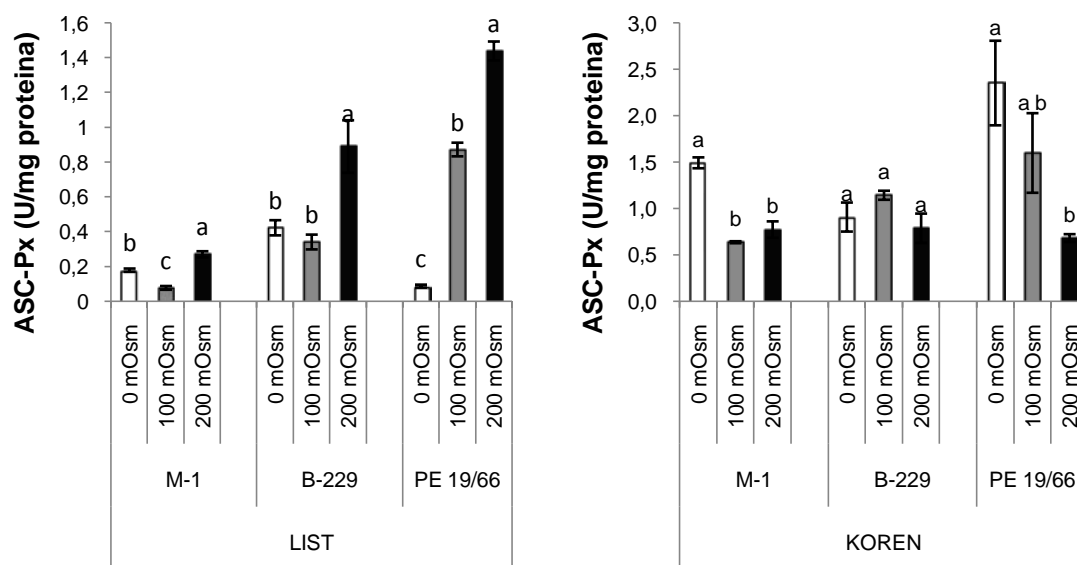
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

GR katalizuje poslednju reakciju askorbat–glutation ciklusa. Ovaj enzim je važan u održavanju visokog odnosa glutaciona GSH/GSSG neophodnog za regeneraciju askorbata kao važne tačke za funkcionisanje ovog ciklusa (Noctor i Foyer, 1998). Iz rezultata prikazanih na *Histogramu 4.5.* vidi se da se aktivnost GR uglavnom nije značajno menjala tokom stresa, što je u skladu sa rezultatima Slabberta i Krügera (2014) koji su povećanje aktivnosti GR zabeležili tek nakon 17 dana tretmana suše. Guerrier i saradnici (2000) su i kod osetljivog i kod tolerantnog hibrida topole uočili smanjenje aktivnosti GR tokom osmotskog stresa.

Na *Histogramu 4.6.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost askorbat-peroksidaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost ASC-Px izražena u U/mg proteina je u listu u kontrolama iznosila: 0.179 (M-1), 0.423 (B-229) i 0.088 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost ASC-Px se menjala u opsegu od: 0.077-0.271 U/mg proteina (M-1), 0.342-0.891 U/mg proteina (B-229) i 0.874-1.441 U/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova su utvrđena značajna povećanja aktivnosti kod 200 mOsm tretmana u odnosu na

kontrolu (kod M-1 klonu za 51.1%, kod B-229 klonu za 110.5% i kod PE19/66 klonu za 1543.5%).

Aktivnost ASC-Px izražena u U/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 1.495 (M-1), 0.909 (B-229) i 2.356 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost ASC-Px se menjala u opsegu od: 0.638-0.774 U/mg proteina (M-1), 0.789-1.145 U/mg proteina (B-229) i 1.601-0.683 U/mg proteina (PE19/66). Kod klonu M-1 aktivnost ASC-Px se značajno smanjivala pri 100 mOsm i 200 mOsm tretmanima, i to za 57.3% i za 48.2%, redom. Takođe, kod klonu PE19/66 pri 200 mOsm tretmanu zabeleženo je statistički značajno smanjenje aktivnosti za 71%.



**Histogram 4.6.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost askorbat peroksidaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

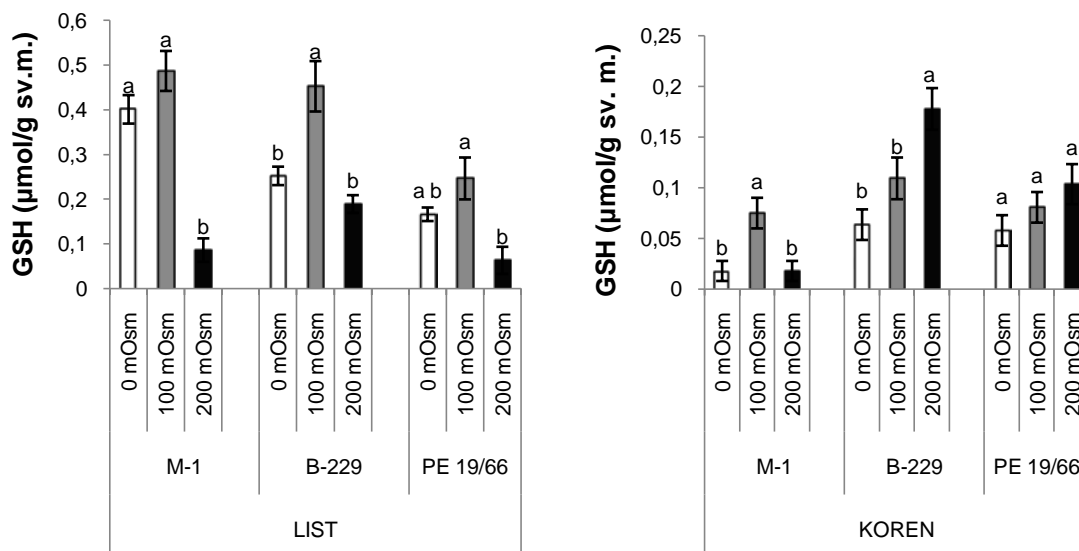
Askorbat-peroksidaza ima ulogu u uklanjanju toksičnog vodonik peroksida i stoga je važna u zaštiti biljke tokom oksidativnog stresa. Askorbat koji se iskoristi tokom ove reakcije se može regenerisati putem askorbat-glutation ciklusa. Yang i saradnici (2009) su uočili povećanje aktivnosti ASC-Px kod vrste *Populus* u uslovima suše. Guerrier i saradnici (2000) su kod tolerantnog hibrida topole uočili povećanje aktivnosti ASC-Px tokom osmotskog stresa, dok je kod hibrida osetljivog na sušu zabeležen pad aktivnosti.

Na *Histogramu 4.7.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na količinu glutaciona u listu i korenu odabranih klonova topole. Količina GSH izražena u  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase je u listu u kontrolama iznosila: 0.401 (M-1), 0.252 (B-229) i 0.166 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina GSH se menjala u opsegu od: 0.086-0.487  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase (M-1), 0.189-0.452  $\mu\text{mol/g}$



sveže mase (B-229) i 0.063-0.246  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase (PE19/66). Statistički značajno povećanje količine GSH utvrđeno je kod klona B-229 kod 100 mOsm tretmana (za 79.4%), dok je statistički značajno smanjenje utvrđeno kod M-1 klona kod 200 mOsm tretmana (za 78.5%).

Količina GSH izražena u  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase je u korenu u kontrolama iznosila: 0.018 (M-1), 0.063 (B-229) i 0.058 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina GSH se menjala u opsegu od: 0.018-0.075  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase (M-1), 0.109-0.178  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase (B-229) i 0.081-0.104  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase (PE19/66). Kod svih klonova, količina GSH se povećavala pri tretmanima, sem kod klona M-1 gde je pri 200 mOsm tretmanu utvrđena količina bila u nivou kontrole. Statistički značajna povećanja utvrđena su kod M-1 klona pri 100 mOsm tretmanu (za 322.6%) i kod B-229 klona pri 200 mOsm tretmanu (180.2%).



*Histogram 4.7.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj GSH u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

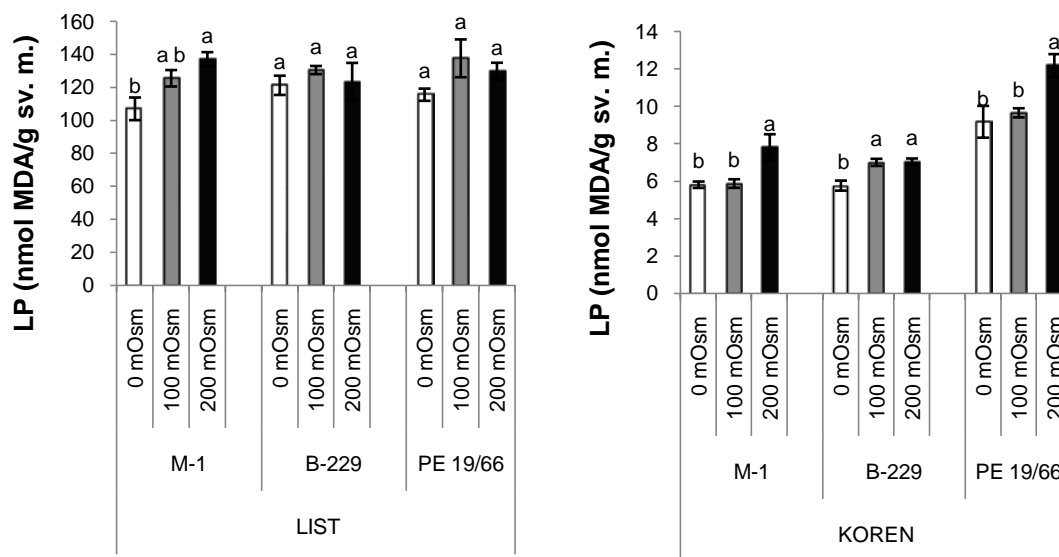
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Viši nivo GSH biljkama omogućuje bolju zaštitu u uslovima oksidativnog stresa, jer neenzimski reduktanti (askorbinska kiselina i redukovani glutation) igraju važnu ulogu u neutralisanju ROS delujući kao supstrati za uklanjanje vodonik peroksida. Određene količine GSH u listu su u skladu sa rezultatima Medori i saradnika (2012). U uslovima suše kod genotipa graška tolerantnog na sušu je zabeležena povećana količina GSH, dok je kod genotipa graška tolerantnog na soni stres zabeleženo smanjenje količine GSH u uslovima suše. Povećanje količine GSH se može dovesti u vezu sa povećanjem aktivnosti

enzima GR koji omogućuje recikliranje redukovanog oblika glutationa, kao i smanjenom aktivnosti enzima GSH-Px koji troši isti (Popović i Štajner, 2008).

#### 4.2.2. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na parametre oksidativnog stresa i sadržaj pigmenata

Na *Histogramu 4.8.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na intenzitet lipidne peroksidacije određen na osnovu količine MDA u listu i korenu odabranih klonova topole. Količina MDA izražena u nmol/g sveže mase (sv.m.) je u listu u kontrolama iznosila: 106.8 (M-1), 121.1 (B-229) i 115.4 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina MDA se menjala u opsegu od: 125.3-136.7 nmol/g sv.m. (M-1), 123.2-130.3 nmol/g sv.m. (B-229) i 129.6-137.5 nmol/g sv.m. (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su povećanja količine MDA pri tretmanima u odnosu na kontrolu, ali je samo kod klona M-1 kod 200 mOsm tretmana povećanje za 28% bilo statistički značajno.



*Histogram 4.8.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na intenzitet lipidne peroksidacije u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

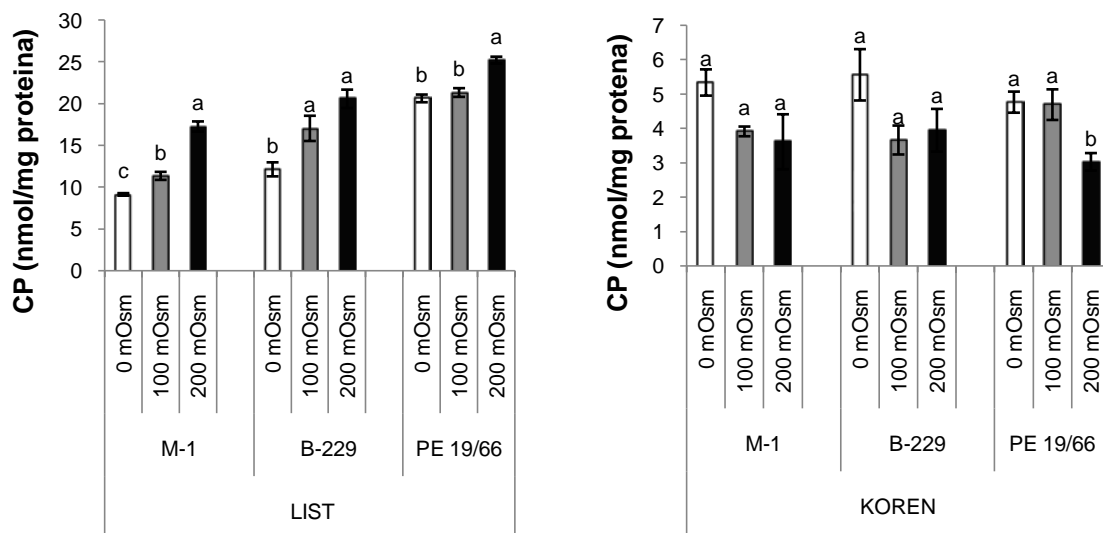
Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Količina MDA izražena u nmol/g sveže mase je u korenu u kontrolama iznosila: 5.8 (M-1), 5.7 (B-229) i 9.2 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina MDA se menjala u opsegu od: 5.9-7.8 nmol/g sveže mase (M-1), 6.99-7.03 nmol/g sveže mase (B-229) i 9.65-12.18 nmol/g sveže mase (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su statistički značajna povećanja količine MDA pri 200 mOsm tretmanu u odnosu na

kontrolu (kod M-1 klonu za 34.5%, kod B-229 klonu za 22.3% i kod PE19/66 klonu za 32.9%).

Iz izloženih rezultata se može konstatovati da je do značajnog povećanja količine MDA u uslovima vodnog stresa došlo u korenu ispitanih klonova, dok je u listu zabeleženo samo kod klonu M-1. Štajner i saradnici (2011) su uočili povećanje količine MDA u *Populus* vrstama pri suši u prirodnim uslovima. Prema Yang i Miao (2010), nivo MDA je okarakterisan kao jedan od korisnih indikatora tolerantnosti biljkaka na sušu. Naime, u svom istraživanju utvrdili su da je kod *P. kangdingensis* koja je okarakterisana kao tolerantnija vrsta nivo MDA u uslovima suše se manje povećao u odnosu na povećanje koje je detektovano kod osetljivije vrste *P. cathayana*.

Na *Histogramu 4.9.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na intenzitet oksidacije proteina određen na osnovu količine karbonil proteina (CP) u listu i korenu odabranih klonova topole. Količina CP izražena u nmol/mg proteina je u listu u kontrolama iznosila: 9.1 (M-1), 12.1 (B-229) i 20.7 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina CP se menjala u opsegu od: 11.4-17.3 nmol/mg proteina (M-1), 17.1-20.6 nmol/mg proteina (B-229) i 21.4-25.2 nmol/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su povećanja količine CP pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najizrazitije povećanje je kod M-1 klonu pri 200 mOsm tretmanu (89%).



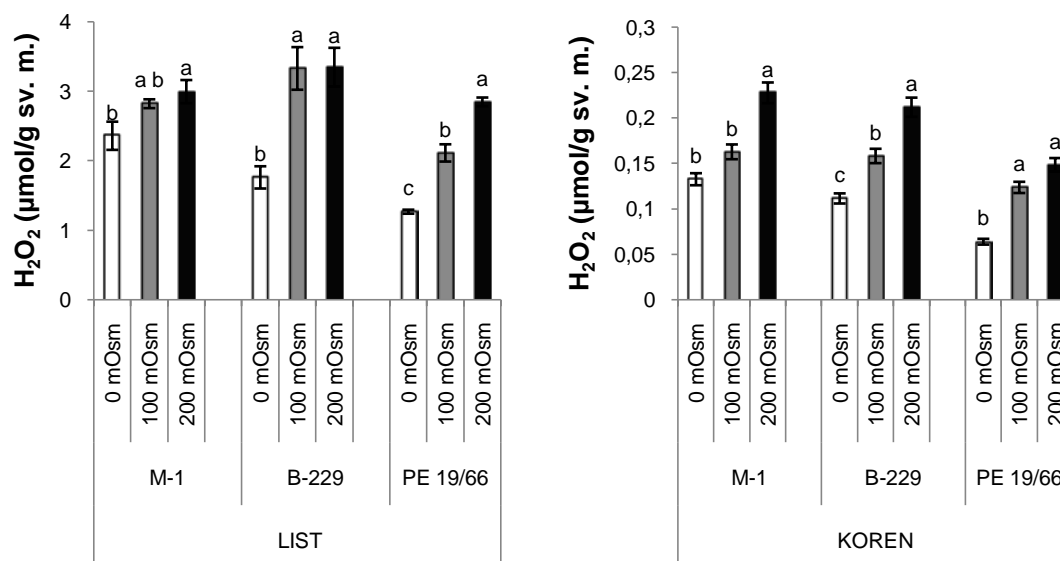
*Histogram 4.9.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na intenzitet oksidacije proteina u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66. Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Količina CP izražena u nmol/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 5.2 (M-1), 7.8 (B-229) i 4.7 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina CP se menjala u opsegu od: 3.1-3.7 nmol/mg proteina (M-1), 3.2-3.6 nmol/mg proteina (B-229) i 3.2-6.3 nmol/mg proteina (PE19/66). Kod svih klonova utvrđeno je smanjenje količine CP pri tretmanima u odnosu na kontrolu, mada nisu statistički značajna u odnosu na kontrolu, sem kod 200 mOsm tretmana kod klona PE19/66 (36.4%).

Iz izloženog se može zaključiti da je do značajnog povećanja intenziteta oksidacije proteina dolazilo u uzorcima lista. U uzorcima korena intenzitet oksidacije proteina se smanjivao ili se nije statistički značajno menjao. Chen i saradnici (2013) su u uslovima oksidativnog stresa izazvanog tretmanom sa bakrom kod *P. cathayana* utvrdili značajno povećanje količine oksidovanih proteina u listovima. U listovima kukuruza odgajanog u uslovima suše utvrđeno je povećanje intenziteta oksidacije proteina, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove teze (Dworak i sar., 2016). Takođe je utvrđeno da genotipovi pirinča tolerantni na oksidativni stres izazvan sušom imaju manju količinu oksidovanih proteina u listovima i korenu u odnosu na osetljive genotipove (Pyngrope i sar., 2013).

Na *Histogramu 4.10.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na količinu vodonik peroksida u listu i korenu odabranih klonova topole. Količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izražena u µmol/g sveže mase je u listu u kontrolama iznosila: 2.4 (M-1), 1.8 (B-229) i 1.3 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se menjala u opsegu od: 2.8-3.0 µmol/g sv.m. (M-1), 3.3-3.4 µmol/g sv.m. (B-229) i 2.1-2.8 µmol/g sv.m. (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su povećanja količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najizrazitije je zabeleženo kod klona PE19/66 pri 200 mOsm tretmanu (125%).

Količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izražena u µmol/g sveže mase je u korenu u kontrolama iznosila: 0.13 (M-1), 0.11 (B-229) i 0.06 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se menjala u opsegu od: 0.16-0.23 µmol/g sveže mase (M-1), 0.16-0.21 µmol/g sveže mase (B-229) i 0.12-0.15 µmol/g sveže mase (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su povećanja količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najizrazitije je zabeleženo kod klona PE19/66 pri 200 mOsm tretmanu (133%).



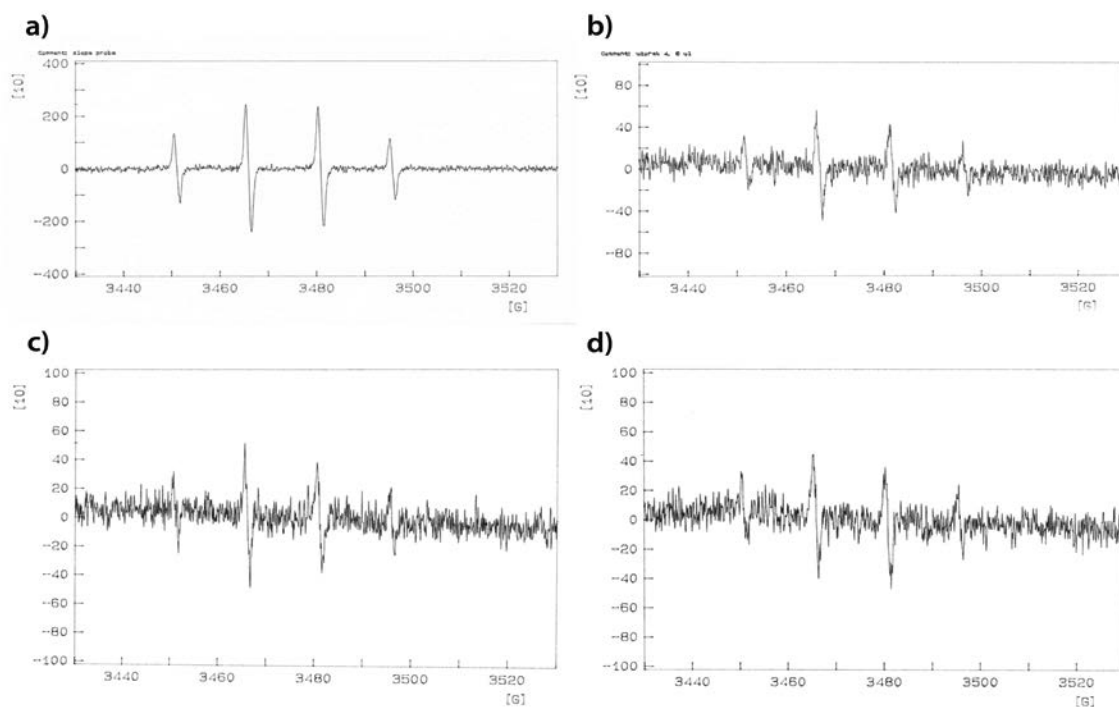
**Histogram 4.10.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na količinu vodonik peroksida u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

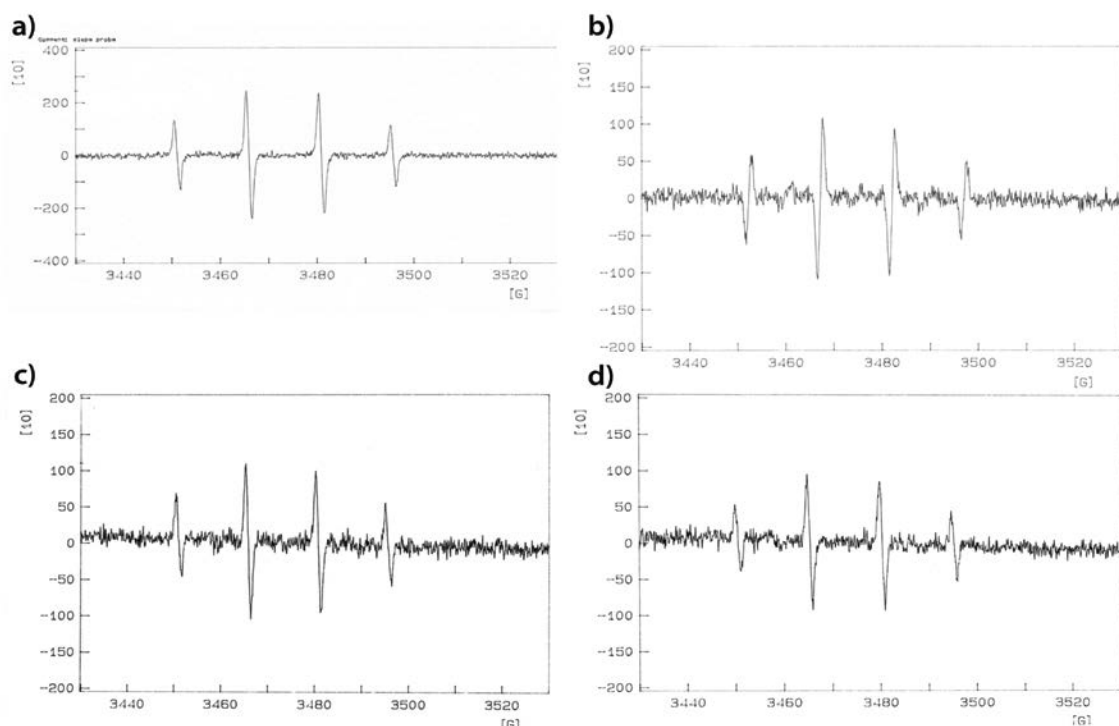
Iz izloženih rezultata se vidi da se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nagomilava u listovima i korenu topole kao odgovor na vodni stres i što su stresni uslovi izraženiji tada je i značajnija akumulacija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što je u skladu sa rezultatima Yang i Miao (2010) i Jia i saradnika (2015). Kompaktnost ćelije i otpornost prema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao i drugim oksidantima postoji zahvaljujući efikasnoj kontroli antioksidantnog sistema. Neophodno je naglasiti dvojaku ulogu vodonik peroksida, koji pored toga što prouzrokuje oksidativnu štetu, predstavlja integralnu komponentu unutarćelijskog prenosa signala u raznim situacijama kada je biljka izložena abiotičkim i biotičkim stresnim faktorima (Vranova i sar., 2002; Luna i sar., 2005).

Poređenjem intenziteta ESR signala DMPO-OH „spin adukata” slepe probe i uzoraka, utvrđeno je da pripremljeni fosfatno-puferski ekstrakti pri masenoj koncentraciji od 0,1 g/ml, imaju inhibitorski efekat na stvaranje OH<sup>•</sup> ili učestvuju u njihovoj transformaciji, što se zaključuje na osnovu smanjenja intenziteta ESR signala DMPO-OH „spin adukata” u njihovom prisustvu (Slika 4.9-4.11.).

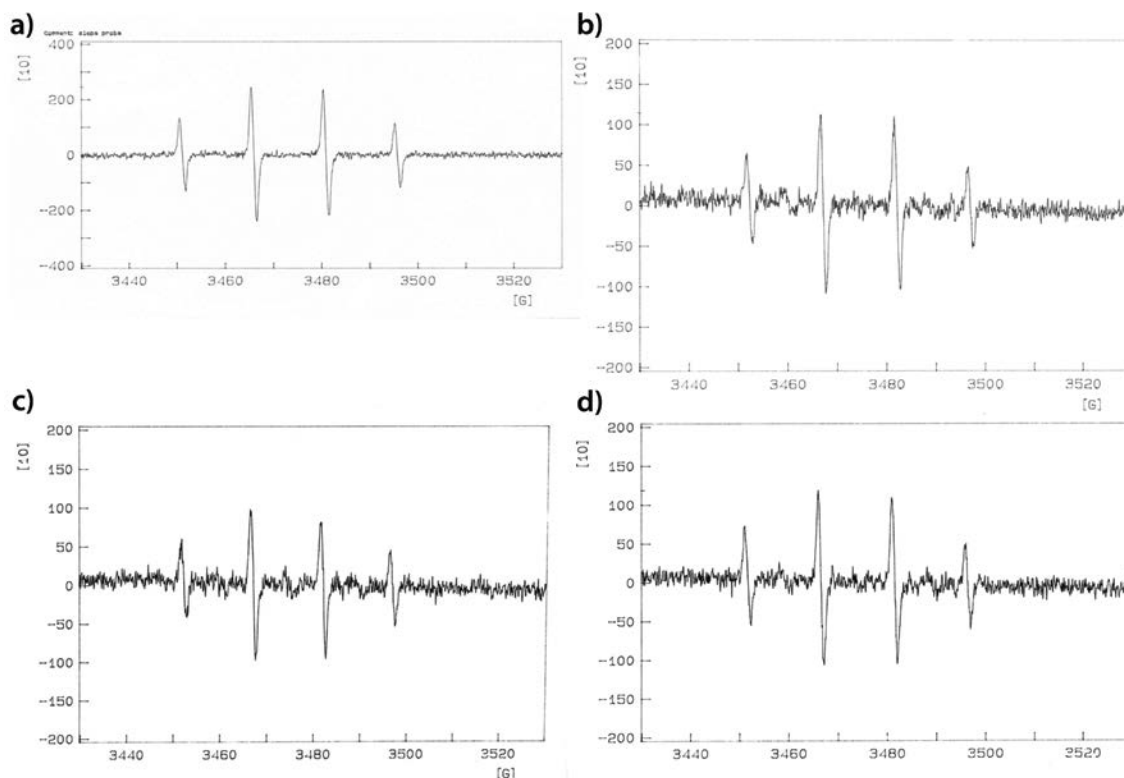
Analizom ESR spektara DMPO-OH spin adukata nastalih dodavanjem ekstrakta topole u Fentonov model sistem može se zaključiti da je ekstrakt klona M-1 najbolje uticao na stvaranje i transformaciju hidroksi radikala. Najbolju antiradikalnu aktivnost pokazao je klon M-1 posebno u uslovima najvećeg intenziteta stresa.



Slika 4.9. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na ESR spektre DMPO-OH spin-adukata u prisustvu ekstrakta klona M-1. a) slepa proba, b) kontrola, c) 100 mOsm vodni stres, d) 200 mOsm vodni stres



Slika 4.10. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na ESR spektre DMPO-OH spin-adukata u prisustvu ekstrakta klona B-229. a) slepa proba, b) kontrola, c) 100 mOsm vodni stres, d) 200 mOsm vodni stres



Slika 4.11. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na ESR spektre DMPO-OH spin-adukata u prisustvu ekstrakta klona PE19/66. a) slepa proba, b) kontrola, c) 100 mOsm vodni stres, d) 200 mOsm vodni stres

U Tabeli 4.2. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na vrednosti relativnih intenziteta (RI) ESR signala DMPO-OH „spin adukata” u prisustvu fosfatno-puferskih ekstrakata listova ispitanih klonova topole. Relativni intenzitet (RI) ESR signala DMPO-OH je u listu u kontrolama iznosio: 600 (M-1), 1105.3 (B-229) i 1157.9 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 RI se menjao u opsegu od: 440-520 (M-1), 1000-1105.3 (B-229) i 1000-1184.20 (PE19/66).

Kao što se može videti iz Tabele 4.2. relativni intenzitet ESR signala DMPO-OH „spin adukata” u prisustvu ekstrakta topole izložene vodnom stresu je bio neznatno veći u odnosu na kontrolu samo kod klona PE19/66 (za 2.27%), dok je kod druga dva klona vodni stres uticao na povećanje antiradikalske aktivnosti prema hidroksil radikalu, pa je kod klonova M-1 i B-229 utvrđeno smanjenje RI ESR signala u odnosu na kontrolu, mada kod klona B-229 promene nisu statistički značajne u odnosu na kontrolu.

Tabela 4.2. Rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na vrednost ESR signala DMPO-OH „spin adukata”

Klon, tretman	RI kontrole	RI tretirane	Promena RI
M-1, 100 mOsm	600 <sup>a</sup>	520 <sup>b</sup>	-13.33%
M-1, 200 mOsm	600	440 <sup>c</sup>	-26.67%
B-229, 100 mOsm	1105.3 <sup>a</sup>	1105.3 <sup>a</sup>	0%
B-229, 200 mOsm	1105.3	1000 <sup>a</sup>	-9.52%
PE 19/66, 100 mOsm	1157.9 <sup>a</sup>	1000 <sup>b</sup>	-13.64%
PE 19/66, 200 mOsm	1157.9	1184.2 <sup>a</sup>	2.27%

\* Promena RI ESR signala topole izložene vodnom stresu izražena je u procentima ( $\pm$  %) u odnosu na kontrolu. Promena RI ( $\pm$  %) =  $100 \cdot (RI_{\text{topole izložene vodnom stresu}} - RI_{\text{kontrole}}) / RI_{\text{kontrole}}$   
Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Hidroksi radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) je hemijski najreaktivnija kiseonična vrsta, odnosno naj snažnije oksidujuće sredstvo koje poseduje dovoljno energije da direktno reaguje sa biomolekulima, pri čemu se inicira proces lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i oksidativnih oštećenja na nukleinskim kiselinama (Gill i Tuteja, 2010; Halliwell i Gutteridge, 2008). Nastaje reakcijom vodonik peroksida i superoksid anjon radikala u prisustvu jona prelaznih metala pri neutralnom pH, u tzv. Haber-Weiss-ovoj reakciji, kao i Fentonovom reakcijom iz  $\text{H}_2\text{O}_2$  u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$ . Sušni uslovi povećavaju dostupnost jona za pomenute reakcije, a time i stvaranje hidroksil radikala (Moran i sar., 1994). Dobijeni rezultati spektroskopskog određivanja  $\text{OH}^\bullet$  radikala ukazuju na to da čak i pri najvećem intenzitetu vodnog stresa (200 mOsm) kod klonova B-229 i PE19/66 ne dolazi do statističkih značajnih promena u odnosu na kontrolne uslove, a kod klona M-1 se intenzitet signala smanjuje, što se može objasniti angažovanjem antioksidanta u uklanjanju hidroksil radikala.

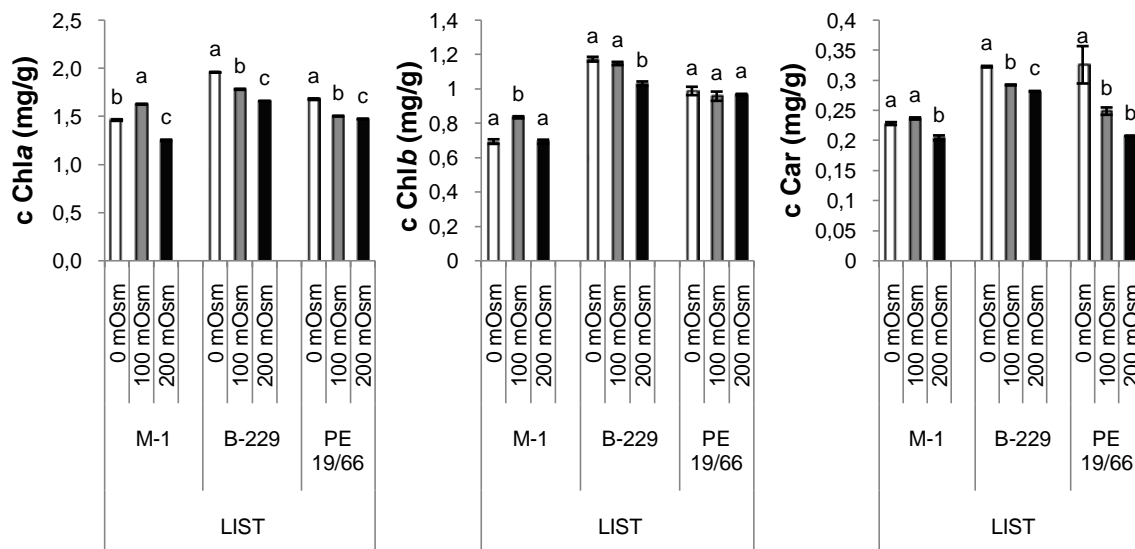
Na *Histogramu 4.11.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj fotosintetičkih pigmenta u listu odabranih klonova topole.

**Hlorofil a.** Sadržaj hlorofila *a* izražen je u mg/g suve mase (s.m.) i u kontrolama je iznosio: 1.46 (M-1), 1.96 (B-229) i 1.68 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj hlorofila *a* se menjao u opsegu od: 1.25-1.63 mg/g s.m. (M-1), 1.66-1.78 mg/g s.m. (B-229) i 1.47-1.50 mg/g s.m. (PE19/66). Samo kod klona M-1 je utvrđeno statistički značajno povećanje pri 100 mOsm tretmanu (11.3%), dok je kod druga dva klona sadržaj hlorofila *a* opadao u odnosu na kontrolu pri svim tretmanima, a najizrazitije smanjenje je zabeleženo kod klona B-229 pri 200 mOsm tretmanu (15.2%).



**Hlorofil b.** Sadržaj hlorofila *b* izražen je u mg/g suve mase i u kontrolama je iznosio: 0.69 (M-1), 1.17 (B-229) i 0.98 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza sadržaj hlorofila *b* se menjao u opsegu od: 0.69-0.83 mg/g s.m. (M-1), 1.03-1.15 mg/g s.m. (B-229) i 0.96-0.97 mg/g s.m. (PE19/66). Kod klona M-1 utvrđeno je statistički značajno povećanje sadržaja hlorofila *b* pri 100 mOsm tretmanu (13.3%), a kod klona B-229 statistički značajno smanjenje pri 200 mOsm tretmanu (12.2%).

**Karotenoidi.** Sadržaj karotenoida izražen je u mg/g suve mase i u kontrolama je iznosio: 0.23 (M-1), 0.32 (B-229) i 0.33 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj karotenoida se menjao u opsegu od: 0.20-0.24 mg/g s.m. (M-1), 0.28-0.29 mg/g s.m. (B-229) i 0.21-0.25 mg/g s.m. (PE19/66). Kod klona M-1 sadržaja karotenoida se nije menjao kod tretmana 100 mOsm u odnosu na kontrolu, dok je kod druga dva klona sadržaja karotenoida statistički značajno opadao pri tretmanima. Najveće smanjenje sadržaja karotenoida zabeleženo je kod klona PE19/66 i to pri 200mOsm tretmanu (36.4%).



**Histogram 4.11.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na količinu hlorofila *a*, hlorofila *b* i karotenoida u listu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

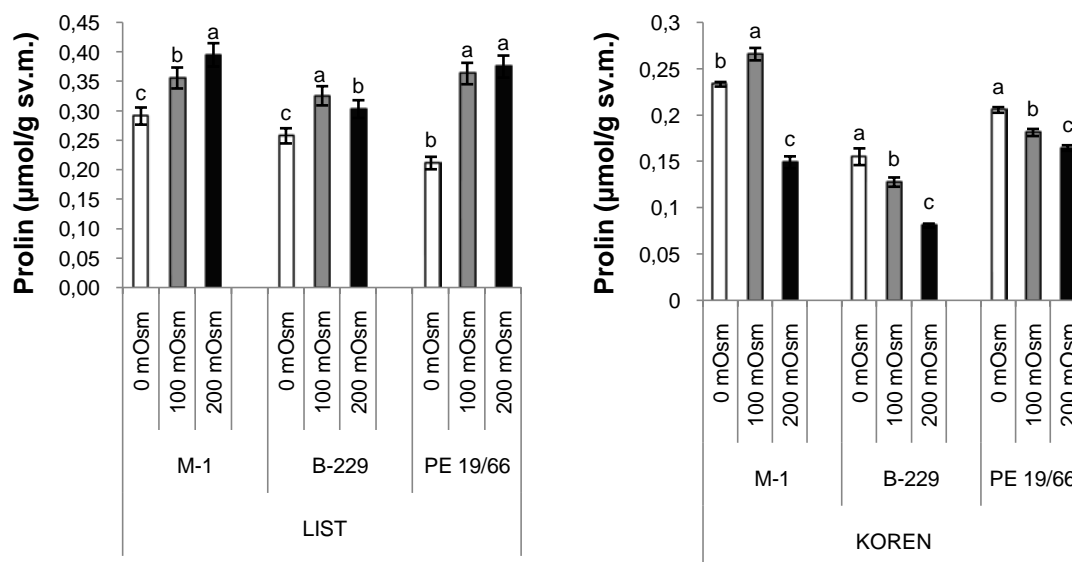
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Fotosinteza je proces posebno osetljiv na sušu. Poznato je da se u uslovima vodnog deficita dešava smanjenje sadržaja fotosintetičkih pigmenata (Lei i sar., 2006). Iz izloženih rezultata se vidi da se kod klonova B-229 i PE19/66 sadržaj pigmenata smanjivao pri tretmanima, što je u skladu sa rezultatima Guo i saradnika (2010). Kod klona M-1 je utvrđeno povećanje sadržaja pigmenata pri 100 mOsm tretmanu, što prema

mišljenju autora Yin i saradnika (2009) može biti karakteristika klona manje osetljivog na sušu.

#### 4.2.3. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na osmotske parametre

Na *Histogramu 4.12.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na količinu prolina u listu i korenu odabranih klonova topole. Količina prolina izražena u  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase je u listu u kontrolama iznosila: 0.29 (M-1), 0.26 (B-229) i 0.21 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina prolina se menjala u opsegu od: 0.36 -0.40  $\mu\text{mol/g}$  sv. m. (M-1), 0.30-0.33  $\mu\text{mol/g}$  sv. m. (B-229) i 0.36-0.38  $\mu\text{mol/g}$  sv. m. (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su statistički značajna povećanja količine prolina pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najveće povećanje količine prolina zabeleženo je kod klona PE19/66 i to pri 200mOsm tretmanu (77.4%).



*Histogram 4.12.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj prolina u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

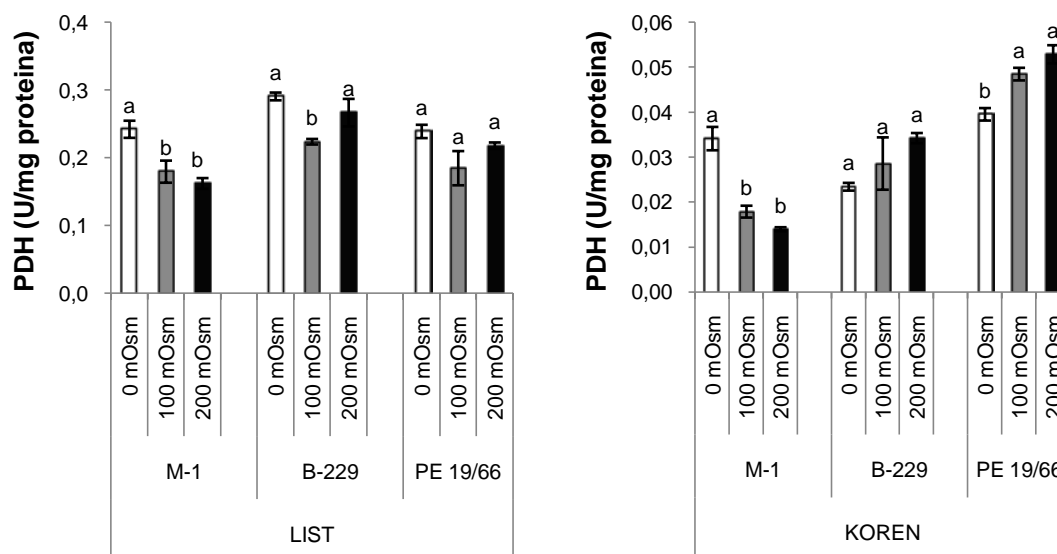
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Količina prolina izražena u  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase je u korenu u kontrolama iznosila: 0.23 (M-1), 0.16 (B-229) i 0.21 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 količina prolina se menjala u opsegu od: 0.15-0.27  $\mu\text{mol/g}$  sv. m. (M-1), 0.08-0.13  $\mu\text{mol/g}$  sv. m. (B-229) i 0.16-0.18  $\mu\text{mol/g}$  sv. m. (PE19/66). U uslovima vodnog stresa izazvanog PEG 6000 kod ispitanih klonova utvrđena su statistički značajna smanjenja količine prolina u odnosu na kontrolu, a najveće je zabeleženo kod klona B-229 pri 200 mOsm tretmanu (47.9%). Izuzetak je klon M-1 kod kojeg je u uslovima 100 mOsm stresa utvrđeno statistički značajno povećanje količine prolina u odnosu na kontrolu (13.9%).

Prolin se u stresnim uslovima akumulira u puno većoj količini u odnosu na ostale aminokiseline (Barchet i sar., 2014). U *Tabeli 2.1.* dat je pregled istraživanja gde je utvrđena povećana akumulacija prolina u tkivima biljaka pod uticajem vodnog ili osmotskog stresa. Akumulacija prolina se smatra adaptivnom reakcijom (Verbruggen i Hermans, 2008). Pokazalo se da veću sposobnost akumulacije prolina u stresnim uslovima imaju tolerantnije biljke u odnosu na osetljivije (Guo i sar., 2010; Türkan i sar., 2005). Li i saradnici (2015) su utvrdili veći sadržaj prolina u listovima nego u korenu vrste *P. cathayana*, što je u saglasnosti sa rezultatima na *Histogramu 4.12.* Zapaženo povećanje količine prolina može biti rezultat indukcije ili aktivacije enzima uključenih u biosintezu prolina ili smanjenja oksidacije prolina do glutamata, kao i smanjenja iskorišćavanja prolina u sintezi proteina (Delauney i Verna, 1993). U poređenju sa rezultatima dobijenim u eksperimentu na kulturi tkiva, uočava se mnogo manja akumulacija prolina. Sinteza prolina u kulturi tkiva je povećana skoro 300%, a u hidroponskom eksperimentu samo 35%.

Na *Histogramu 4.13.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost prolin-dehidrogenaze u listu i korenu odabranih klonova topole. Aktivnost PDH izražena u U/mg proteina je u listu u kontrolama iznosila: 0.242 (M-1), 0.291 (B-229) i 0.239 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost PDH se menjala u opsegu od: 0.162-0.180 U/mg proteina (M-1), 0.224-0.267 U/mg proteina (B-229) i 0.185-0.218 U/mg proteina (PE19/66). U uslovima vodnog stresa kod klona M-1 aktivnost PDH je statistički značajno opala u odnosu na kontrolu (za 25.8% i 33%), kao i kod klona B-229 pri 100mOsm tretmanu (za 23%). Kod klona PE19/66 utvrđene promene nisu statistički značajne.

Aktivnost PDH izražena u U/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 0.034 (M-1), 0.023 (B-229) i 0.040 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost PDH se menjala u opsegu od: 0.014-0.018 U/mg proteina (M-1), 0.029-0.034 U/mg proteina (B-229) i 0.048-0.053 U/mg proteina (PE19/66). Kod klona M-1 aktivnost PDH se statistički značajno smanjila u uslovima vodnog stresa (za 47.6% i 59%), dok se kod druga dva klona aktivnost PDH povećavala, ali su značajne promene utvrđene samo kod klona PE19/66 (za 22.6% i 33.8%).

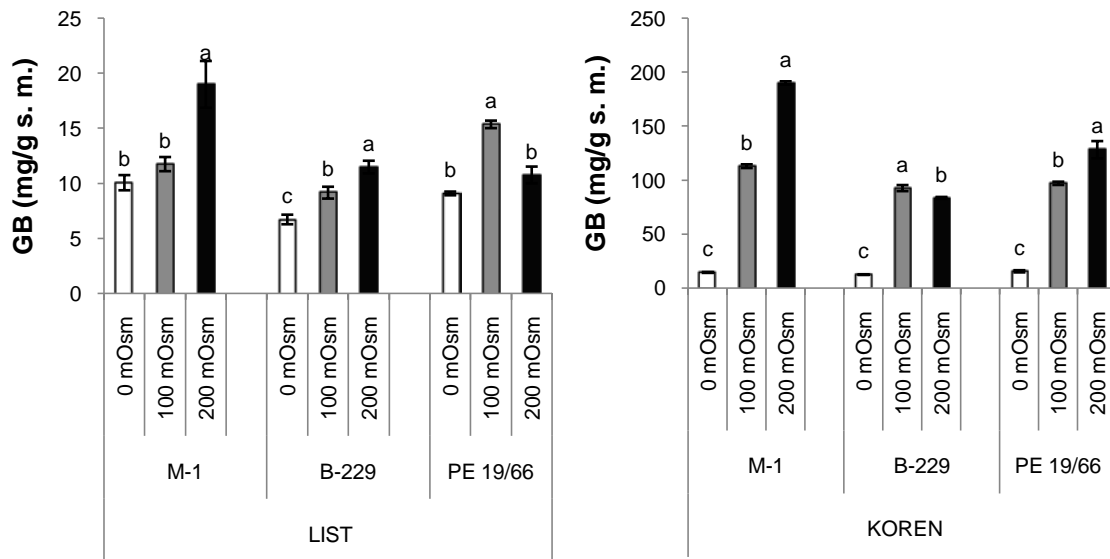


*Histogram 4.13.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost prolin-dehidrogenaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Rezultati mnogih ispitivanja ukazuju na to da je akumulacija prolina u uslovima vodnog stresa rezultat povećane biosinteze i smanjene degradacije prolina, odnosno povećane količine "ratelimiting" enzima pirolin-5-karboksilat sintaze (P5CS) i smanjene aktivnosti prolin-dehidrogenaze (PDH) (Miller i sar., 2005; Saibi i sar., 2015; Szabados i Savoure, 2010; Zhang i sar., 1995). Raymond i Smirnoff (2002), El Sayed (1992), Dobrá i saradnici (2011), Yang i saradnici (2015) kao i mnogi drugi autori ukazuju na pojavu smanjenja aktivnosti enzima PDH u uslovima suše, što je u skladu sa rezultatima koji se odnose na aktivnost PDH u listovima svih ispitanih klonova i korenu klona M-1.

Na *Histogramu 4.14.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj glicin-betaina (GB) u listu i korenu odabranih klonova topole. Sadržaj GB izražena u mg/g suve mase (s.m.) je u listu u kontrolama iznosila: 10.1 (M-1), 6.7 (B-229) i 9.1 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj GB se menjao u opsegu od: 11.7-19.0 mg/g s.m. (M-1), 9.1-11.5 mg/g s.m. (B-229) i 10.8-15.4 mg/g s.m. (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su povećanja sadržaja GB pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najveće je kod klona M-1 pri 200 mOsm tretmanu (88.9%).



**Histogram 4.14.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj glicin-betaina u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Sadržaj glicin-betaina izražena u mg/g s.m. je u korenu u kontrolama iznosila: 14.4 (M-1), 12.3 (B-229) i 15.4 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj GB se menjao u opsegu od: 112.9-190.1 mg/g s.m. (M-1), 83.5-92.6 mg/g s.m. (B-229) i 97.0-128.2 mg/g s.m. (PE19/66). Kod svih klonova utvrđena su statistički značajna povećanja sadržaja GB pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najveće kod klona M-1 pri 200 mOsm tretmanu (1222.1%).

U dosadašnjoj literaturi GB je opisan kao molekul čija se akumulacija aktivira u različitim stresnim uslovima, te je utvrđeni povećan sadržaj GB u listu i korenu ispitanih klonova topole u skladu sa ovom činjenicom (Ashraf i Fooland, 2007; Ahmad i sar., 2013). Takođe, u većini ovih istraživanja GB je uticao na povećanje antioksidantnog kapaciteta biljaka. Još uvek nije utvrđena direktna sposobnost GB da neutrališe ROS, ali je u mnogim istraživanjima gde su korišćene transgene biljke sa sposobnošću akumulacije GB pokazana važna uloga GB u održavanju aktivnosti antioksidantnih enzima, posebno enzima askorbat-glutation ciklusa (Chen i Murata, 2011). Ovakva uloga GB potvrđena je u ovoj tezi, posebno rezultatima koji su dobijeni za klon M-1, gde je u listu u uslovima 200 mOsm stresa utvrđeno značajno povećanje GB i signifikantna povećanja aktivnosti peroksidaza (GPx, *Slika 4.3*; GSHPx, *Slika 4.4* i ASC-Px, *Slika 4.6*), dok je kod druga dva klona povećanje GB uticalo na povećanje aktivnosti ASC-Px. Takođe, kod klona M-1 je utvrđena najbolja antiradikalna aktivnost prema hidroksil radikal.

#### 4.2.4. Korelaciona analiza biohemijskih parametara topole izložene vodnom stresu

Poznato je da vodni stres može dovesti do povećanja aktivnosti antioksidantnih enzima u biljkama koji na taj način štite biljku od slobodnih radikala i pojave oksidativnog stresa koji se može pratiti preko merenja lipidne peroksidacije, intenziteta oksidacije proteina i količine vodonik peroksida, zatim indukcije osmotski aktivnih jedinjenja. Primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između svih ispitanih parametara za uzorke lista (*Tabela 4.3.*) i korena (*Tabela 4.4.*) Dobijeni faktori korelacije ukazuju na međusobni uticaj različitih parametara u ispitivanim ekstraktima.

Značajne pozitivne korelacije utvrđene su samo između pojedinih antioksidantnih enzima, dok SOD i GR nisu pokazale značajne korelacije ni sa jednim ispitanim parametrom. U uzorcima lista nađena je značajna pozitivna korelacija između ASC-Px i GPx ( $r = 0.691$ ), zatim između ASC-Px i GSH-Px ( $r = 0.765$ ), kao i negativna korelacija između količine GSH i aktivnosti GSH-Px ( $r = -0.856$ ). Aktivnosti enzima ASC-Px, GPx i GSH-Px su u negativnim korelacijama sa aktivnosti katalaze. Iako su svi navedeni enzimi uključeni u uklanjanje vodonik peroksida, a CAT i ASC-Px predstavljaju ključne enzime detoksifikacije  $H_2O_2$ , njihovi afiniteti prema supstratu se razlikuju. Rezultati ukazuju na to da se u uslovima 200 mOsm stresa aktivnosti enzima ASC-Px, GPx i GSH-Px u listu uglavnom povećavaju u odnosu na kontrolu, dok se aktivnost CAT smanjuje. S obzirom da se sa stresom povećava količina  $H_2O_2$ , a poznato je da ASC-Px ima veći afinitet prema  $H_2O_2$ , enzim ASC-Px je u odnosu na CAT više delovao i uklanjao  $H_2O_2$  u datim uslovima. Značajna korelacija utvrđena je između CAT i količine GSH ( $r = 0.686$ ). U uzorcima korena nađena je značajna pozitivna korelacija između SOD i GPx ( $r = 0.752$ ), zatim između ASC-Px i GSH-Px ( $r = 0.814$ ), kao i negativne korelacije količine GSH i aktivnosti GPx i SOD ( $r = -0.798$  i  $-0.801$ , redom). U literaturnim podacima se navodi da aktivnost antioksidantnih enzima u uslovima vodnog stresa raste u odnosu na kontrolu kod tolerantnih biljaka. S obzirom da u ovom radu vodni stres nije doveo do značajnog povećanja aktivnosti antioksidantnih enzima u korenu, to upućuje na zaključak da su kod ovih biljaka u ovom organu angažovani neenzimski mehanizmi odbrane, jer drugi rezultati (količina vodonik peroksida, intenzitet lipidne peroksidacije) ukazuju da su biljke bile izložene stresu usled vodnog deficita. Od svih ispitanih parametara u korenu u uslovima vodnog stresa utvrđeno je značajno povećanje količine GSH (posebno kod klona M-1 i B-229) i GB. Količina GSH u listu u uslovima 100 mOsm stresa je veća u

odnosu na kontrolu, dok je pri 200 mOsm stresu statistički značajno manja. Poznato je da GSH učestvuje u regeneraciji askorbata iz dehidroaskorbinske kiseline kao i u procesima uklanjanja ROS (Asada, 1999). Pored ove uloge, glutathion učestvuje u mnogim reakcijama detoksifikacije metabolita. Utvrđeno naglo smanjenje količine GSH u listu u uslovima 200 mOsm stresa se može objasniti povećanom aktivnošću GSH-Px koja je utvrđena u datim uslovima kao i ulogom glutathiona u uklanjanju ROS i učestvovanju u procesima detoksifikacije. Shalata i saradnici (2001) su ukazali da povećanje sadržaja redukovano glutathiona i askorbata imalo uticaja na bolje održavanje askorbat-glutathion ciklusa i uklanjanje ROS u uslovima oksidativnog stresa izazvanog visokim koncentracijama soli.

Određivanjem parametara oksidativnog stresa, dobija se kompletnija slika mehanizma delovanja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000. U *Poglavlju 2.2.1* detaljno je opisan mehanizam nastajanja LP i OP. Značajne pozitivne korelacije u uzorcima lista utvrđene su između intenziteta LP i količine prolina ( $r = 0.751$ ), između intenziteta oksidacije proteina i ARP OH ( $r = 0.717$ ), dok količina vodonik peroksida nije pokazala značajnu korelaciju ni sa jednim ispitanim parametrom u listu. Visoka, ali nesigifikantna pozitivna korelacija utvrđena je između GB i LP ( $r = 0.648$ ). Takođe, intenzitet oksidacije proteina je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa aktivnostima enzima GPx, GSH-Px i ASC-Px ( $r = 0.890, 0.714, 0.729$ , redom), kao i negativnoj korelaciji sa količinom GSH ( $r = -0.703$ ) u listu. Ovakve pozitivne korelacije između LP i prolina kao i OP i antioksidantnih enzima se prema Chmielowska-Bąk i saradnicima (2015) mogu objasniti ulogom proizvoda oksidacije lipida i proteina u regulaciji ekspresije gena kod biljaka, čime se pokreće aktivacija esencijalnih odbrambenih mehanizama tokom stresa. U uzorcima korena nađena je značajna pozitivna korelacija između intenziteta LP i aktivnosti enzima PDH ( $r = 0.763$ ) i između  $H_2O_2$  i GB ( $r = 0.753$ ), kao i negativna korelacija između intenziteta oksidacije proteina i sadržaja GB ( $r = -0.818$ ). Ispitivanje nivoa MDA u uslovima vodnog stresa je bilo predmet mnogih istraživanja (Vendruscolo i sar., 2007; Yang i sar., 2009). Yang i Miao (2010) su u istraživanju tolerantnosti vrsta *P.cathayana* i *P.kangdingensis*, koje naseljavaju različite nadmorske visine planine Himalaji, pokazali da nivo MDA i koncentracija  $H_2O_2$  mogu biti korisni indikatori osetljivosti pojedinih biljaka na sušu. Tako su kod *P.cathayana* povećanja nivoa MDA i koncentracije  $H_2O_2$  iznosila 88.9% i 99.7%, redom, dok su kod tolerantnije vrste *P.kangdingensis*, povećanja iznosila 44% i 63.6% redom, u odnosu na kontrolu. Isto su pokazali Moran i saradnici

(1994) koji su u grašku u uslovima suše odredili 4 puta veći nivo MDA u odnosu na kontrolu i utvrdili visoku korelaciju sa oksidacijom proteina, što je takođe u skladu sa našim rezultatima ( $r = 0.504$ ).

Poznato je da vodni stres utiče na intenzitet fotosinteze i na preraspodelu produkata fotosinteze, što dovodi do sinteze osmotski aktivnih materija – šećera i amino-kiselina, posebno prolina. Takođe, vodni stres utiče negativno na sadržaj fotosintetičkih pigmenta, što ograničava fotosintezu i smanjuje zaštitu od ROS (Lei i sar., 2006; Toscano i sar., 2016; Marok i sar., 2013). U skladu sa ovim su rezultati dobijeni za klon M-1 kod koga je u uslovima 100 mOsm stresa određeno statistički značajno povećanje *chl a* i *chl b*, kao i povećana antiradikalska aktivnost ovog ekstrakta prema hidroksil radikalu u uslovima stresa. Pojedini autori smatraju da je povećan sadržaj pigmenta u uslovima suše osobina tolerantnih biljaka (Pérez-Pérez i sar, 2007; Yin i sar., 2009). U okviru ove teze utvrđene su negativne korelacije između prolina i sadržaja fotosintetičkih pigmenta od kojih je značajna korelacija između prolina i sadržaja karotenoida ( $r = -0.840$ ). U nekoliko studija utvrđena je pozitivna korelacija akumulacije GB i povećanja sposobnost biljaka da neutrališu ROS u uslovima stresa (Park i sar., 2004; Ahmad i sar., 2008; 2010). U okviru ove disertacije, kod svih ispitanih klonova utvrđena su povećanja GB u uslovima vodnog stresa, koja su u uzorcima lista praćena aktivacijom različitih antioksidantnih enzima (kod klona M-1 utvrđena su značajna povećanja aktivnosti GPx, GSHPx i ASC-Px; kod klona B-229 i PE19/66 povećanje aktivnosti ASC-Px). Pored ovakve uloge glicin-betaina, Ahmad i saradnici (2013) ističu da GB utiče na indukciju različitih gena od kojih su neki uključeni u izbegavanje različitih stresnih uslova, zatim regulaciju prenosa signala, metabolizma i membranskih transportera. U okviru ove teze sadržaj GB je u uzorcima lista u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa količinom prolina, sadržajem *chl b* i ARP OH ( $r = 0.732, 0.721, 0.686$ , redom), dok je u uzorcima korena u pozitivnoj korelaciji sa količinom  $H_2O_2$  i negativnoj korelaciji sa intenzitetom oksidacije proteina ( $r = 0.753$  i  $-0.818$ , redom). Visoka vrednost pozitivne korelacije utvrđena je između prolina i GB ( $r = 0.732$ ), dok je između prolina i enzima uključenog u razgradnju prolina, PDH, utvrđena visoka vrednost negativne korelacije ( $r = -0.759$ ). Prolin u uzorcima korena nije pokazao nijednu statistički značajnu korelaciju, ali je u pozitivnim korelacijama sa antioksidantnim enzimima. O mogućoj ulozi prolina u zaštiti antioksidantnih enzima u štetnim uslovima *in vivo* i *in vitro* se sve više govori.



Tabela 4.3. Korelacioni faktor (r) između ispitanih parametara u uzorcima lista pri značajnosti  $p < 0.05$ 

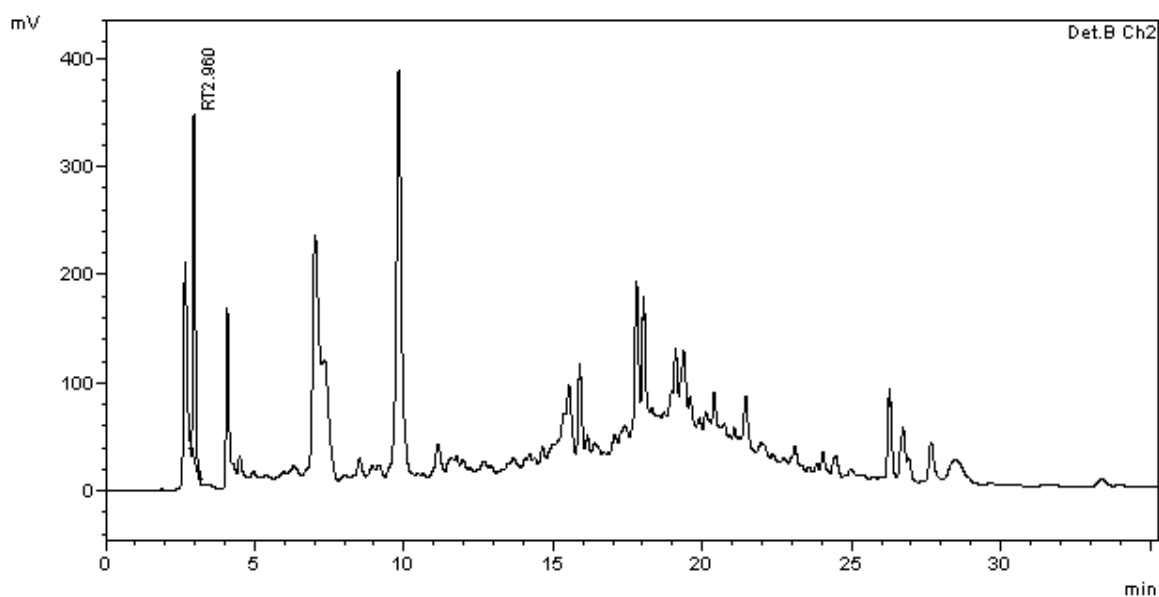
	SOD	CAT	GPx	GSH-Px	GR	APx	GSH	LP	OP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PRO	PDH	GB	CHLa	CHLb	CAR
SOD	1.000															
CAT	0.637	1.000														
GPx	-0.301	-0.413	1.000													
GSH-Px	-0.229	-0.504	0.655	1.000												
GR	0.246	0.123	-0.140	-0.655	1.000											
APx	-0.256	-0.333	<b>0.691</b>	<b>0.765</b>	-0.651	1.000										
GSH	0.312	<b>0.686</b>	-0.602	<b>-0.856</b>	0.354	-0.542	1.000									
LP	-0.258	-0.477	0.208	0.386	-0.236	0.401	-0.287	1.000								
OP	-0.261	-0.640	<b>0.890</b>	<b>0.714</b>	-0.199	<b>0.729</b>	<b>-0.703</b>	0.504	1.000							
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.442	0.062	-0.160	0.227	-0.403	0.279	0.141	0.404	0.089	1.000						
PRO	-0.306	-0.450	-0.117	0.316	-0.563	0.393	-0.101	<b>0.751</b>	0.208	0.657	1.000					
PDH	0.461	0.611	0.193	0.037	0.104	0.079	-0.001	-0.621	-0.135	-0.272	<b>-0.759</b>	1.000				
GB	-0.223	-0.639	-0.204	0.199	-0.237	0.082	-0.339	0.648	0.235	0.323	<b>0.732</b>	<b>-0.810</b>	1.000			
CHLa	0.362	<b>0.746</b>	0.134	-0.247	0.322	-0.142	0.371	-0.287	-0.210	-0.266	-0.644	<b>0.721</b>	<b>-0.810</b>	1.000		
CHLb	0.247	0.394	0.521	0.126	0.210	0.274	0.029	0.105	0.286	-0.103	-0.398	0.593	<b>0.721</b>	<b>0.849</b>	1.000	
CAR	0.407	0.518	0.215	-0.266	0.611	-0.287	0.145	-0.329	-0.050	-0.477	<b>-0.840</b>	<b>0.686</b>	0.593	<b>0.860</b>	<b>0.755</b>	1.000
ARP OH	0.082	-0.102	<b>0.737</b>	0.452	0.084	0.527	-0.438	0.453	<b>0.717</b>	-0.064	-0.138	0.291	<b>0.686</b>	0.418	<b>0.803</b>	0.520

Tabela 4.4. Korelacioni faktor (r) između ispitanih parametara u uzorcima korena pri značajnosti  $p < 0.05$ 

	SOD	CAT	GPx	GSH-Px	GR	APx	GSH	LP	OP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PRO	PDH
SOD	1.000											
CAT	0.184	1.000										
GPx	<b>0.752</b>	0.161	1.000									
GSH-Px	0.130	-0.203	0.478	1.000								
GR	-0.231	0.550	-0.018	0.339	1.000							
APx	0.158	-0.003	0.163	<b>0.814</b>	0.455	1.000						
GSH	<b>-0.801</b>	-0.377	<b>-0.798</b>	-0.320	0.078	-0.287	1.000					
LP	-0.436	0.087	-0.247	0.128	0.530	0.154	0.167	1.000				
OP	0.527	-0.302	0.650	<b>0.731</b>	-0.127	0.509	-0.399	-0.496	1.000			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.070	0.092	-0.475	<b>-0.924</b>	-0.497	<b>-0.747</b>	0.251	-0.159	-0.590	1.000		
PRO	0.513	0.383	0.640	0.313	0.137	0.264	-0.622	-0.139	0.293	-0.453	1.000	
PDH	-0.302	-0.365	-0.168	0.398	0.415	0.381	0.321	<b>0.763</b>	-0.065	-0.435	-0.077	1.000
GB	-0.271	0.289	-0.428	<b>-0.717</b>	-0.239	-0.580	0.064	0.333	<b>-0.818</b>	<b>0.753</b>	-0.209	-0.199

### 4.3. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na polifenolni profil i antioksidantni kapacitet lista i korena odabranih klonova topole

U cilju utvrđivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima lista i korena klonova topole, primenjena je HPLC/UV-Vis tehnika. Određivanje polifenolnog profila obuhvatilo je analizu 10 fenolnih kiselina i 4 flavonoida. U ispitanim uzorcima detektovana su polifenolna jedinjenja iz klase hidroksibenzoevih kiselina (galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva), hidroksicimetnih kiselina (kafena, hlorogenska, *p*-kumarinska, ferulna, izoferulna), salicilna kiselina i njen glikozid salicin kao i flavonoidi (katehin, hrisin, miricetin i kemferol). Rezultati su dati u *Tabeli 4.5.* i *Tabeli 4.6.* Na *Slici 4.12.* prikazan je hromatogram uzorka lista klona B-229 na 270 nm na kojem je označen pik salicina.



*Slika 4.12.* HPLC hromatogram uzorka lista kontrole klona B-229 na 270 nm (označen je pik salicina)

HPLC/UV-Vis analizom utvrđene su razlike u fenolnom profilu lista i korena kontrolnih biljaka tri ispitana klona M-1, B-229 i PE19/66. Kao dominantne komponente kod sva tri klona u oba organa detektovani su katehin (od 17.68 do 26.94 mg/g s.e. u listu i u korenu od 5.75 do 33.82 mg/g s.e.) i salicin (od 2.86 do 4.90 mg/g s.e. u listu i u korenu od 3.49 do 5.47 mg/g s.e.) što je u skladu sa rezultatima Randriamanana i

saradnika (2014). U listu B-229 klon dominantnija komponenta od salicina je protokatehinska kiselina detektovana u količini 3.99 mg/g s.e. (41% ukupnih fenolnih kiselina).

Tabela 4.5. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 (100 i 200 mOsm) na sadržaj odabranih fenolnih kiselina u ekstraktima korena i lista klonova topole (M-1, B 229 i PE19/66).

uzorak organ klon	Tretman	koncentracija (mg/g ekstrakta)										Ukupan sadržaj
		Salicin	Salicina kiselina	Galna kiselina	Protokatehinska kiselina	<i>p</i> -hidroksi benzoeva kiselina	Kafena kiselina	Hlorogenska kiselina	<i>p</i> -kumarinska kiselina	Ferulna kiselina	Isoferulna kiselina	
M-1	c	3.29 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	2.47 <sup>b</sup>	0.84 <sup>b</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>	10.13 <sup>a</sup>
	100	2.49 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.82 <sup>b</sup>	2.27 <sup>b</sup>	0.79 <sup>c</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.11 <sup>c</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	8.37 <sup>b</sup>
	200	1.86 <sup>c</sup>	1.23 <sup>a</sup>	0.69 <sup>c</sup>	2.99 <sup>a</sup>	<i>1.13<sup>a</sup></i>	0.23 <sup>a</sup>	<i>0.39<sup>a</sup></i>	<i>0.20<sup>a</sup></i>	0.15 <sup>b</sup>	0.20 <sup>c</sup>	9.07 <sup>b</sup>
LIST B-229	c	2.86 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>	0.76 <sup>b</sup>	3.99 <sup>a</sup>	0.49 <sup>b</sup>	0.122 <sup>ab</sup>	0.17 <sup>b</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.44 <sup>ab</sup>	9.69 <sup>a</sup>
	100	2.26 <sup>b</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.69 <sup>b</sup>	3.15 <sup>b</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.116 <sup>b</sup>	0.14 <sup>c</sup>	<i>0.06<sup>b</sup></i>	<i>0.30<sup>a</sup></i>	0.48 <sup>a</sup>	8.06 <sup>b</sup>
	200	2.18 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	<i>1.03<sup>a</sup></i>	2.01 <sup>c</sup>	<b>0.89<sup>a</sup></b>	0.134 <sup>a</sup>	<b>0.28<sup>a</sup></b>	<i>0.07<sup>a</sup></i>	<i>0.29<sup>a</sup></i>	0.43 <sup>b</sup>	7.74 <sup>b</sup>
PE19/66	c	4.90 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	1.69 <sup>b</sup>	1.13 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	10.96 <sup>a</sup>
	100	2.77 <sup>b</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.80 <sup>b</sup>	2.02 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	<b>0.54<sup>a</sup></b>	0.04 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.49 <sup>c</sup>	7.87 <sup>b</sup>
	200	2.20 <sup>c</sup>	0.52 <sup>a</sup>	0.53 <sup>c</sup>	1.67 <sup>b</sup>	0.98 <sup>c</sup>	0.08 <sup>c</sup>	0.15 <sup>c</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.39 <sup>c</sup>	0.58 <sup>b</sup>	7.16 <sup>b</sup>
M-1	c	3.49 <sup>a</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	1.51 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	7.09 <sup>a</sup>
	100	1.88 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.53 <sup>b</sup>	0.07 <sup>c</sup>	0.98 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>	4.11 <sup>b</sup>
	200	1.12 <sup>c</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.79 <sup>c</sup>	0.10 <sup>c</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.01 <sup>c</sup>	0.02 <sup>c</sup>	0.07 <sup>c</sup>	2.79 <sup>c</sup>
KOREN B-229	c	5.47 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.23 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.07 <sup>b</sup>	9.62 <sup>a</sup>
	100	2.05 <sup>b</sup>	<b>0.62<sup>a</sup></b>	0.55 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>	1.34 <sup>b</sup>	0.08 <sup>c</sup>	0.04 <sup>c</sup>	0.01 <sup>c</sup>	0.07 <sup>b</sup>	<b>0.24<sup>a</sup></b>	5.12 <sup>b</sup>
	200	1.67 <sup>c</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.10 <sup>c</sup>	1.29 <sup>b</sup>	0.13 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.04 <sup>c</sup>	0.06 <sup>b</sup>	4.37 <sup>c</sup>
PE19/66	c	5.15 <sup>a</sup>	0.40 <sup>a</sup>	1.22 <sup>a</sup>	0.17 <sup>b</sup>	1.93 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	9.63 <sup>a</sup>
	100	2.19 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.71 <sup>b</sup>	0.04 <sup>c</sup>	0.42 <sup>b</sup>	<i>0.27<sup>a</sup></i>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	3.95 <sup>b</sup>
	200	0.95 <sup>c</sup>	0.12 <sup>c</sup>	0.54 <sup>c</sup>	<b>1.05<sup>a</sup></b>	0.02 <sup>c</sup>	0.14 <sup>c</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.01 <sup>c</sup>	0.03 <sup>c</sup>	2.85 <sup>c</sup>

\*Vrednosti označene različitim malim slovom, za svako jedinjenje i klon, se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ) po Duncan-ovom testu

\*\*Povećanje do 50% u odnosu na kontrolu je označeno *Italic* stilom, dok su povećanja iznad 50% podebljana.

Dudonné i saradnici (2011) su ispitivali sadržaj odabranih fenola u ekstraktu pupuljaka vrste *Populus nigra* i identifikovali kao glavne komponente fenolne kiseline

(kafena, *p*-kumarna, ferulna, izoferulna, cimetna i *O*-metilkafena kiselina), salicin i flavonoidne aglikone (pinobaksin 5-metiletar, pinobaksin i pinocembrin), što je delom u saglasnosti sa rezultatima ove teze. U ekstraktima korena i listova klonova topole takođe su određene fenolne kiseline i salicin, ali različiti flavonoidi. Identifikovane komponente u ekstraktima su dobro poznate fitohemikalije nađene u vrstama topola (Devappa i sar., 2015). Randriamanana i saradnici (2014) su u listu vrste *P.tremula* kao glavnu komponentu među fenolnim kiselinama identifikovali hlorogensku kiselinu (~38% od ukupnih fenolnih kiselina), od flavonoida kemferol-3-glukuronid i katehin (~56% ukupnih flavonoida), a od salicinoida salikortin i tremulacin, što je delom u saglasnosti sa rezultatima ove teze. Isti autori su u korenu kao glavne komponente identifikovali derivate *p*-hidroksicimetne kiseline, katehin i salikortin.

Poznato je da *Populus* vrste sadrže specifične fenolne glikozide salicina, tako da salicin predstavlja marker jedinjenje roda *Populus*. Kao što je prikazano u *Tabeli 4.5.* vidi se da je salicin identifikovan u većoj količini od pojedinih fenolnih kiselina i da vodni stres utiče na smanjenje sadržaja salicina kod svih ispitanih klonova. Analizom uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj fenolnih komponenti, uglavnom je utvrđeno smanjenje sadržaja u odnosu na kontrolu, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za sadržaj ukupnih fenola.

Statistički značajno povećanje i povećanje za 50% u odnosu na kontrolu je utvrđeno samo u nekim slučajevima i posebno je naznačeno u *Tabeli 4.5.* i *Tabeli 4.6.* Kod klona B-229 u ekstraktu lista pod uticajem 100 mOsm stresa statistički značajno se povećala količina ferulne kiseine, *p*-kumarinske kiseline i miricetina, a pod uticajem 200 mOsm stresa je određeno statistički značajno povećanje sadržaja galne kiseline, hlorogenske kiseline, *p*-hidroksibenzojeve kiseline, *p*-kumarinske i ferulne kiseline; zatim u ekstraktu korena pod uticajem 100 mOsm stresa značajno se povećao sadržaj salicilne kiseline, izoferulne kiselne, hrisina, miricetina i kemferola, dok je u uslovima 200 mOsm stresa u ekstraktu korena određeno značajno povećanje sledećih flavonoida: hrisina, miricetina i kemferola. Kod klona PE19/66 u ekstraktu lista je određeno statistički značajno povećanje sadržaja hlorogenske kiseline, protokatehinske kiseline, hrisina i kemferola (pod uticajem 100 mOsm stresa), dok je u ekstraktu korena utvrđeno statistički značajno povećanje sadržaja kafene kiseline (pod uticajem 100 mOsm stresa), protokatehinske kiseline i hrisina (pod uticajem 200 mOsm stresa). Kod klona M-1 u ekstraktu lista pod uticajem 100 mOsm stresa je utvrđeno statistički značajno povećanje izoferulne kiseline i

flavonoida hrisina, miricetina i kemferola; dok su pod uticajem 200 mOsm stresa utvrđena statistički značajna povećanja sadržaja protokatehinske kiseline, *p*-hidroksibenzojeve kiseline, hlorogenske kiseline i *p*-kumarinske kiseline. U korenu klona M-1 je određeno statistički značajno povećanje sadržaja flavonoida (hrisin, miricetin i kemferol) u uslovima 100 mOsm stresa.

Tabela 4.6. Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 (100 i 200 mOsm) na sadržaj odabranih flavonoida u ekstraktima korena i lista klonova topole (M-1, B-229 i PE19/66).

uzorak organ klon	Tretman	koncentracija (mg/g ekstrakt)					ukupan sadržaj
		Katehin	Hrisin	Miricetin	Kemferol		
M-1	c	17.68 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.021 <sup>b</sup>	18.00 <sup>a</sup>	
	100	12.52 <sup>b</sup>	<i>0.23<sup>a</sup></i>	<i>0.12<sup>a</sup></i>	<i>0.024<sup>a</sup></i>	12.88 <sup>b</sup>	
	200	12.44 <sup>b</sup>	0.22 <sup>ab</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.016 <sup>c</sup>	12.76 <sup>b</sup>	
LIST B-229	c	22.74 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.06 <sup>a</sup>	23.31 <sup>a</sup>	
	100	17.46 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	<i>0.19<sup>a</sup></i>	0.04 <sup>b</sup>	17.97 <sup>b</sup>	
	200	15.06 <sup>c</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.03 <sup>c</sup>	15.51 <sup>c</sup>	
PE19/66	c	26.94 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	27.57 <sup>a</sup>	
	100	26.20 <sup>a</sup>	<i>0.54<sup>a</sup></i>	0.18 <sup>a</sup>	<b>0.07<sup>a</sup></b>	26.99 <sup>a</sup>	
	200	25.80 <sup>a</sup>	0.29 <sup>c</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.04 <sup>c</sup>	26.28 <sup>a</sup>	
M-1	c	5.75 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.038 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	6.07 <sup>b</sup>	
	100	6.44 <sup>a</sup>	<i>0.35<sup>a</sup></i>	0.015 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	6.80 <sup>a</sup>	
	200	2.85 <sup>c</sup>	<i>0.36<sup>a</sup></i>	0.004 <sup>c</sup>	0.00 <sup>a</sup>	3.21 <sup>c</sup>	
KOREN B-229	c	33.82 <sup>a</sup>	0.20 <sup>c</sup>	0.02 <sup>c</sup>	0.004 <sup>c</sup>	34.05 <sup>a</sup>	
	100	15.40 <sup>b</sup>	<b>0.46<sup>a</sup></b>	<b>0.14<sup>a</sup></b>	<b>0.101<sup>a</sup></b>	16.10 <sup>b</sup>	
	200	17.06 <sup>b</sup>	<b>0.30<sup>b</sup></b>	<b>0.06<sup>b</sup></b>	<b>0.018<sup>b</sup></b>	17.43 <sup>b</sup>	
PE19/66	c	25.73 <sup>a</sup>	0.16 <sup>c</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.012 <sup>a</sup>	25.92 <sup>a</sup>	
	100	12.28 <sup>b</sup>	0.18 <sup>b</sup>	<b>0.04<sup>a</sup></b>	0.000 <sup>c</sup>	12.5 <sup>b</sup>	
	200	0.87 <sup>c</sup>	<b>0.25<sup>a</sup></b>	0.01 <sup>c</sup>	0.002 <sup>b</sup>	1.13 <sup>c</sup>	

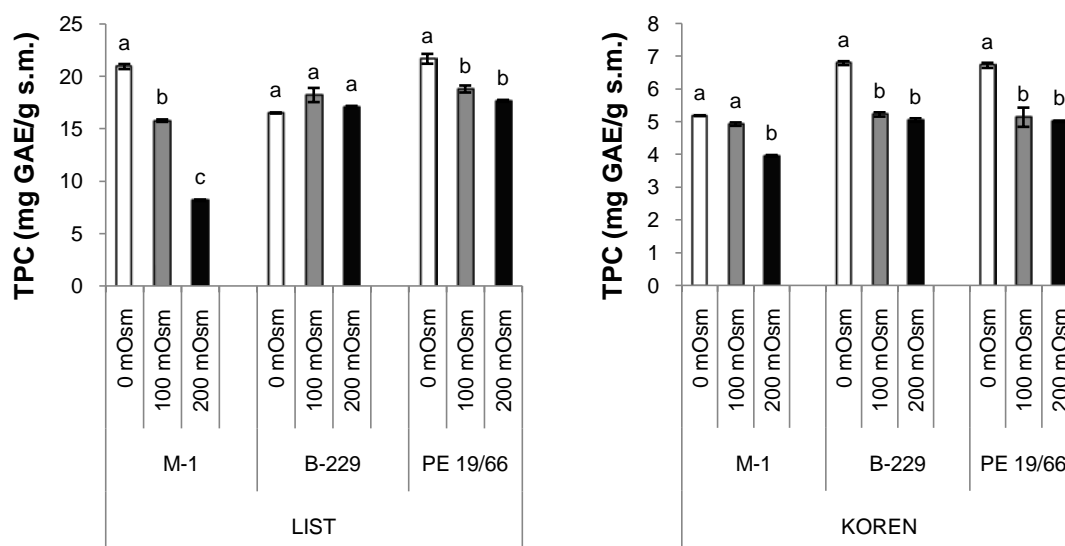
\*Vrednosti označene različitim malim slovom, za svako jedinjenje i klon, se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ) po Duncan-ovom testu

\*\*Povećanje do 50% u odnosu na kontrolu je označeno *Italic* stilom, dok su povećanja iznad 50% podebljana.

Poznato je da fenolna jedinjenja pružaju konstitutivnu odbranu biljkama u uslovima abiotičkog i biotičkog stresa (Ruuhola i sar., 2001). Ipak, u nekoliko istraživanja je

pokazano da konstitutivan nivo fenola može da se poveća kao odgovor na infekcije mikroorganizmima, povrede, sušu i dr. (Ruuhola i sar., 2001; Yoshida i sar., 2005; Barchet i sar., 2014). Istraživanja uticaja vodnog i osmotskog stresa na polifenole su dala različite rezultate u smislu da je sadržaj opadao ili rastao u zavisnosti od vrste, tipa i intenziteta stresa (Cheruiyot i sar., 2007; Petridis i sar., 2012; Griesser i sar., 2015; Cherit-Hacid i sar., 2015). Barchet i saradnici (2014) su sproveli istraživanje uticaja suše na metabolički profil klonova hibridne topole i utvrdili da se pri suši povećao sadržaj katehina i kemferola, zatim osmolita rafinoze i galaktinola kao i različitih amino kiselina. Kirakosyan i saradnici (2004) su utvrdili višestruko povećanje sadržaja hlorogenske kiseline u uslovima suše kod dve vrste gloga, što je u skladu sa našim rezultatima.

Na *Histogramu 4.15.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ukupnih fenola u listu i korenu odabranih klonova topole. Sadržaj ukupnih fenola izražen u mg ekvivalenta galne kiseline/g suve mase (mg GAE/g s.m.) je u listu u kontrolama iznosio: 20.93 (M-1), 16.49 (B-229) i 21.67 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG sadržaj ukupnih fenola se menjao u opsegu od: 8.16-15.76 mg EGA/g s. m. (M-1), 17.05-18.21 mg EGA/g s. m. (B-229) i 17.65-18.78 mg EGA/g s. m. (PE19/66). Kod klonova M-1 i PE19/66 utvrđena su značajna smanjenja sadržaja fenola pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najizrazitije je zabeleženo kod klona M-1 pri 200 mOsm tretmanu (61%). Kod B-229 klona utvrđeno je povećanje sadržaja fenola pri tretmanima, a najveće je iznosilo (13.9%).



*Histogram 4.15.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ukupnih fenola u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

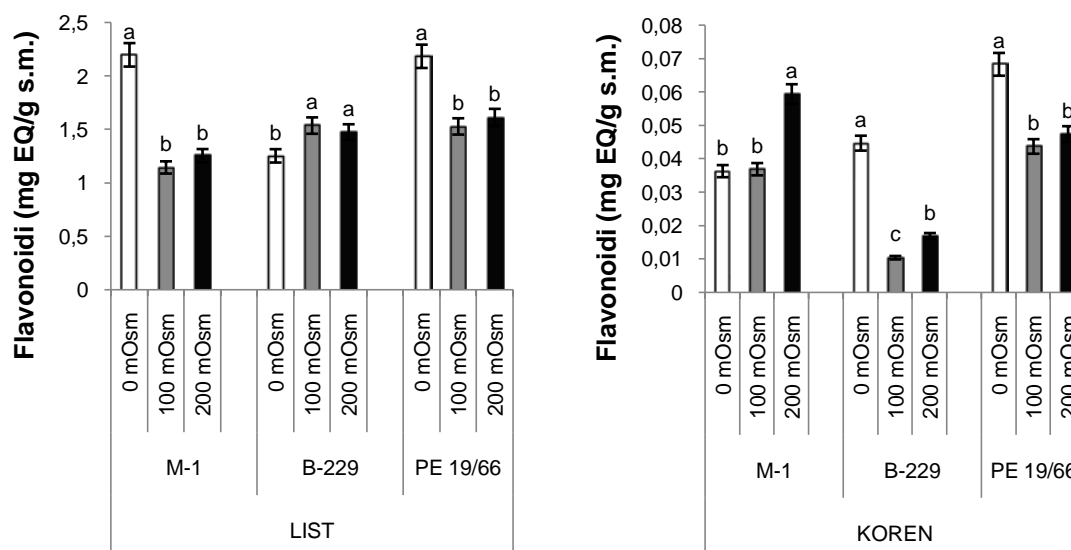
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Sadržaj ukupnih fenola izražen u mg ekvivalenata galne kiseline/g suve mase je u korenu u kontrolama iznosio: 5.18 (M-1), 6.79 (B-229) i 6.72 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG sadržaj ukupnih fenola se menjao u opsegu od: 3.96-4.93 mg EGA/g s. m. (M-1), 5.05-5.22 mg EGA/g s. m. (B-229) i 5.01-5.14 mg EGA/g s. m. (PE19/66). Sadržaj fenola se smanjivao pri tretmanima kod svih klonova.

Fenoli igraju važnu ulogu u razvijanju otpornosti biljaka na vodni i oksidativni stres zahvaljujući svojim antioksidantnim osobinama (Gould i sar., 2002). Prema rezultatima sa *Histograma 4.15.* može se zaključiti da se sadržaj ukupnih fenola uglavnom smanjuje u uslovima vodnog stresa, što može biti rezultat njihove oksidacije antioksidantnim enzimima koji koriste fenole kao supstrat ili je rezultat smanjene sinteze. Ovo je u skladu sa rezultatima Hussien i saradnika (2015) i Salem i saradnika (2014) koji su dokazali da suša izaziva smanjenje sadržaja ukupnih fenola. Ahmed i saradnici (2015) su samo kod tolerantnog tipa graška utvrdili povećanje sadržaja fenola u uslovima suše.

Na *Histogramu 4.16.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ukupnih flavonoida u listu i korenu odabranih klonova topole. Sadržaj ukupnih flavonoida izražen u mg ekvivalenata kvercetina/g suve mase (mg EQ/g s. m.) je u listu u kontrolama iznosio: 2.20 (M-1), 1.25 (B-229) i 2.19 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj ukupnih flavonoida se menjao u opsegu od: 1.14-1.25 mg EQ/g s. m. (M-1), 1.48-1.54 mg EQ/g s. m. (B-229) i 1.53-1.61 mg EQ/g s. m. (PE19/66). Kod B-229 klona utvrđena su statistički značajna povećanja količine flavonoida, a najveće pri 100 mOsm tretmanu (23.2%). Kod klonova M-1 i PE19/66 utvrđena su značajna smanjenja sadržaja flavonoida pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najizrazitije je zabeleženo kod klona M-1 pri 100 mOsm tretmanu (48.2%).

Sadržaj ukupnih flavonoida izražen u mg ekvivalenata kvercetina/g suve mase je u korenu u kontrolama iznosio: 0.036 (M-1), 0.045 (B-229) i 0.068 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj ukupnih flavonoida se menjao u opsegu od: 0.037-0.059 mg EQ/g s. m. (M-1), 0.010-0.017 mg EQ/g s. m. (B-229) i 0.044-0.047 mg EQ/g s. m. (PE19/66). Kod M-1 klona utvrđeno je statistički značajno povećanje količine flavonoida pri 200 mOsm tretmanu (63.9%). Kod klonova B-229 i PE19/66 utvrđena su značajna smanjenja sadržaja flavonoida pri tretmanima u odnosu na kontrolu, a najizrazitije je zabeleženo kod klona B-229 pri 100 mOsm tretmanu (77.8%).



*Histogram 4.16.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ukupnih flavonoida u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

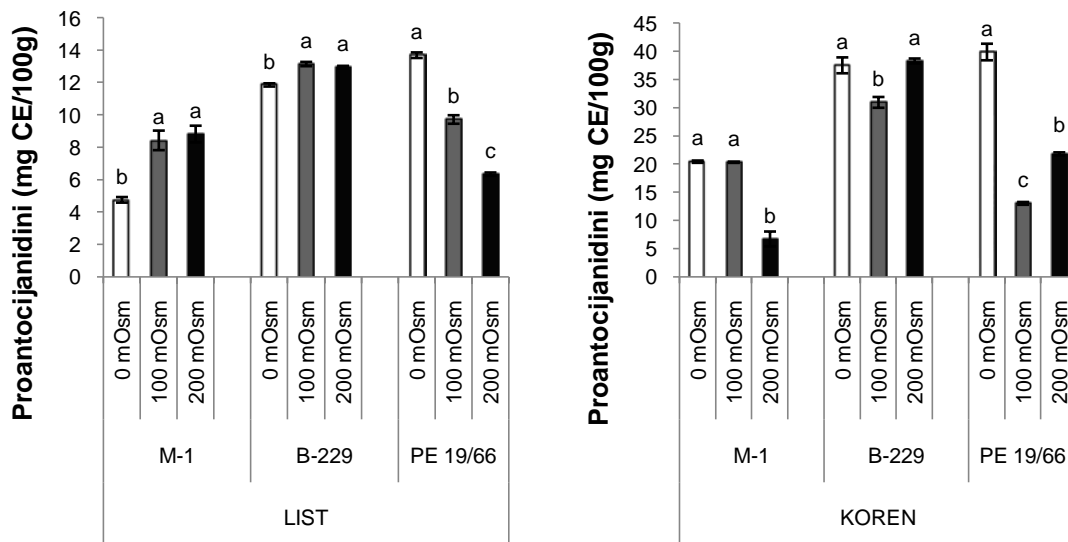
I drugi autori navode da vodni stres utiče na promenu sadržaja flavonoida kod biljaka (Nogués i sar., 1998; Kirakosyan i sar., 2004; Hussien i sar., 2015). Ahmed i saradnici (2015) su utvrdili povećanje sadržaja ukupnih flavonoida u uslovima vodnog deficita kod tri genotipa graška. Smanjenje sadržaja flavonoida u korenu klonova B-229 i PE19/66 je u skladu sa rezultatima Dash i saradnika (2017) koji su utvrdili značajno smanjenje sadržaja flavonoida u korenu kod klona *P.tremula x P.alba* u uslovima vodnog stresa izazvanog PEG 6000.

Na *Histogramu 4.17.* prikazani su rezultati ispitivanja uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ukupnih proantocijanidina u listu i korenu odabranih klonova topole. Sadržaj ukupnih proantocijanidina izražen u mg cijanidina/100 g suve mase je u listu u kontrolama iznosio: 4.77 (M-1), 11.87 (B-229) i 13.71 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj ukupnih proantocijanidina se menjao u opsegu od: 8.44-8.84 mg cijanidina/100 g s. m. (M-1), 12.96-13.16 mg cijanidina/100 g s. m. (B-229) i 6.36-9.74 mg cijanidina/100 g s. m. (PE19/66). Sadržaj ukupnih proantocijanidina se statistički signifikantno povećao pri svim tretmanima u odnosu na kontrolu kod klonova M-1 i B-229, a najveće povećanje je zabeleženo kod klona M-1 pri 200 mOsm tretmanu (85.3%). Kod klona PE19/66 utvrđeno je smanjenje sadržaja ukupnih proantocijanidina, najveće pri 200 mOsm tretmanu (53.6%).

Sadržaj ukupnih proantocijanidina izražen u mg ekvivalenata cijanidina/100 g suve mase je u korenu u kontrolama iznosio: 20.46 (M-1), 37.57 (B-229) i 39.93



(PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 sadržaj ukupnih proantocijanidina se menjao u opsegu od: 6.75-20.36 mg cijanidina/100 g s. m. (M-1), 30.99-38.34 mg cijanidina/100 g s. m. (B-229) i 13.06-21.85 mg cijanidina/100 g s. m. (PE19/66). Najveće promene sadržaja ukupnih proantocijanidina su zabeležene pri 100 mOsm tretmanu kod klona PE19/66 (67.3%) i kod klona M-1 (67%).



**Histogram 4.17.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na sadržaj ukupnih proantocijanidina u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66

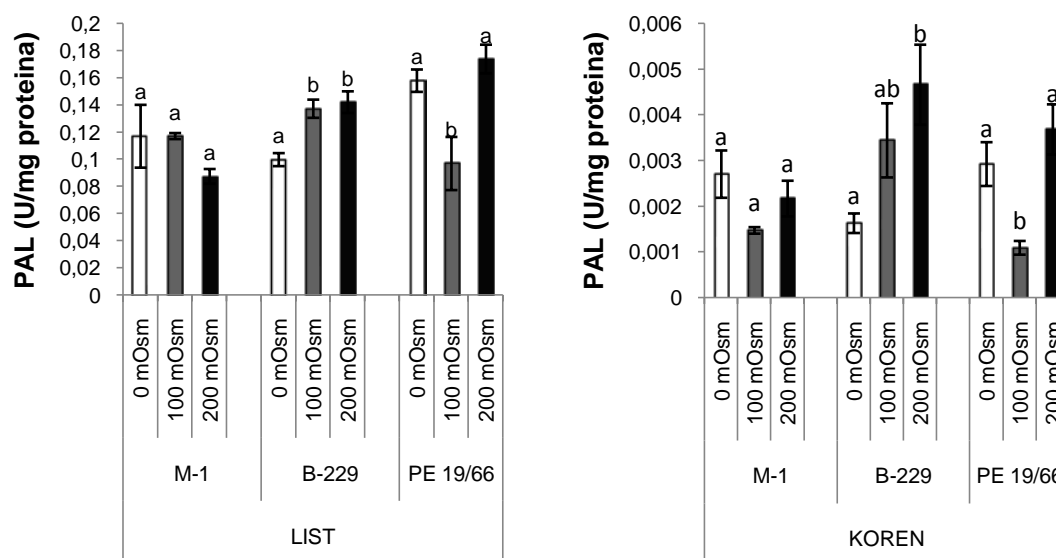
Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Salem i saradnici (2014) ukazuju da se kod biljaka izloženih jačim sušnim uslovima smanjuje sadržaj polifenola, flavonoida i proantocijanidina. Takođe, Carter i saradnici (1999) su kod vrste *Lotus corniculatus* u uslovima suše odredili smanjenje sadržaja proantocijanidina u listovima i korenu. Hernández i saradnici (2006) su utvrdili značajno povećanje sadržaja proantocijanidina u listovima čaja tek nakon 26 dana izloženosti suši. Miranda i saradnici (2007) su pri ispitivanju odgovora hibridne topole na infekciju *Melampsora medusae* utvrdili akumulaciju sadržaja proantocijanidina.

Rezultati uticaja PEG 6000 na aktivnost fenilalaninamonijum-lijaze (PAL) u listu i korenu klonova topole prikazani su na *Histogramu 4.18*. Aktivnost PAL izražena u U/mg proteina je u listu u kontrolama iznosila: 0.117 (M-1), 0.100 (B-229) i 0.158 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost PAL se menjala u opsegu od: 0.087 - 0.117 U/mg proteina (M-1), 0.137-0.142 U/mg proteina (B-229) i 0.097-0.174 U/mg proteina (PE19/66). U uslovima vodnog stresa samo kod klona B-229 aktivnost PAL se statistički značajno povećala (42% pri 200 mOsm tretmanu), dok kod drugih klonova

utvrđene promene nisu statistički značajne, sem značajnog pada aktivnosti kod klona PE19/66 pri 100 mOsm tretmanu (38.6%).

Aktivnost PAL izražena u U/mg proteina je u korenu u kontrolama iznosila: 0.00271 (M-1), 0.00163 (B-229) i 0.00293 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 aktivnost PAL se menjala u opsegu od: 0.00147-0.00217 U/mg proteina (M-1), 0.00344-0.00466 U/mg proteina (B-229) i 0.00109-0.00368 U/mg proteina (PE19/66). Statistički značajno povećanje aktivnosti zabeleženo je samo kod klona B-229 pri 200 mOsm tretmanu (185.9%). Kod klona PE19/66 pri 100 mOsm tretmanu zabeleženo je statistički značajno smanjenje aktivnosti PAL (62.8%).



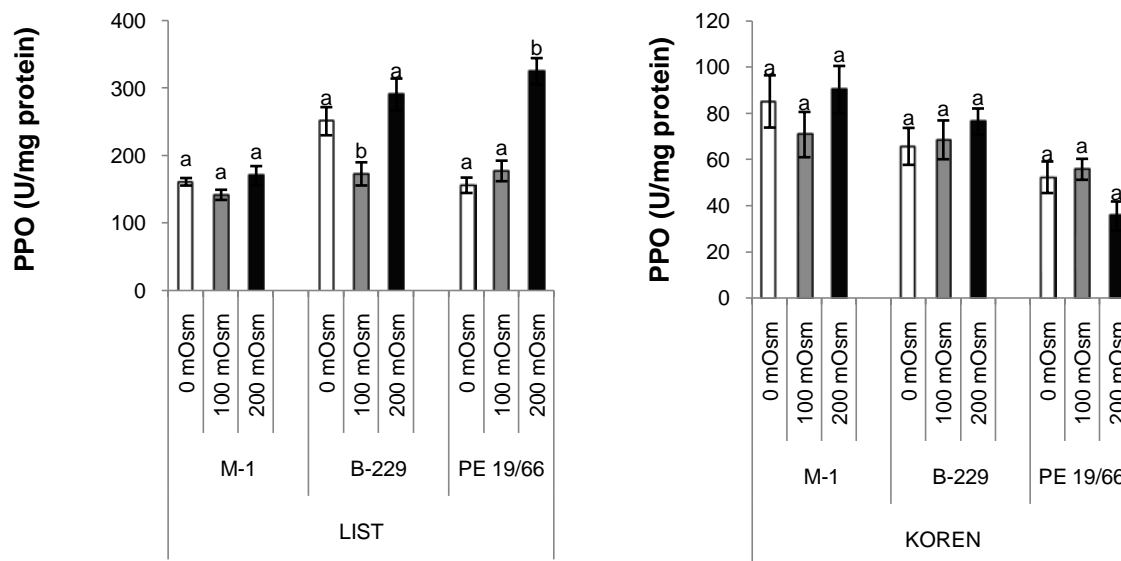
*Histogram 4.18.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost fenilalaninamonijum-lijaze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE 19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Iz rezultata prikazanih na *Histogramu 4.18.* vidi se da se aktivnost PAL različito menjala u zavisnosti od klona i primenjenog stresa, što je u skladu sa rezultatima Phimchan i saradnika (2014). Mnogi autori su uočili povećanje aktivnosti PAL tokom suše (Jaafar i sar., 2012; Ahmed i sar., 2015).

Rezultati uticaja vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost polifenol-oksidadaze (PPO) u listu i korenu klonova topole prikazani su na *Histogramu 4.19.* Aktivnost PPO je varirala među kontrolama u listu od 155.94 do 251.04 U/mg proteina i korenu od 52.31 do 85.12 U/mg proteina. Značajno povećanje aktivnosti PPO u uzorcima korena nije zabeleženo ni kod jednog klona ni pri jednom tretmanu. Kod klona PE19/66 pri 200 mOsm tretmanu zabeleženo je statistički značajno povećanje aktivnosti PPO u

listu, dok je kod klona B-229 pri tretmanu od 100 mOsm u uzorku lista zabeleženo značajno smanjenje aktivnosti PPO.



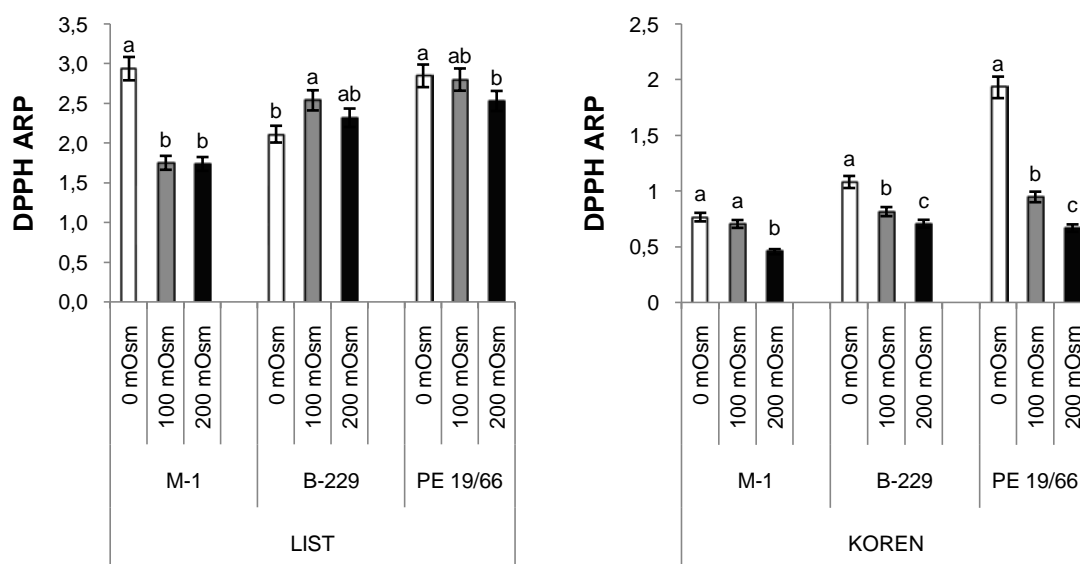
*Histogram 4.19.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na aktivnost polifenol-oksidadze u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE19/66. Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Oksidacija flavonoida u biljkama je uglavnom katalizovana polifenol-oksidadzama i peroksidazama. Aktivnosti ovih enzima se indukuju tokom u uslovima stresa, a naročito pri napadu patogena (Pourcel i sar., 2007). Iz izloženih rezultata se može konstatovati da je do statistički signifikantnog povećanja aktivnosti PPO došlo samo pri 200 mOsm tretmanu u listu klona PE19/66, dok u korenu nije došlo do statistički značajnih promena aktivnosti. Mnogi autori su uočili povećanje aktivnosti PPO tokom suše (Ahmed i sar., 2015; Chakhchar i sar., 2015).

Jedna od najčešće primenjenih metoda za određivanje antioksidantnog potencijala je DPPH metoda. Na *Histogramu 4.20.* prikazane su rezultati delovanja ekstrakata na neutralizaciju DPPH radikala izraženi kao DPPH ARP (eng. *Antiradical power*,  $ARP = 1/IC_{50}$ ).

Vrednosti za DPPH ARP u listu u kontrolama su iznosile: 2.943 (M-1), 2.117 (B-229) i 2.852 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 vrednosti su se menjale u opsegu od: 1.741 - 1.755 (M-1), 2.323-2.543 (B-229) i 2.535-2.805 (PE19/66). U uslovima vodnog stresa samo kod klona B-229 DPPH ARP vrednost se statistički značajno povećala, dok je kod drugih klonova DPPH ARP vrednost opadala.

Vrednosti za DPPH ARP u korenu u kontrolama su iznosile: 0.768 (M-1), 1.084 (B-229) i 1.934 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 vrednosti su se menjale u opsegu od: 0.457 - 0.706 (M-1), 0.708-0.817 (B-229) i 0.669-0.949 (PE19/66). U uslovima vodnog stresa kod svih klonova DPPH ARP vrednost se smanjivala, najveće je utvrđeno kod klona PE19/66 pri 200 mOsm tretmanu (65.4%).



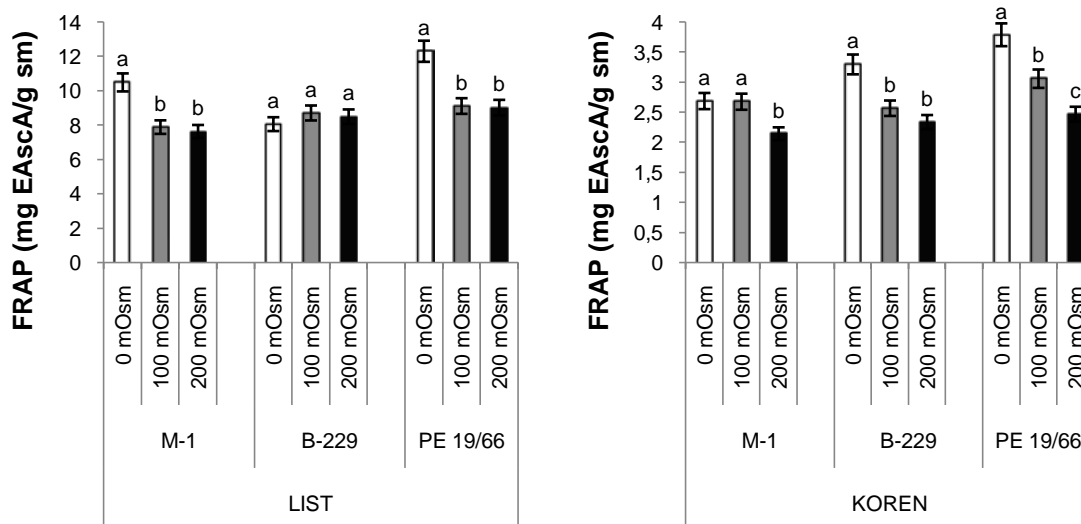
**Histogram 4.20.** Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na DPPH antiradikalisku aktivnost u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE 19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Łabanowska i saradnici (2013) su utvrdili da tolerantnije vrste biljaka pokazuju veću DPPH aktivnost u odnosu na osetljive, ali je kod svih biljaka u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 600 određena manja DPPH aktivnost u odnosu na kontrolu, što se može objasniti angažovanjem antioksidanta za uklanjanje viška ROS nastalih tokom stresnih uslova. Ahmed i saradnici (2015) su samo kod tolerantnog tipa graška utvrdili povećanje DPPH aktivnosti u uslovima suše.

Rezultati ispitivanja redukcionog potencijala ekstrakata izraženim u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suve mase (mg EAscA/g s. m.) prikazani su na *Histogramu 4.21*. Vrednosti za FRAP u listu u kontrolama su iznosile: 10.5 (M-1), 8.1 (B-229) i 12.3 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 vrednosti su se menjale u opsegu od: 7.6 -7.9 mg EAscA/g s. m. (M-1), 8.5-8.7 mg EAscA/g s. m. (B-229) i 9.0-9.1 mg EAscA/g s. m. (PE19/66). U uslovima vodnog stresa samo kod klona B-229 FRAP vrednost se nije statistički značajno menjala, dok je kod drugih klonova FRAP vrednost značajno opadala.

Vrednosti za FRAP u korenu u kontrolama su iznosile: 2.7 (M-1), 3.3 (B-229) i 3.8 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 vrednosti su se menjale u opsegu od: 2.1- 2.7 mg EAscA/g s. m. (M-1), 2.3-2.6 mg EAscA/g s. m. (B-229) i 2.5-3.1 mg EAscA/g s. m. (PE19/66). U uslovima vodnog stresa kod svih klonova FRAP vrednost se smanjivala.



*Histogram 4.21.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na redukcionu sposobnost u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE 19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

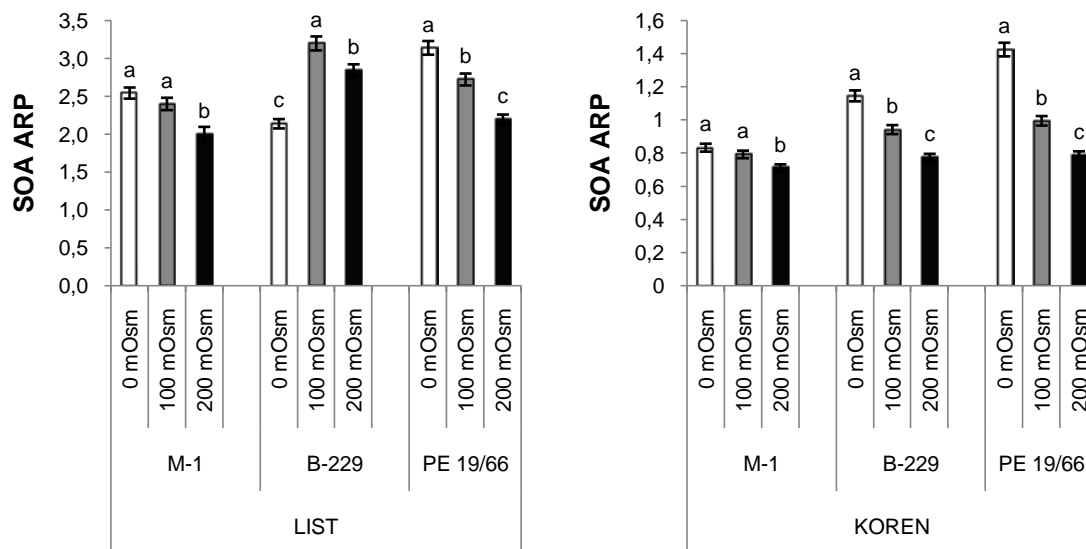
Ispitivanja antioksidanih osobina korena i lista vinove loze u uslovima suše su ukazala na smanjenje redukcionog potencijala koje je u korelaciji sa smanjenim sadržajem fenolnih jedinjenja (Król i sar., 2014). Łabanowska i saradnici (2013) su utvrdili veću redukcionu sposobnost pšenice u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 600.

Na *Histogramu 4.22.* prikazani su rezultati delovanja ekstrakata na neutralizaciju superoksid anjon radikala.

Vrednosti za SOA ARP u listu u kontrolama su iznosile: 2.5 (M-1), 2.1 (B-229) i 3.1 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 vrednosti su se menjale u opsegu od: 2.0 -2.4 (M-1), 2.8-3.2 (B-229) i 2.2-2.7 (PE19/66). U uslovima vodnog stresa samo kod klona B-229 SOA ARP vrednost se statistički značajno povećala u odnosu na kontrolu, i to najviše pri 100 mOsm tretmanu (49.7%), dok se kod drugih klonova SOA ARP vrednost smanjivala.

Vrednosti za SOA ARP u korenu u kontrolama su iznosile: 0.83 (M-1), 1.15 (B-229) i 1.43 (PE19/66). Pod uticajem različitih doza PEG 6000 vrednosti su se menjale u

opsegu od: 0.71- 0.75 (M-1), 0.77-0.94 (B-229) i 0.79-1.05 (PE19/66). U uslovima vodnog stresa kod svih klonova SOA ARP vrednost se smanjivala.



*Histogram 4.22.* Uticaj vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 na SOA antiradikalnu aktivnost u listu i korenu klonova topole M-1, B-229 i PE 19/66

Rezultat je izražen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Vrednosti označene različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

Superoxid anjon radikal je veoma štetan za ćelijske komponente. Kao što se vidi na *Histogramu 4.22.* sposobnost neutralizacije  $O_2^{\bullet -}$  radikala se statistički značajno povećala samo kod klona B-229 u listu u uslovima vodnog stresa, što je povezano sa povećanjem sadržaja flavonoida u ovim ekstraktima. Robak i Glyglewski (1988) smatraju flavonoide efikasnim antioksidantima, uglavnom zbog sposobnosti da neutrališu  $O_2^{\bullet -}$  radikale.

#### 4.3.1. Korelaciona analiza i PCA

Regresiona analiza, primenjena na dobijene rezultate antioksidantne aktivnosti ekstrakata i analize polifenolnog profila (*Tabela 4.7.*) pokazuje da postoji visok stepen korelacije sadržaja ukupnih fenola i sposobnosti „hvatanja“  $DPPH^{\bullet}$  i  $O_2^{\bullet -}$  radikala, kao i redukcionog potencijala ( $r = 0.94, 0.95$  i  $0.96$ ), kao i ukupnih flavonoida i sposobnosti „hvatanja“  $DPPH^{\bullet}$  i  $O_2^{\bullet -}$  radikala, i redukcionog potencijala ( $r = 0.93, 0.93$  i  $0.99$ ), što ukazuje na to da pri neutralizaciji slobodnih radikalskih vrsta, kada se ona odvija po mehanizmu transfera elektrona tj. redukcije, fenolna jedinjenja i flavonoidi imaju ključnu ulogu. Manje vrednosti od ovih faktora ( $r \geq 0.71$ ), ali i dalje visoke i značajne, utvrđene su između sadržaja navedenih antioksidantnih aktivnosti i pojedinih polifenolnih jedinjenja: miricetin, protokatehinska kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina i

izoferulna kiselina, što ukazuje da sadržaj ovih jedinjenja takođe utiče na nivo neutralizacije slobodnih radikala. Takođe, visok stepen pozitivne korelacije utvrđen je i između pojedinih jedinjenja: ferulna – izoferulna kiselina ( $r = 0.91$ ), miricetin – izoferulna kiselina ( $r = 0.90$ ), salicilna kiselina – *p*-kumarna kiselina ( $r = 0.81$ ), miricetin – kemferol ( $r = 0.80$ ), miricetin – ferulna kiselina ( $r = 0.75$ ), salicin – galna kiselina ( $r = 0.75$ ), itd. Između pojedinih parametara su utvrđene negativne korelacije, ali nijedna od njih nije bila statistički značajna sem između hrisina i kafene kiseline ( $r = -0.68$ ). Sva polifenolna jedinjenja su u pozitivnoj korelaciji sa TPC, flavonoidima i navedenim antioksidantnim aktivnostima, sem *p*-hidroksibenzojeve kiseline i kafene kiseline, što ukazuje na to da ove dve kiseline imaju neku drugu fiziološku ulogu tokom vodnog stresa i da im glavna funkcija nije antioksidantna. Nasuprot našem rezultatu, Dudonné i saradnici (2011) su našli da kafena kiselina i *p*-kumarinska kiselina najviše doprinose antioksidantnoj aktivnosti koja je utvrđena ORAC (*eng. Oxygen radical absorbance capacity*) testom. Ovakvo neslaganje rezultata se može objasniti različitim mehanizmima na kojima se zasnivaju korišćeni testovi za ispitivanje antioksidantne aktivnosti. Iako predstavlja jedan od najvažnijih antioksidantnih testova, ORAC test se zasniva na procesu transfera H atoma (HAT- *eng. Hydrogen atom transfer*). Pored već navedenog mehanizma metode, predviđanje kako će pojedino polifenolno jedinjenje delovati kao antioksidant, poznato kao veza između strukture i aktivnosti je veoma složeno i zavisi od mnogo drugih faktora koji uključuju i polarnost rastvarača, pH, tip oksidanta u reakciji kao i sam složeni kompleks biološkog sistema (Rice-Evans i sar., 1996). Iako rezultati ukazuju na indukciju proantocijanidina kod klona M-1 i B-229 u uslovima vodnog stresa, ovaj parametar nije u pozitivnoj korelaciji sa antioksidantnom aktivnošću. Field i saradnici (2006) su sugerisali da ova jedinjenja imaju ulogu u ojačavanju ćelijskog zida u uslovima stresa, stoga ova fiziološka uloga može biti priritet u poređenju sa antioksidantnom ulogom u uslovima stresa izazvanim PEG 6000. Polifenolna jedinjenja kao neenzimski antioksidanti doprinose mehanizmima tolerancije na osmotski stres i stres suše zahvaljujući potencijalu hvatanja ROS kao što je  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$  i  $H_2O_2$  koji nastaju u višku u uslovima nedostatka vode (Štajner i sar., 2011; Rai i sar., 2013).

Enzim PAL je pokazao statistički signifikantnu korelaciju sa TPC ( $r = 0.93$ ), DPPH<sup>•</sup> ( $r = 0.88$ ), FRAP ( $r = 0.95$ ), sa svim pojedinačnim polifenolnim jedinjenjima koja su u pozitivnoj korelaciji sa antioksidantnom aktivnosti (miricetin, protokatehinska kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina i izoferulna kiselina,  $r > 0.68$ ), kao i sa enzimom

PPO ( $r = 0.87$ ). Enzim PPO je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju sa istim parametrima kao i enzim PAL, ali u manjoj meri.

Biosinteza i akumulacija polifenolnih jedinjenja se odvija šikimatnim putem (Dixon i Paiva, 1995). Prekursor većine polifenolnih jedinjenja u biljkama je L-fenilalanin, jedinjenje koje se pomoću enzima PAL deaminuje i formira se *t*-cimetna kiselina. Ova reakcija je prvi korak u biosintezi velikog broja polifenola jer hidroksicimetne kiseline, a naročito njihovi estri sa koenzimom A su najčešće strukturni elementi polifenolnih jedinjenja, kao što su estri i amidi cimetne kiseline, lignini, flavonoidi i kondenzovani tanini (Sánchez-Rodríguez i sar., 2011). Brojna istraživanja potvrđuju da se tokom stresa u biljkama povećava aktivnost PAL i drugih enzima fenilpropanoidnog puta (Keleş i Öncel, 2002; Oh i sar., 2009; Sánchez-Rodríguez i sar., 2011). Matsumoto i saradnici (1973) su prvi zabeležili povezanost aktivnosti PAL i akumulacije polifenola u ćelijskoj suspenziji hibridne topole. Enzim PAL je prvi enzim povezan za fenilpropanoidni metabolizam, iako i drugi enzimi, kao što je halkon-sintaza mogu imati regulatornu ulogu (Hahlbrock i Scheel, 1989). Stoga, povećan nivo polifenola i antioksidantne aktivnosti kod klona B-229 se mogu objasniti indukcijom enzimske aktivnosti PAL u uslovima vodnog stresa. Miranda i saradnici (2007) su pri ispitivanju reakcije hibridne topole na infekciju *Melalampora medusae* utvrdili indukciju gena koji kodiraju enzime neophodne u sintezi proantocijanidina, kao i akumulaciju proantocijanidina u zaraženim listovima. U našim ispitivanjima, tokom vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 došlo je do akumulacije sadržaja proantocijanidina kod klona M-1 i klona B-229.

Polifenol-oksidaža je jedan od enzima uključenih u odbranu od patogena ili povreda od herbivora. Indukcija ekspresije PPO je zabeležena pri reakciji biljaka na različite vrste stresa i povezuje se sa pojavom tolerantnosti (Ortega-García i Peragón, 2009). Polifenol-oksidaže katalizuju oksidaciju polifenola do hinona, veoma reaktivnih molekula koji mogu kovalentno da se vežu za druga jedinjenja i dovode do stvaranja tamnih ili braon polimera. Thipyapong i saradnici (2004) su povezali smanjenu ekspresiju PPO kod biljaka sa većom tolerancijom na sušu, ali zadovoljavajuće objašnjenje ove pojave nisu imali. Prikazani rezultati (*Histogram 4.19.*) ukazuju na to da se u listu klona B-229 pri 100 mOsm tretmanu statistički značajno smanjila aktivnost PPO što je u skladu sa rezultatima dobijenim za antioksidantnu aktivnost ovog klona koja je u uslovima vodnog stresa povećana.



Tabela 4.7. Korelacioni faktor ( $r$ ) između ispitanih parametara u uzorcima pri značajnosti  $p < 0.01$ .

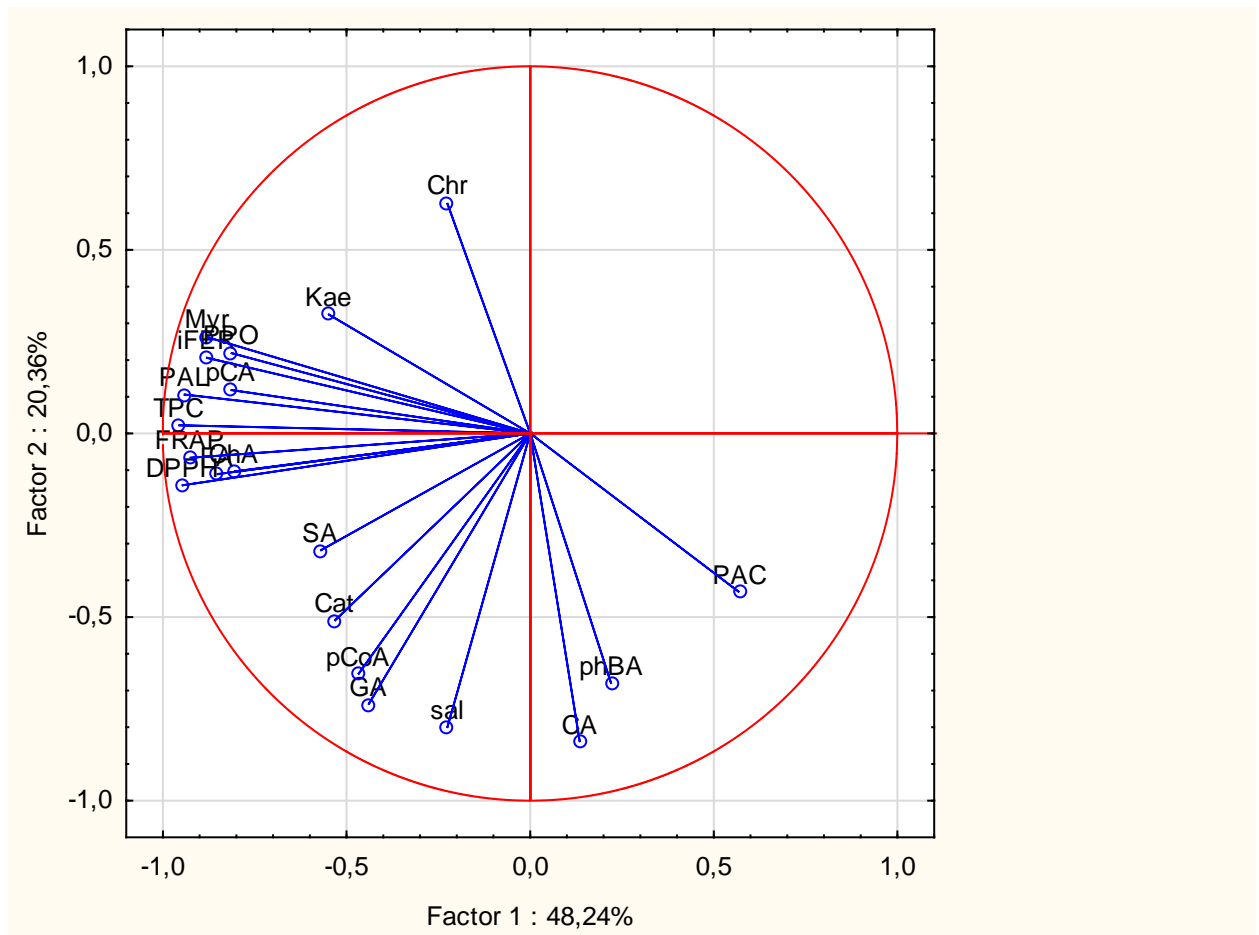
	sal	SA	GA	pCA	phBA	CA	ChA	pCoA	FA	iFA	Cat	Chr	Myr	Kae	TPC	PAC	DPPH ARP	FRAP	PAL	PPO	SOA	
SA	0.13	-																				
GA	<b>0.75</b>	0.32	-																			
pCA	-0.05	0.56	0.23	-																		
phBA	<b>0.61</b>	0.12	0.32	-0.44	-																	
CA	0.53	0.24	0.49	-0.11	0.32	-																
ChA	0.16	<b>0.67</b>	0.43	<b>0.65</b>	-0.20	0.03	-															
pCoA	0.42	<b>0.81</b>	0.51	0.47	0.31	<b>0.59</b>	<b>0.59</b>	-														
FA	0.47	0.24	0.51	0.51	0.04	-0.19	0.58	0.28	-													
iFA	0.21	0.23	0.24	<b>0.61</b>	-0.19	-0.41	0.57	0.12	<b>0.91</b>	-												
Cat	<b>0.72</b>	0.20	<b>0.61</b>	0.21	0.35	0.27	0.36	0.37	<b>0.65</b>	0.47	-											
Chr	-0.19	-0.13	-0.35	0.06	-0.26	<b>-0.68</b>	0.27	-0.39	0.21	0.44	0.07	-										
Myr	0.06	0.38	0.23	<b>0.69</b>	-0.28	-0.38	<b>0.63</b>	0.17	<b>0.75</b>	<b>0.90</b>	0.46	0.47	-									
Kae	-0.01	0.25	0.04	0.37	-0.13	-0.50	0.38	-0.08	0.44	<b>0.62</b>	0.40	<b>0.71</b>	<b>0.80</b>	-								
TPC	0.24	0.46	0.45	<b>0.75</b>	-0.31	-0.15	<b>0.73</b>	0.38	<b>0.83</b>	<b>0.86</b>	0.50	0.21	<b>0.84</b>	0.46	-							
PAC	0.36	-0.36	0.18	<b>-0.61</b>	<b>0.63</b>	0.21	-0.52	-0.18	-0.30	-0.49	0.22	-0.15	-0.42	-0.10	-0.57	-						
DPPH ARP	0.35	0.50	<b>0.59</b>	<b>0.71</b>	-0.17	-0.05	<b>0.76</b>	0.46	<b>0.88</b>	<b>0.82</b>	<b>0.60</b>	0.11	<b>0.78</b>	0.44	<b>0.94</b>	-0.46	-					
FRAP	0.24	0.57	0.45	<b>0.78</b>	-0.25	-0.08	<b>0.80</b>	0.51	<b>0.85</b>	<b>0.85</b>	0.47	0.15	<b>0.82</b>	0.43	<b>0.96</b>	<b>-0.61</b>	<b>0.95</b>	-				
PAL	0.07	0.47	0.30	<b>0.78</b>	-0.28	-0.22	<b>0.68</b>	0.40	<b>0.83</b>	<b>0.87</b>	0.39	0.13	<b>0.84</b>	0.42	<b>0.93</b>	<b>-0.64</b>	<b>0.88</b>	<b>0.95</b>	-			
PPO	-0.07	0.33	0.15	<b>0.71</b>	-0.23	-0.33	0.54	0.26	<b>0.68</b>	<b>0.77</b>	0.34	0.16	<b>0.71</b>	0.41	<b>0.75</b>	<b>-0.60</b>	<b>0.71</b>	<b>0.75</b>	<b>0.87</b>			
SOA	0.23	0.46	0.51	<b>0.78</b>	-0.26	-0.09	<b>0.77</b>	0.45	<b>0.84</b>	<b>0.84</b>	0.47	0.14	<b>0.85</b>	0.45	<b>0.95</b>	-0.53	<b>0.94</b>	<b>0.95</b>	<b>0.93</b>	<b>0.72</b>		
FLA	0.15	<b>0.60</b>	0.38	<b>0.79</b>	-0.29	-0.11	<b>0.79</b>	0.51	<b>0.79</b>	<b>0.82</b>	0.40	0.15	0.80	0.41	<b>0.96</b>	<b>-0.66</b>	<b>0.93</b>	<b>0.99</b>	<b>0.95</b>	<b>0.76</b>	<b>0.93</b>	

\* Skraćenice u tabeli: salicin (sal); salicilna kiselina (SA); galna kiselina (GA); protokatehinska kiselina (pCA); *p*-hidroksibenzoeva kiselina (phBA); kafena kiselina (CA); hlorogenska kiselina (ChA); *p*-kumarinska kiselina (pCoA); ferulna kiselina (FA); izoferulna kiselina (iFA); katehin (Cat); hrisin (Chr); miricetin (Myr); kempferol (Kae); ukupni fenoli (TPC); proantocijanidini (PAC); DPPH; FRAP; fenilalaninamonijum-lijaza (PAL); polifenol-oksidaaza (PPO); superoksid anjon ARP (SOA); ukupni flavonoidi (FLA).

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj tezi može se uočiti razlika odgovora klona M-1 vrste *Populus euramericana* u odnosu na druga dva klona vrste *Populus deltoides* (B-229 i PE19/66). Varela i saradnici (2016) su ukazali na to da akumulacija polifenola, posebno flavonoida može biti važna prednost u okviru mehanizama uključenih u izbegavanje oksidativnih oštećenja i da može biti indikator tolerancije na vodni stres. U okviru rezultata veća akumulacija flavonoida zapažena je u korenu klona B-229 kao i povećanje sadržaja ukupnih fenola u listovima (*Histogram 4.15*), što može biti povezano sa boljom adaptacijom ovog klona na vodni stres pogotovo u odnosu na klon M-1. Aridne biljke mogu akumulirati velike količine sekundarnih jedinjenja uključujući i polifenole koja se mogu koristiti kao strategija za toleranciju na sušu s obzirom da njihova antioksidantna aktivnost može imati uticaja na kontrolu prekomernog stvaranja ROS u tkivima (Agati i Tattini, 2010).

Analizirani parametri među kojima su 14 polifenolnih jedinjenja, ukupni fenoli, ukupni proantocijanidini, antioksidantna aktivnost (FRAP, DPPH) i enzimi PAL i PPO su korišćeni kao promenljive za analizu glavnih komponenti (PCA - *Principle components analysis*). Primenom PCA na normalizovane vrednosti analiziranih parametara konstruisan je biplot prikazan na *Slici 4.13*. Na x i y osu naneti su faktor I i faktor II koji objašnjavaju 68.60% od ukupne varijabilnosti. Na *Slici 4.13* se uočava da u blizini x-ose dolazi do grupisanja najvažnijih antioksidantnih parametara i indikatora antioksidantne aktivnosti kao što su FRAP, DPPH i TPC, između kojih postoje i značajne pozitivne korelacije. To ukazuje da Faktoru 1 najviše doprinose antioksidantni i redukujući kapacitet. U blizini antioksidantnih parametara su sva jedinjenja koja su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ukupnim antioksidantnim kapacitetom, kao što je galna kiselina, protokatehinska kiselina, hlorogenska kiselina, ferula i izoferulna kiselina i miricetin. Oba ispitana enzima PAL i PPO su takođe pozicionirani u pomenutom klasteru zbog visoke pozitivne korelacije između svih ovih parametara. Činjenica da su svi pomenuti parametri postavljeni blizu jedan drugog, ističe njihovu duboku povezanost u slučaju vodnog stresa. Dalje od ovog klastera su proantocijanidini, *p*-hidroksibenzoeva kiselina i kafena kiselina što se može objasniti njihovom drugačijom metaboličkom ulogom u slučaju vodnog stresa u odnosu na parametre koji se nalaze grupisani u klasteru (Field i sar., 2006). PCA analiza je potvrdila povezanost između ključnih enzimskih markera u polifenolnom metabolizmu kao što je PAL sa individualnim polifenolnim jedinjenjima i antioksidantnom aktivnošću. Iako je veza između strukture i antioksidantne aktivnosti za

glavne biljne flavonoide i fenolne kiseline već dokazana *in vitro*, stvaran doprinos individualnih fenola na antioksidantni status *in vivo* je potrebno tek ispitati. Mnogobrojne biološke uloge, strukturna raznolikost, antioksidantni potencijal i uključenost u osnovne signalne mehanizme stavlja polifenole u grupu veoma važnih medijatora tokom vodnog stresa uključujući sušu i osmotski stres.



Slika 4.13. Analiza glavnih komponenti (salicin (sal); salicilna kiselina (SA); galna kiselina (GA); protokatehinska kiselina (pCA); *p*-hidroksibenzoeva kiselina (phBA); kafena kiselina (CA); hlorogenska kiselina (ChA); *p*-kumarinska kiselina (pCoA); ferulna kiselina (FA); izoferulna kiselina (iFA); katehin (Cat); hrisin (Chr); miricetin (Myr); kempferol (Kae); ukupni fenoli (TPC); proantocijanidini (PAC); DPPH; FRAP; fenilalaninamonijum-lijaza (PAL); polifenol-oksida (PPO)).

## 5. ZAKLJUČAK

U prvom delu istraživanja ispitivan je uticaj različitih koncentracija PEG 6000 na različite biohemijske parametre klona crne hibridne topole M-1 u *in vitro* kulturi tkiva. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- ✓ Ispitivanje vijabilnosti ćelija i nivoa RNOS u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 su jednostavni i korisni parametri koji su pokazali da se sa povećanjem intenziteta stresa smanjuje vijabilnost ćelija, a povećava nivo NO<sup>•</sup> i ONOO<sup>-</sup>.
- ✓ Nivo ROS se povećao značajno pri 200 mOsm stresu, što je praćeno porastom nivoa MDA pri istim uslovima. Karbonil proteini su značajno povećani samo pri 100 mOsm stresu, dok se nivo vodonik peroksida smanjivao sa povećanjem intenziteta stresa, što ukazuje na kompleksnu regulaciju unutraćelijskog nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri vodnom stresu.
- ✓ U uslovima vodnog stresa kod ispitanog klona aktivnost pojedinih antioksidantnih enzima se povećava, najviše GSH-Px i GPx, ali i SOD pri 200 mOsm stresu, dok se antioksidantna aktivnost i sadržaj fenola smanjuje.
- ✓ Od ispitanih parametara osmotskog stresa, količina prolina se povećala u uslovima 200 mOsm stresa, dok se aktivnost enzima PDH uključenog u katabolizam prolina smanjila pri datim uslovima; sadržaj glicin-betaina se mnogostruko povećavao sa povećanjem intenziteta stresa.

U drugom delu istraživanja, ispitivan je uticaj različitih koncentracija PEG 6000 na biohemijske parametre u listu i korenu različitih klonova topole (M-1, B-229 i PE19/66) u hidroponskom eksperimentu u kontrolisanim uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Primenjeni tretmani PEG 6000 (100 mOsm i 200 mOsm) u uzorcima korena sva tri klona topole nisu doveli do značajnih povećanja aktivnosti antioksidantnih enzima, ali su u uzorcima lista doveli do značajnih povećanja aktivnosti SOD i ASC-Px kod klona B-229, zatim kod klona M-1 su zabeležena povećanja aktivnosti GPX, GSH-Px i ASC-Px i kod klona PE19/66 povećanje aktivnosti ASC-Px i GSH-Px. Kod klona B-229 je zabeleženo značajno povećanje količine GSH u listu pri 100 mOsm tretmanu kao i u korenu pri 200 mOsm tretmanu.

Značajno povećanje količine GSH zabeleženo je još kod klona M-1 u uzorcima korena pri 100 mOsm tretmanu.

- ✓ U uzorcima lista kod sva tri klona dolazi do povećanja količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i intenziteta oksidacije proteina. Intenzitet LP se povećava samo kod klona M-1 u uslovima 200 mOsm stresa, što je u skladu sa rezultatom zabeleženim u kulturi tkiva ovog klona. U uzorcima korena kod sva tri klona je pri 200 mOsm tretmanu utvrđeno da dolazi do povećanja intenziteta LP i količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok se intenzitet oksidacije proteina ne menja značajno u odnosu na kontrolu.
- ✓ ESR spektralnom analizom utvrđeno je da ekstrakti lista ispitanih klonova imaju inhibitorski efekat na stvaranje hidroksil radikala, koji se u uslovima vodnog stresa značajno povećao kod klona M-1 i kod klona PE19/66 u uslovima 100 mOsm stresa.
- ✓ Količina prolina se povećala u uslovima vodnog stresa u listu, dok je u korenu povećanje zabeleženo samo kod klona M-1 pri 100 mOsm tretmanu.
- ✓ Aktivnost enzima PDH uključenog u katabolizam prolina se smanjila u uslovima vodnog stresa kod klona M-1 i u listu i u korenu, dok se kod klona B-229 smanjila samo pri 100 mOsm tretmanu.
- ✓ Sadržaj GB se povećavao u uslovima vodnog stresa i u listu i u korenu kod sva tri klona.

U trećem delu istraživanja, ispitivan je uticaj različitih koncentracija PEG 6000 na polifenolni profil i antioksidantni kapacitet kod različitih klonova topole (M-1, B-229 i PE19/66) u hidroponskom eksperimentu u kontrolisanim uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- ✓ HPLC analizom odabranih polifenolnih komponenti u ekstraktima lista i korena tri ispitana klona M-1, B-229 i PE19/66 kao najzastupljenije komponente utvrđene su katehin (od 17.68 do 26.94 mg/g s.e. u listu i u korenu od 5.75 do 33.82 mg/g s.e.) i salicin (od 2.86 do 4.90 mg/g s.e. u listu i u korenu od 3.49 do 5.47 mg/g s.e.), zatim je u ekstraktima lista utvrđeno prisustvo protokatehinske kiseline (detektovana u količini od 1.69 do 3.99 mg/g s.e) i u ekstraktima korena *p*-hidroksibenzojeve kiseline (detektovana u količini od 1.51 do 1.93 mg/g s.e).
- ✓ Vodni stres izazvan sa PEG 6000 uglavnom utiče na smanjenje sadržaja velikog broja polifenolnih komponenti. Povećanje sadržaja u uslovima vodnog stresa je utvrđeno samo u nekim slučajevima. Ukoliko se kao kriterijum posmatraju samo

promene veće od 50% u odnosu na kontrolu, onda je lakše uočiti razlike koje je vodni stres izazvao kod različitih klonova. Najviše promena većih od 50% u odnosu na kontrolu u uslovima vodnog stresa je uočeno kod klona B-229, gde je u ekstraktu lista pod uticajem 200 mOsm stresa određeno povećanje sadržaja hlorogenske kiseline i *p*-hidroksibenzojeve kiseline, dok se u ekstraktu korena istog klona povećao sadržaj salicilne i izoferulne kiseline pri 100 mOsm stresu, kao i hrisina, miricetina i kemferola u uslovima 100 mOsm i 200 mOsm stresa. Kod klona PE19/66 je zabeležen manji broj komponenti čiji se sadržaj povećao u uslovima vodnog stresa u odnosu na klon B-229. U ekstraktu lista klona PE19/66 je pod uticajem 100 mOsm stresa određeno povećanje sadržaja hlorogenske kiseline i kemferola, dok je u ekstraktu korena utvrđeno povećanje sadržaja protokatehinske kiseline i hrisina pod uticajem 200 mOsm stresa i miricetina pod uticajem 100 mOsm stresa. Kod klona M-1 u uslovima vodnog stresa nisu zabeležena povećanja veća od 50%.

- ✓ U uslovima vodnog stresa je kod ekstrakata B-229 klona određeno povećanje sadržaja flavonoida i proantocijanidina, a sadržaj ukupnih fenola je na nivou kontrole. Kod druga dva klona ukupni fenoli i flavonoidi se smanjuju.
- ✓ Procenom antioksidantne aktivnosti primenom testova koji su zasnovani na transferu elektrona (neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala i određivanje redukcione sposobnosti - FRAP test) i neutralizaciji slobodnoradikalnih vrsta (kapacitet „hvatanja“ O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) utvrđeno je da se jedino antioksidantni kapacitet klona B-229 povećava u uslovima stresa.
- ✓ Aktivnost enzima PPO uključenog u katabolizam fenola se smanjila u uslovima vodnog stresa kod klona B-229 pri 100 mOsm tretmanu; dok se aktivnost enzima PAL uključenog u biosintezu fenola u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 povećala samo kod klona B-229 u listu i u korenu.
- ✓ Regresiona analiza pokazuje da su sva polifenolna jedinjenja u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim fenolima, flavonoidima i navedenim antioksidantnim aktivnostima, sem *p*-hidroksibenzojeve kiseline i kafene kiseline, što ukazuje na to da ove dve kiseline imaju neku drugu fiziološku ulogu tokom vodnog stresa i da im glavna funkcija nije antioksidantna.

- ✓ PCA analizom je potvrđena povezanost između određenih polifenolnih parametara i antioksidantne aktivnosti kao i enzima uključenih u metabolizam fenola (PAL i PPO).

Na osnovu dobijenih rezultata iz eksperimenta na kulturi tkiva *in vitro* je pokazano da se, kao odgovor na oksidativni stres i akumulaciju ROS koji se javljaju u uslovima vodnog stresa povećava aktivnost pojedinih antioksidantnih enzima i sadržaj osmolita prolina i glicin-betaina, dok se ukupna antioksidantna aktivnost i sadržaj fenola smanjuje tokom stresa.

Na osnovu dobijenih rezultata iz hidroponskog eksperimenta uočene su razlike u tolerantnosti na vodni stres izazvan sa PEG 6000 između ispitanih klonova. Klon B-229 se izdvojio aktivacijom SOD i akumulacijom GSH u uslovima vodnog stresa izazvanim sa PEG 6000. Takođe, klon B-229 je pokazao veći antioksidantni kapacitet u odnosu na klonove M-1 i PE19/66 zahvaljujući povećanoj akumulaciji polifenolnih jedinjenja i aktivaciji enzima PAL, uključenog u biosintezu polifenola. Klon M-1 se izdvojio aktivacijom peroksidaza u uslovima vodnog stresa, povećanjem sadržaja *chl a* i *chl b*, najmanjim sadržajem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao i najvećim inhibitornim efektom na stvaranje hidroksil radikala. Kod klona PE19/66 je zabeležena najveća akumulacija prolina, najveća aktivacija ASC-Px i najmanji intenzitet oksidacije proteina.

U oba eksperimenta uočeno je da je akumulacija prolina i GB u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 najvažnija strategija otpornosti na stres i prevazilaženju vodnog deficita, tako da se ovi parametri mogu definisati kao najbolji indikatori otpornosti topole na sušu.

Ovim je hipoteza postavljena u uvodnom delu disertacije da vodni stres utiče na antioksidantni sistem izazivajući indukciju aktivnosti pojedinih antioksidanata, kao i promene u metabolizmu prolina i GB u potpunosti verifikovana. Naša dalja istraživanja će biti usmerena ka detaljnijem analitičkom ispitivanju antioksidanata i proširivanju ispitivanja uticaja vodnog stresa na druge klonove topole gajenih iz reznica u hidroponskim uslovima. Ovakva ispitivanja bi mogla voditi i ka identifikaciji novih antioksidantnih jedinjenja kao, na primer, fenolnih struktura ili izoformi antioksidantnih enzima nastalih u uslovima vodnog stresa.

Rezultati ovog istraživanja upotpunjavaju saznanja o povezanosti oksidativnog stresa uzrokovanog vodnim stresom sa antioksidantnim odgovorom, nivoom oštećenja lipida i proteina, uključivanjem osmolita kao i promenama u polifenolnom profilu.

Takođe, dobijeni rezultati su značajni za odabir klonova topola tolerantnih na vodni stres izazvan sa PEG 6000 i za pošumljavanje sušnih staništa, kojih će biti sve više usled negativnog uticaja klimatskih promena.



## 6. SUMMARY

Over the last decade, numerous studies have been published about the effects of global climate change on ecosystems. It has been predicted that climate change leads to extreme temperatures and severe prolonged drought in some parts of the world, which will have a dramatic impact on plant growth and productivity (IPCC, 2007). Investigations of the effects of drought on plants, as well as mechanisms of plant survival in changed environmental conditions are current problems that scientists around the world are facing. The study of stress responses in tree species is also important because of the crucial role of forests in global ecological equilibrium and their constant exposure to environmental stresses due to long life span. Poplar is one of the most commonly used model plants because of the rapid growth and the availability of the whole-genome sequence of *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2006).

Most types of abiotic stresses affect the cellular redox homeostasis and result in an enhanced accumulation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress which may cause oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acid (Krasensky and Jonak, 2012). In response to water stress, plants adopt various mechanisms including the accumulation of high concentrations of substances with potential to retain the water such as proline and glycine betaine (GB).

In view of all this, the aim of presented PhD thesis was investigation of the impact of water deficit caused by polyethylene glycol (PEG) 6000 on biochemical features of poplar clones. Cuttings of tree poplar clones (M-1, B-229 and PE 19/66) were grown in hydroponics and subjected to 100 and 200 mOsm PEG 6000 during six days. Changes in the activity of antioxidant enzymes, polyphenol characterization, two enzymatic markers of polyphenol metabolism, antioxidant capacity as well as proline and glycine betaine content were investigated in stressed plants. Furthermore, assessment of antioxidant potential was performed *in vitro* in tissue culture of poplar clone M-1.

The results related to the effect of PEG 6000 on poplar tissue culture shown that, in response to oxidative stress and ROS accumulation, which occurred under stress conditions, the activity of certain antioxidant enzymes and the content of osmolites (proline and glycine betaine) increases, while the total antioxidant activity and phenol content decreases during stress.

The obtained results from the hydroponic experiment showed differences in tolerance of three tested clones to water stress influenced by PEG 6000. Clone B-229 was highlighted by activation of SOD and accumulation of GSH in water stress caused by PEG 6000. Also, clone B-229 showed a higher antioxidant capacity compared to clones M-1 and PE19/66 due to increased accumulation of polyphenol compounds and activation of enzyme PAL (involved in polyphenol biosynthesis). The clone M-1 was highlighted by the activation of peroxidases under water stress conditions, as well as increased content of *chl a* and *chl b*, the smallest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, and the greatest inhibitory effect on the formation of hydroxyl radicals. However, clone PE19/66 had highest proline accumulation, the largest activation of ASC-Px and the lowest intensity of protein oxidation.

In both experiments, the most important strategy for stress resistance and overcoming of water deficiency was accumulation of proline and GB, the reason of which these parameters can be defined as the best indicators of poplar resistance to drought.

Obtained results completely verified the hypothesis mentioned in the introduction that water stress influences on antioxidant system, inducing the activity of certain antioxidants, as well as the changes in proline metabolism and GB content. Recorded results show that poplar clones under water stress are stimulated to synthesise different enzymatic and nonenzymatic antioxidants. Our further investigations will be focused on the detailed analytical investigation of antioxidants and the extension of the study of the impact of water stress on other clones of poplar grown from cuttings in hydroponic conditions. This research could also lead to the identification of new antioxidant compounds, such as phenol structures or isoforms of antioxidant enzymes produced under conditions of water stress.

The results of this study complete the findings on the oxidative stress caused by water stress and their relationship with the antioxidant response, the level of lipid and protein damage, accumulation of the osmolites and changes in the polyphenol profile. Also, the obtained results may be important for the selection of poplar clones resistant to water stress caused by PEG 6000.

## 7. LITERATURA

- Abouzaid, E., El-Sayed, E. S. N., Mohamed, E. S. A., Youssef, M. (2016). Molecular Analysis of Drought Tolerance in Guava Based on In Vitro PEG Evaluation. *Tropical Plant Biology*, 9(2), 73-81.
- Adams, E., Frank, L. (1980). Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annual review of biochemistry*, 49(1), 1005-1061.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Agati, G., Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186(4), 786-793.
- Agrell, J., Kopper, B., McDonald, E. P., Lindroth, R. L. (2005). CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> effects on host plant preferences of the forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Global Change Biology*, 11(4), 588-599.
- Ahmad, R., Ju, C., Kwon, L. S., Ahmad, R. (2013). Glycine betaine : a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses, 49–57.
- Ahmad, R., Kim, M. D., Back, K. H., Kim, H. S., Lee, H. S., Kwon, S. Y., ... Kwak, S. S. (2008). Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses. *Plant cell reports*, 27(4), 687-698.
- Ahmed, I. M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D., Wu, F. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 49–60.
- Ahmed, I. M., Nadira, U. A., Bibi, N., Cao, F., He, X., Zhang, G., Wu, F. (2015). Secondary metabolism and antioxidants are involved in the tolerance to drought and salinity, separately and combined, in Tibetan wild barley. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 1–12.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Allakhverdiev, S. I., Hayashi, H., Nishiyama, Y., Ivanov, A. G., Aliev, J. A., Klimov, V. V., ... Carpentier, R. (2003). Glycinebetaine protects the

- D1/D2/Cytb559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation. *Journal of plant physiology*, 160(1), 41-49.
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12), 1732-1740.
  - Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
  - Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172(5), 876-887.
  - Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Kubiś, J. (2009). Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2), 177-186.
  - Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Kubiś, J. (2009b). Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant science*, 177(6), 682-690.
  - Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., Marion-Poll, A. (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science*, 4, 63.
  - Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.
  - Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), 391-396.
  - Ashraf, M., Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.
  - Askari, E., Ehsanzadeh, P. (2015). Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. *Acta physiologiae plantarum*, 37(2), 1-14.

- Ayres, M. P., Clausen, T. P., MacLean, S. F., Redman, A. M., Reichardt, P. B. (1997). Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 78(6), 1696-1712.
- Babst, B. A., Harding, S. A., Tsai, C. J. (2010). Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in *Populus*. *Journal of chemical ecology*, 36(3), 286-297.
- Bacon, M. A., Thompson, D. S., Davies, W. J. (1997). Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought?. *Journal of Experimental Botany*, 48(12), 2075-2085.
- Badiani, M., De Biasi, M.G., Colognola, M., Artemi, F. (1990). Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit. *Agrochimica*, 34(1-2), pp.90-102.
- Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau, T. (2013). Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Science*, 213, 98– 105.
- Barbehenn, R. V., Constabel, C. P. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551-1565.
- Barchet, G. L., Dauwe, R., Guy, R. D., Schroeder, W. R., Soolanayakanahally, R. Y., Campbell, M. M., Mansfield, S. D. (2014). Investigating the drought-stress response of hybrid poplar genotypes by metabolite profiling. *Tree physiology*, 34(11), 1203-1219.
- Barnett, N. M., Naylor, A. W. (1966). Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology*, 41(7), 1222-1230.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Behrens, A., Maie, N., Knicker, H., Kögel-Knabner, I. (2003). MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochemistry*, 62(7), 1159-1170.
- Beligni, M. V., Lamattina, L. (1999a). Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta*, 208(3), 337-344.
- Beligni, M. V., Lamattina, L. (1999b). Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide*, 3(3), 199-208.

- Beligni, M. V., Lamattina, L. (2001). Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment*, 24(3), 267-278.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.
- Bethke, P. C., Badger, M. R., Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16(2), 332-341.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G., Jones, R. L. (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 57(3), 517-526.
- Binzel, M. L., Hasegawa, P. M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A. K., Bressan, R. A. (1987). Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiology*, 84(4), 1408-1415.
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J., Unsicker, S. B. (2011). Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry*, 72(13), 1497-1509.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54(1), 519-546.
- Boggess, S. F., Stewart, C. R., Aspinall, D., Paleg, L. G. (1976). Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiology*, 58(3), 398-401.
- Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current opinion in plant biology*, 2(4), 287-294.
- Boyer, J. S., James, R. A., Munns, R., Condon, T. A., Passioura, J. B. (2008). Osmotic adjustment leads to anomalously low estimates of relative water content in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 35(11), 1172-1182.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brown, L. M., Hellebust, J. A. (1978). Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Canadian Journal of Botany*, 56(6), 676-679.

- Cai, W., Liu, W., Wang, W. S., Fu, Z. W., Han, T. T., Lu, Y. T. (2015). Overexpression of rat neurons nitric oxide synthase in rice enhances drought and salt tolerance. *PloS one*, 10(6), e0131599.
- Čanadanović-Brunet, J.M. Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, Zadužbina Andrejević, Beograd, p. 36, 1998.
- Čanadanović-Brunet, J.M., Vulić, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas Šaponjac, V. (2013). Bioactive compounds and antioxidant properties of dried apricot. *APTEFF*, 44, 193-205.
- Candan, N., Tarhan, L. (2012). Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. *Environmental and experimental botany*, 75, 83-88.
- Carter, E. B., Theodorou, M. K., Morris, P. (1999). Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. 2. Effect of elevated CO<sub>2</sub>, temperature and drought on tissue digestion in relation to condensed tannin and carbohydrate accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(11), 1431-1440.
- Caruso, A., Chefdor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F. M., Kahlem, G., Morabito, D. (2008). Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(9), 932-941.
- Caseys, C., Glauser, G., Stölting, K. N., Christe, C., Albrechtsen, B. R., Lexer, C. (2012). Effects of interspecific recombination on functional traits in trees revealed by metabolomics and genotyping-by-resequencing. *Plant Ecology & Diversity*, 5(4), 457-471.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., Métraux, J. P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS letters*, 582(4), 473-478.
- Chakhchar, A., Wahbi, S., Lamaoui, M., Mousadik, A. El, Ibsouda-koraichi, S., Modafar, C. El. (2015). Physiological and biochemical traits of drought tolerance in *Argania spinosa*. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 252-261.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).

- Chappell, J. (1997). *Phytoremediation of TCE using Populus*. US Environmental Protection Agency, Technology Innovation Office.
- Chaves, M. M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Chedgy, R. J., Köllner, T. G., Constabel, C. P. (2015). Functional characterization of two acyltransferases from *Populus trichocarpa* capable of synthesizing benzyl benzoate and salicyl benzoate, potential intermediates in salicinoid phenolic glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 113, 149-159.
- Chen, C., Dickman, M. B. (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3459-3464.
- Chen, F., Liu, C. J., Tschaplinski, T. J., Zhao, N. (2009a). Genomics of secondary metabolism in *Populus*: interactions with biotic and abiotic environments. *Critical Reviews in Plant Science*, 28(5), 375-392.
- Chen, L., Wang, L., Chen, F., Korpelainen, H., Li, C. (2013). The effects of exogenous putrescine on sex-specific responses of *Populus cathayana* to copper stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 97, 94-102.
- Chen, T. H., Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 250-257.
- Chen, T. H., Murata, N. (2008). Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in plant science*, 13(9), 499-505.
- Chen, T. H., Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, cell & environment*, 34(1), 1-20.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., Fan, B. (2009b). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), 493-496.
- Cherit-Hacid, F., Derridij, A., Moulti-Mati, F., Mati, A. (2015). Drought stress effect on some biochemical and physiological parameters; accumulation on total



- polyphenols and flavonoids in leaves of two provenance seedling *Pistacia lentiscus*. *International Journal of Research in Applied Natural Social Sciences*, 3(9), 127-138.
- Cheruiyot, E. K., Mumera, L. M., Ng'etich, W. K., Hassanali, A., Wachira, F. (2007). Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia sinensis* L.). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(9), 2190-2197.
  - Chiu, D. T., Stults, F. H., Tappel, A. L. (1976). Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 445(3), 558-566.
  - Chmielowska-Bąk, J., Izbiańska, K., Deckert, J. (2015). Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 405.
  - Claussen, W. (2005). Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, 168(1), 241-248.
  - Constabel, C. P., Lindroth, R. L. (2010). The impact of genomics on advances in herbivore defense and secondary metabolism in *Populus*. In *Genetics and genomics of Populus* (pp. 279-305). Springer New York.
  - Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J., Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*, 102(5), 460.
  - Corcuera, L. J., Hintz, M., Pahlich, E. (1989). Proline metabolism in *Solanum tuberosum* cell suspension cultures under water stress. *Journal of plant physiology*, 134(3), 290-293.
  - Corpas, F. J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M., Barroso, J. B. (2009). Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 151(4), 2083-2094.
  - Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.
  - Csiszár, J., Pintér, B., Kolbert, Z., Erdei, L., Tari, I. (2008). Peroxidase activities in root segments of wheat genotypes under osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 52, 155-156.

- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews*, 53(1), 121-147.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329(1), 23-38.
- Dash, M., Yordanov, Y. S., Georgieva, T., Tschaplinski, T. J., Yordanova, E. (2017). Poplar PtabZIP1-like enhances lateral root formation and biomass growth under drought stress. *The Plant Journal*, 89, 692–705.
- de Araújo Silva, M. M., Willadino, L., dos Santos, D. Y. A. C., Oliveira, A. F. M., Camara, T. R. (2016). Response of *Ricinus communis* L. to in vitro water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Growth Regulation*, 78(2), 195-204.
- Delauney, A. J. Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*, 4, 215-223.
- Delauney, A. J., Hu, C. A., Kishor, P. B., Verma, D. P. (1993). Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18673-18678.
- Deligoz, A., Gur, M. (2015). Morphological, physiological and biochemical responses to drought stress of Stone pine (*Pinus pinea* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(11), 243.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, M. A., Adams, W. W. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*, 10, 403-412.
- Devappa, R. K., Rakshit, S. K., Dekker, R. F. (2015). Forest biorefinery: potential of poplar phytochemicals as value-added co-products. *Biotechnology advances*, 33(6), 681-716.
- Dewick, P. M. (2009). The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition*, 137-186.
- Dickinson, D. A., Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64(5), 1019-1026.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.

- Dobrá, J., Vanková, R., Havlová, M., Burman, A. J., Libus, J., Štorchová, H. (2011). Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. *Journal of plant physiology*, 168(13), 1588-1597.
- Dudonné, S., Poupard, P., Coutiere, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J. M., Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4527-4536.
- Dworak, A., Nykiel, M., Walczak, B., Miazek, A., Szworst-Łupina, D., Zagdańska, B., Kielkiewicz, M. (2016). Maize proteomic responses to separate or overlapping soil drought and two-spotted spider mite stresses. *Planta*, 244(4), 939-960.
- Eckenwalder, J.E. (1996). Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman J, P. E., Hinckley TM, editors. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa, Ontario, Canada: NRC Research Press, National Research Council of Canada. 7– 32.
- Egert, M., Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 43-49.
- El Rabey, H. A., Al-Malki, A. L., Abulnaja, K. O., Rohde, W. (2015). Proteome analysis for understanding abiotic stress (salinity and drought) tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International journal of genomics*, 2015.
- El Sayed, H. (1992). Proline metabolism during water stress in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) plant. *Phyton*, 32 (2), 255-261.
- English, S., Greenaway, W., Whatley, F. R. (1991). Analysis of phenolics of *Populus trichocarpa* bud exudate by GC-MS. *Phytochemistry*, 30(2), 531-533.
- Fan, Q. J., Liu, J. H. (2012). Nitric oxide is involved in dehydration/drought tolerance in *Poncirus trifoliata* seedlings through regulation of antioxidant systems and stomatal response. *Plant cell reports*, 31(1), 145-154.
- Ferguson, L. R., Zhu, S. T., Harris, P. J. (2005). Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular nutrition & food research*, 49(6), 585-593.

- Field, B., Jordán, F., Osbourn, A. (2006). First encounters–deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist*, 172(2), 193-207.
- Filippou, P., Antoniou, C., Fotopoulos, V. (2011). Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 270-277.
- Filippou, P., Bouchagier, P., Skotti, E., Fotopoulos, V. (2014). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 1-10.
- Fischer, B. B., Hideg, E., Krieger-Liszky, A. (2013). Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxidants & redox signaling*, 18(16), 2145-2162.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
- Fujita, T., Maggio, A., Garcia-Rios, M., Bressan, R. A., Csonka, L. N. (1998). Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiology*, 118(2), 661-674.
- Funck, D., Stadelhofer, B., Koch, W. (2008). Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 8(1), 40.
- Gadallah, M.A.A. (1999). Effect of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum*, 42, 249-257.
- García-Mata, C., Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126(3), 1196-1204.
- Gebre, G. M., Kuhns, M. R., Brandle, J. R. (1994). Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree physiology*, 14(6), 575-587.
- Gerasimova, N. G., Pridvorova, S. M., Ozeretskovskaya, O. L. (2005). Role of L-phenylalanine ammonia Lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(1), 103-105.

- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
- Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of botany*, 94(3), 345-351.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., Koncz, C., Zilberstein, A. (1998). Isolation and characterization of two different cDNAs of  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology*, 38(5), 755-764.
- Gorham, J., (1995). *Betaines in higher plants—biosynthesis and role in stress metabolism*. In: Wallsgrave, R.M. (Ed.), *Amino acids and their Derivatives in Higher Plants*. University Press, Cambridge, 172–203.
- Gould, K. S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response?. *Plant, Cell & Environment*, 26(11), 1851-1862.
- Gould, K. S., Neill, S. O., Vogelmann, T. C. (2002) A unified explanation for anthocyanins in leaves? In: *Anthocyanins in Leaves. Advances in Botanical Research*, vol. 37, Gould, K.S. and Lee, D.W., Eds., Academic Press, Amsterdam, 167.
- Grace, S. C., Logan, B. A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1402), 1499-1510.
- Greenaway, W., English, S., May, J., Whatley, F. R. (1991). Chemotaxonomy of section Leuce poplars by GC-MS of bud exudate. *Biochemical systematics and ecology*, 19(6), 507-518.
- Greenaway, W., English, S., Whatley, F. R. (1992). Relationships of *Populus* × *acuminata* and *Populus* × *generosa* with their parental species examined by gas chromatography-mass spectrometry of bud exudates. *Canadian journal of botany*, 70(1), 212-221.

- Greenaway, W., May, J., Whatley, F. R. (1989). Flavonoid aglycones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of *Populus balsamifera*. *Journal of Chromatography A*, 472, 393-400.
- Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., Varmuza, K., ... Forneck, A. (2015). Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiology and Biochemistry*, 88, 17-26.
- Grieve, C. M., Grattan, S. R. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 70(2), 303-307.
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F. (2013). Nitric oxide , antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science*, 4(October), 1–15.
- Guerrier, G., Brignolas, F., Thierry, C., Courtois, M., Kahlem, G. (2000). Organic solutes protect drought-tolerant *Populus × euramericana* against reactive oxygen species. *Journal of Plant Physiology*, 156(1), 93-99.
- Guo X.Y, Zhang X.C., Huang, Z.Y. (2010). Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. *Journal of plant ecology*, 3, 79-87.
- Hahlbrock, K., Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual review of plant biology*, 40(1), 347-369.
- Häikiö, E., Makkonen, M., Julkunen-Tiitto, R., Sitte, J., Freiwald, V., Silfver, T., ... Oksanen, E. (2009). Performance and secondary chemistry of two hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) clones in long-term elevated ozone exposure. *Journal of chemical ecology*, 35(6), 664-678.
- Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology*, 70(6), 737.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57, 715-724.
- Halliwell, B., Foyer, C.H. (1978). Properties and physiological function of a glutathion reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139, 9–17.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. fourth edition. Oxford: University press Inc., US.
- Hamilton, E. W., Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, 126(3), 1266-1274.
- Handa, S., Bressan, R. A., Handa, A. K., Carpita, N. C., Hasegawa, P. M. (1983). Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiology*, 73(3), 834-843.
- Hanson, A.D.; Rivoal, J.; Burnet, M.; Rathinasabapathi, B. (1995). *Biosynthesis of quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in response to water deficit*. In: Smirnoff, N. (Ed.), *Environment and Plant Metabolism*. Series: Environmental Plant Biology BIOS Scientific Publisher, Oxford, UK, 189-198.
- Hao, G. P., Xing, Y., Zhang, J. H. (2008). Role of Nitric Oxide Dependence on Nitric Oxide Synthase-like Activity in the Water Stress Signaling of Maize Seedling. *Journal of integrative plant biology*, 50(4), 435-442.
- Harborne, J. B. (1977). Flavonoids and the evolution of the angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(1), 7-22.
- Hare, P. D., Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21, 79-125.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M. (2010). Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. *American Journal of Plant Physiology*, 5, 295-324.
- Hasheminasab, H., Aliakbari, A., Baniasadi, R. (2014). Optimizing the relative water protection (RWP) as novel approach for monitoring drought tolerance in Iranian pistachio cultivars using graphical analysis. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 4(1), 194-203.
- Hayashi, H., Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M., Murata, N. (1997). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *The Plant Journal*, 12(1), 133-142.

- Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S. (2006). Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry*, 67(11), 1120-1126.
- Heuer, B. (2003). Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science*, 165(4), 693-699.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edit).
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(2), 300-372.
- Holm, G. (1954). Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 4(1), 457-471.
- Holton, M. K., Lindroth, R. L., Nordheim, E. V. (2003). Foliar quality influences tree-herbivore-parasitoid interactions: effects of elevated CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, and plant genotype. *Oecologia*, 137(2), 233-244.
- Houda, Z., Bejaoui, Z., Albouchi, A., Gupta, D. K., Corpas, F. J. (2016). Comparative study of plant growth of two poplar tree species irrigated with treated wastewater, with particular reference to accumulation of heavy metals (Cd, Pb, As, and Ni). *Environmental monitoring and assessment*, 188(2), 1-10.
- Hu, C.A., Delauney, A.J., Verma, D.P. (1992). A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9354-9358.
- Hu, C.A., Donald, S. P., Yu, J., Lin, W.W., Liu, Z., Steel, G., ... Phang, J. M. (2007). Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent and mitochondria-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 295(1-2), 85-92.
- Hu, X., Neill, S. J., Tang, Z., Cai, W. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, 137(2), 663-670.



- Huang, A. H., Cavalieri, A. J. (1979). Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves. *Plant Physiology*, 63(3), 531-535.
- Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K. L., Hammerlindl, J. K., Keller, W. A., Selvaraj, G. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology*, 122(3), 747-756.
- Huseynova, I. R., Aliyeva, D. R., Aliyev, J. A. (2014). Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 54-60.
- Hussien, H. A., Salem, H., Mekki, B. E. D. (2015). Ascorbate-glutathione  $\alpha$  tocopherol triad enhances antioxidant systems in cotton plants grown under drought stress. *International Journal of ChemTech Research*, 8(4), 1463-1472.
- IPCC (2007): Climate Change 2007: The physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change Fourth Assessment Report. www.ipcc.ch 11.07.2013
- Iqbal, S., Bano, A. (2009). Water stress induced changes in antioxidant enzymes, membrane stability and seed protein profile of different wheat accessions. *African Journal of Biotechnology*, 8(23).
- Jaafar, H. Z. E., Ibrahim, M. H., Farhana, N., Fakri, M. (2012). Impact of Soil Field Water Capacity on Secondary Metabolites, Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL), Malondialdehyde (MDA) and Photosynthetic Responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). *Molecules*, 17, 7305–7322.
- Jajic, I., Sarna, T., Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*, 4(3), 393-411.
- Jia, J., Li, S., Cao, X., Li, H., Shi, W., Polle, A., ... Luo, Z. B. (2015). Physiological and transcriptional regulation in poplar roots and leaves during acclimation to high temperature and drought. *Physiologia plantarum*, 157, 38-53.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., ... Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1-6.
- Kaufmann, M. R. (1969). Effects of water potential on germination of lettuce, sunflower, and citrus seeds. *Canadian Journal of Botany*, 47(11), 1761-1764

- Kautz, B., Noga, G., Hunsche, M. (2015). PEG and drought cause distinct changes in biochemical, physiological and morphological parameters of apple seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(8), 162.
- Kebert, M. (2014). Biohemijska i fiziološka karakterizacija klonova topole (*Populus* spp.) u procesu fitoekstrakcije bakra, nikla i kadmijuma. *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Kebert, M., Rapparini, F., Neri, L., Bertazza, G., Orlović, S., Biondi, S. (2017). Copper-Induced Responses in Poplar Clones are Associated with Genotype-and Organ-Specific Changes in Peroxidase Activity and Proline, Polyamine, ABA, and IAA Levels. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 131-147
- Keleş, Y., Öncel, I. (2002). Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Science*, 163(4), 783-790.
- Kemble, A.R., MacPherson, H.T. (1954). Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochemistry journal*, 58, 46-49
- Khan, M. S., Yu, X., Kikuchi, A., Asahina, M., Watanabe, K. N. (2009). Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant biotechnology*, 26(1), 125-134.
- Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Zick, S., Aaronson, K., Bolling, S., Chul Chang, S. (2004). Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiologia Plantarum*, 121(2), 182-186.
- Klepper, L. (1979). Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment (1967)*, 13(4), 537-542.
- Kohl, D. H., Kennelly, E. J., Zhu, Y., Schubert, K. R., Shearer, G. (1991). Proline accumulation, nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reducing) activity and activities of enzymes related to proline metabolism in drought-stressed soybean nodules. *Journal of experimental botany*, 42(7), 831-837.
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., ... Nagano, T. (1998). Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46(2), 373-375.

- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L. (2005). Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biol Szegediensis*, 49, 13-16.
- Kolbert, Z., Pető, A., Lehotai, N., Feigl, G. Erdei, L. (2012). Long-term copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Growth Regulation*, 68(2), 151-159.
- Königshofer, H., Löppert, H. G. (2015). Regulation of invertase activity in different root zones of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings in the course of osmotic adjustment under water deficit conditions. *Journal of Plant Physiology*, 183, 130-137.
- Krasensky, J., Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
- Król, A., Amarowicz, R., Weidner, S. (2014). Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6), 1491-1499.
- Kumar, R. R., Karajol, K., Naik, G. R. (2011). Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Recent Research in Science and Technology*, 3(1).
- Łabanowska, M., Filek, M., Kurdziel, M., Bidzińska, E., Miszalski, Z., Hartikainen, H. (2013). EPR spectroscopy as a tool for investigation of differences in radical status in wheat plants of various tolerances to osmotic stress induced by NaCl and PEG-treatment. *Journal of plant physiology*, 170(2), 136-145.
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Lawlor, D. W. (1970). Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New phytologist*, 69(2), 501-513.
- Lehotai, N., Pető, A., Bajkán, S., Erdei, L., Tari, I., Kolbert, Z. (2011). In vivo and in situ visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2199-2207.

- Lei, Y., Yin, C., Li, C. (2006). Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum*, 127(2), 182-191.
- Leisinger, T. (1987). *Biosynthesis of proline*. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Editors: Neidhardt F C, Ingraham J L, Low K B, Magasanik B, Schaechter M, Umberger H E. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 346–351.
- Leisinger, T. (1996). *Biosynthesis of proline*. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Editors: Neidhardt F C, Curtis III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E. 2nd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 434–441.
- Leon, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M. A., Raskin, I. (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22), 10413-10417.
- Leshem, Y. Y., Haramaty, E. (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology*, 148(3), 258-263.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 186, 464-478.
- Li, Z., Wu, N., Liu, T., Chen, H., Tang, M. (2015). Sex-related responses of *Populus cathayana* shoots and roots to AM fungi and drought stress. *PloS one*, 10(6), e0128841.
- Liang, J., Lia, X., Liu, Y., Wu, Y., Zhou, R., Feng, Q. (2016). Effects of drought stress on seedling growth and accumulation of secondary metabolites in the roots of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Acta Ecologica Sinica*. 36, 4415-4422.
- Lindner, M., Maroschek, M., Netherer, S., Kremer, A., Barbati, A., Garcia-Gonzalo, J., ... Lexer, M. J. (2010). Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 259(4), 698-709.

- Li-Ping, B. A. I., Fang-Gong, S. U. I., Ti-Da, G. E., Zhao-Hui, S. U. N., Yin-Yan, L. U., Guang-Sheng, Z. H. O. U. (2006). Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere*, 16(3), 326-332.
- Liu, C. C., Liu, Y. G., Guo, K., Zheng, Y. R., Li, G. Q., Yu, L. F., Yang, R. (2010). Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewatering. *Physiologia plantarum*, 139(1), 39-54.
- Liu, D., Kong, D. D., Fu, X. K., Ali, B., Xu, L., Zhou, W. J. (2016) Influence of exogenous 5-aminolevulinic acid on chlorophyll synthesis and related gene expression in oilseed rape de-etiolated cotyledons under water-deficit stress. *Photosynthetica*, 54, 468-474.
- Liu, F., Guo, F. Q. (2013). Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 8(2), e56345.
- López, R., Rodríguez-Calcerrada, J., Gil, L. (2009). Physiological and morphological response to water deficit in seedlings of five provenances of *Pinus canariensis*: potential to detect variation in drought-tolerance. *Trees*, 23(3), 509-519.
- Lozano-Juste, J., León, J. (2010). Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nialnia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR-and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 152(2), 891-903.
- Lv, S., Yang, A., Zhang, K., Wang, L., Zhang, J. (2007). Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Molecular Breeding*, 20(3), 233-248.
- Ma, X., Ou, Y. B., Gao, Y. F., Lutts, S., Li, T. T., Wang, Y., ... Yao, Y. A. (2016). Moderate salt treatment alleviates ultraviolet-B radiation caused impairment in poplar plants. *Scientific Reports*, 6.
- Mäkelä, P., Kärkkäinen, J., Somersalo, S. (2000). Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity. *Biologia Plantarum*, 43(3), 471-475.
- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G. A., Panneerselvam, R. (2007). Growth, biochemical

modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2), 141-149.

- Manoj, K., Uday, D. (2007). In vitro screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol. *African Journal of Biotechnology*, 6(6).
- Marok, M. A., Tarrago, L., Ksas, B., Henri, P., Abrous-belbachir, O., Havaux, M., Rey, P. (2013). A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety. *Journal of Plant Physiology*, 170(7), 633–645.
- Marumo, K., Waite, J. H. (1986). Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*. 872, 98–103.
- Matsumoto, T., Nishida, K., Noguchi, M., Tamaki, E. (1973). Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(3), 561-567.
- Matysik, J., Bhalu, B., Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82(5), 525-532.
- McCue, K. F., Hanson, A. D. (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology*, 8, 358-362.
- McNeil, S. D., Rhodes, D., Russell, B. L., Nuccio, M. L., Shachar-Hill, Y., Hanson, A. D. (2000). Metabolic modeling identifies key constraints on an engineered glycine betaine synthesis pathway in tobacco. *Plant physiology*, 124(1), 153-162.
- Medori, M., Michelini, L., Nogues, I., Loreto, F., Calfapietra, C. (2012). The impact of root temperature on photosynthesis and isoprene emission in three different plant species. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Meister, A.M.E.A., Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Mendhulkar, V.D., Nisha, K. (2015). Physiological and biochemical effects of polyethylene glycol (PEG) induced drought stress condition in four varieties of indian tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6, 971-980.

- Michel, B.E., Kaufmann, M.R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology*, 51, 914-916.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., Zilberstein, A. (2009). Unraveling  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26482-26492.
- Miller, G., Stein, H., Honig, A., Kapulnik, Y., Zilberstein, A. (2005). Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation. *Planta*, 222(1), 70-79.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
- Mioto, P. T., Mercier, H. (2013). Abscisic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. *Journal of plant physiology*, 170(11), 996-1002.
- Miranda, M., Ralph, S. G., Mellway, R., White, R., Heath, M. C., Bohlmann, J., Constabel, C. P. (2007). The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoids*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 816-831.
- Mishra, S., Duley, R. S. (2006). Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzym protectant. *Journal of plant physiology*, 163, 927-936.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Pereira, L. F. P., Vieira, L. G. E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 130(2), 218-229.
- 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(3), 346-352.

- Morse, A. M., Tschaplinski, T. J., Dervinis, C., Pijut, P. M., Schmelz, E. A., Day, W., Davis, J. M. (2007). Salicylate and catechol levels are maintained in nahG transgenic poplar. *Phytochemistry*, 68(15), 2043-2052.
- Munns, R., Brady, C. J., Barlow, E. W. R. (1979). Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water stress. *Functional Plant Biology*, 6(3), 379-389.
- Mur, L. A., Carver, T. L., Prats, E. (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. *Journal of experimental botany*, 57(3), 489-505.
- Mur, L. A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V., ... Gupta, K. J. (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants*, 5, pls052.
- Murillo-Amador, B., López-Aguilar, R., Kaya, C., Larrinaga-Mayoral, J., Flores-Hernández, A. (2002). Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188(4), 235-247.
- 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(2), 95-101.
- Nagano, T. (2009). Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 45(2), 111-124.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 165-176.
- Neill, S. J., Burnett, E. C. (1999). Regulation of gene expression during water deficit stress. *Plant Growth Regulation*, 29(1-2), 23-33.
- Neill, S. J., Desikan, R., Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249–279.



- Noctor, G., Gornetz, L., Vanacker, H., Foyer, C. H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1283–1304.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C. H. (2014). The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*, 164(4), 1636-1648.
- Nogués, S., Allen, D. J., Morison, J. I. L., Baker N. R. (1998). Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiology*, 117, 173–181.
- Nuccio, M. L., Russell, B. L., Nolte, K. D., Rathinasabapathi, B., Gage, D. A., Hanson, A. D. (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *The Plant Journal*, 16(4), 487-496.
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*, 24(7), 1311-1317.
- Obata, T., Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3225-3243.
- Obradović, D. (2002). *Svetlosni mikroskopi*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 173.
- Oh, M. M., Trick, H. N., Rajashekar, C. B. (2009). Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of plant physiology*, 166(2), 180-191.
- Ortega-García, F., Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1565-1573.
- 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(3), 487-492.
- Park, E. J., Jeknić, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N., Chen, T. H. (2004). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *The Plant Journal*, 40(4), 474-487.

- Park, Y. K., Alencar, S. M., Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502-2506.
- Parmar, M. T., Moore, R. P. (1966). Effects of simulated drought by polyethylene glycol solutions on corn (*Zea mays* L.) germination and seedling development. *Agronomy Journal*, 58(4), 391-392.
- Patakas, A. A., Zotos, A., Beis, A. S. (2010). Production, localisation and possible roles of nitric oxide in drought-stressed grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 203-209.
- Pérez-Pérez, J. G., Syvertsen, J. P., Botía, P., García-Sánchez, F. (2007). Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized Carrizo citrange seedlings during drought stress and recovery. *Annals of Botany*, 100(2), 335-345.
- Perlikowski, D., Kierszniowska, S., Sawikowska, A., Krajewski, P., Rapacz, M., Eckhardt, Ä., Kosmala, A. (2016). Remodeling of leaf cellular glycerolipid composition under drought and re-hydration conditions in grasses from the *Lolium-Festuca* complex. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Pető, A., Lehotai, N., Feigl, G., Tugyi, N., Ördög, A., Gémes, K., Tari, I., Erdei, L., Kolbert, Z., 2013. Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 32(12), pp.1913-1923.
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S., Giannakoula, A. (2012). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant physiology and biochemistry*, 60, 1-11.
- Petrucci, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A. (2013). Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14950-14973.
- Phimchan, P., Chanthai, S., Bosland, P. W., Techawongstien, S. (2014). Enzymatic Changes in Phenylalanine Ammonia-lyase, Cinnamic-4- hydroxylase, Capsaicin Synthase, and Peroxidase Activities in *Capsicum* under Drought Stress. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 62, 7057-7062.
- Pilipović, A. (2005) Uloga topola (*Populus* sp.) u fitoremedijaciji voda zagađenih nitratima, Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

- Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling: computer simulation as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 126, 445–462.
- Polle, A., Otter, T., Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106(1), 53-60.
- Popović, B., Štajner, D. (2008). *Oksidativni stres kod biljaka*. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet.
- Popović, B.M., Štajner, D., Kevrešan, S., Bijelić, S. (2012). Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.)—Comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods. *Food chemistry*, 134(2), 734-741.
- Popović, B.M., Štajner, D., Ždero-Pavlović, R., Tari, I., Csiszár, J., Gallé, Á., ... Orlović, S. (2017). Biochemical response of hybrid black poplar tissue culture (*Populus × canadensis*) on water stress. *Journal of plant research*, 130(3), 559-570.
- Popović, B.M., Štajner, D., Ždero-Pavlović, R., Tumbas-Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Orlović, S. (2016). Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 105(1), 242-250.
- Poulson, M.E., Boeger, M.R.T., Donahue, R.A. (2006). Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. *Photosynthesis Research*, 90(1), 79-90.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: From biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29–36. doi:10.1016/j.tplants.2006.11.006
- Procházková, D., Haisel, D., Pavlíková, D. (2014). Nitric oxide biosynthesis in plants—the short overview. *Plant Soil Environment*, 60(3), 129-134.
- Pyngrope, S., Bhoomika, K., Dubey, R. S. (2013). Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in Indica rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 69(2), 149-165.

- Qi-lin, D., Chen, C., Bin, F., Ting-ting, L., Xia, T., Yuan-ya, G., ... Shi-zhang, D. (2009). Effects of NaCl treatment on the antioxidant enzymes of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 8(20).
- Quan, R., Shang, M., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, J. (2004). Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2(6), 477-486.
- Rai, G. K., Rai, N. P., Rathaur, S., Kumar, S., Singh, M. (2013). Expression of rd29A: AtDREB1A/CBF3 in tomato alleviates drought-induced oxidative stress by regulating key enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Plant physiology and biochemistry*, 69, 90-100.
- Ramanjulu, S., Bartels, D. (2002). Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, cell & environment*, 25(2), 141-151.
- Randriamanana, T. R., Nybakken, L., Lavola, A., Aphalo, P. J., Nissinen, K. (2014). Sex-related differences in growth and carbon allocation to defence in *Populus tremula* as explained by current plant defence theories. *Tree Physiology*, 34, 471–487.
- Rao, S., Jabeen, F. T. Z. (2013). In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 261-268.
- Ravn, H., Andary, C., Kovács, G., Mølgaard, P. (1989). Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochemical systematics and ecology*, 17(3), 175-184.
- Raymond, M.J., Smirnoff, N. (2002). Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Annals of Botany*, 89, 813-23.
- Rehill, B. J., Whitham, T. G., Martinsen, G. D., Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., Lindroth, R. L. (2006). Developmental trajectories in cottonwood phytochemistry. *Journal of Chemical Ecology*, 32(10), 2269-2285.
- Ren, J., Dai, W., Xuan, Z., Yao, Y., Korpelainen, H., Li, C. (2007). The effect of drought and enhanced UV-B radiation on the growth and physiological traits of two contrasting poplar species. *Forest Ecology and Management*, 239(1), 112-119.

- Rena, A. B., Splittstoesser, W. E. (1975). Proline dehydrogenase and pyrroline-5-carboxylate reductase from pumpkin cotyledons. *Phytochemistry*, 14(3), 657-661.
- Repellin, A., Thi, A. P., Tashakorie, A., Sahseh, Y., Daniel, C., Zuily-Fodil, Y. (1997). Leaf membrane lipids and drought tolerance in young coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *European Journal of Agronomy*, 6(1), 25-33.
- Rhodes, D., Handa, S., Bressan, R. A. (1986). Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiology*, 82(4), 890-903.
- Rhodes, D., Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology*, 44(1), 357-384.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Robak, J., Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37, 837-841.
- Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., Del Río, L. A., Palma, J. M. (2006). Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytologist*, 170(1), 43-52.
- Rubiolo, P., Casetta, C., Cagliero, C., Brevard, H., Sgorbini, B., Bicchi, C. (2013). *Populus nigra* L. bud absolute: a case study for a strategy of analysis of natural complex substances. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(4), 1223-1235.
- Ruuhola, T., Tikkanen, O. P., Tahvanainen, J. (2001). Differences in host use efficiency of larvae of a generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species. *Journal of chemical ecology*, 27(8), 1595-1615.
- Saibi, W., Feki, K., Yacoubi, I., Brini, F. (2015). Bridging Between Proline Structure, Functions, Metabolism, and Involvement in Organism Physiology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(8), 2107-2119.
- Sakamoto, A., Murata, A. N. (1998). Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant molecular biology*, 38(6), 1011-1019.

- Sakamoto, A., Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 81-88.
- 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.
- Salem, N., Msaada, K., Dhifi, W., Sriti, J., Mejri, H., Limam, F., ... Sidi, B. De. (2014). Effect of drought on safflower natural dyes and their biological activities. *EXCLI Journal*, 13, 1–18.
- Sánchez, E., López-Lefebvre, L. R., García, P. C., Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Romero, L. (2001). Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). *Journal of Plant Physiology*, 158, 593-598.
- Sánchez-Rodríguez, E., Moreno, D. A., Ferreres, F., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., Ruiz, J. M. (2011). Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry*, 72(8), 723-729.
- Santisree, P., Bhatnagar-Mathur, P., Sharma, K. K. (2015). NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: Do we have all the answers? *Plant science*, 239, 44-55.
- Saviouré, A., Jaoua, S., Hua, X. J., Ardiles, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 372(1), 13-19.
- Saxena, I., Shekhawat, G. S. (2013). Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitra- tion. *Nitric Oxide* 32, 13–20.
- Sayfzadeh, S., Habibi, D., Taleghani, D. F., Kashani, A., Vazan, S., Qaen, S. H. S., ... Rashidi, M. (2011). Response of antioxidant enzyme activities and root yield in sugar beet to drought stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(3), 357-362.

- Schimel, J. P., Cleve, K. V., Cates, R. G., Clausen, T. P., Reichardt, P. B. (1996). Effects of balsam poplar (*Populus balsamifera*) tannins and low molecular weight phenolics on microbial activity in taiga floodplain soil: implications for changes in N cycling during succession. *Canadian Journal of Botany*, 74(1), 84-90.
- Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., Rehill, B. J., Martinsen, G. D., Hart, S. C., Lindroth, R. L., ... Whitham, T. G. (2004). Genetically based trait in a dominant tree affects ecosystem processes. *Ecology letters*, 7(2), 127-134.
- Scioneaux, A. N., Schmidt, M. A., Moore, M. A., Lindroth, R. L., Wooley, S. C., Hagerman, A. E. (2011). Qualitative variation in proanthocyanidin composition of *Populus* species and hybrids: genetics is the key. *Journal of chemical ecology*, 37(1), 57-70.
- Sečenji, M., Lendvai, Á., Miskolczi, P., Kocsy, G., Gallé, Á., Szűcs, A., ... Dudits, D. (2010). Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biology*, 12(6), 871-882.
- Sedlak, J., Lindsay, H. (1968). Estimation of total protein bound and non protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 487-494.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H., Kang, C. M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4(1), 8.-14.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzyme in growing rice seedling. *Plant Growth Regulation*, 46, 209–221.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005b). 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(8), 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.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., Nguyen, H. T. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2343-2351.
- Shen, S. C., Wu, M. S., Lin, H. Y., Yang, L. Y., Chen, Y. H., Chen, Y. C. (2014). Reactive Oxygen Species-Dependent Nitric Oxide Production in Reciprocal Interactions of Glioma and Microglial Cells. *Journal of cellular physiology*, 229(12), 2015-2026.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Basalah, M. O. (2011). Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248(3), 447-455.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A., Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(1), 82-92.
- Simpson, G. G. (2005). NO flowering. *Bioessays*, 27(3), 239-241.
- Singh, B., Bohra, A., Mishra, S., Joshi, R., Pandey, S. (2015). Embracing new-generation “omics” tools to improve drought tolerance in cereal and food-legume crops. *Biologia plantarum*, 59, 413-428.
- Singh, T. N., Aspinall, D., Paleg, L. G. (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature*, 236(67), 188-190.
- Slabbert, M. M., Krüger, G. H. J. (2014). Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves. *South African Journal of Botany*, 95, 123-128.
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58.
- Smirnoff, N. (2008). Ascorbate, tocopherol and carotenoids. In: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants* (ed. Smirnoff, N.), John Wiley & Sons Inc., USA. pp. 53–86.



- Smirnoff, N., Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., Masia, A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32(1), 45-53.
- Song, S. Q., Lei, Y. B., Tian, X. R. (2005). Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(6), 793-800.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Khodambashi, M., Rouhi, V., Mosavei, S., Sofo, A. (2012). Exogenous proline alleviates the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in wild almond species. *Russian journal of plant physiology*, 59(6), 788-798.
- Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- Štajner D., Orlović S., Popović B. M., Kebert M., Galić Z. (2011). Screening of drought oxidative stress tolerance in Serbian melliferous plant species. *African Journal of Biotechnology*, 10, 1609–1614.
- Stöhr, C., Ullrich, W. R. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2293-2303.
- Szabados, L., Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Talamond, P., Verdeil, J. L., Conéjéro, G. (2015). Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules*, 20(3), 5024-5037.
- Tanner, J. J. (2008). Structural biology of proline catabolism. *Amino Acids*, 34, 719–730.
- Teiz L., Zeiger E. (ed.): *Plant Physiology*.- Sinauer Associates, Sunderland 2010. p 757.
- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress, *Frontiers in plant science*, 5(771), 1-9.
- Thill, D. C., Schirman, R. D., Appleby, A. P. (1979). Osmotic stability of mannitol and polyethylene glycol 20,000 solutions used as seed germination media. *Agronomy journal*, 71(1), 105-108.

- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D. W., Steffens, J. C. (2004). Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Science*, 167(4), 693-703.
- Torres-Franklin, M. L., Gigon, A., De Melo, D. F., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A. T. (2007). Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiologia plantarum*, 131(2), 201-210.
- Toscano, S., Farieri, E., Ferrante, A., Romano, D. (2016). Physiological and biochemical responses in two ornamental shrubs to drought stress. *Frontiers in plant science*, 7.
- Tsago, Y., Andargie, M., Takele, A. (2013). In vitro screening for drought tolerance in different sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) varieties. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9(3).
- Tsai, C. J., Harding, S. A., Tschaplinski, T. J., Lindroth, R. L., Yuan, Y. (2006). Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. *New Phytologist*, 172(1), 47-62.
- Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
- Turner, N.C. (1979). *Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants*. In: *Stress Physiology in Crop Plants* (eds. Mussell, H. and Staples, R. C.), New York: Wiley, 343–372.
- Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 163(3), 515-523.
- Varela, M. C., Arslan, I., Reginato, M. A., Cenzano, A. M., Luna, M. V. (2016). Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina). *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 81-91.
- Vendruscolo, E.C., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B., Marur, C.J., Vieira, L.G. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1367–1376.

- Venekamp, J. H., Koot, T. M. (1988). The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water withholding. *Journal of plant physiology*, 132(1), 102-109.
- Venkatesh, J., Park, S. W. (2014). Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies*, 55(1), 1
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). Isolation and identification of phenolic compounds. In *Phenolic compound biochemistry* (pp. 151-196). Springer Netherlands.
- Vogel, D.J., Davis, B.D. (1952). Glutamic  $\gamma$ -Semiaaldehyde and  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-carboxylic Acid, Intermediates in the Biosynthesis of Proline. *Journal of the American chemical Society*, 74, 109-112.
- Vranova, E., Inze, D., Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 1227–1236.
- Wang, M., Li, Q., Fu, S., Xiao, D., Dong, B. (2005). Effects of exogenous nitric oxide on drought-resistance of poplar. *Journal of Applied Ecology*, 16, 805–810.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*, 100(4), 681-697.
- Watanabe, S., Kojima, K., Ide, Y., Sasaki, S. (2000). Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(3), 199-206.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- Wettstein, D. von (1975) Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12, 427–506.
- Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnov, N. (1998). The biosynthesis pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393, 365–369.
- White, T. A., Krishnan, N., Becker, D. F., Tanner, J. J. (2007). Structure and kinetics of monofunctional proline dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14316-14327.

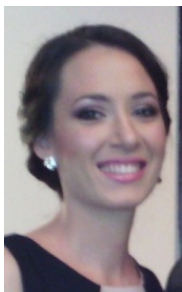
- Wilson, I. D., Neill, S. J., Hancock, J. T. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 31(5), 622-631.
- Wohlbach, D. J., Quirino, B. F., Sussman, M. R. (2008). Analysis of the *Arabidopsis* Histidine Kinase ATHK1 Reveals a Connection between Vegetative Osmotic Stress Sensing and Seed Maturation. *The Plant Cell*, 20(4), 1101-1117.
- Wrench, P., Brady, C. J., Hinde, R. W. (1980). Interaction of slicing and osmotic stress on proline metabolism in Jerusalem artichoke tuber tissue. *Functional Plant Biology*, 7(2), 149-157.
- Wu, Y., Thorne, E. T., Sharp, R. E., Cosgrove, D. J. (2001). Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiology*, 126(4), 1471-1479.
- Xiong, J., Zhang, L., Fu, G., Yang, Y., Zhu, C., Tao, L. (2012). Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. *Journal of plant research*, 125(1), 155-164.
- Xu, X., Peng, G., Wu, C., Korpelainen, H., Li, C. (2008). Drought inhibits photosynthetic capacity more in females than in males of *Populus cathayana*. *Tree Physiology*, 28, 1751–1759.
- 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.
- Yang, F., Miao, L.F. (2010). Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Silva Fennica*, 44, 23-37.
- Yang, F., Xu, X., Xiao, X., Li, C. (2009). Responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Biologia Plantarum*, 53, 511-516.
- Yang, S., Liu, L., Li, D., Xia, H., Su, X., Peng, L., Pan, S. (2016). Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action. *Food chemistry*, 196, 610-618.
- Yin, C., Pang, X., Lei, Y. (2009). *Populus* from high altitude has more efficient protective mechanisms under water stress than from low-altitude habitats: a study in greenhouse for cuttings. *Physiologia Plantarum*, 137, 22–35.

- Yordanov, I., Velikova, V., Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., ... Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 7(5), 751-760.
- Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H. (2005). High molecular weight plant polyphenols (tannins): Prospective functions. *Recent Advances in Phytochemistry*, 39, 163–190.
- Yu-Mei, W., Yu-Ling, M., Naosuke, N. (2004). Changes in glycine betaine and related enzyme contents in *Amaranthus tricolor* under salt stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30, 496-502.
- Zhang, L., Gao, M., Hu, J., Zhang, X., Wang, K., & Ashraf, M. (2012). Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3189-3202.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X., Tan, M. (2007). Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, 175(1), 36-50.
- Zhang, C. S., Lu, Q., Verma, D. P. S. (1995). Removal of feedback inhibition of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20491-20496.
- Zhang, J., Kirkham, M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132(3), 361-373.
- Zhang, S., Jiang, H., Peng, S., Korpelainen, H., Li, C. (2011). Sex-related differences in morphological, physiological and ultrastructural responses of *Populus cathayana* to chilling. *Journal of Experimental Botany*, 62, 675–686.
- Zhang, S., Lu, S., Xu, X., Korpelainen, H., Li, C. (2010). Changes in antioxidant enzyme activities and isozyme profiles in leaves of male and female *Populus*

*cathayana* infected with *Melampsora larici-populina*. *Tree Physiology*, 30, 116–128.

- Zhang, X.D., Wang, Z.W., Han, Q.F., Wang, Z.Y., Min, A.C., Jia, Z.K., Nie, J.F. (2016). Effects of water stress on the root structure and physiological characteristics of early-stage maize. *Acta Ecologica Sinica*, 36, 2969-2977.
- Zhao, H., Li, Y., Duan, B., Korpelainen, H., Li, C. (2009). Sex-related adaptive responses of *Populus cathayana* to photoperiod transitions. *Plant, cell & environment*, 32, 1401–1411.
- Ziogas, V., Tanou, G., Filippou, P., Diamantidis, G., Vasilakakis, M., Fotopoulos, V., Molassiotis, A. (2013). Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant physiology and biochemistry*, 68, 118-126.
- Zucker, W. V. (1983). Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *American Naturalist*, 335-365.
- [http://www.bomengids.nl/pics/Canada\\_populier\\_\\_Populus\\_x\\_canadensis\\_\\_Carolina\\_poplar@populiercanada@1@boomtree@img\\_3386.jpg](http://www.bomengids.nl/pics/Canada_populier__Populus_x_canadensis__Carolina_poplar@populiercanada@1@boomtree@img_3386.jpg)- januar 2016
- [https://www.geocaching.com/geocache/GC219J0\\_giant-eastern-cottonwood-tree-virtual-](https://www.geocaching.com/geocache/GC219J0_giant-eastern-cottonwood-tree-virtual-) januar 2016

## BIOGRAFIJA



Ružica Ždero Pavlović rođena je u Novom Sadu 04.06.1987. godine, gde se i školovala. Završila je osnovnu školu „Miroslav Antić“ u Futogu 2002. godine i gimnaziju „Svetozar Marković“ u Novom Sadu 2006. godine, kao nosilac Vukovih diploma. Osnovne studije biohemije završila je 2010. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu sa prosečnom ocenom 9,72. Iste godine upisala je Diplomске akademske studije (master) biohemije, takođe na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Master rad pod nazivom „Biološka aktivnost ekstrakata i etarskih ulja vrste *Juniperus excelsa* M. Bieb. 1800” odbranila je 15.07.2011. godine i stekla zvanje Master biohemičar. U toku završne godine osnovnih akademskih studija i na završnoj godini master studija bila je stipendista Fonda za mlade talente. Dobitnik je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za uspeh postignut u toku školovanja. Doktorske studije je upisala 2011. godine, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, obrazovni profil Doktor nauka - biohemijske nauke, a prosečna ocena položenih ispita je 10,00.

Od 2012. godine zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu kao istraživač saradnik, na projektu „Biosensing tehnologije i globalni sistemi za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima“ III 43002 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Kao demonstrator, u Laboratoriji za hemiju i biohemiju, pomagala je pri upoznavanju studenata sa radom u hemijskoj laboratoriji i učestvovala u realizaciji laboratorijskih vežbi iz Hemije i Biohemije. Od 2015. godine je asistent za užu naučnu oblast Hemija i biohemija na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu.

Celokupni naučni rad vezan je za ispitivanje oksidativnog stresa kod biljaka. Učesnik je prekograničnog IPA programa sa Mađarskom „Joint development of higher education and training programmes in plant biology in support of knowledge-based society” u okviru kog je boravila dve nedelje na Univerzitetu Jožef Atila u Segedinu. Koautor je četiri naučna rada koji su objavljeni u međunarodnim časopisima, trinaest naučnih saopštenja prezentovanih na internacionalnim skupovima i jednog saopštenja prezentovanog na domaćem naučnom skupu.

Govori, čita i piše engleski i nemački jezik.

Član je *Srpskog hemijskog društva, Društva za fiziologiju biljaka Srbije i Japanskog botaničkog društva.*

*U Novom Sadu, 10.07.2017.*

*Ružica Ždero Pavlović*



**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET****KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ružica Ždero Pavlović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Boris Popović, vanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu dr Ivana Beara, vanredni profesor Prirodno- matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Biohemijski mehanizmi otpornosti klonova topole ( <i>Populus spp.</i> ) na vodni stres
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija

Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 8; Stranica: 202 (38 u Dodatnom materijalu na CD-u); Slika: 80 (45 u Dodatnom materijalu na CD-u); Referenci: 376; Tabela: 21 (9 u Dodatnom materijalu na CD-u); Grafikona 9 (9 u Dodatnom materijalu na CD-u); Histograma: 22; Priloga: 1 (1 u Dodatnom materijalu na CD-u).
Naučna oblast: NO	Biohemija
Naučna disciplina: ND	Biohemija biljaka
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	klonovi topola, vodni stres, suša, PEG 6000, antioksidantna aktivnost, HPLC, prolin, glicin-betain, reaktivne kiseonične i azotne vrste
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija.
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>Cilj ove doktorske disertacije predstavljalo je ispitivanje uticaja vodnog stresa izazvanog sa polietilen glikolom (PEG) 6000 na biohemijske osobine klonova topole. Reznice tri klona topole (M-1, B-229 i PE19/66) su hidroponski gajene i izložene 100 mOsm i 200 mOsm PEG 6000 tokom šest dana. Nakon tretmana u kontrolnim i stresiranim biljkama su ispitane promene aktivnosti antioksidantnih enzima, aktivnost dva enzimska markera polifenolnog metabolizma, fenolni profil, antioksidantna aktivnost, kao i sadržaj prolina i glicin betaina (GB). Takođe, ispitan je biohemijski odgovor kulture tkiva klona M-1 na vodni stres izazvan sa PEG 6000.</p> <p>U oba eksperimenta uočeno je da je akumulacija prolina i GB u uslovima vodnog stresa izazvanog sa PEG 6000 najvažnija strategija u otpornosti na stres i prevazilaženju vodnog deficita, tako da se ovi parametri mogu definisati kao najbolji indikatori otpornosti topole na sušu.</p> <p>Rezultati ovog istraživanja</p>

	<p>upotpunjavaju saznanja o povezanosti oksidativnog stresa uzrokovanog vodnim stresom sa antioksidantnim odgovorom, nivoom oštećenja lipida i proteina, uključivanjem osmolita kao i promenama u polifenolnom profilu. Takođe, dobijeni rezultati su značajni za odabir klonova topola tolerantnih na vodni stres i za pošumljavanje sušnih staništa, kojih će biti sve više usled negativnog uticaja klimatskih promena.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>26.01.2017.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	<p>2017</p>
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>_____</p> <p><i>dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, predsednik</i></p> <p>_____</p> <p><i>dr Saša Orlović, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, član</i></p> <p>_____</p> <p><i>dr Boris Popović, vanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, mentor</i></p> <p>_____</p> <p><i>dr Ivana Beara, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, mentor</i></p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCE****KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Ružica Ždero Pavlović
Mentor: MN	Dr Boris Popović, Associate Professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad Dr Ivana Beara, Associate Professor Faculty of Science, University of Novi Sad
Title: TI	Biochemical aspects of resistance of poplar ( <i>Populus</i> spp) clones on water stress
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia.

Physical description: PD	Chapters: 8 (8. Supplementary data on CD); Pages: 202 (38 Supplementary data on CD); Pictures: 80 (45 Supplementary data on CD); References: 376; Tables: 21 (9 Supplementary data on CD); Figures: 9 (9 Supplementary data on CD); Charts: 22.
Scientific field SF	Biochemistry
Scientific discipline SD	Plant Biochemistry
Subject, Key words SKW	poplar clones, water stress, drought, PEG 6000, antioxidant activity, HPLC, proline, glycine betaine, reactive oxygen and nitrogen species
UC	-
Holding data: HD	Library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	<p>The aim of presented doctoral thesis was investigation of the impact of water deficit caused by polyethylene glycol (PEG) 6000 on biochemical features of poplar clones. During six days, cuttings of three poplar clones (M-1, B-229 and PE 19/66) were grown in hydroponics and subjected to 100 and 200 mOsm PEG 6000. Changes in the activity of antioxidant enzymes, polyphenol characterization, two enzymatic markers of polyphenol metabolism, antioxidant capacity, as well as proline and glycine betaine content were investigated in stressed plants. Furthermore, assessment of biochemical response of poplar clone M-1 tissue culture to water stress induced by PEG 6000 was performed.</p> <p>In both experiments, the most important strategy for stress resistance and overcoming water deficiency was accumulation of proline and glycine betaine so these parameters can be defined as the best indicators of poplar resistance to drought.</p> <p>The results of this study complete the findings on the oxidative stress caused by water stress and their relationship with the antioxidant response, the level of lipid and</p>

	protein damage, accumulation of the osmolites and changes in the polyphenol profile. Also, the obtained results may be important for the selection of poplar clones resistant to water stress and for afforestation in arid sites, which appeared to be more numerous due to the effects of global climate change.
Accepted on Senate on: AS	26.01.2017.
Defended: DE	2017
Thesis Defend Board: DB	<p>_____ <i>Professor Neda Mimica-Dukić, PhD, Faculty of Science, University of Novi Sad, president</i></p> <p>_____ <i>Professor Saša Orlović, PhD, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, member</i></p> <p>_____ <i>Associate professor Boris Popović, PhD, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, mentor</i></p> <p>_____ <i>Associate professor Ivana Beara, PhD, Faculty of Science, University of Novi Sad, mentor</i></p>



**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI  
FAKULTET**

**DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I  
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE**



# **Biohemijski mehanizmi otpornosti klonova topole (*Populus* spp.) na vodni stres**

**- DODATNI MATERIJAL UZ DOKTORSKU DISERTACIJU -**

**Mentori:**

**Vanr. prof. dr Boris Popović**

**Vanr. prof. dr Ivana Beara**

**Kandidat:**

**Ružica Ždero Pavlović**

**Novi Sad, 2017.**



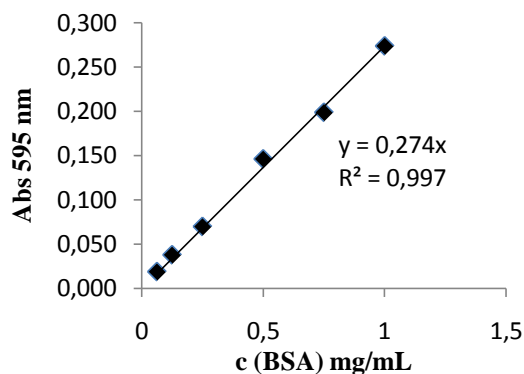


## 8. PRILOG

### 8.1. Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina

Tabela 7.1. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja rastvorljivih proteina

početna konc. mg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A
0.0625	0.023	0.015	0.019	0.019
0.125	0.037	0.038	0.039	0.038
0.25	0.069	0.076	0.065	0.070
0.5	0.153	0.146	0.14	0.146
0.75	0.201	0.196	0.2	0.199
1	0.278	0.272	0.271	0.274

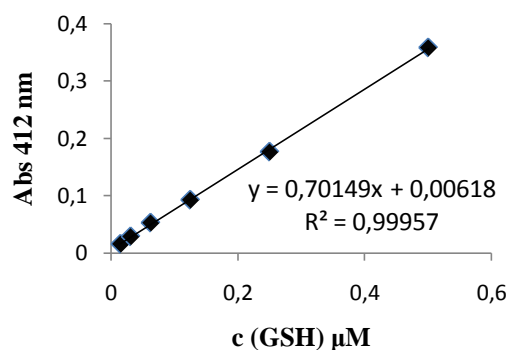


Grafik 8.1. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja rastvorljivih proteina

### 8.2. Određivanje količine redukovanog glutationa

Tabela 8.2. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja redukovanog glutationa

početna konc. µg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>kor</sub>	A
0.015	0.015	0.016	0.016	0	0.016
0.031	0.034	0.028	0.032	0.002	0.029
0.0625	0.053	0.06	0.058	0.004	0.053
0.125	0.103	0.111	0.099	0.011	0.093
0.25	0.185	0.195	0.196	0.015	0.177
0.5	0.376	0.38	0.374	0.018	0.359

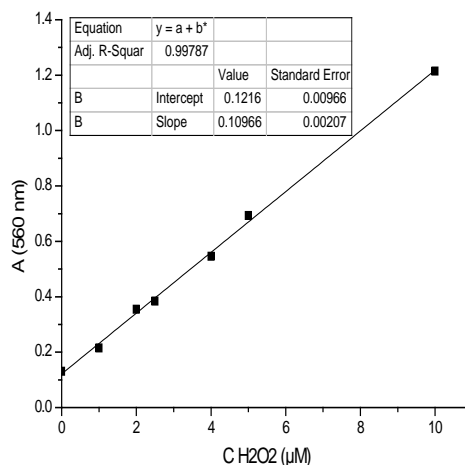


Grafik 8.2. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja redukovanog glutationa

### 8.3. Određivanje količine vodonik peroksida

Tabela 8.3. Kalibraciona kriva za određivanje količine vodonik peroksida

radna konc. $\mu\text{M}$	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_{\text{kor}}$	A
0	0.186	0.192	0.159	0.048	0.131
1	0.272	0.271	0.273	0.057	0.215
2	0.417	0.398	0.397	0.049	0.355
2.5	0.444	0.438	0.441	0.057	0.384
4	0.623	0.64	0.63	0.085	0.546
5	0.749	0.747	0.747	0.055	0.693
10	1.303	1.321	1.31	0.097	1.214

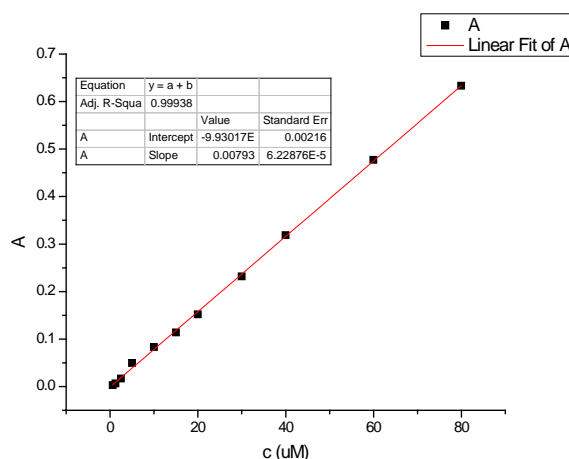


Grafik 8.3. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje količine vodonik peroksida

### 8.4. Određivanje količine prolina

Tabela 8.4. Kalibraciona kriva za određivanje količine prolina

početna konc. $\mu\text{M}$	$A_1$	$A_2$	$A_3$	A
80.0	0.618	0.637	0.645	0.633
60.0	0.47	0.472	0.489	0.477
40.0	0.326	0.315	0.315	0.319
30.0	0.232	0.23	0.233	0.232
20.0	0.152	0.153	0.151	0.152
15.0	0.112	0.114	0.116	0.114
10.0	0.082	0.085	0.082	0.083
5.0	0.066	0.049	0.034	0.050
2.5	0.015	0.018	0.017	0.017
1.2	0.006	0.007	0.006	0.006
0.6	0.003	0.003	0.003	0.003

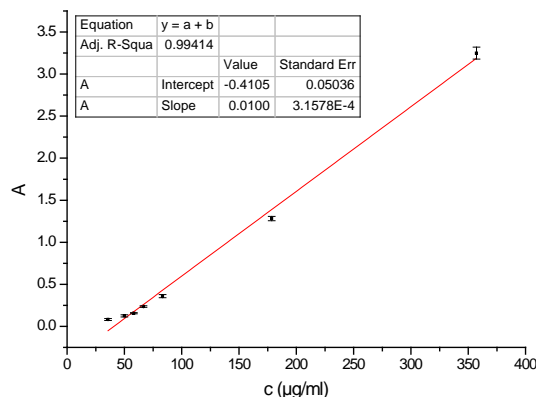


Grafik 8.4. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje količine prolina

## 8.5. Određivanje glicin-betaina

Tabela 8.5. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja glicin-betaina

početna konc. µg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A
35.7	0.108	0.083	0.054	0.082
50.0	0.160	0.125	0.090	0.125
58.3	0.185	0.161	0.122	0.156
66.7	0.262	0.241	0.203	0.235
83.3	0.387	0.357	0.333	0.359
178.6	1.312	1.292	1.242	1.282
357.1	3.279	3.231	3.236	3.249

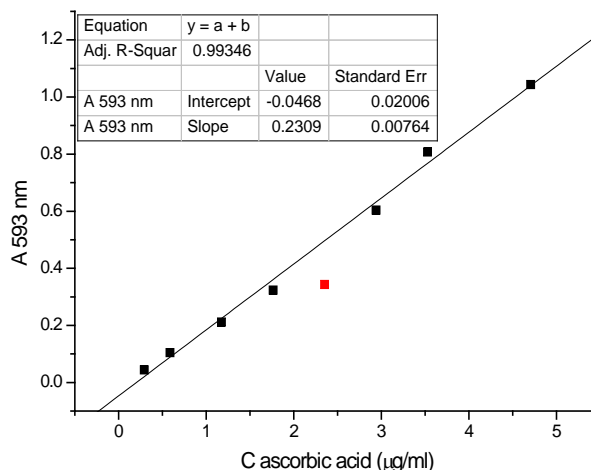


Grafik 8.5. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja glicin-betaina

## 8.6. Određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom

Tabela 8.6. Kalibraciona kriva za određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom

radna konc. µg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A
0.294	0.111	0.11	0.108	0.044
0.588	0.172	0.17	0.17	0.105
1.176	0.275	0.281	0.275	0.211
1.765	0.386	0.395	0.386	0.323
2.353	0.415	0.405	0.408	0.343
2.941	0.649	0.676	0.685	0.604
3.529	0.897	0.834	0.888	0.807
4.706	1.108	1.113	1.106	1.043
0.294	0.111	0.11	0.108	0.044
0.588	0.172	0.17	0.17	0.105
0	0.068	0.065	0.065	

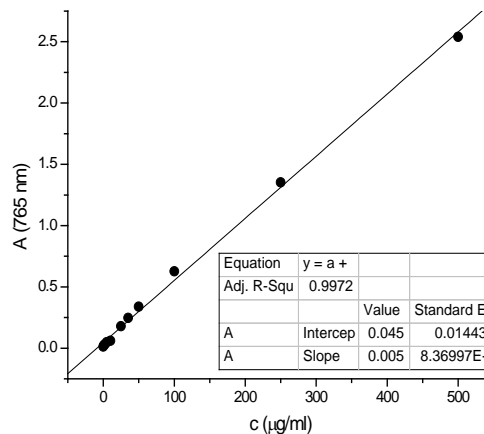


Grafik 8.6. Kalibraciona kriva za određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom

## 8.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Tabela 8.7. Kalibraciona kriva za određivanje ukupnih fenola

poč. konc. µg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>kor</sub>	A
500	2.552	2.538	2.639	0.005	2.571
250	1.390	1.358	1.319	0.003	1.353
100	0.632	0.624	0.625	0	0.627
50	0.334	0.343	0.336	0	0.338
35	0.246	0.248	0.243	-0.001	0.247
25	0.178	0.178	0.180	0	0.179
10	0.070	0.059	0.050	-0.001	0.061
5	0.050	0.047	0.047	-0.001	0.049
2.5	0.032	0.031	0.028	-0.001	0.031
1	0.023	0.025	0.021	-0.001	0.024
0	0.011	0.012	0.011	-0.001	0.012

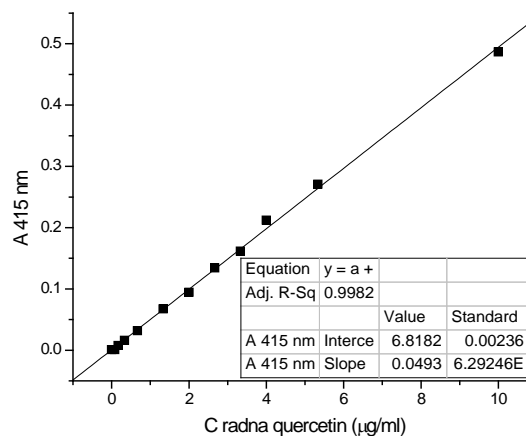


Grafik 8.7. Kalibraciona kriva za određivanje ukupnih fenola

## 8.8. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Tabela 8.8. Kalibraciona kriva za određivanje ukupnih flavonoida

radna konc. µg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>kor</sub>	A
0	0.003	0.003	0.002	0.002	0.001
0.083	0.016	0.017	0.008	0.007	0.001
0.167	0.018	0.015	0.014	0.008	0.008
0.333	0.024	0.025	0.023	0.008	0.016
0.667	0.053	0.055	0.050	0.021	0.032
1.333	0.100	0.104	0.106	0.036	0.067
2.000	0.156	0.150	0.151	0.058	0.094
2.667	0.202	0.210	0.210	0.073	0.134
3.333	0.263	0.266	0.265	0.103	0.162
4.000	0.319	0.323	0.325	0.110	0.212
5.333	0.411	0.419	0.418	0.145	0.271
10.000	0.729	0.742	0.742	0.251	0.487

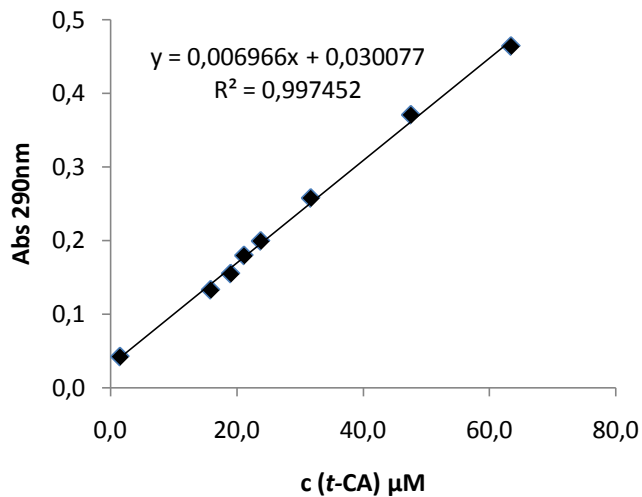


Grafik 8.8. Kalibraciona kriva za određivanje ukupnih flavonoida

## 8.9. Određivanje aktivnosti PAL

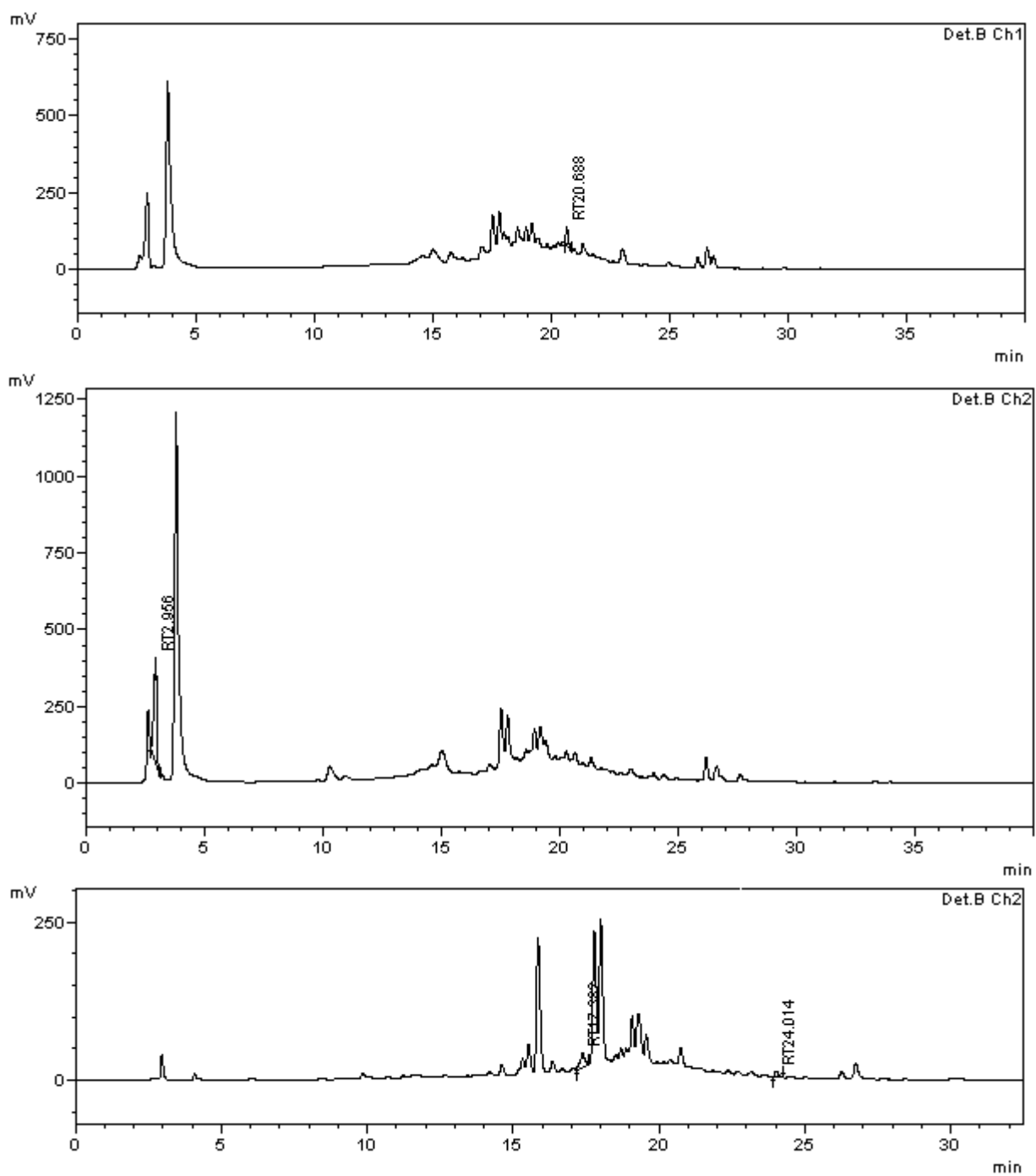
Tabela 8.9. Kalibraciona kriva za određivanje PAL

početna konc. µg/ml	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A
63.4	0.46	0.473	0.459	0.464
47.6	0.368	0.37	0.374	0.371
31.7	0.249	0.255	0.269	0.258
23.8	0.202	0.2	0.196	0.199
21.1	0.184	0.176	0.179	0.180
19.0	0.156	0.152	0.157	0.155
15.9	0.13	0.136	0.133	0.133
1.5	0.039	0.045	0.043	0.042

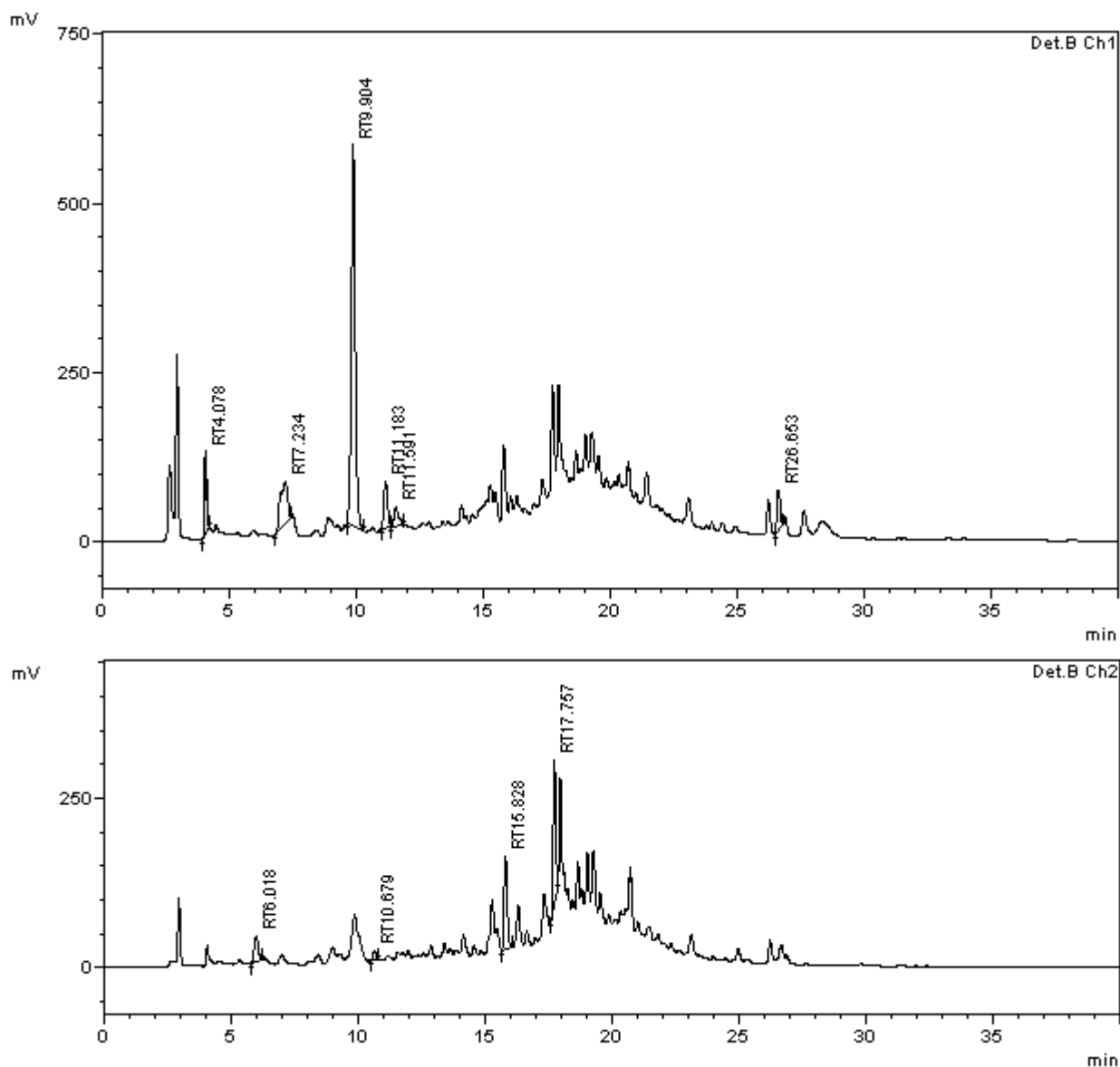


Grafik 8.9. Kalibraciona kriva za određivanje PAL

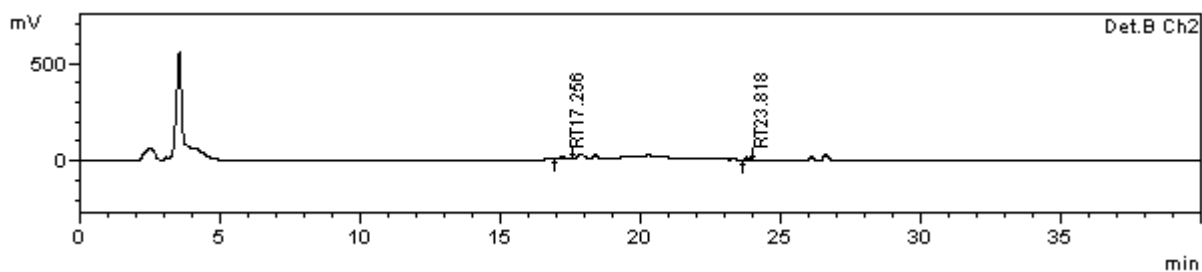
### 8.10. HPLC analiza fenolnih komponenti topole



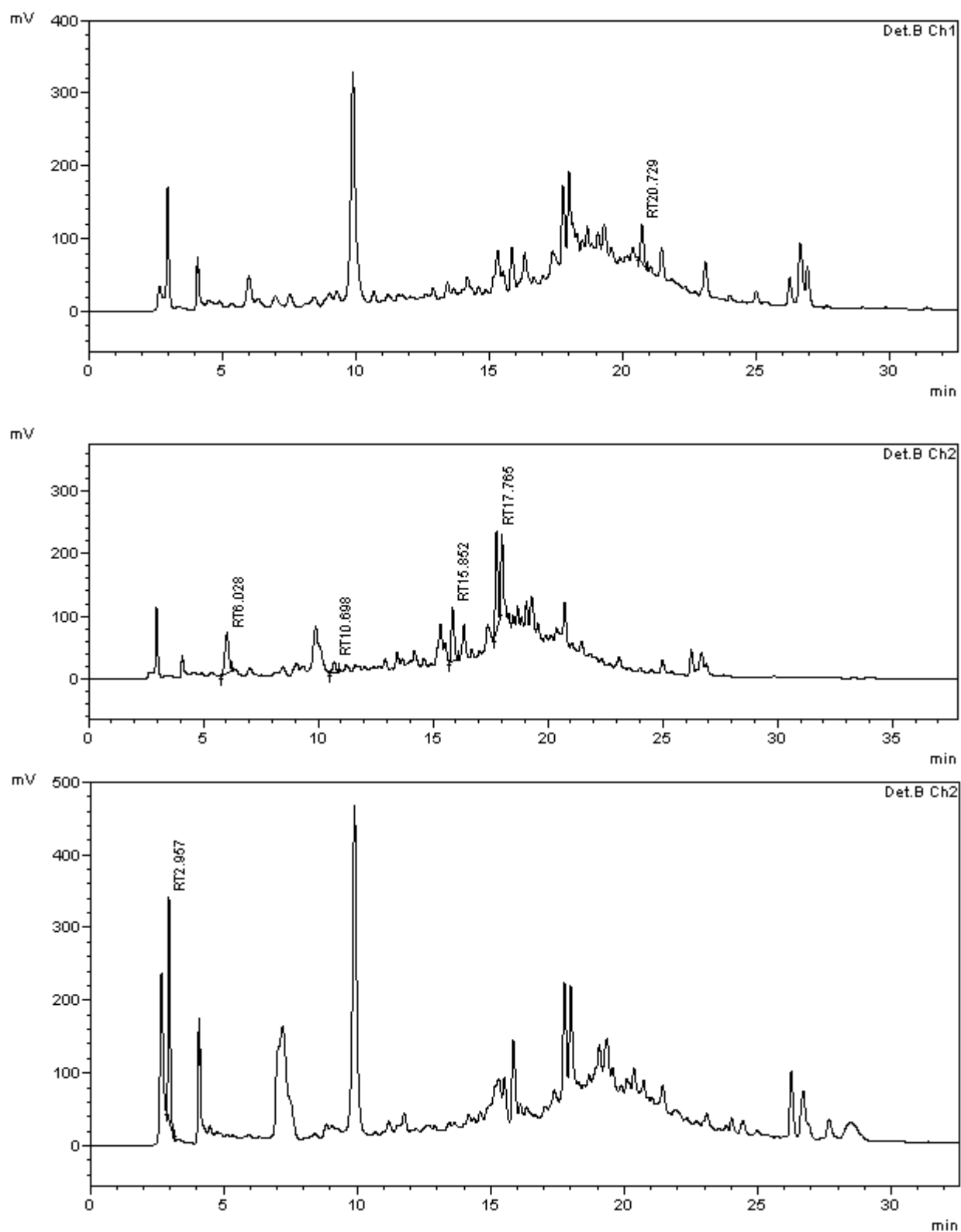
Slika 8.1. Hromatogrami uzorka lista PE19/66 (kontrola) na 300 nm (gore), 270 nm (sredina) i 360 nm (dole)



Slika 8.2. Hromatogrami uzorka lista PE19/66 (kontrola) na 280 nm (gore) i 320 nm (dole)

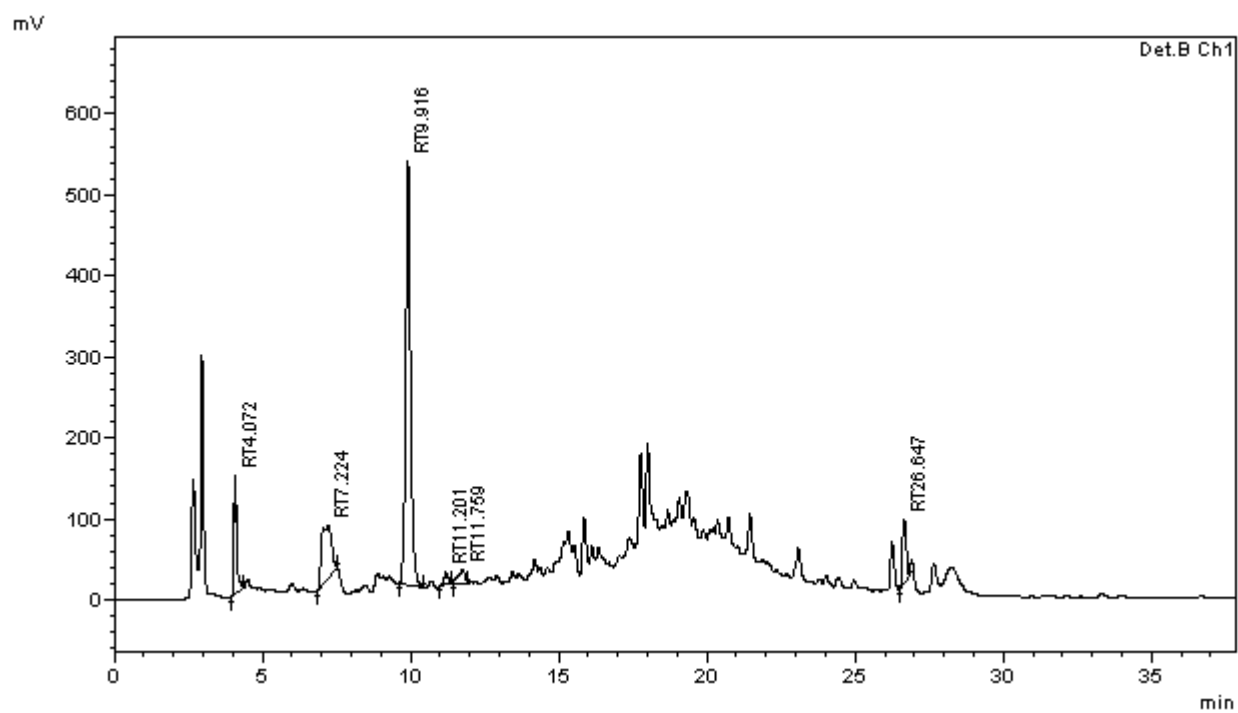


Slika 8.3. Hromatogram uzorka lista PE19/66 (100 mOsm) na 360 nm

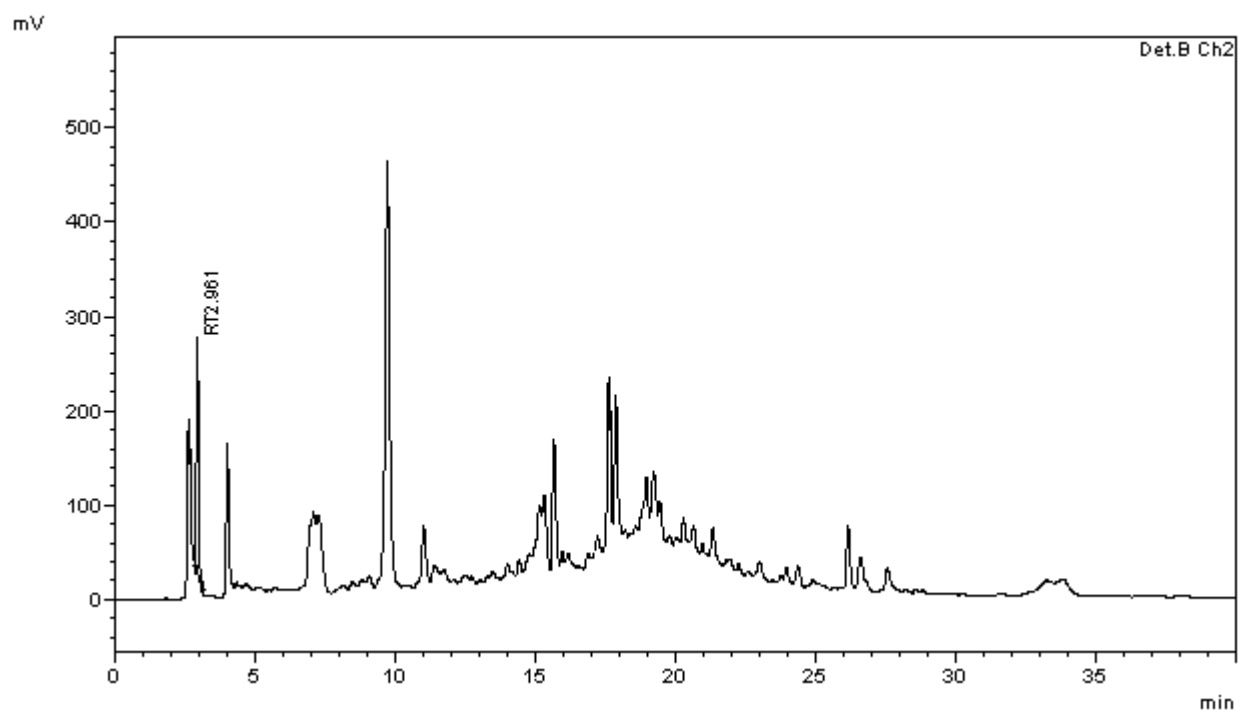


Slika 8.4. Hromatogrami uzorka lista PE19/66 (100 mOsm) na 300 nm (gore), 320 nm (sredina) i 270 nm (dole)

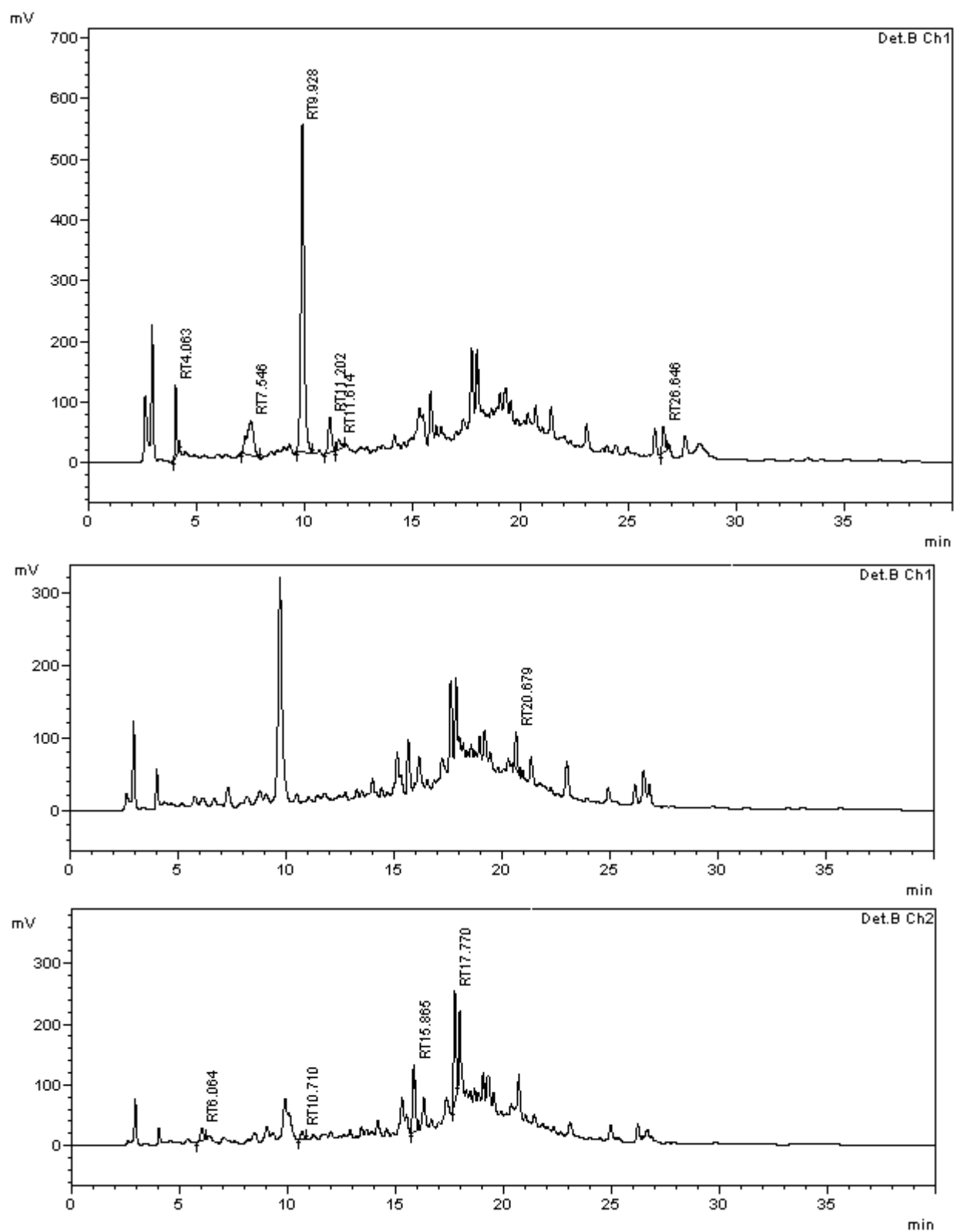




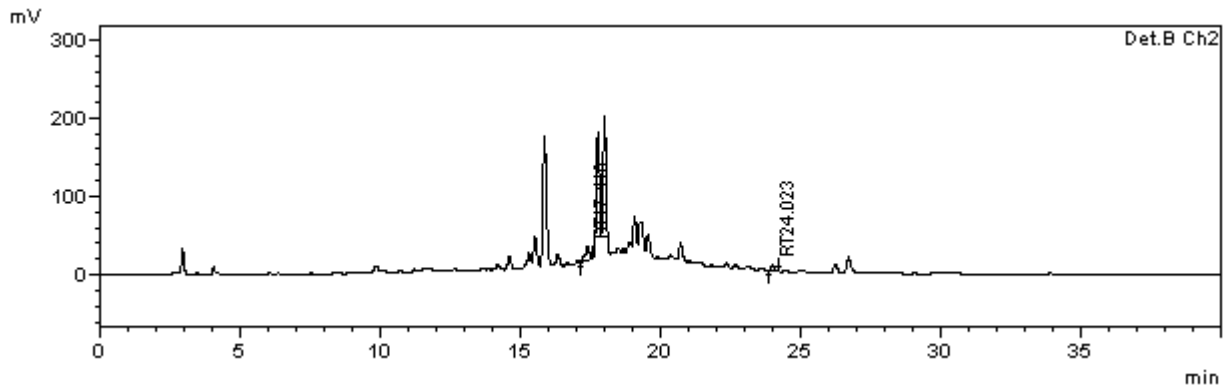
Slika 8.5. Hromatogram uzorka lista PE19/66 (100 mOsm) na 280 nm



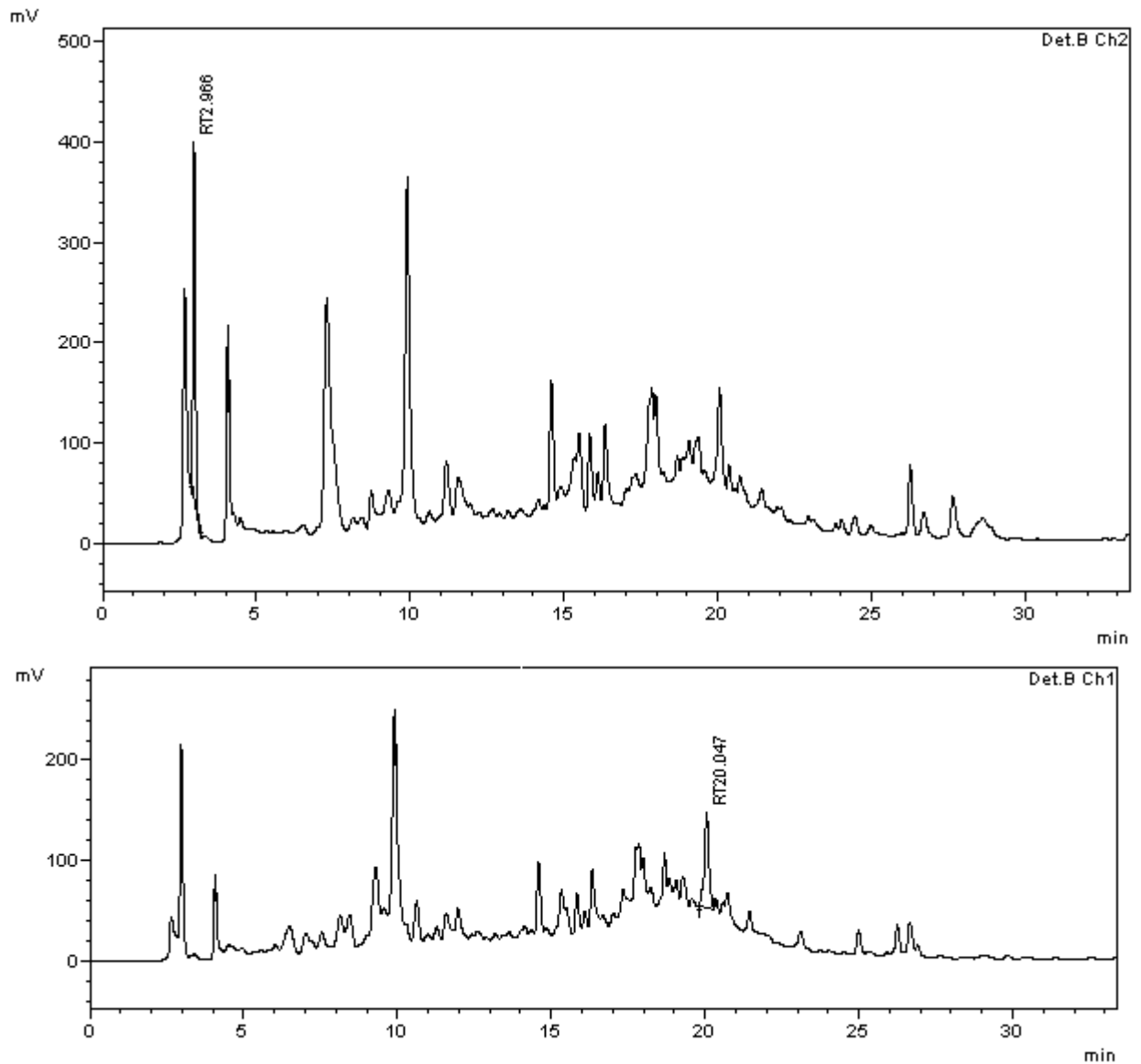
Slika 8.6. Hromatogram uzorka lista PE19/66 (200 mOsm) na 270 nm



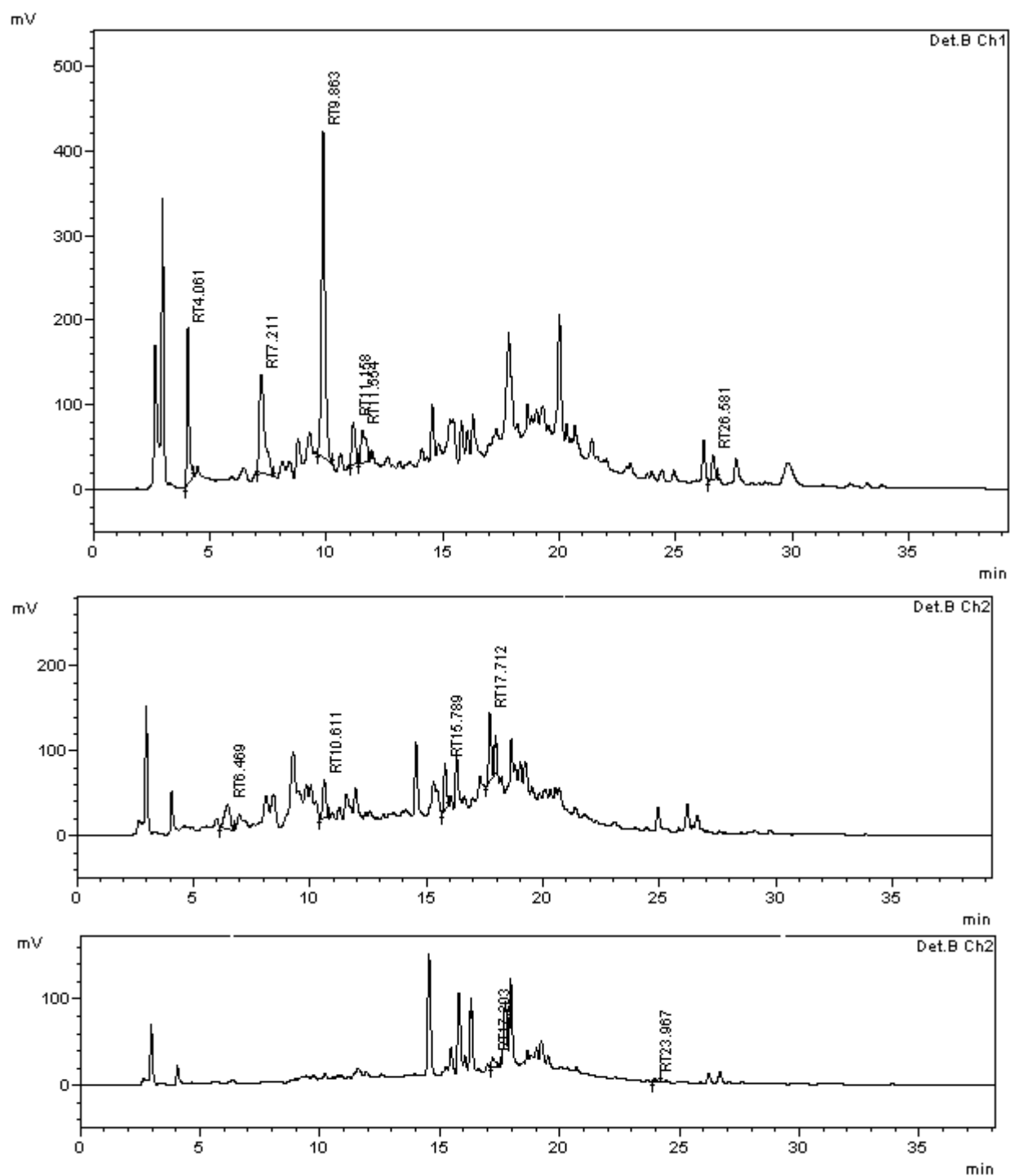
Slika 8.7. Hromatogrami uzorka lista PE19/66 (200 mOsm) na 280 nm (gore), na 300 nm (sredina) i 320 nm (dole)



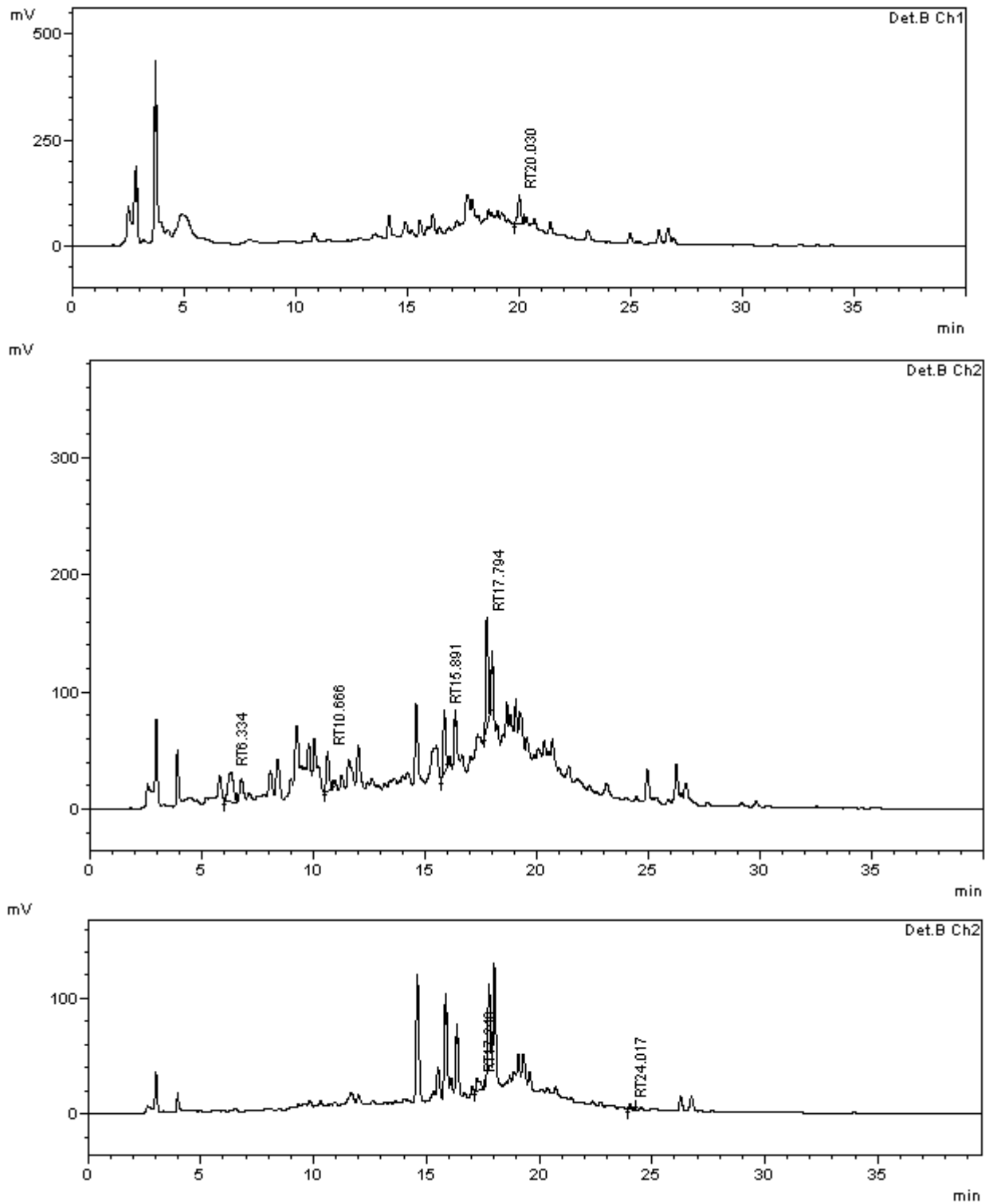
Slika 8.8. Hromatogram uzorka lista PE19/66 (200 mOsm) na 360 nm



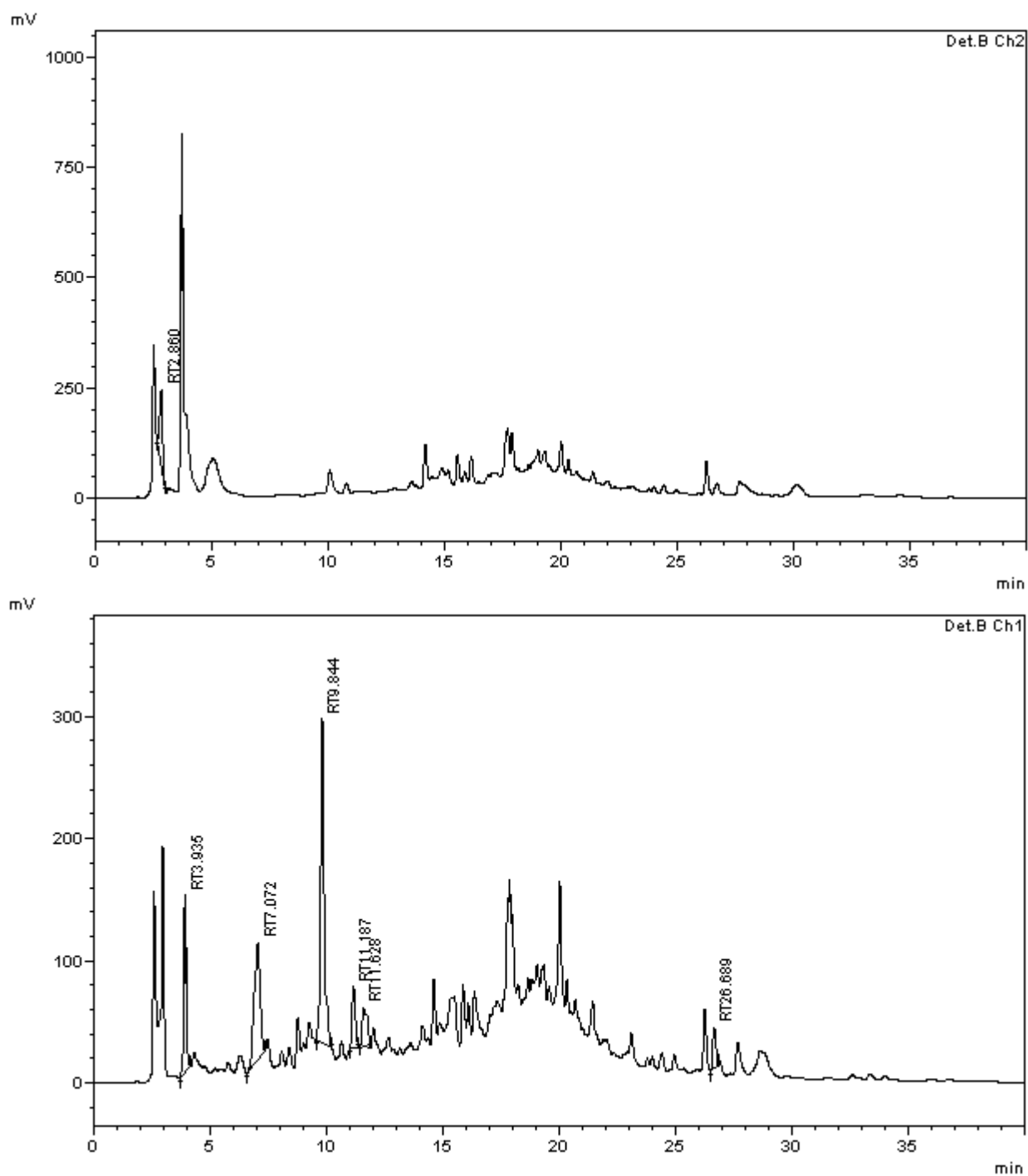
Slika 8.9. Hromatogrami uzorka lista M-1 (kontrola) na 270 nm (gore) i 300 (dole)



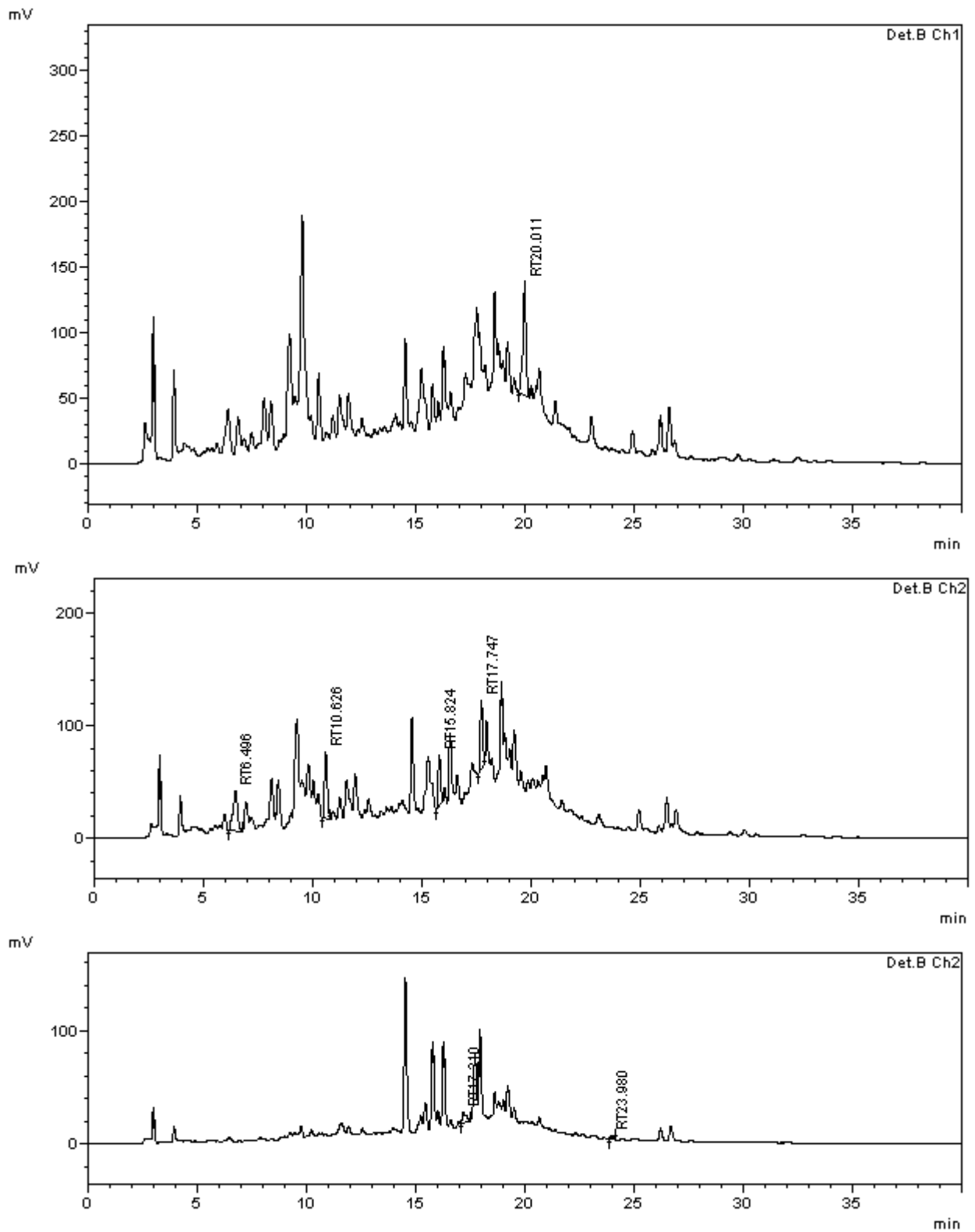
Slika 8.10. Hromatogram uzorka lista M-1 (kontrola) na 280 nm (gore), 320 nm (sredina) i 360 nm (dole)



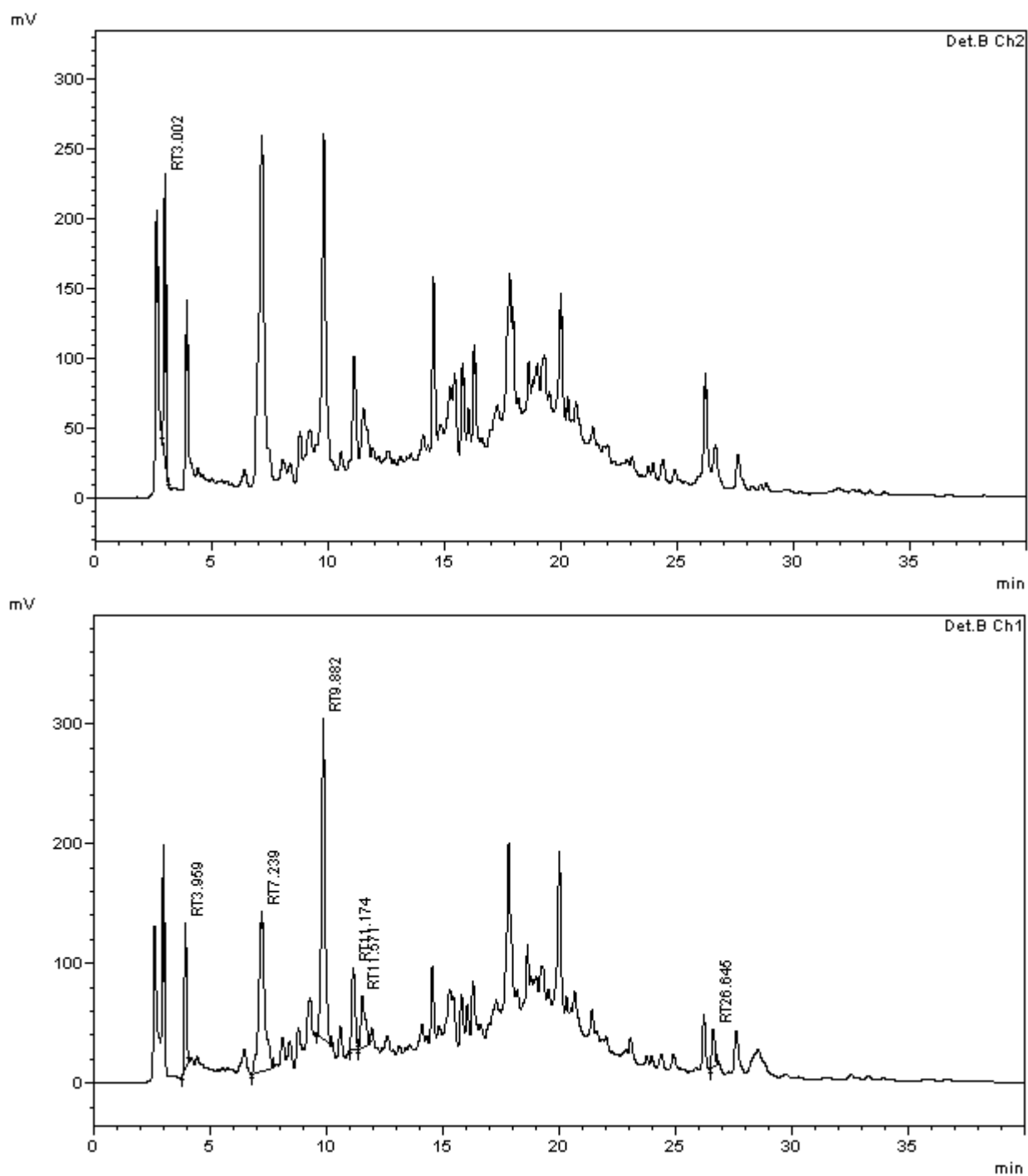
Slika 8.11. Hromatogrami uzorka lista M-1 (100 mOsm) na 300 nm (gore), 320 (sredina) i 360 nm (dole)



Slika 8.12. Hromatogrami uzorka lista M-1 (100 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 nm (dole)

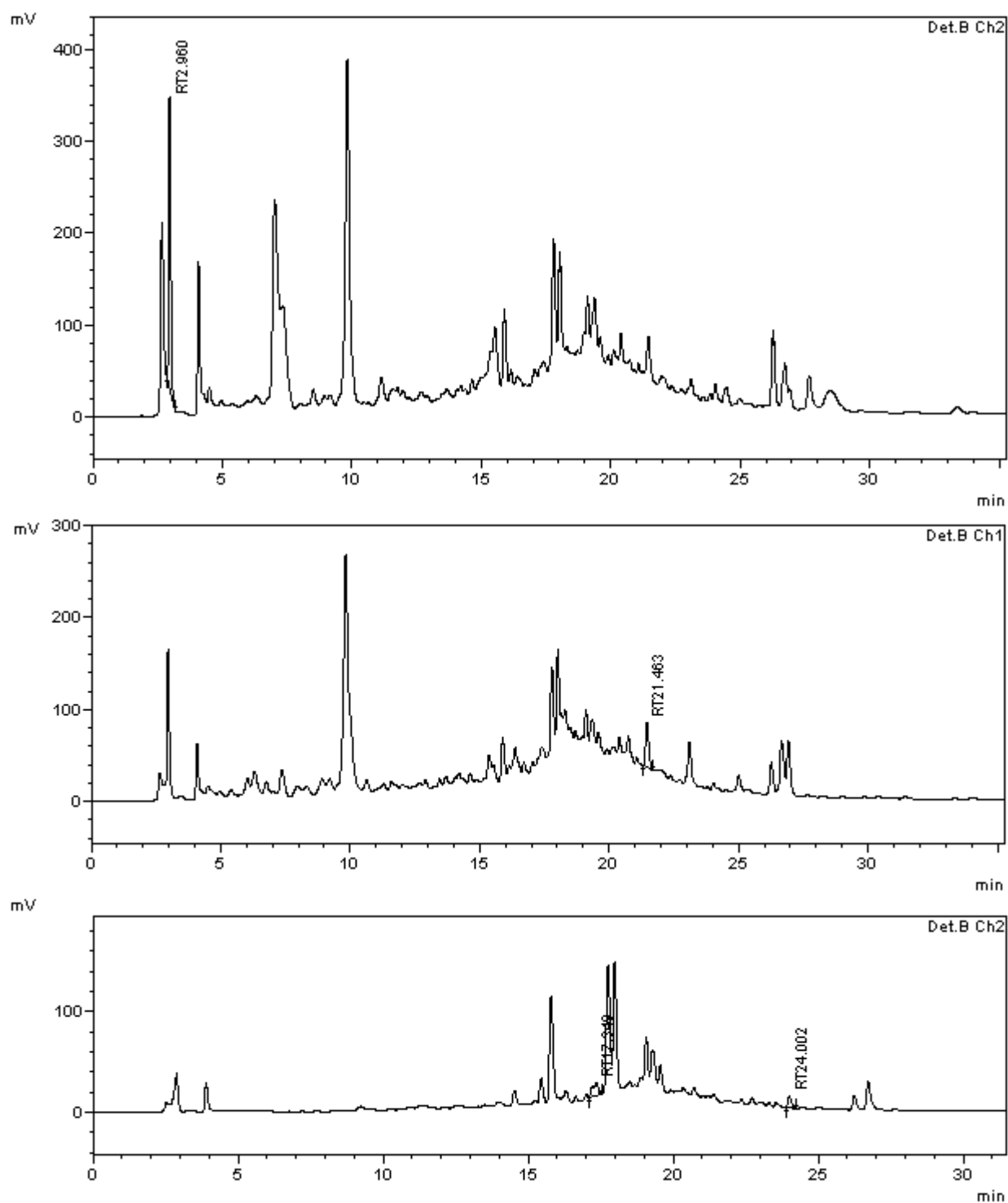


Slika 8.13. Hromatogrami uzorka lista M-1 (200 mOsm) na 300 nm (gore), 320 nm (sredina) i 360 nm (dole)

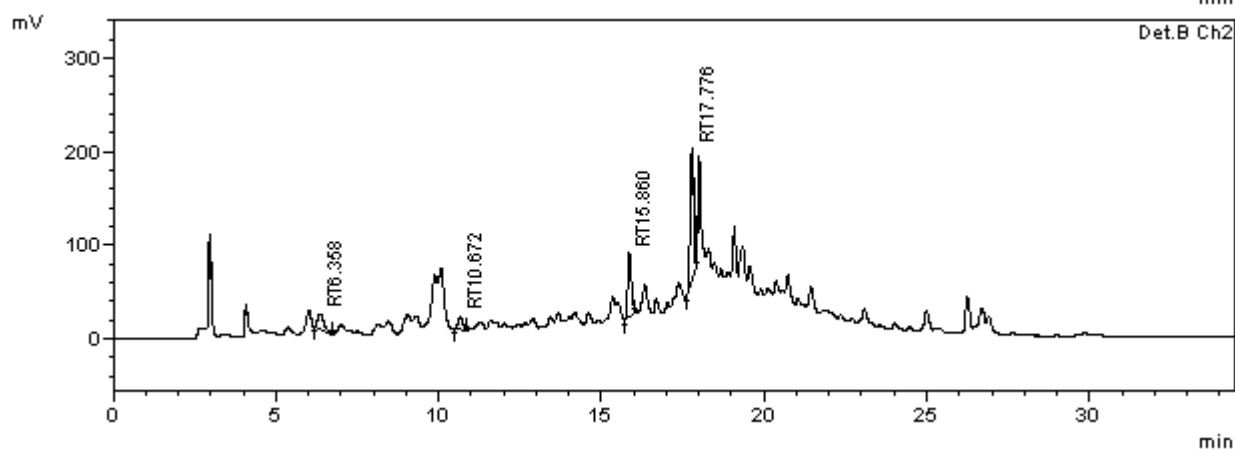
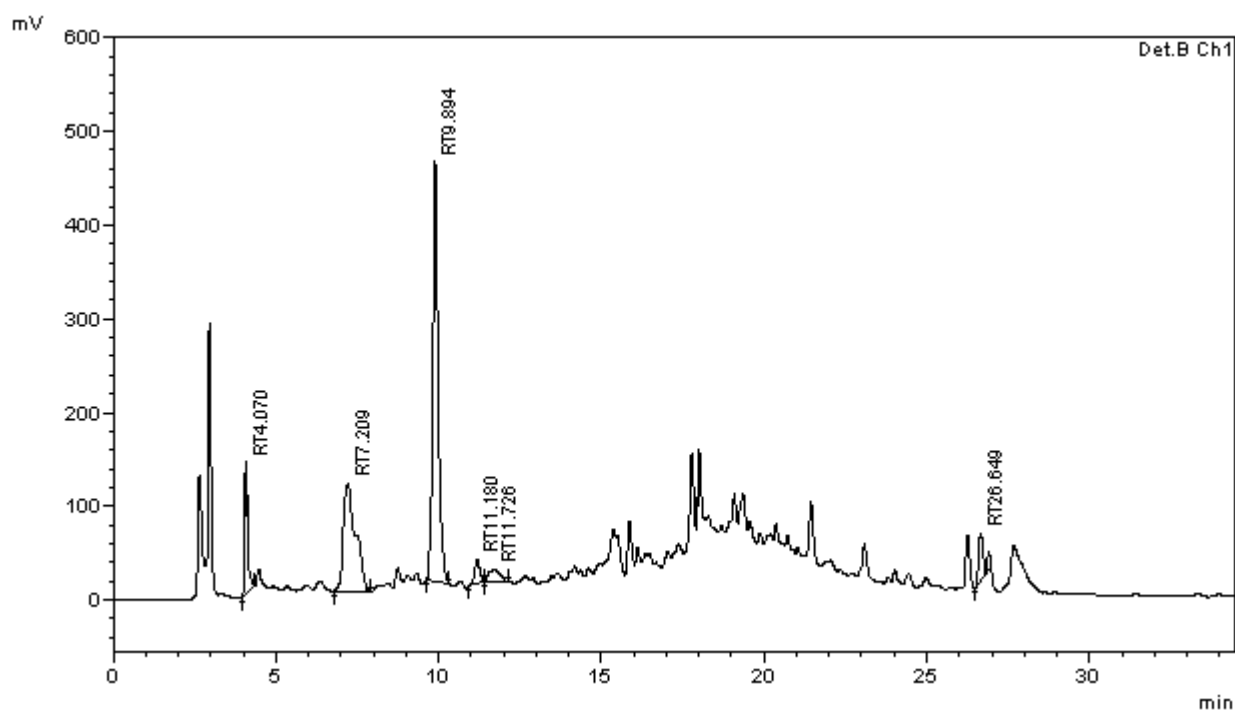


Slika 8.14. Hromatogrami uzorka lista M-1 (200 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 (dole)

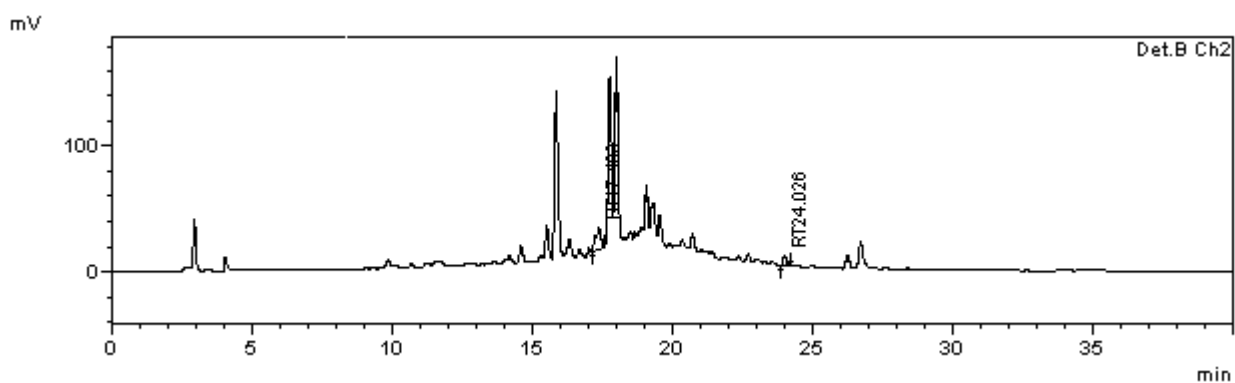




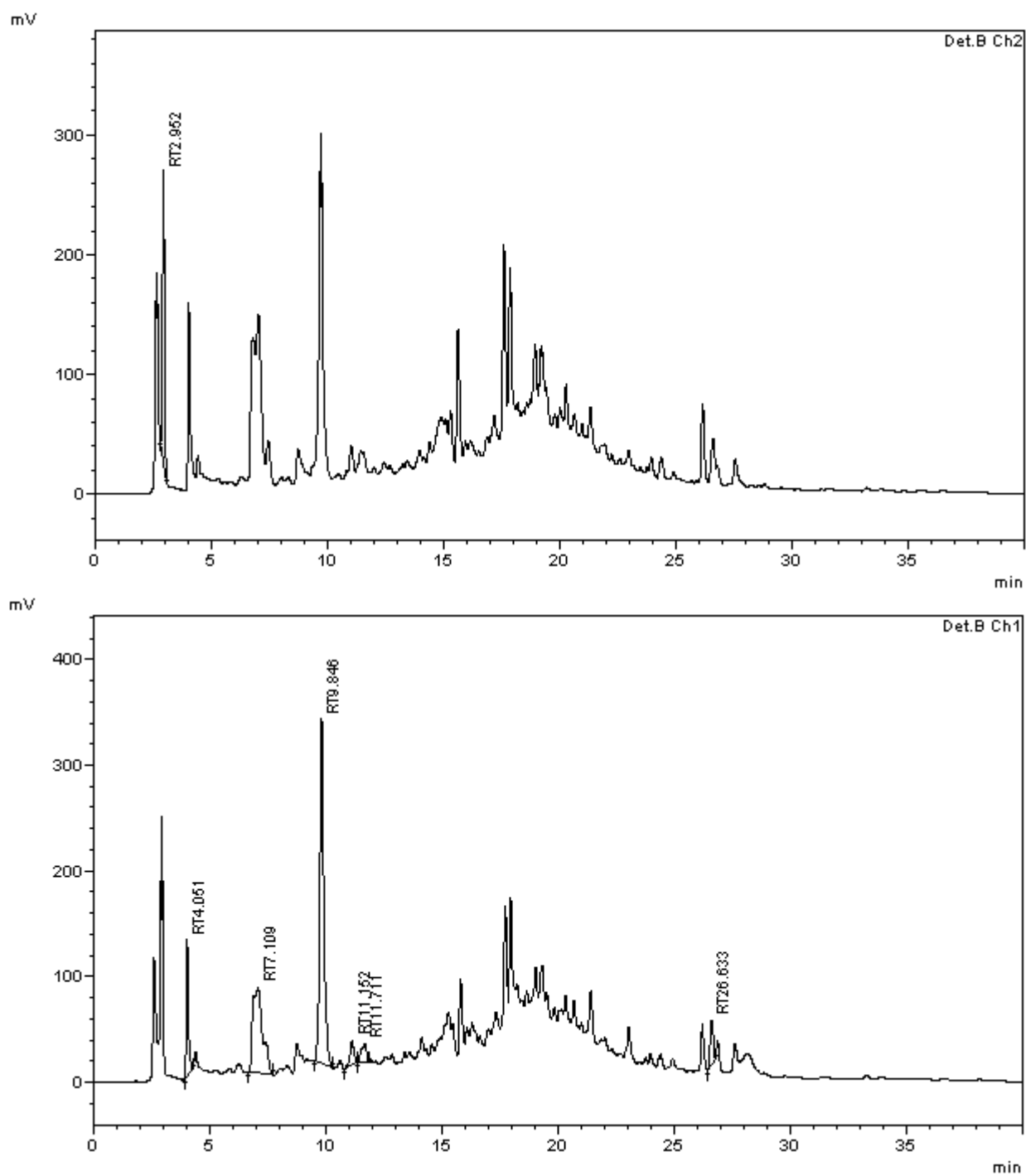
Slika 8.15. Hromatogram uzorka lista B-229 (kontrola) na 270 nm (gore), 300 (sredina) i 360 (dole)



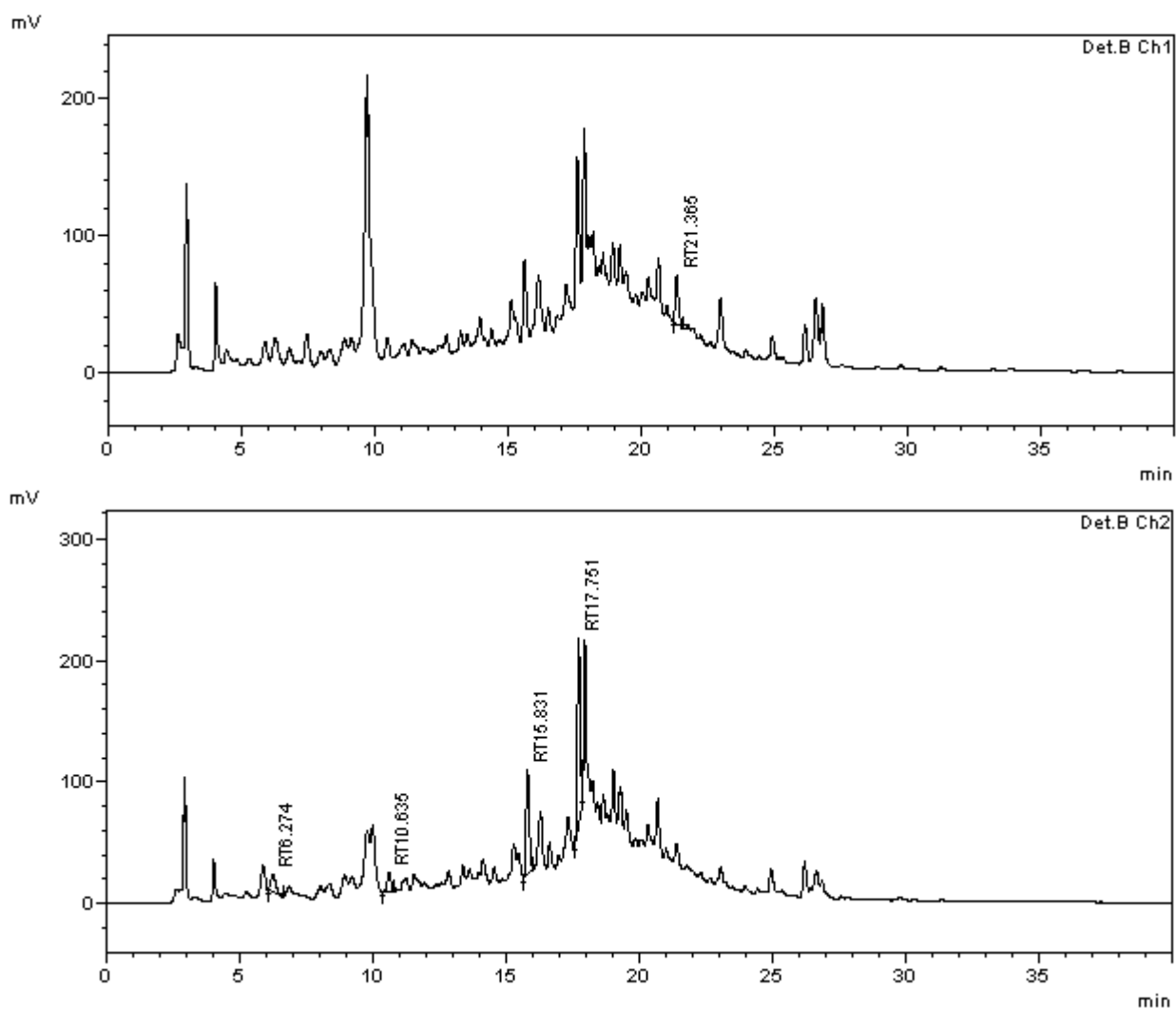
Slika 8.16. Hromatogrami uzorka lista B-229 (kontrola) na 280 nm (gore) i 320 (dole)



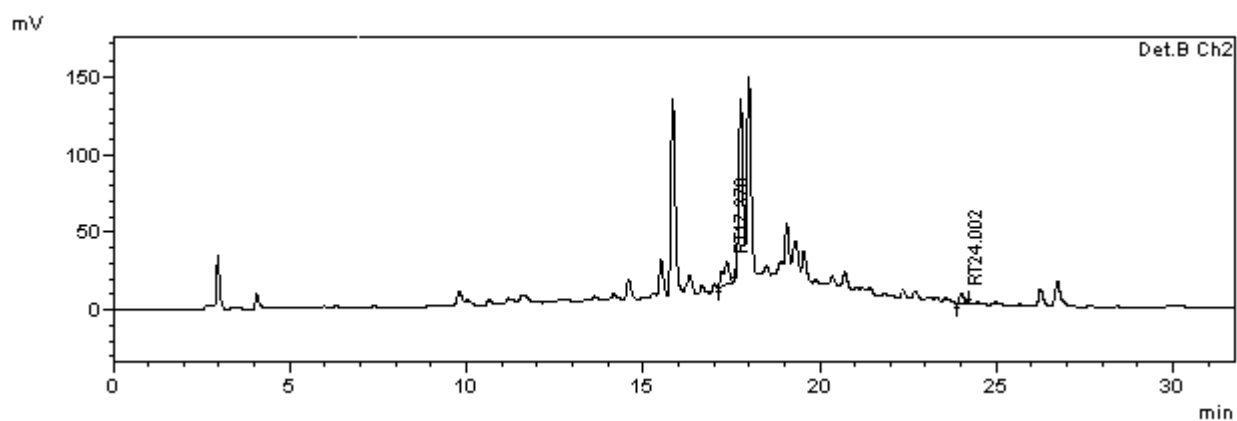
Slika 8.17. Hromatogram uzorka lista B-229 (100 mOsm) na 360 nm



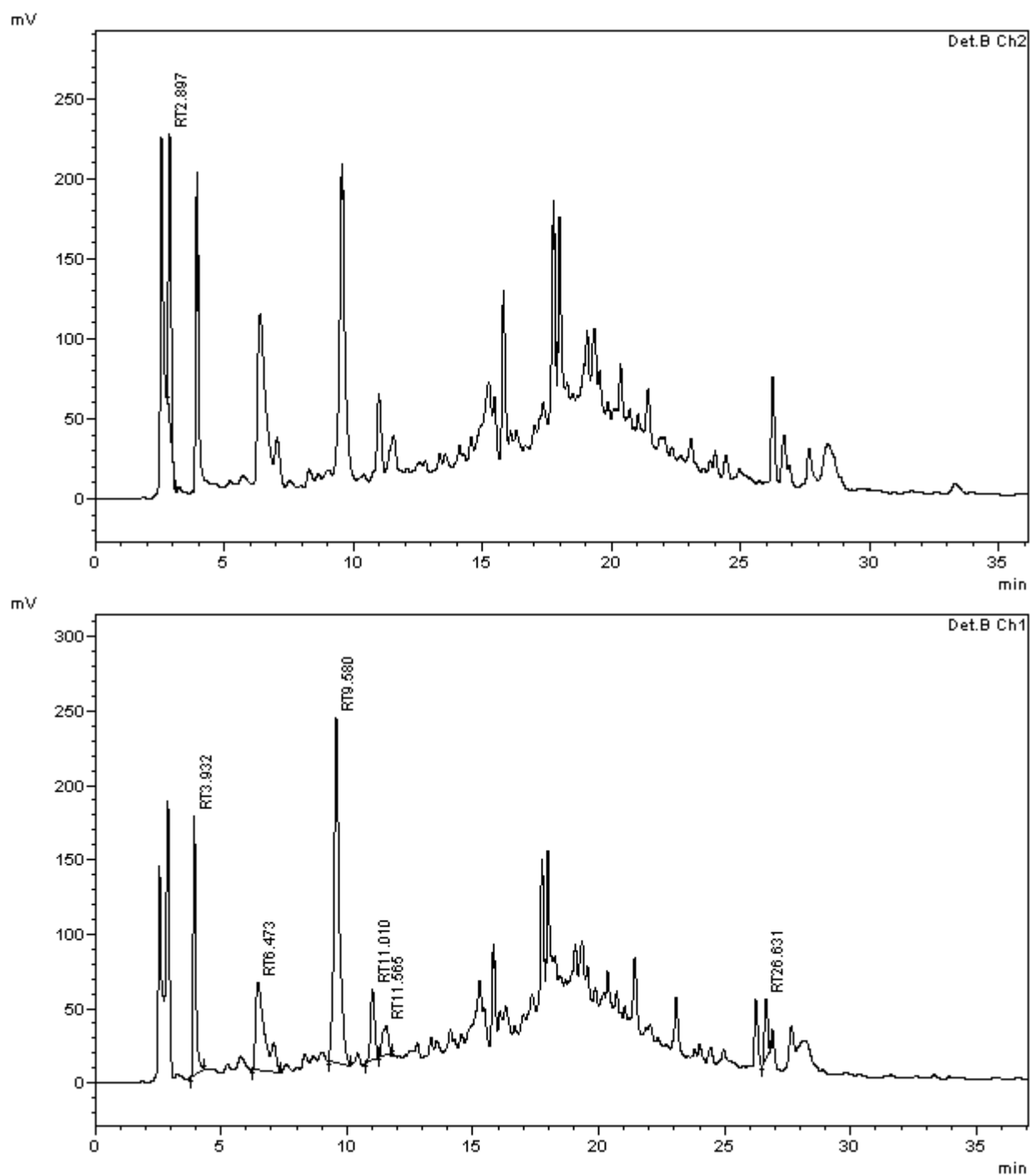
Slika 8.18. Hromatogrami uzorka lista B-229 (100 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 (dole)



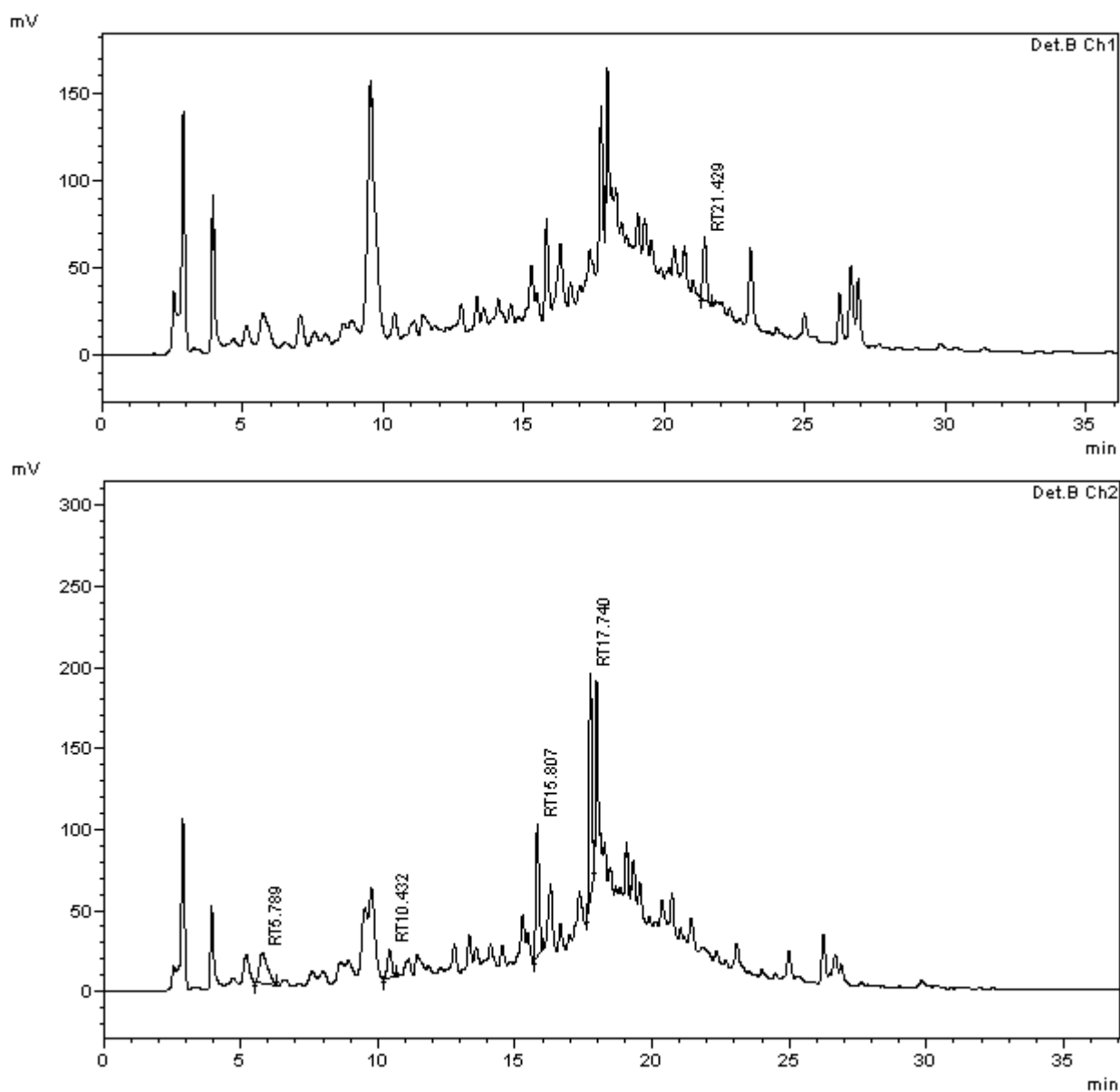
Slika 8.19. Hromatogrami uzorka lista B-229 (100 mOsm) na 300 nm (gore) i 320 nm (dole)



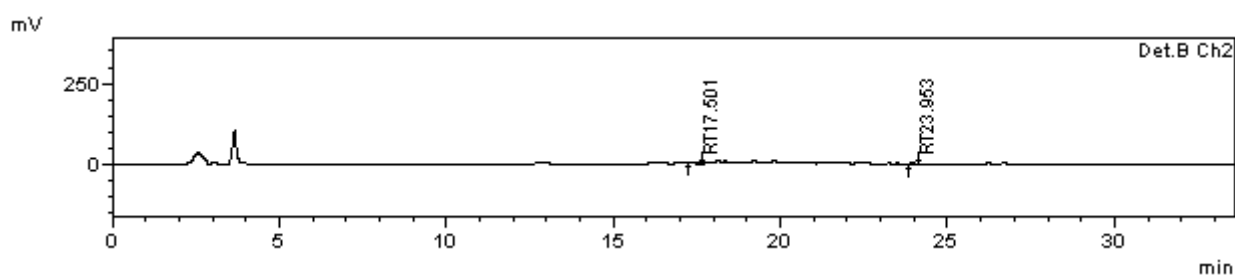
Slika 8.20. Hromatogram uzorka lista B-229 (200 mOsm) na 360 nm



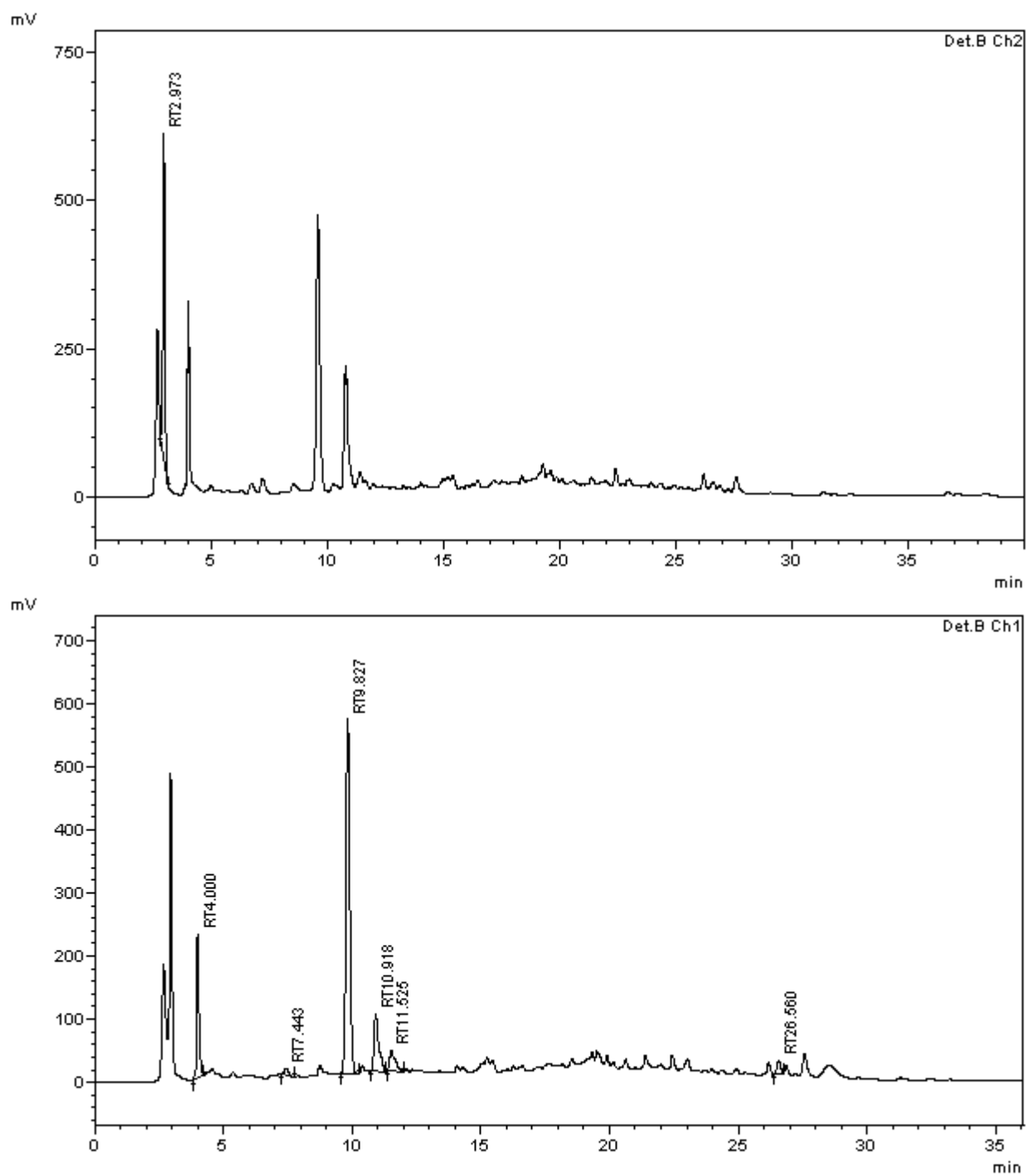
Slika 8.21. Hromatogram uzorka lista B-229 (200 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 nm (dole)



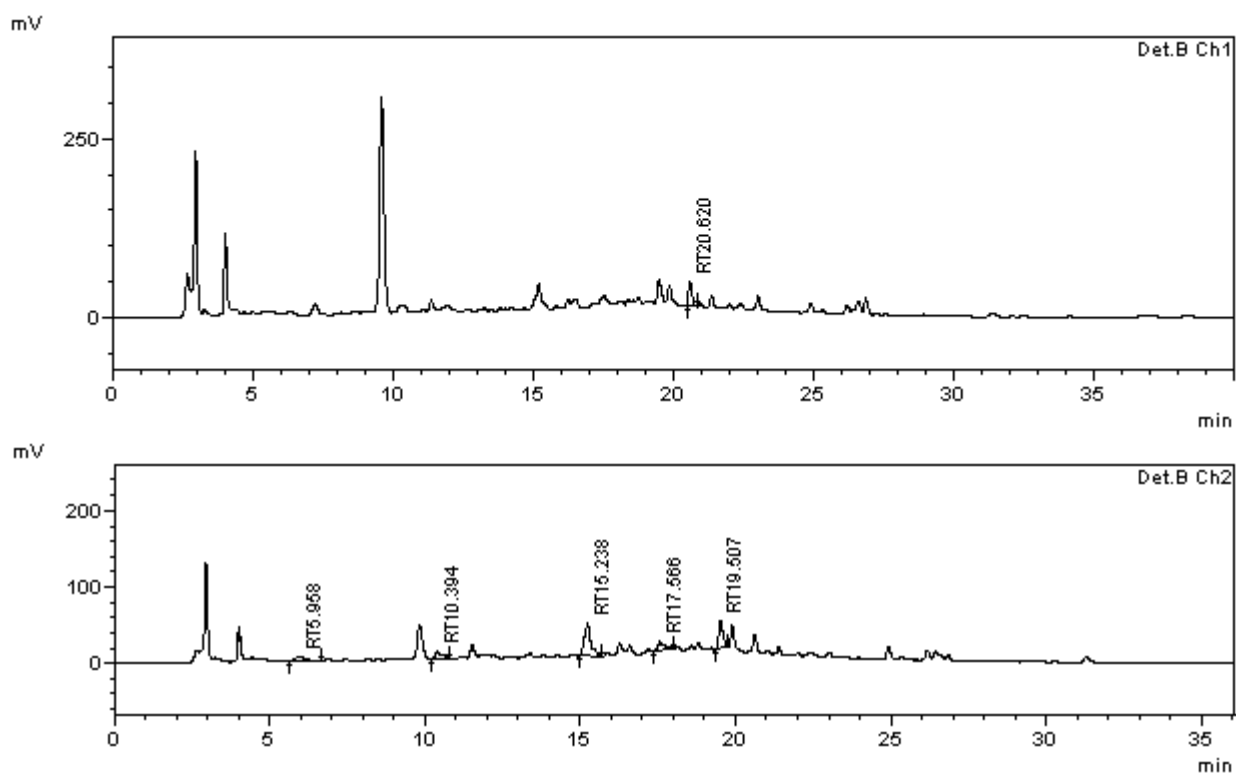
Slika 8.22. Hromatogrami uzorka lista B-229 (200 mOsm) na 300 nm (gore), 320 nm (dole)



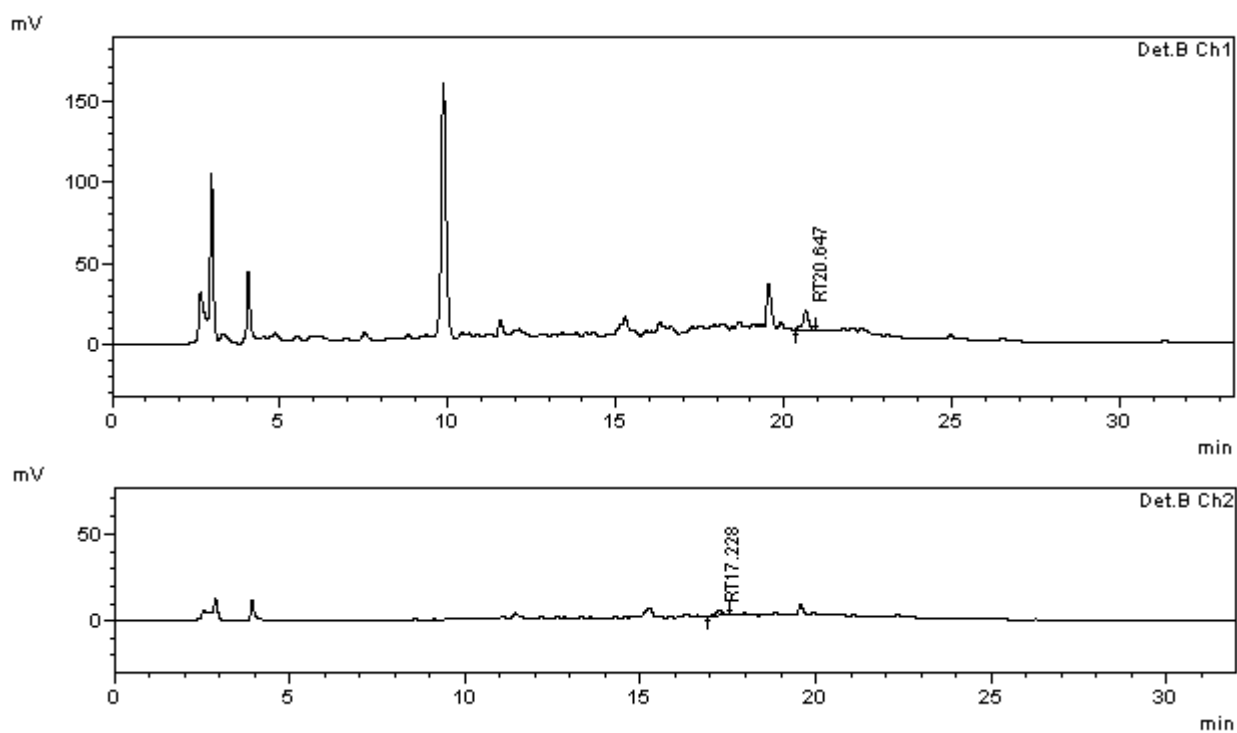
Slika 8.23. Hromatogram uzorka korena PE19/66 (kontrola) na 360 nm



Slika 8.24. Hromatogrami uzorka korena PE19/66 (kontrola) na 270 nm (gore) i 280 (dole)

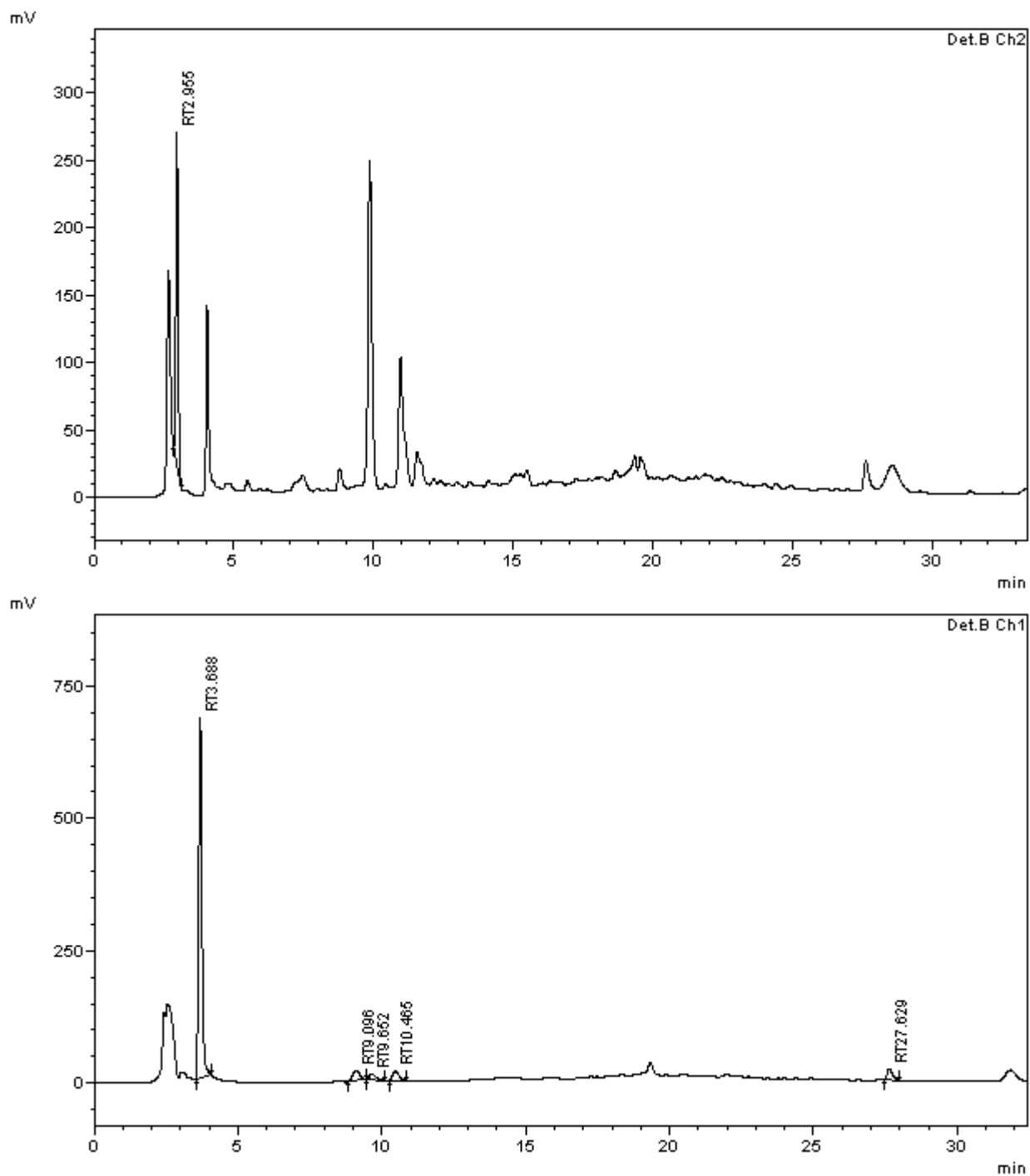


Slika 8.25. Hromatogrami uzorka korena PE19/66 (kontrola) na 300 nm (gore), 320 nm (dole)

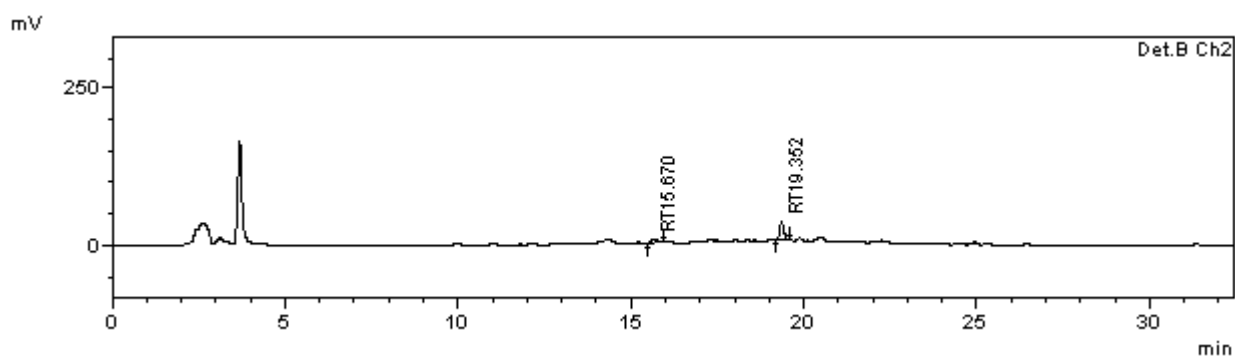


Slika 8.26. Hromatogrami uzorka korena PE19/66 (100 mOsm) na 300 nm i 360 nm

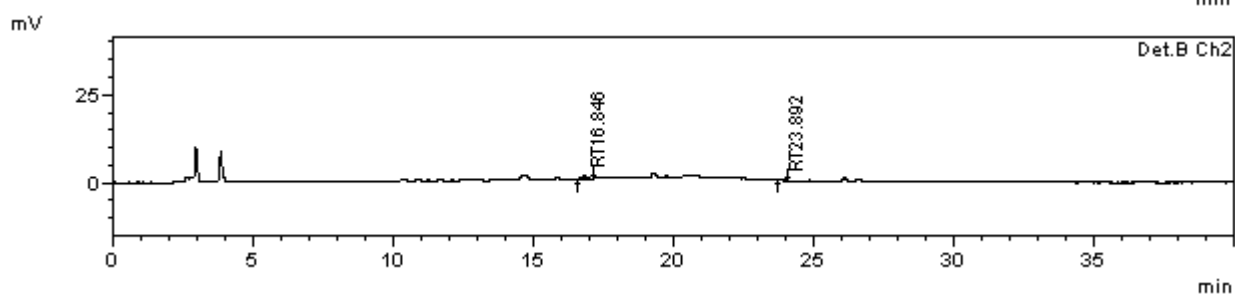
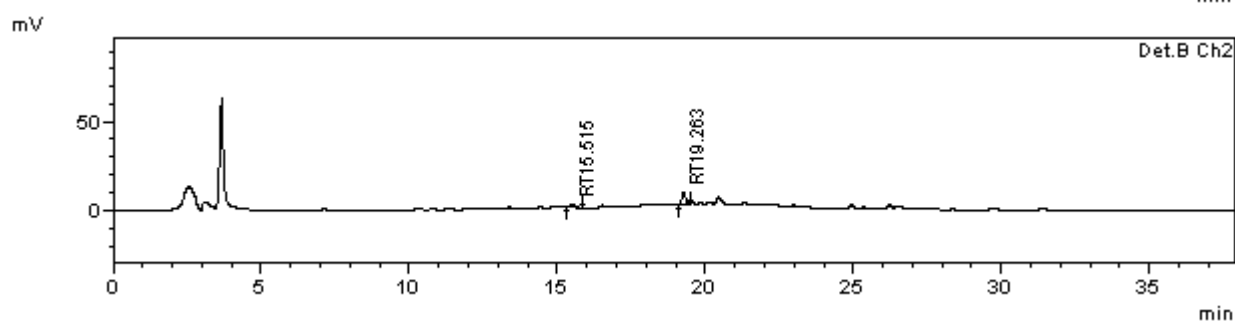
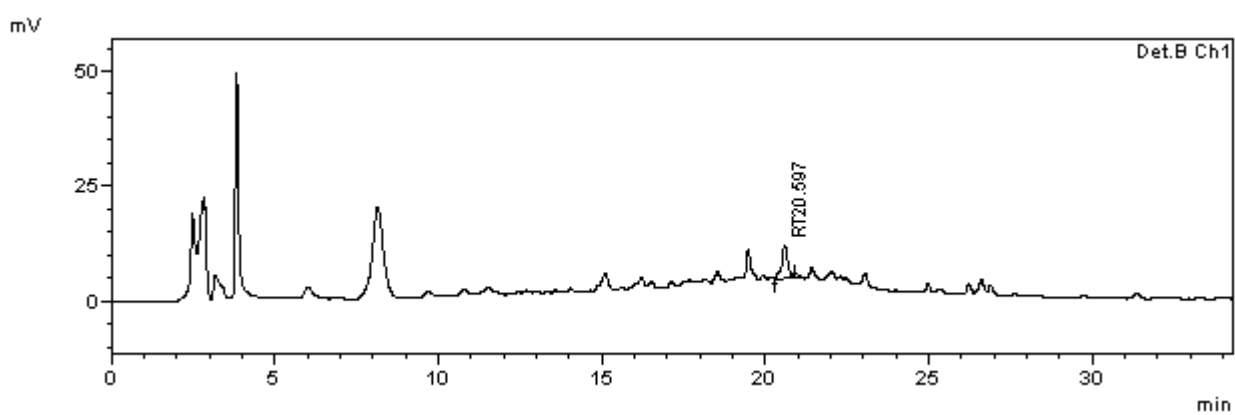




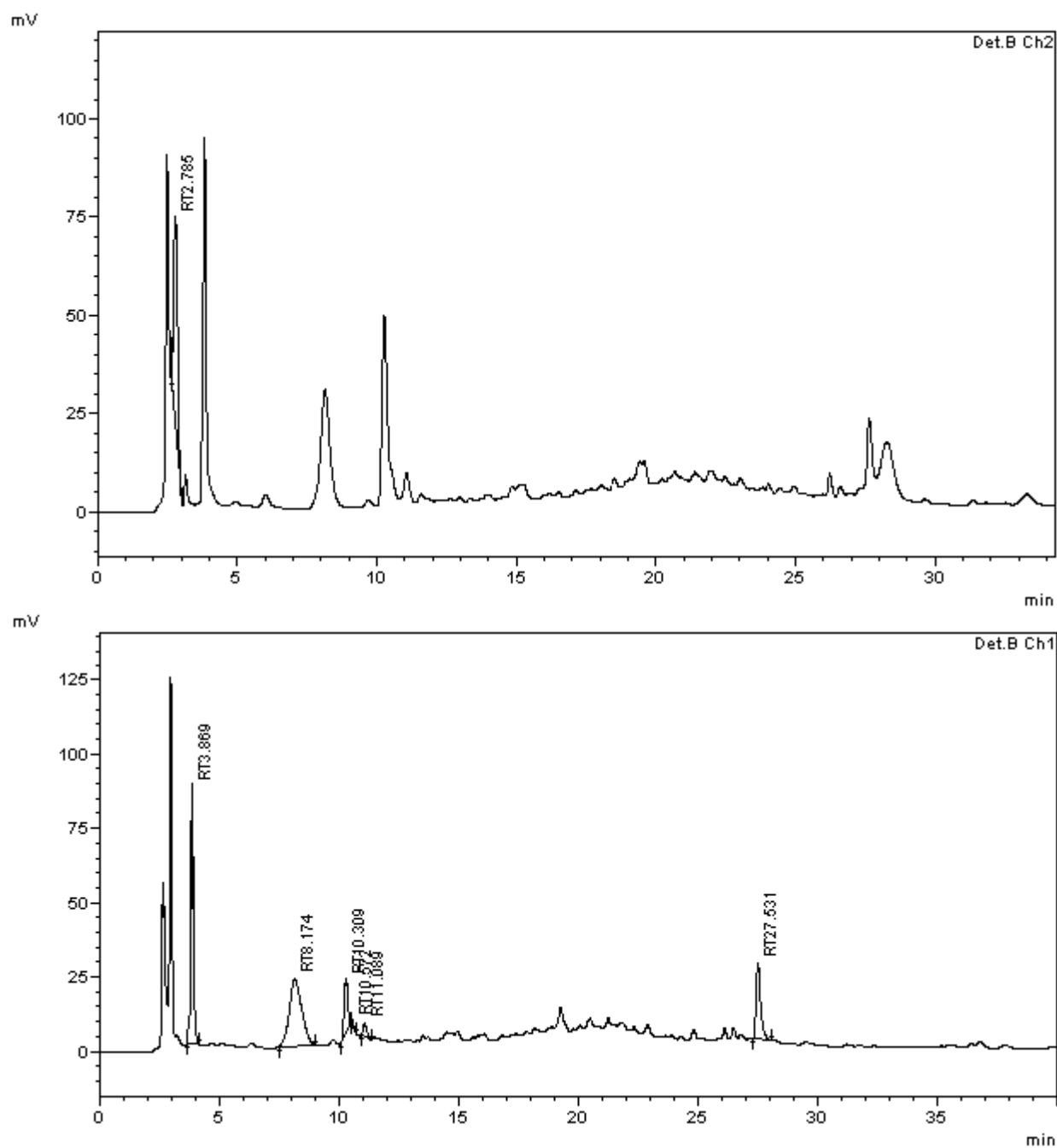
Slika 8.27. Hromatogrami uzorka korena PE19/66 (100 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 nm (dole)



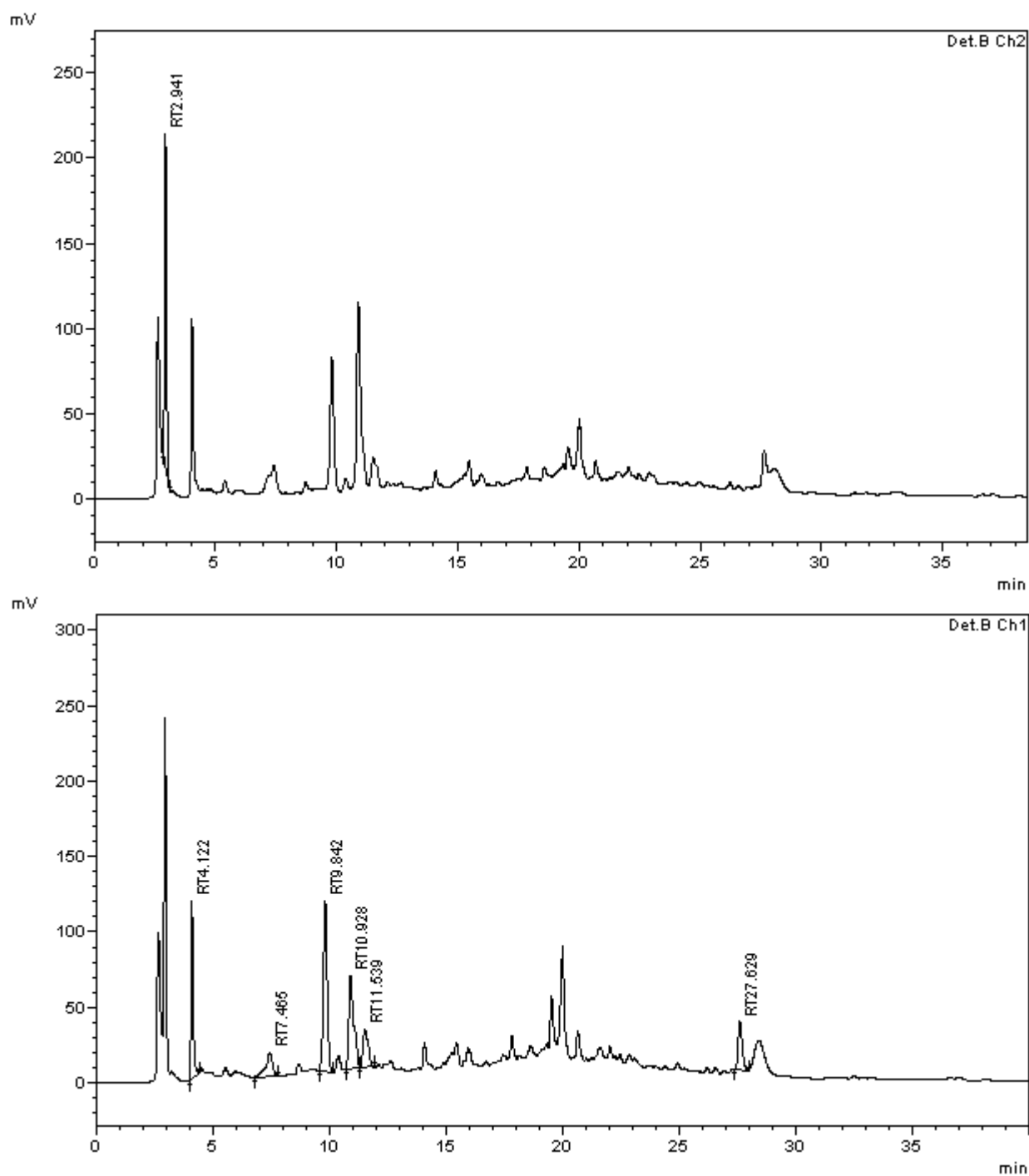
Slika 8.28. Hromatogram uzorka korena PE19/66 (100 mOsm) na 320 nm



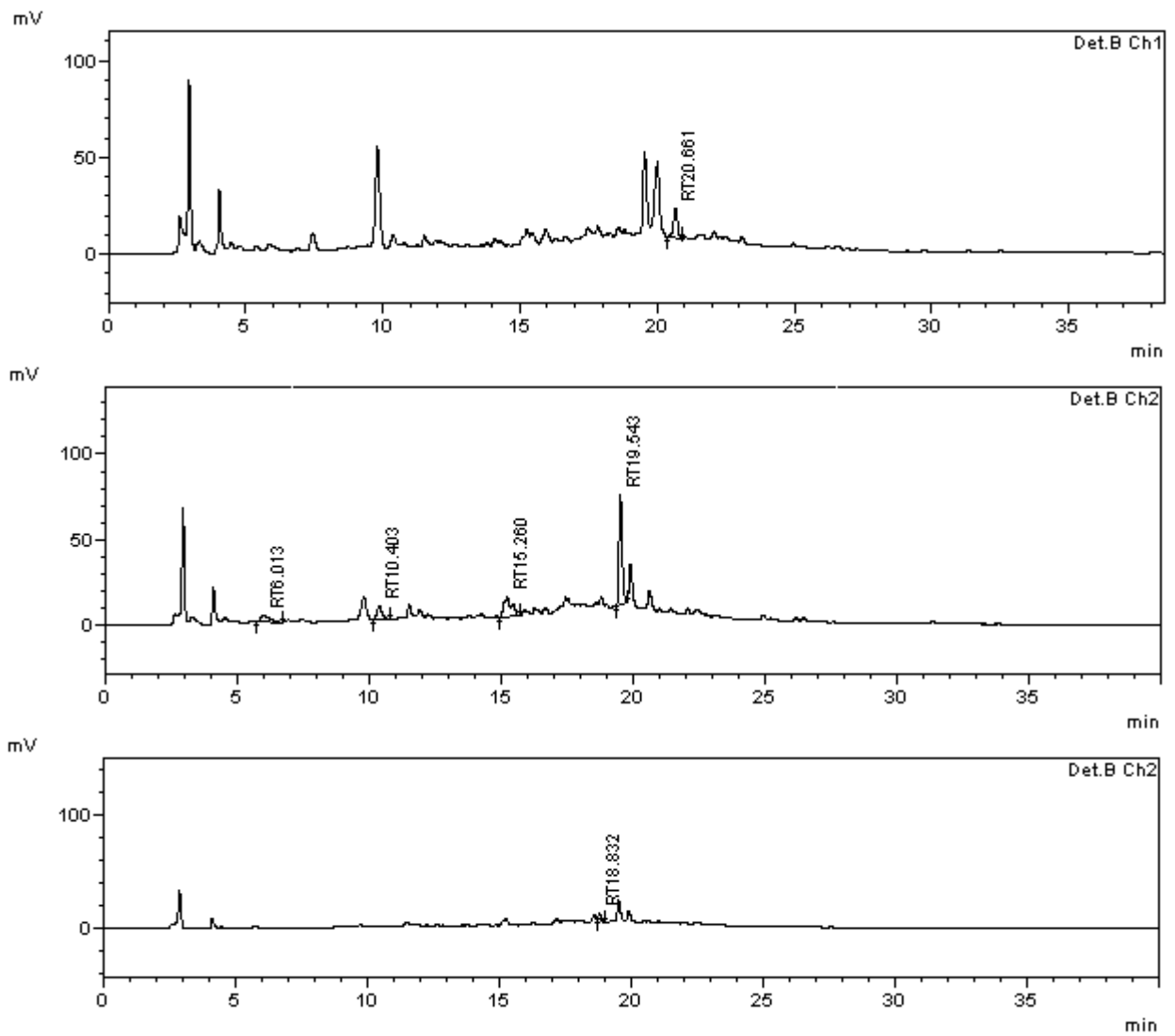
Slika 8.29. Hromatogrami uzorka korena PE19/66 (200 mOsm) na 300 nm (gore), 320 nm 360 (dole)



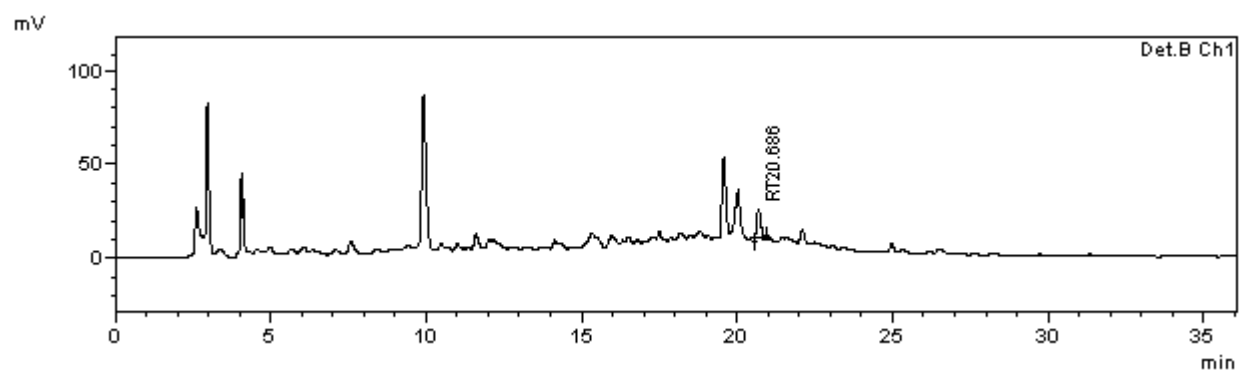
Slika 8.30. Hromatogrami uzorka korena PE19/66 (200 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 (dole)



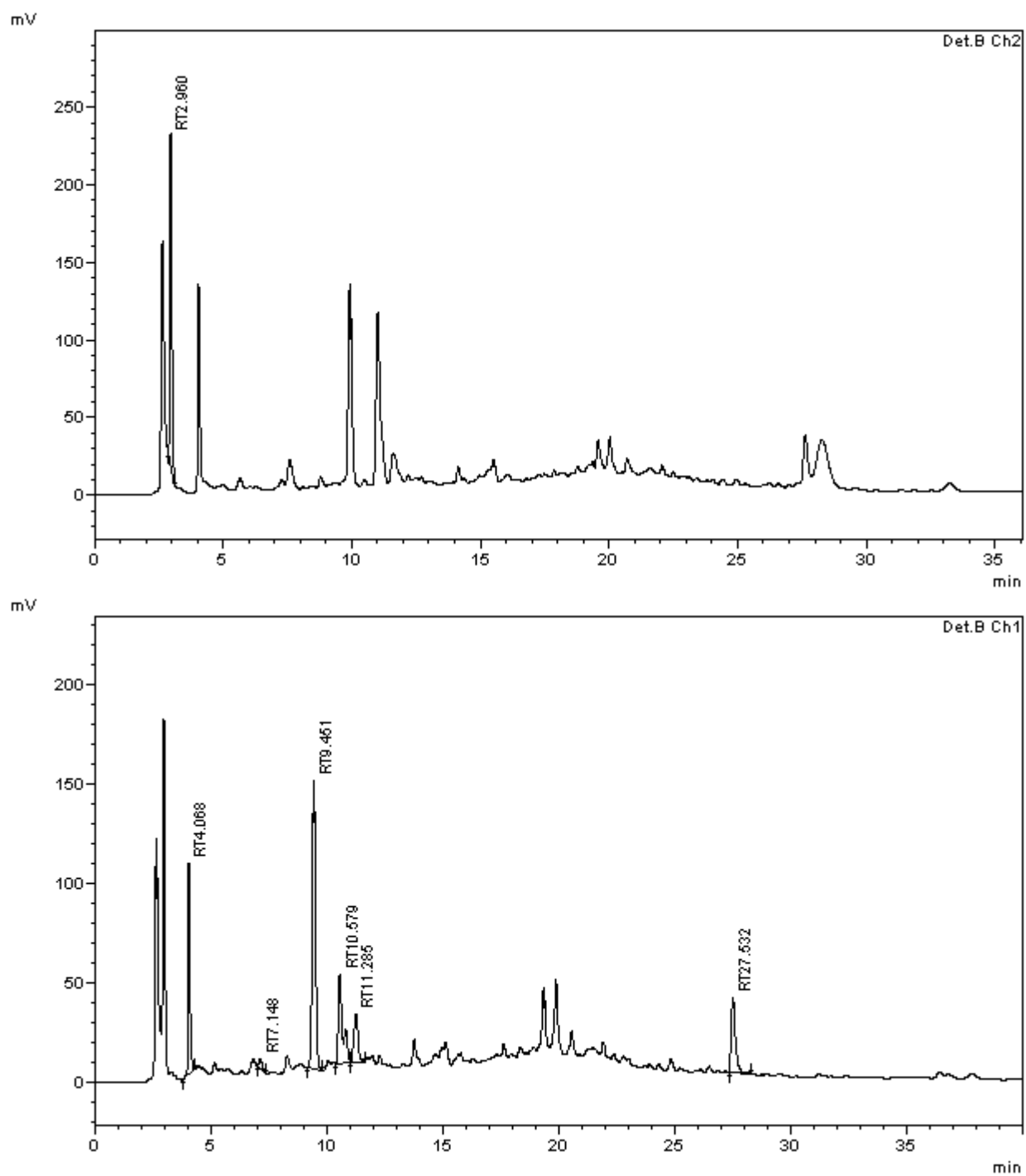
Slika 8.31. Hromatogrami uzorka korena M-1 (kontrola) na 270 nm (gore) i 280 nm (dole)



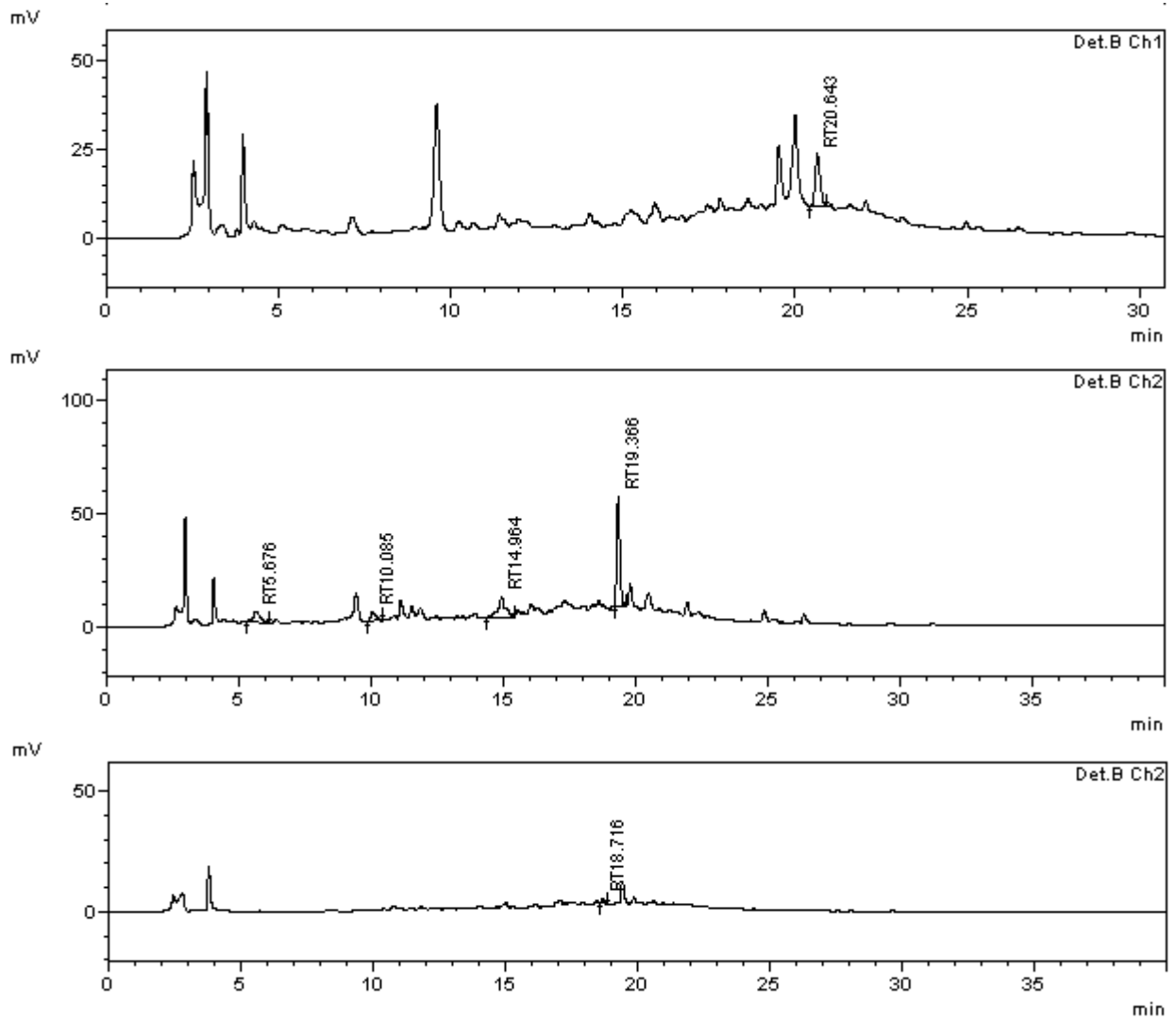
Slika 8.32. Hromatogrami uzorka korena M-1 (kontrola) na 300 nm (gore) i 320 nm i 360 (dole)



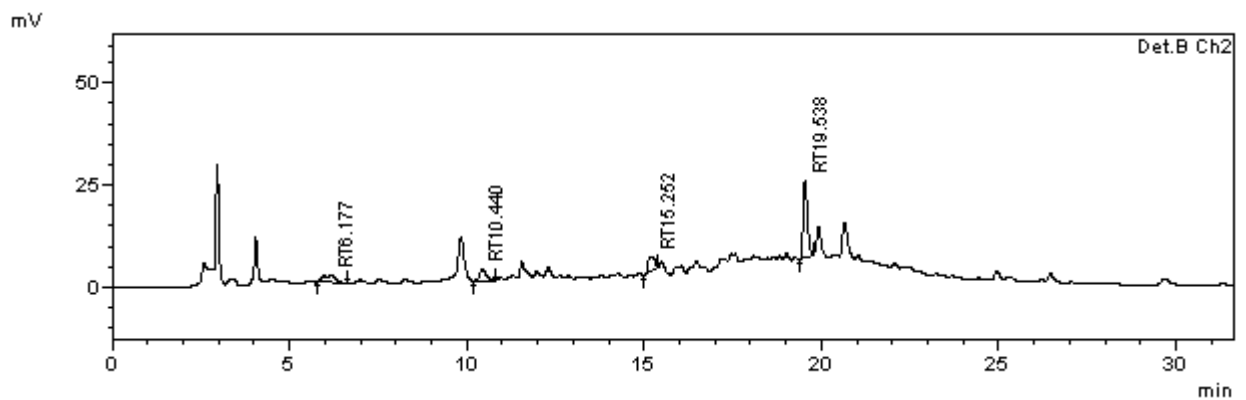
Slika 8.33. Hromatogram uzorka korena M-1 (100 mOsm) na 300 nm



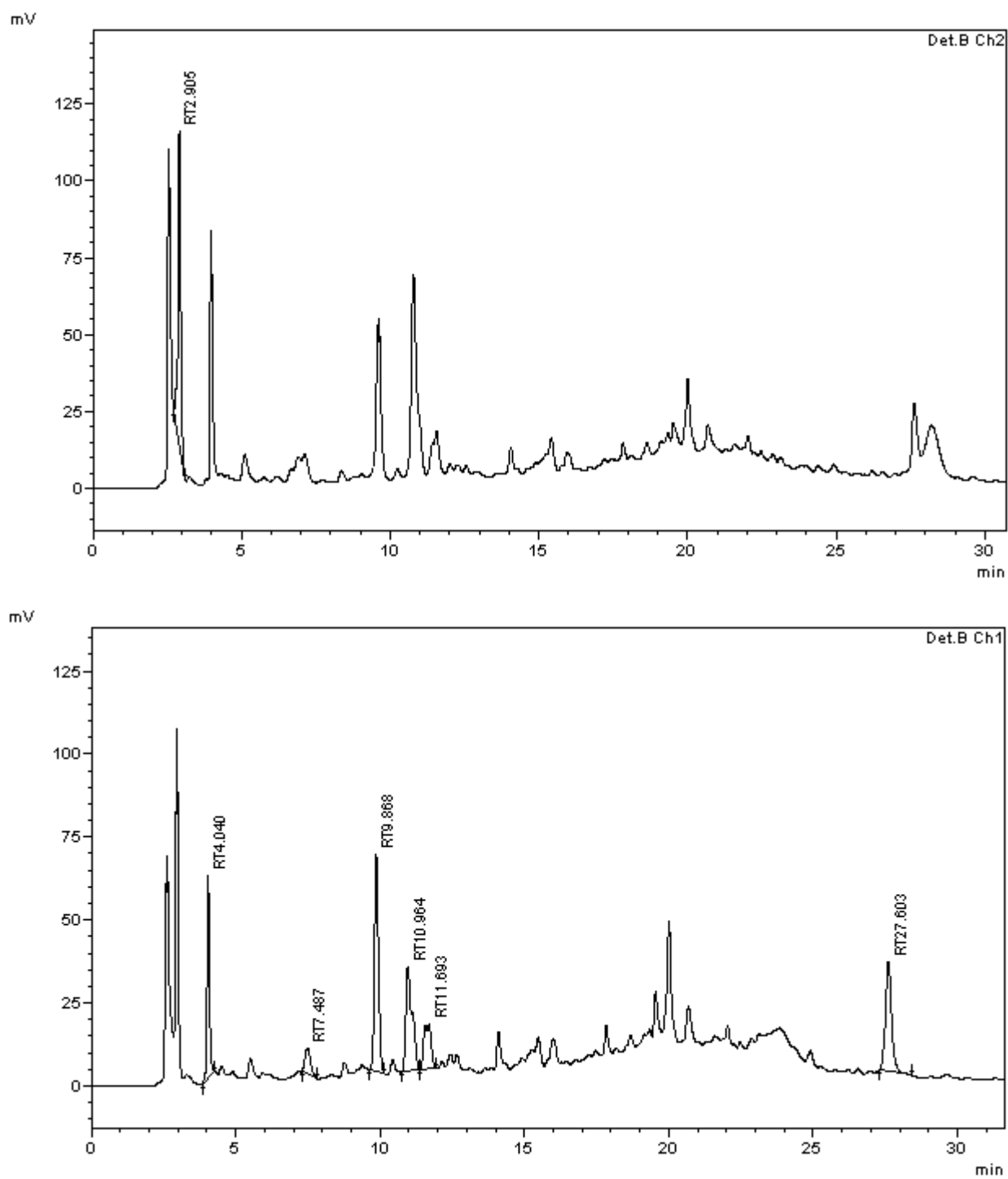
Slika 8.34. Hromatogrami uzorka korena M-1 (100 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 (dole)



Slika 8.35. Hromatogrami uzorka korena M-1 (100 mOsm) na 300 nm (gore), 320 nm i 360 (dole)

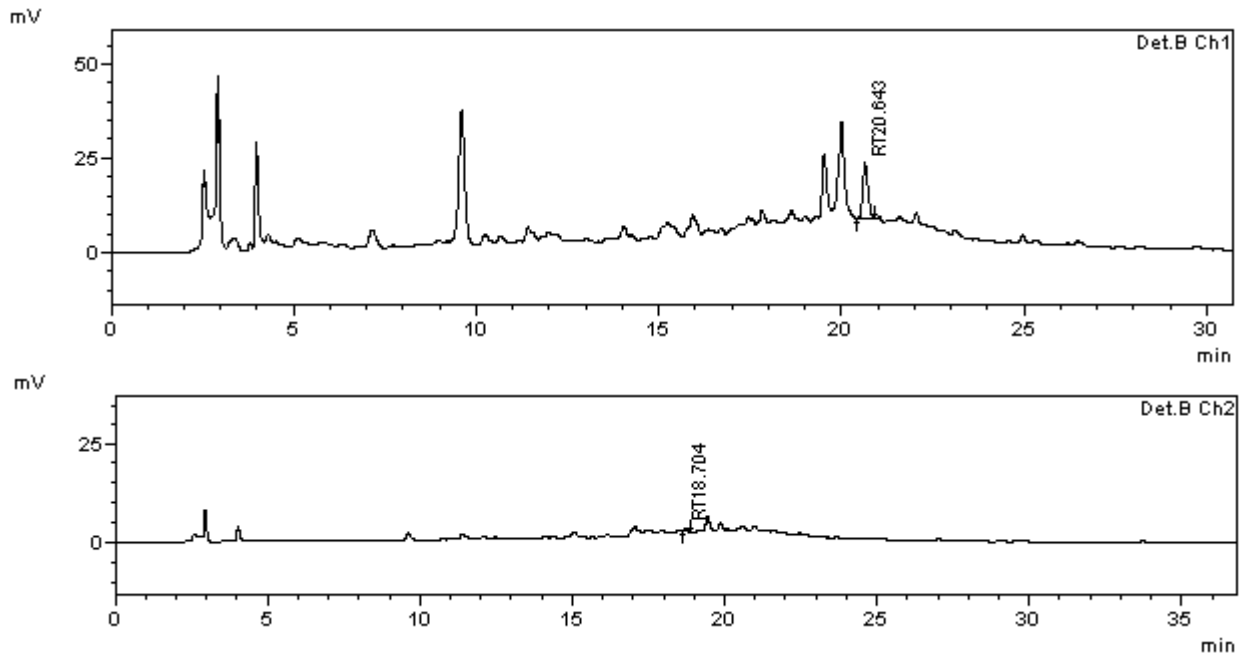


Slika 8.36. Hromatogram uzorka korena M-1 (200 mOsm) na 320 nm

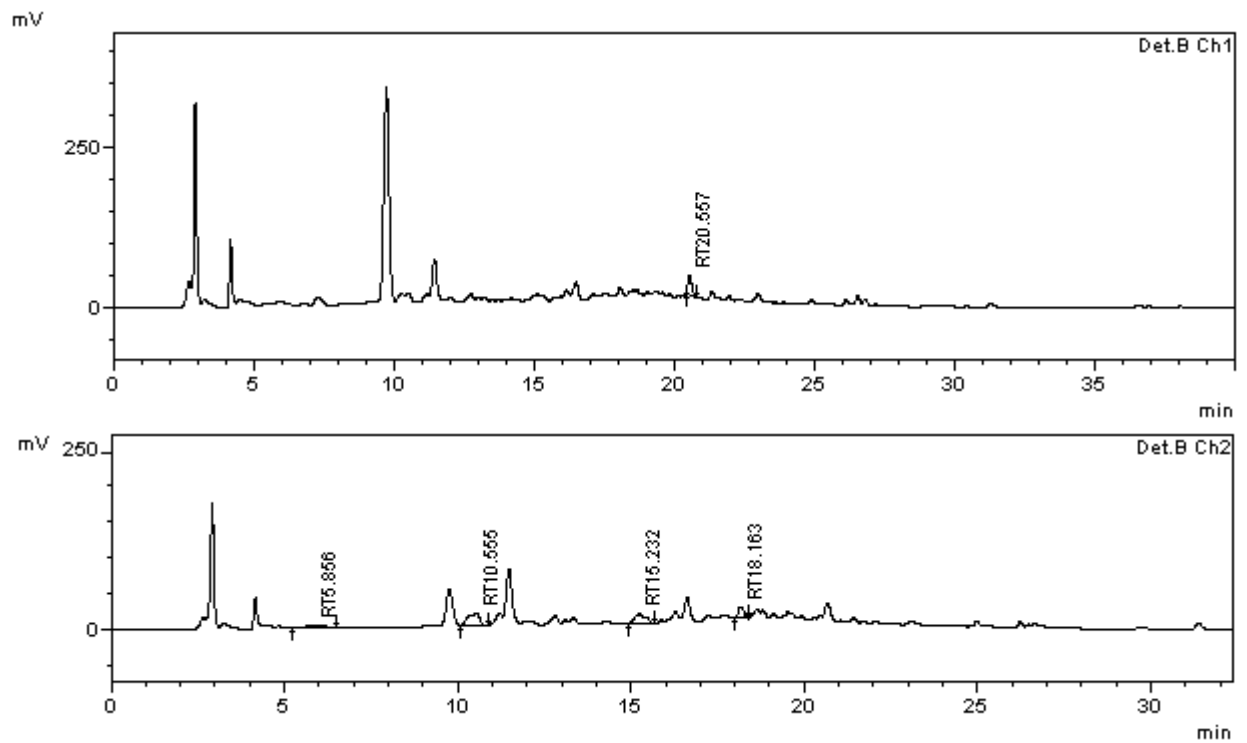


Slika 8.37. Hromatogrami uzorka korena M-1 (200 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 nm (dole)

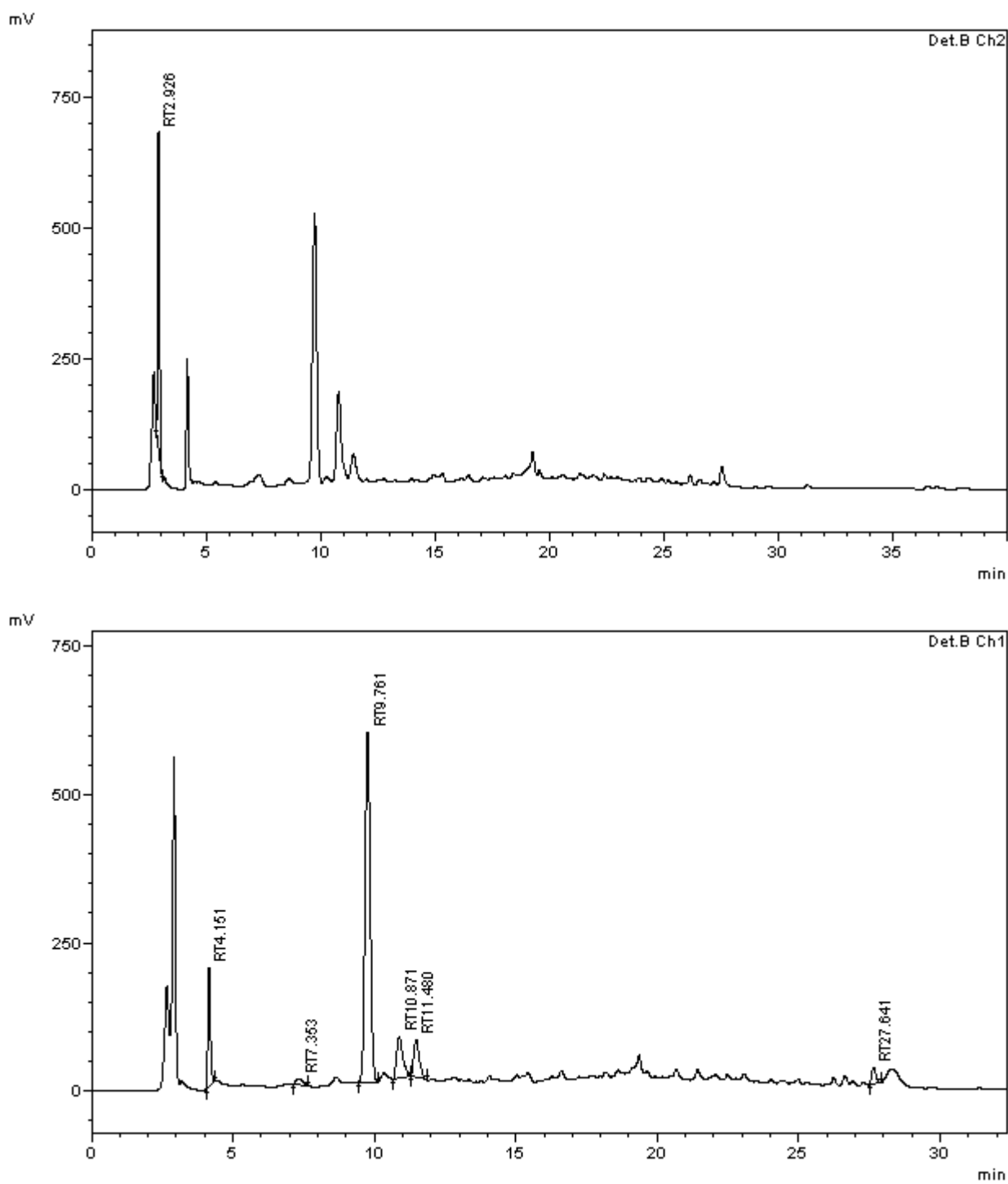




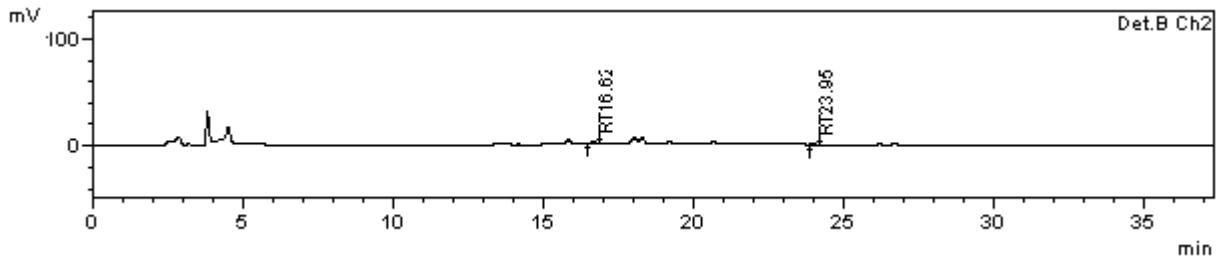
Slika 8.38. Hromatogrami uzorka korena M-1 (200 mOsm) na 300 nm (gore) i 360 nm (dole).



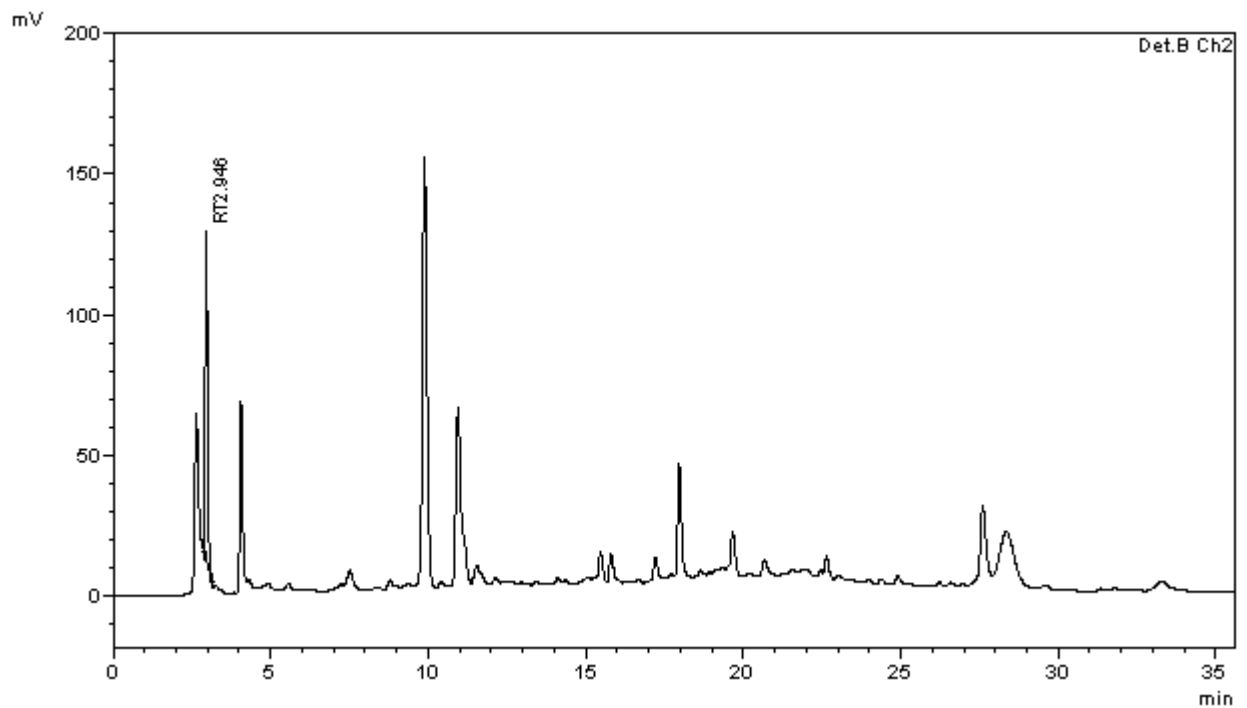
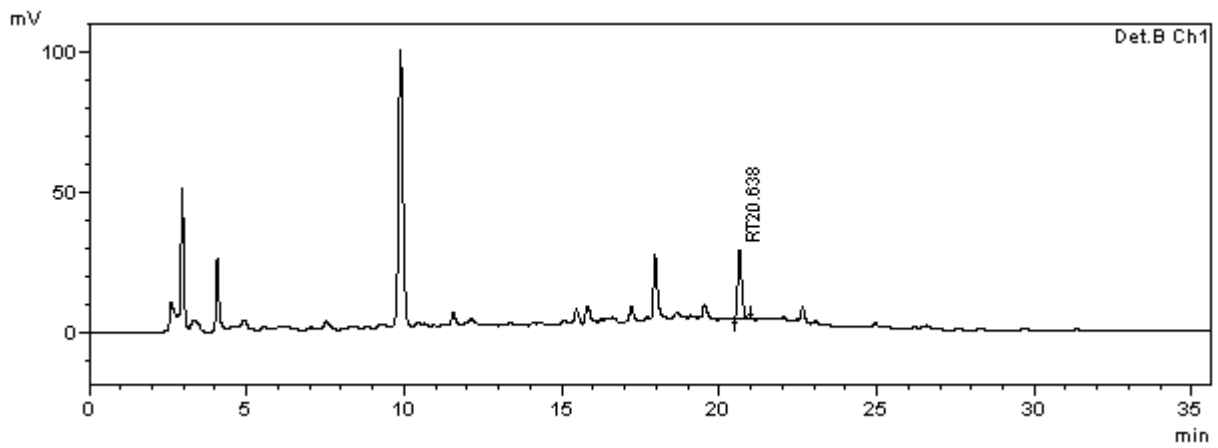
Slika 8.39. Hromatogrami uzorka korena B-229 (kontrola) na 300 nm 320 nm



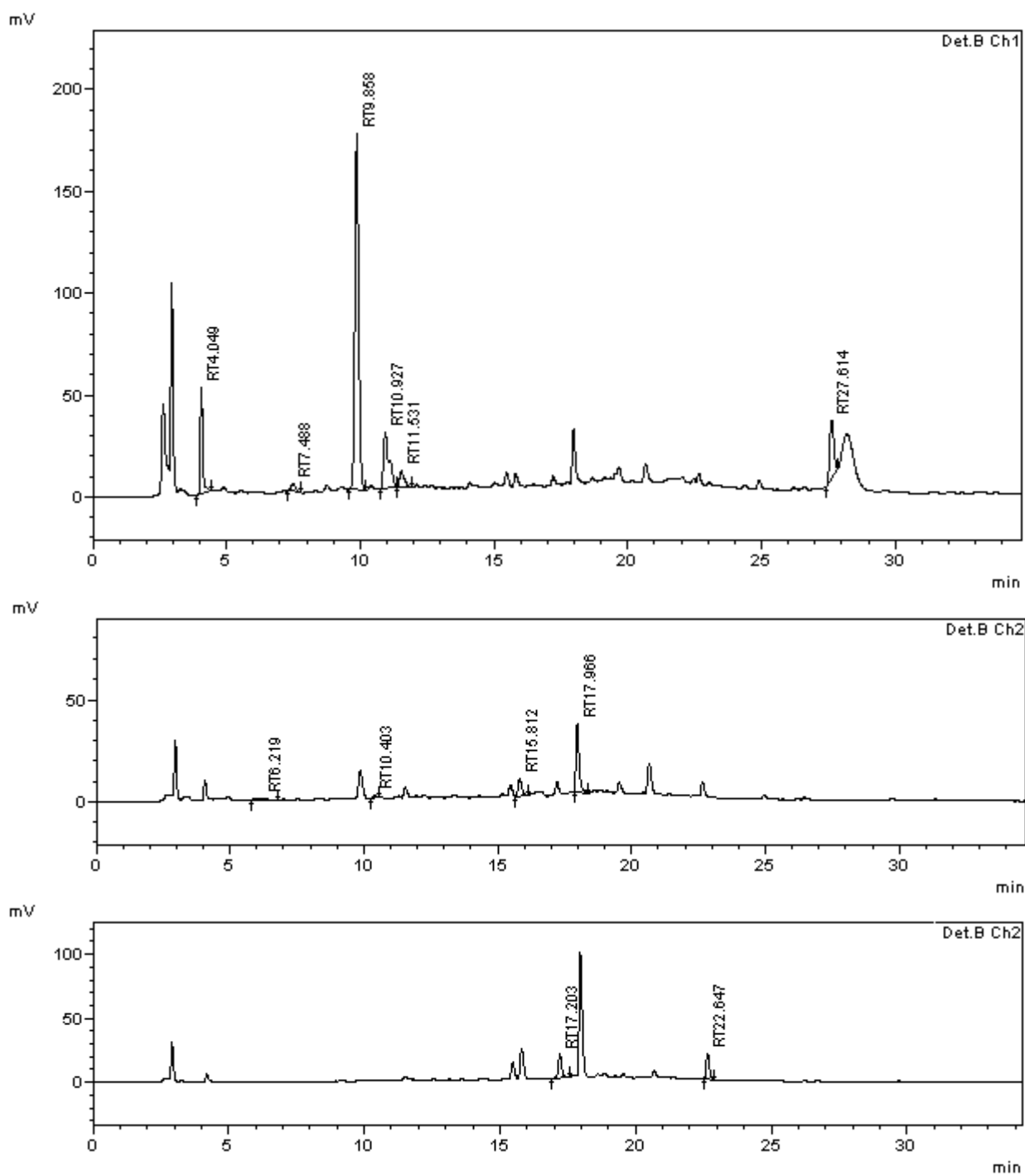
Slika 8.40. Hromatogrami uzorka korena B-229 (kontrola) na 270 nm (gore) i 280 (dole)



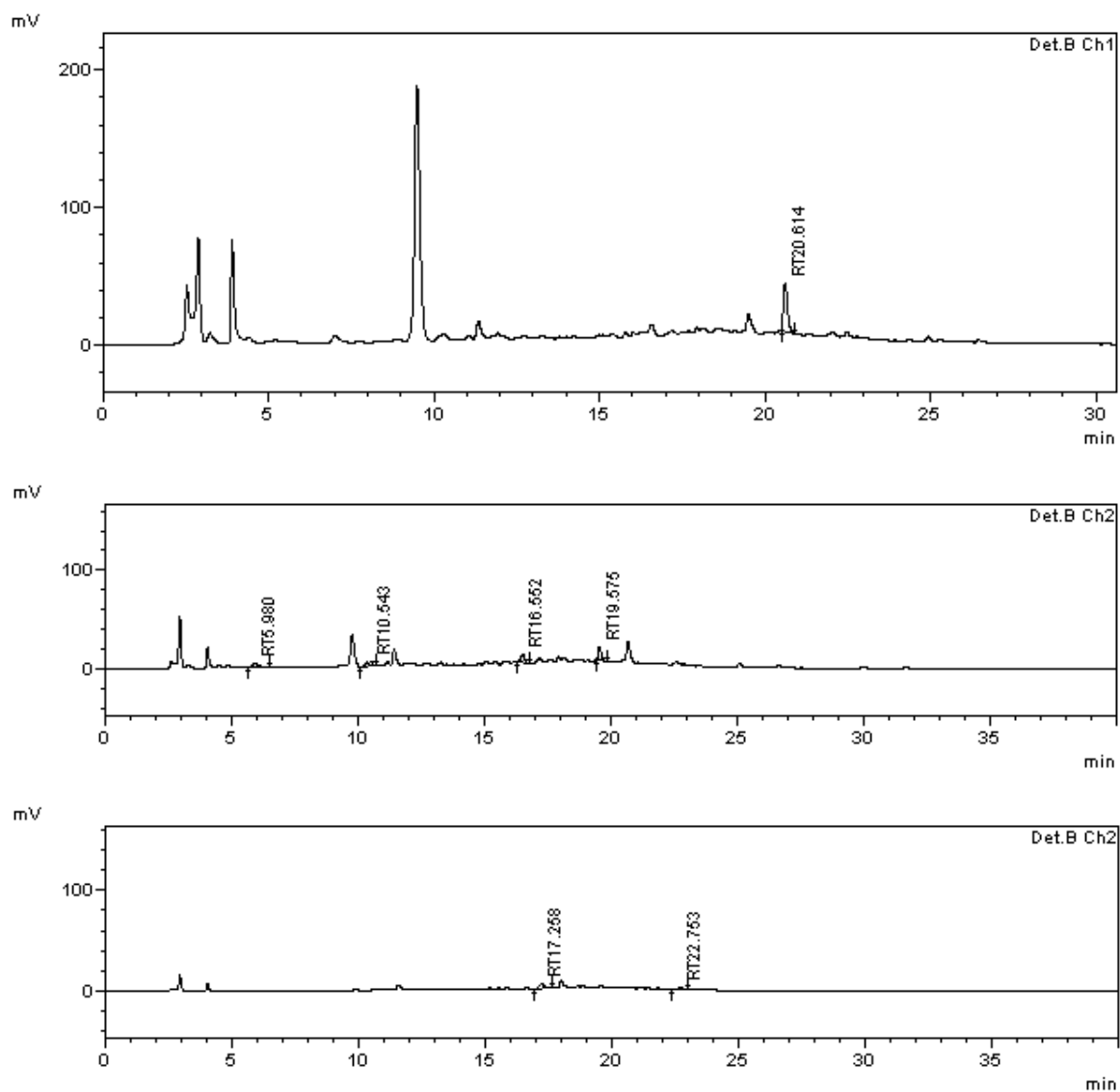
Slika 8.41. Hromatogram uzorka korena B-229 (kontrola) na i 360 nm



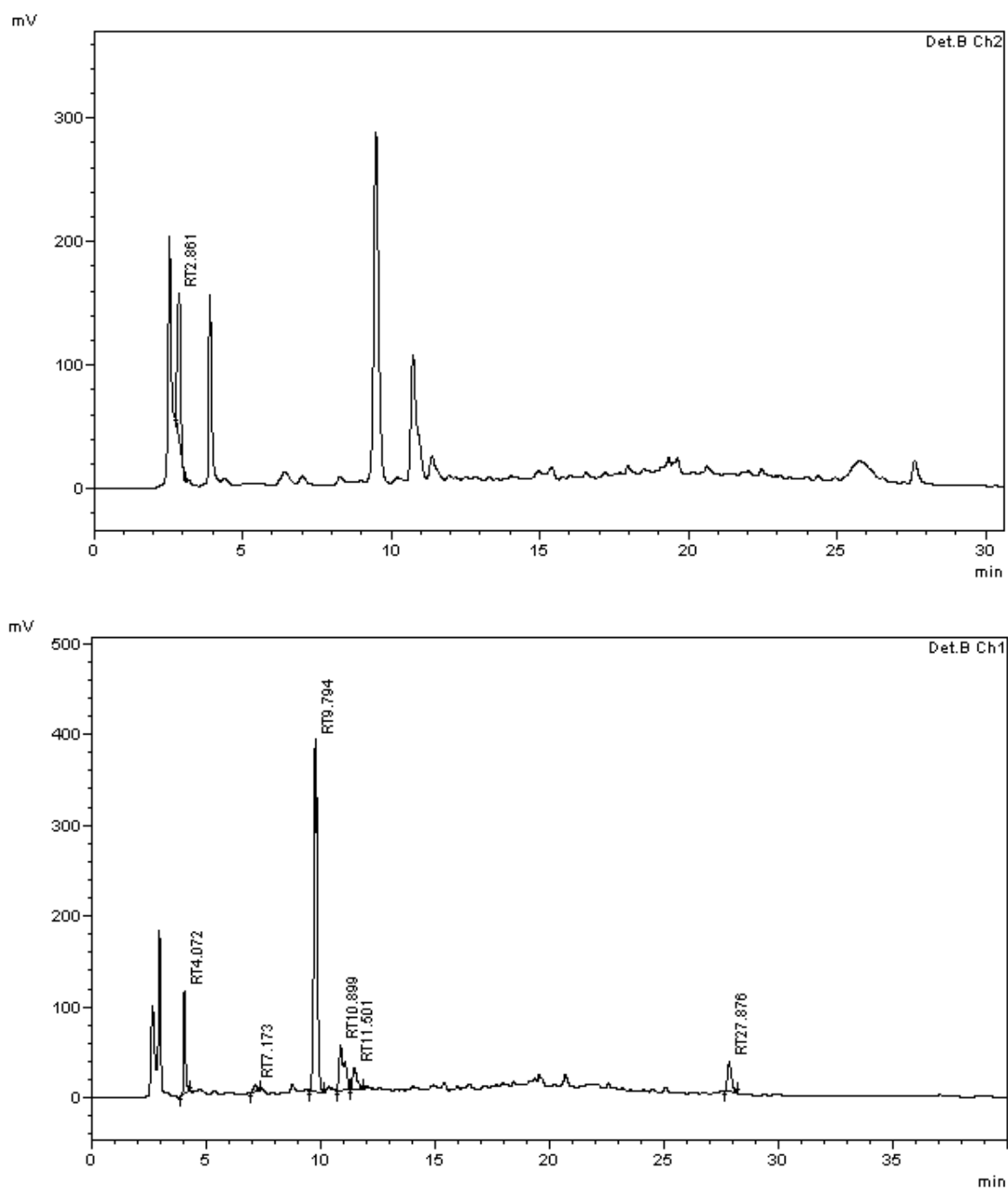
Slika 8.42. Hromatogrami uzorka korena B-229 (100 mOsm) na 300 nm (gore) i 270 nm (dole)



Slika 8.43. Hromatogrami uzorka korena B-229 (100 mOsm) na 280 nm (gore), 320 nm (sredina) i 360 nm (dole)



Slika 8.44. Hromatogrami uzorka korena B-229 (200 mOsm) na 300 nm (gore), 320 nm (sredina) i 360 nm (dole)



Slika 8.45. Hromatogrami uzorka korena B-229 (200 mOsm) na 270 nm (gore) i 280 (dole)