



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



**EFEKAT ZEOLITA NA PARAMETRE  
ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA KOD  
PARADAJZA (*Solanum lycopersicum* L.)  
I KUKURUZA (*Zea mays* L.) U  
USLOVIMA SUŠE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Danijela Kojić

Prof. dr Biljana Kukavica

Kandidat:

Dino Hasanagić

Novi Sad, 2021. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА<sup>1</sup>

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Дино Хасанагић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Данијела Којић, редовни професор, Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду Др Биљана Кукавица, редовни професор, Природно-математички факултет Универзитет у Бањој Луци
Наслов рада:	Ефекат зеолита на параметре антиоксидативног статуса код парадајза ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) и кукуруза ( <i>Zea mays</i> L.) у условима суше
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница <u>187</u> Поглавља <u>8</u> Референци <u>392</u> Табела <u>11</u> Слика <u>52</u>
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Биохемија

<sup>1</sup> Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

Кључне речи / предметна одредница:	Антиоксидативни метаболизам, <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Zea mays</i> , зеолит, суша, оксидативни стрес
Резиме на језику рада:	<p>Узимајући у обзир климатске промјене које подразумевају смањење количине падавина и пораст температура, суша је постала глобални проблем за који се сматра да ће бити актуелан још дуго времена у будућности. Осим проблема које ствара у бројним животним сферама, суша је један од најозбиљнијих фактора који негативно утиче на пољопривреду, с обзиром да недовољно водоснабдијевање негативно утиче на раст и развој биљака. У условима суше повећана продукција реактивних врста кисеоника може да изазове помјерање равнотеже у ћелијским оксидоредукционим реакцијама у смјеру оксидације те да доведе до настанка оксидативног стреса. Посљедице оксидативног стреса су структурна и функционална оштећења ћелијских компоненти која доводе до поремећаја у метаболизму и функционисању ћелије. Веома важну улогу у толеранцији биљака на стрес изазван сушом има антиоксидативни систем заштите који неизбежно укључује ензиме супероксид дисмутазу, каталазу, пероксидазе Класе III и аскорбат пероксидазу, али такође и нискомолекуларне антиоксиданте попут аскорбата, глутатиона, фенола и каротеноида. Посљедњих година се нагло повећао интерес за кориштење еколошки оправданих и неинвазивних средстава којима се унапријеђује проблем водоснабдијевања биљака, а велика пажња је посвећена примјени природних алуминосиликата, од којих је најпознатији зеолит. Иако нису многобројни, постоје радови који упућују да овај природни минерал може значајно да допринесе побољшању водног режима биљака због особине везивања те уравнотеженог отпуштања воде. У овој докторској дисертацији предмет истраживања је укључио двије биљне врсте различите по типу фотосинтетичког метаболизма и адаптивним стратегијама на прилагођавање на сушу, а то су парадајз (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) и кукуруз (<i>Zea mays</i> L.). Фокус истраживања био је испитивање могућности примјене зеолита у сврху спрјечавања или ублажавања посљедица стреса изазваног сушом код биљака парадајза и кукуруза, али и испитивање могућег различитог одговора у односу на биљну врсту. Интензитет оксидативног стреса анализиран је на основу индиректних показатеља, анализом биохемијских параметара антиоксидативног метаболизма. Осим тога, анализе су укључиле и физиолошке параметре повезане са фотосинтетичким метаболизмом (структурне карактеристике стома, интензитет фотосинтезе и транспирације, садржај ензима <i>Rubisco</i>, концентрације фотосинтетичких пигмената, релативни садржај воде) те анатомско-хистолошке карактеристике листова и</p>

	<p>морфолошке особине изданка. За истраживање на биљкама парадајза зеолит је додат у супстрат у три различите концентрације (5%, 10% и 20%). Контролне биљке су оптимално наводњаване током цијелог експерименталног периода, без зеолита у супстрату, али и са свим примјењеним концентрацијама. Биљке у условима суше нису наводњаване, а биле су подијељене у групу која није имала зеолит те у групе са три концентрације зеолита. Добијени резултати су показали да се са додатком 5% зеолита у супстрат може значајно допринијети ублажавању негативних посљедица стреса, иако није остварено потпуно спречавање утицаја суше. Додатак 10% зеолита у супстрат није имао позитиван ефекат, док је додатак 20% зеолита додатно погоршао услове проузроковане сушом. У том смислу закључено је да је ефекат зеолита на антиоксидативни статус биљака парадајза у условима суше условљен његовом концентрацијом у земљишту, те да у зависности од ње може бити и позитиван и негативан. Код експеримента на биљкама кукуруза примјењене су двије концентрације (5% и 10%) зеолита. Контролне биљке су наводњаване без зеолита и са примјењеним концентрацијама, док су биљке подвргнуте утицају суше биле без наводњавања, такође без зеолита, али и са одабраним концентрацијама. Резултати су показали да примјена зеолита ни у једној концентрацији не може да спријечи нити да ублажи посљедице оксидативног стреса изазваног сушом код биљака кукуруза. Осим тога физиолошки показатељи и параметри ензимског антиоксидативног метаболизма указали су да присуство 10% зеолита додатно погоршава стресно стање изазвано сушом. Присуство зеолита у супстрату биљака кукуруза се показало штетним чак и у условима оптималног наводњавања, због настале размјене катјона са околним супстратом и редистрибуције хемијских елемената која је условила токсичан ефекат појединих јона, али и дефицит оних који су неопходни за несметан метаболизам. Закључено је да су се биохемијско-физиолошки путеви у метаболичким стратегијама прилагођавања на сушу донекле разликовали код биљака парадајза и кукуруза, а такође да је и сам ефекат зеолита у спречавању посљедица стреса био специфичан у односу на врсту и зависи од примјењене концентрације зеолита.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	21. 03. 2019.
Датум одбране:	

(Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник: др Јелена Пураћ, редовни професор Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Сања Крстић, виши научни сарадник Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Соња Вељовић-Јовановић, научни саветник Институт за мултидисциплинарна истраживања Универзитет у Београду</p> <p>Члан: др Биљана Кукавица, редовни професор Природно-математички факултет Универзитет у Бањој Луци, ментор</p> <p>Члан: др Данијела Којић, редовни професор Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду, ментор</p>
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SCIENCES

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Dino Hasanagić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Danijela Kojić, full professor, Faculty of Sciences University of Novi Sad  Dr. Biljana Kukavica, full professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics University of Banja Luka
Thesis title:	Zeolite effect on antioxidative status parameters in tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) and maize ( <i>Zea mays</i> ) under drought conditions
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages <u>187</u> Chapters <u>8</u> References <u>392</u> Tables <u>11</u> Illustrations <u>52</u>
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Biochemistry
Subject, Key words:	Antioxidative metabolism, <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Zea mays</i> , zeolite, drought, oxidative stress

---

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

Abstract in English language:

Taking into account climate change, which implies a precipitation decreasing and temperatures rising, drought has become a global problem that is considered to be relevant for a long time to come. In addition to the problems it creates in many spheres of life, drought is one of the most serious factors that negatively affects agriculture, given that insufficient water supply disrupts the growth and development of plants. The production of reactive oxygen species in drought conditions can cause an imbalance of cellular redox homeostasis in the direction of oxidation and lead to the formation of oxidative stress. The consequences of oxidative stress are structural and functional damages of cellular compartments which leads to disturbance of metabolism and cell function. A very important role in plant tolerance to drought stress has the antioxidant protection systems that inevitably include the enzymes superoxide dismutase, catalase, Class III peroxidases and ascorbate peroxidase, but also low molecular weight antioxidants such as ascorbate, glutathione phenol and carotenoids. In recent years, there has been a sharp increase in interest in the use of environmentally sound and non-invasive means to improve the water supply of plants, and much attention has been paid to the use of natural aluminosilicates, the most famous of which is zeolite. Although not numerous, there are studies that suggest that this natural mineral can significantly contribute to the improvement of the water regime of plants due to the binding properties and balanced release of water. In this PhD thesis, the subject of research included two plant species different in type of photosynthetic metabolism and adaptive drought adaptation strategies, namely tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) and maize (*Zea mays* L.). The focus of research was to examine the possibility of using zeolite to prevent or mitigate the effects of drought stress in tomato and maize plants, but also to examine the possible different response in relation to the plant species. The intensity of oxidative stress was analyzed on the basis of analysis of biochemical parameters of antioxidant metabolism. In addition, analyzes included physiological parameters related to photosynthetic metabolism (structural characteristics of stoma, photosynthesis and transpiration intensity, Rubisco content,

photosynthetic pigment concentrations, relative water content) and anatomical-histological characteristics of leaves and shoot morphological properties. For the research with tomato plants zeolite was applied with three different concentrations (5%, 10% and 20%). Control plants were optimally irrigated during the entire experimental period, without zeolite in substrate, but also with all applied zeolite concentrations. The plants in drought conditions were not irrigated and they were divided into group without zeolite and with 5%, 10% and 20% zeolite respectively. The obtained results showed that the addition of 5% zeolite to the substrate can significantly contribute to the mitigation of the negative effects of stress, although complete drought prevention has not been achieved. The zeolite application of 10% did not have a positive effect, while the application of 20% caused additional deterioration of drought consequences. In that sense, it was concluded that the effect of zeolite on the antioxidant status of tomato plants in drought conditions is conditioned by its concentration in the soil, and that depending on it, it can be both positive and negative. In experiment with maize plants, two zeolite concentrations (5% and 10%) were applied. Control plants were irrigated without zeolite and with applied 5% and 10% zeolite respectively, while plants submitted to drought were not irrigated and they also were without zeolite and with selected concentrations. The results showed that the application of zeolite in any concentration cannot prevent or mitigate the effects of oxidative stress caused by drought in maize plants. In addition, physiological indicators and parameters of enzymatic antioxidant metabolism indicated that the presence of 10% zeolite further exacerbates drought-induced stress. The presence of zeolite in the substrate of maize plants was harmful even in conditions of optimal irrigation as a result of cation exchange with surrounding substrate and redistribution of chemical elements which conditioned the toxic effects of certain ions, but also the deficit of necessary ions for undisturbed metabolism. It was concluded that the biochemical-physiological pathways in metabolic drought adaptation strategies differed somewhat in tomato and maize plants, and also that the effect



	of zeolite in preventing the effects of stress was species-specific and concentration dependent.
Accepted on Scientific Board on:	21 March 2019
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr. Jelena Purać, full professor Faculty of Sciences University of Novi Sad</p> <p>Member: dr. Sanja Krstić, senior research associate Faculty of Sciences University of Novi Sad</p> <p>Member: dr. Sonja Veljović-Jovanović, principal research fellow Institute of multidisciplinary research University of Belgrade</p> <p>Member: dr. Biljana Kukavica, full professor Faculty of Natural Sciencis and Mathematics University of Banja Luka, mentor</p> <p>Member: dr. Danijela Kojić, full professor Faculty of Sciences University of Novi Sad, mentor</p>
Note:	

## **Zahvalnica**

*Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji realizovana su u Laboratoriji za biohemiju i molekularnu biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci i predstavljaju dio istraživanja sprovedenih za potrebe projekta "Ispitivanje uloge zeolita u umanjenju oksidativnih oštećenja biljaka paradajza i pasulja nastalih pod uticajem različitih abiotičkih faktora", broj 9/06-020/961-23/15, finansiranog od strane Ministarstva za naučnotehnoški razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorkama, prof. dr Biljani Kukavica i prof. dr Danijeli Kojić, na svesrdnoj pomoći koju su mi pružile prilikom izrade doktorske disertacije, kao i na velikoj poštovanosti, strpljenju i nesebičnosti koju su iskazale u našoj saradnji.*

*Dio postavke eksperimenta urađen je u stakleniku Instituta za hortikulturu Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci, čijem osoblju, prof. dr Gordani Đurić, prof. dr Vidi Todorović, Nikolini Đekić, ma, i Ljiljani Tomović dugujem veliku zahvalnost na pomoći koju su mi pružile, a posebnu zahvalnost dugujem prijateljici doc. dr Ivani Kolečka, na podršci koju mi je pružila u mnogim segmentima realizacije doktorske disertacije, počevši od postavke eksperimenta, preko laboratorijskih analiza te do sumiranja rezultata.*

*Zahvaljujem se kolegi doc. dr Senadu Murtiću, na pomoći koju mi je pružio u analizama hemijskih elemenata u uzorcima biljaka i zeolita u laboratoriji na Poljoprivredno-prehrambenom fakultetu, Univerziteta u Sarajevu.*

*U Laboratoriji za biohemiju, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu urađena je analiza fenolnih jedinjenja, a kolegini dr Sanji Krstić, dugujem veliku zahvalnost na susretljivosti i pomoći koju mi je pružila.*

*Dragoj profesorici, dr Nini Janjić, sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci dugujem veliku zahvalnost za urađene anatomske analize uzoraka.*

*Za urađene analize hemijskih osobina zeolita veliku zahvalnost dugujem osoblju Instituta za ispitivanje materijala i konstrukcija Republike Srpske, kao i kolegini Dragani Gajić sa Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci.*

*Za konsultacije oko statističke obrade podataka veliku zahvalnost dugujem kolegi doc. dr Borutu Bosančiću sa Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci.*

*Dragoj kolegini dr Tanji Maksimović, sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci dugujem veliku zahvalnost za pomoć koju mi je pružila prilikom određivanja koncentracije fotosintetičkih pigmenata.*

*Dragim prijateljicama i kolegincama Neveni Šuškalu, Renati Vujičić i Ivani Pucar dugujem neizmjernu zahvalnost za nesebičnu pomoć i posvećenost koju su mi pružile prilikom uzorkovanja biljaka i enzimskih analiza u laboratoriji.*

*Kompaniji “Ekofarm zeol” u Banjoj Luci se zahvaljujem na ustupljenom zeolitu, koji je korišten za postavku eksperimenta. Takođe, veliku zahvalnost dugujem kompaniji “Adria Hishtil” iz Čapljinine na ustupljenim sadnicama paradajza a Institutu “Seme” iz Novog Sada na ustupljenom sjemenu kukuruza.*

*Dragim kolegama doc. dr Ivanu Samelaku i Biljani Radusin-Sopić zahvaljujem se na moralnoj podršci koju su mi pružili tokom izrade doktorske disertacije, a svim kolegama i saradnicima sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci koji su mi pomagali u postizanju brojnih poslovnih obaveza koje su se odvijale uporedno sa izradom disertacije dugujem takođe ogromnu zahvalnost.*

*Dragim prijateljicama i kolegincama dr Dušici Jovičić i dr Dragani Stamenov sa Univerziteta u Novom Sadu dugujem veliku zahvalnost za mnoge korisne savjete i pomoć koju su mi pružile tokom mojih fakultetskih obaveza na doktorskom studiju.*

*Mojim dragim prijateljima Miši Milakoviću i Tanji Grahovac dugujem veliku zahvalnost za pomoć koju su mi pružili u prevođenju radova na engleski jezik, prilikom publikovanja dijela rezultata iz doktorske disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, pok. ocu Ilijasu, majci Slavici i sestri Daliji na velikoj ljubavi, podršci i razumijevanju koje su mi pružili u ostvarivanju svojih snova.*

*Autor*

*Naučnik u svojoj laboratoriji nije samo tehničar, on je i dijete koje se suočava sa prirodnim fenomenima koji ga toliko impresioniraju kao da se radi o bajkama...*

*Marija Kiri*

## Spisak skraćenica

**AA**- askorbat

**ABA**- abscisinska kiselina

**AOX**- askorbat oksidaza

**APX**- askorbat peroksidaza

**ATP**- adenzin trifosfat

**CAM**- metabolizam krasulacenske kiseline, eng. *Crassulacean acid metabolizam*

**CAT**- katalaza

**DHA**- dehidroaskorbat

**DHAR**- dehidroaskorbat reduktaza

**DNK**- dezoksiribonukleinska kiselina

**ETC**-elektron transportni lanac, eng. *Electron transport chain*

**Fd**-ferodoksin

**GR**- glutation reduktaza

**GSH**- redukovani glutation

**GSSG**-oksidovani glutation

**HNE**- 4-hidroksi-2-nonenal

**LEA**- učestali u kasnoj embriogenezi, eng. *Late embryogenesis abundant*

**MDA**- malondialdehid

**MDHAR**- monodehidroaskorbat reduktaza

**NADP<sup>+</sup>**- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**NADPH**- Redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**PEP**- fosfoenolpiruvat

**PEPC**- fosfoenolpiruvat karboksilaza

**POD**- peroksidaza Klase III

**PSI**-fotosistem I

**PSII**-fotosistem II

**Rubisco**-ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

**RuBP**- ribulozo-1,5-bisfosfat

**ROS**- reaktivne vrste kiseonika, eng. *Reactive oxygen species*

**SDS**- natrijum dodecil sulfat, eng. *Sodium dodecyl sulphate*

**SOD**- superoksid dismutaza

**XO**- ksantin oksidaza

**3-PGK**- trifosfoglicerinska kiselina

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. VODNI REŽIM I VODNI DEFICIT KOD BILJAKA.....	3
2.2. NEDOSTATAK VODE (SUŠA) KAO ABIOTIČKI EKOLOŠKI FAKTOR.....	6
2.3. GENEZA OKSIDATIVNOG STRESA U BILJNIM ĆELIJAMA U USLOVIMA SUŠE	8
2.3.1. Reaktivne vrste kiseonika .....	8
2.3.2. Oksidativni stres u uslovima suše.....	10
2.4. UTICAJ SUŠE NA PROCES FOTOSINTEZE.....	13
2.4.1. Fotosintetički pigmenti .....	13
2.4.2. Poremećaj fotosintetičkog metabolizma u uslovima suše .....	15
2.4.3. Fotorespiracija u uslovima suše .....	18
2.4.4. Uticaj suše na aktivnost <i>Rubisco</i> -a .....	19
2.5. METABOLIČKE ADAPTACIJE BILJAKA NA SUŠU .....	22
2.5.1. Anatomsko-morfološka prilagođavanja.....	22
2.5.2. Evolutivne adaptacije fotosintetičkih puteva .....	22
2.5.3. Osmotska prilagođavanja.....	26
2.5.4. Uloga LEA proteina.....	27
2.5.5. Prilagođavanja na nivou membranskih sistema.....	29
2.5.6. Molekularni putevi signalinga u odgovoru na sušu .....	29
2.5.7. Uloga abscisinske kiseline (ABA).....	31
2.5.8. Mehanizam reakcije stoma .....	32
2.5.9. Antioksidativni metabolizam .....	35
2.6. ISTRAŽIVANJA O UTICAJU SUŠE NA VRSTU <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> ....	44
2.7. ISTRAŽIVANJA O UTICAJU SUŠE NA VRSTU <i>ZEA MAYS</i> .....	46
2.8. PRIMJENA ZEOLITA KOD GAJENJA BILJAKA .....	48
3. CILJEVI I ZADACI .....	51
4. MATERIJAL I METODE.....	52
4.1. ANALIZA FIZIČKO-HEMIJSKIH OSOBINA ZEOLITA .....	52
4.1.1. Određivanje sadržaja oksida silicijuma i aluminijuma .....	52

4.1.2.	Određivanje sadržaja metala u zeolitu .....	53
4.1.3.	Određivanje specifične površine zeolita .....	53
4.1.4.	Određivanje kapaciteta izmjene katjona (KKI) .....	53
4.1.5.	Određivanje pH vrijednosti suspenzije zeolita .....	54
4.2.	POSTAVKA EKSPERIMENATA .....	54
4.2.1.	Preliminarni eksperiment- istraživanje na biljkama paradajza .....	54
4.2.2.	Istraživanje na biljkama paradajza u drugoj godini .....	56
4.2.3.	Istraživanje na biljkama kukuruza .....	57
4.3.	UZORKOVANJE BILJAKA .....	58
4.4.	ANALIZE UZORKOVANIH BILJAKA .....	60
4.4.1.	Morfološke analize.....	60
4.4.2.	Anatomske analize .....	61
4.4.3.	Analiza stoma.....	61
4.4.4.	Određivanje relativnog sadržaja vode i svježe i suve mase listova .....	62
4.4.5.	Određivanje fotosintetičke aktivnosti i intenziteta transpiracije.....	62
4.4.6.	Određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenta .....	62
4.4.7.	Ekstrakcija proteina za analizu aktivnosti antioksidativnih enzima i elektroforezu	63
4.4.8.	Određivanje koncentracije ukupnih proteina .....	63
4.4.9.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza Klase III.....	64
4.4.10.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze.....	64
4.4.11.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze .....	64
4.4.12.	Nativna elektroforeza.....	65
4.4.13.	Određivanje molekulske mase peroksidaznih izoformi modifikovanom SDS elektroforezom.....	67
4.4.14.	SDS elektroforeza .....	67
4.4.15.	Određivanje koncentracije redukovanog i oksidovanog askorbata .....	68
4.4.16.	Određivanje koncentracije fenola .....	69
4.4.17.	LC-MS/MS određivanje odabranih fenolnih jedinjenja .....	69
4.4.18.	Određivanje sadržaja metala u listovima biljaka .....	70
4.4.19.	Statistička obrada podataka.....	71
5.	REZULTATI .....	72
5.1.	FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE ZEOLITA .....	72
5.2.	PRELIMINARNI EKSPERIMENT NA BILJKAMA PARADAJZA .....	73



5.2.1. Morfo-anatomske analize.....	73
5.2.2. Parametri povezani sa fotosintezom i karakteristike stoma.....	78
5.2.3. Parametri antioksidativnog metabolizma.....	86
5.3. ISTRAŽIVANJE NA BILJKAMA PARADAJZA U DRUGOJ GODINI.....	97
5.3.1. Morfo-anatomske analize .....	97
5.3.2. Parametri povezani sa fotosintezom i karakteristike stoma.....	102
5.3.3. Parametri antioksidativnog metabolizma .....	112
5.4. ISTRAŽIVANJE NA BILJKAMA KUKURUZA .....	117
5.4.1. Morfologija biljaka .....	118
5.4.2. Relativni sadržaj vode .....	119
5.4.3. Karakterizacija proteina razdvojenih SDS-elektroforezom.....	121
5.4.4. Koncentracija hemijskih elemenata.....	125
5.4.5. Parametri antioksidativnog metabolizma .....	126
6. DISKUSIJA .....	133
6.1. NEGATIVNI EFEKTI SUŠE NA METABOLIZAM BILJAKA PARADAJZA I KUKURUZA .....	133
6.2. ULOGA ZEOLITA U SPREČAVANJU NEGATIVNIH EFEKATA SUŠE NA BILJKE PARADAJZA I KUKURUZA.....	142
7. ZAKLJUČAK.....	149
8. LITERATURA .....	151

## 1. UVOD

Pojava suše postaje sve češća u cijelom svijetu i smatra se da će problem nedostatka vode u regionu biti aktuelan u narednom periodu jer je zabilježen trend smanjenja padavina i porast temperatura (Maksimović i sar., 2012). Vodni deficit je jedan od vodećih problema s kojim se biljke susreću tokom svog rasta i razvika, jer kada je količina vode izgubljena transpiracijom veća od usvojene dolazi do brojnih metaboličkih poremećaja. Jedna od najčešćih negativnih posljedica koje se javljaju u uslovima nedostatka vode jeste poremećaj protoka gasova kroz stome, što skoro neizbježno vodi ka intenziviranju produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, eng. reactive oxygen species) (Takahashi i Murata, 2008). Hiperprodukcija ROS može da izazove pomjeranje ravnoteže u ćelijskim oksido-redukcionim reakcijama u smjeru oksidacije te da dovede do nastanka tzv. oksidativnog stresa. S obzirom da ROS reaguju sa biološkim molekulama, one utiču na njihovu strukturu i funkciju izazivajući razna oštećenja koja najviše obuhvataju polinezasićene masne kiseline, ugljene hidrate, proteine i nukleinske kiseline (Demidchik, 2015). Kao posljedica toga, u biljnim ćelijama se pokreću kaskade različitih biohemijsko-fizioloških procesa kojima biljke nastoje prevazići nastale poteškoće. Na molekularnom nivou, dolazi do aktiviranja brojnih odbrambenih mehanizama poput povećanja ekspresije gena uključenih u sintezu antioksidativnih enzima, povećanja sinteze proteina vodnog stresa te akumulacije kompatibilnih osmolita, poput prolina ili šećera. Od posebnog značaja za toleranciju biljaka na vodni stres su integrisani enzimski i neenzimski antioksidativni sistemi koji neizbježno uključuju superoksid dismutazu, katalazu, peroksidazu, askorbat peroksidazu, glutation peroksidazu, a takođe i niskomolekularna hidrosolubilna (askorbat, glutation, fenoli) i liposolubilna (tokoferol, karotenoidi) jedinjenja. Ovakve odbrambene adaptacije kod biljaka iziskuju velike energetske izdatke u ćelijama, što ostavlja posljedice i na njihovu reproduktivnu fazu, a to najčešće rezultuje značajnim redukovanjem veličine i broja plodova i sjemena (Chaves i saradnici, 2009). Tokom posljednjih nekoliko decenija nauka je uložila velike napore i sredstva u istraživanja povezana sa uticajem suše na metabolizam biljaka, a u cilju povećanja njihove tolerancije na stresne uslove izazvane ovim fenomenom. Posljednjih godina se naglo povećao interes za korištenje ekološki opravdanih i neinvazivnih sredstava kojima se unaprijeđuje problem vodosnabdijevanja biljaka, a velika pažnja je posvećena primjeni prirodnih aluminosilikata, od kojih je najpoznatiji zeolit. Iako nisu mnogobrojni, postoje radovi koji upućuju da ovaj prirodni mineral može značajno da doprinese poboljšanju vodnog režima biljaka zbog osobine vezivanja te uravnoteženog otpuštanja vode

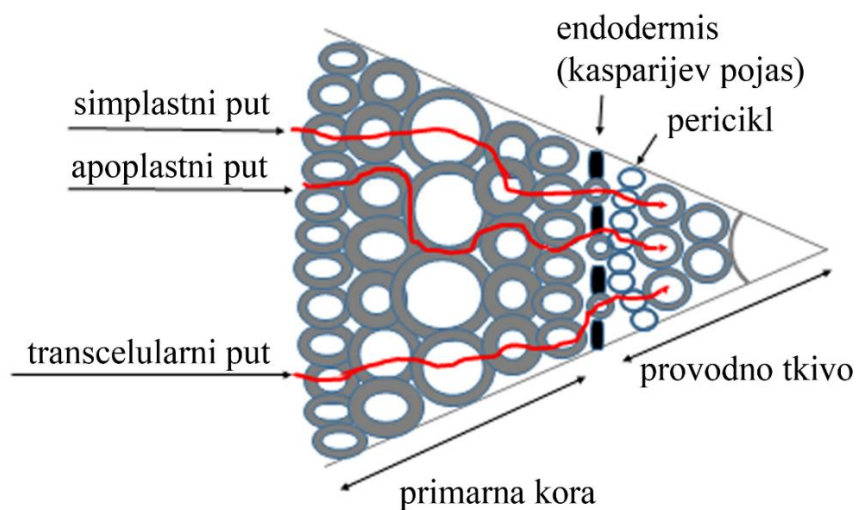
(Pirzad i Mohammadzade, 2014, Wu i saradnici, 2019, Bahador i Tadayon, 2020). Ipak, ova tema je još uvijek nedovoljno istražena, a dosadašnji rezultati upućuju da uticaj zeolita značajno zavisi od primjenjene koncentracije u supstratu te da takođe zavisi od biljne vrste. Dvije biljne vrste različite po tipu fotosintetičkog metabolizma i adaptivnim strategijama na vodni deficit čine adekvatan izbor za proučavanje vodnog stresa te omogućavaju širi pristup u istraživanju odgovora na pitanje u smislu specifičnosti same vrste. Fokus istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivanje mogućnosti primjene zeolita u svrhu sprječavanja ili ublažavanja posljedica vodnog stresa na biljke paradajza i kukuruza ali i ispitivanje mogućeg različitog odgovora u odnosu na biljnu vrstu. U tom smislu, stepen oksidativnog stresa razmatran je indirektno, analizom bihemijskih parametara antioksidativnog metabolizma, a uključena je i analiza anatomsko-fizioloških pokazatelja (histološke analize listova, struktura stoma, intenzitet fotosinteze i transpiracije te sadržaj fotosintetičkih pigmenata).

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. VODNI REŽIM I VODNI DEFICIT KOD BILJAKA

Voda kao najrasprostranjeniji molekul na Zemlji (70% njene površine je prekriveno vodom) je apsolutno neophodna za život svih živih bića, a za biljke predstavlja esencijalan faktor u skoro svim metaboličkim procesima te je kao konstituent prisutna u svakoj biljnoj ćeliji od 75-90% u odnosu na ukupnu masu (Staknović, 2010). Fizičko-hemijske osobine vode čine je idealnim molekulom za reakcionu sredinu u živim ćelijama, a to su visoka dielektrična konstanta, dobra električna provodljivost, visok stepen adhezije povezan sa polarnošću, jak površinski napon, kapilarnost, amfoternost, toplotna provodljivost, prilagodljiva specifična toplota i gustina u odnosu na temperaturu, providnost te osobina dobrog rastvarača (Chwastowski i sar., 2020). U zavisnosti od njene pristupačnosti za biljke voda se može klasifikovati na gravitacionu, kapilarnu i higroskopnu, a najveći značaj ima kapilarna voda koja se zadržava u porama zemljišta pod uticajem površinskih sila čestica zemlje te je kohezionim silama vezana između filma higroskopne vode (Saarenketo, 1998). Većina vode koja uđe u biljne organizme je „tranzitnog“ tipa, odnosno nakon upotrebe biva evaporisana putem transpiracije u atmosferu, a manje od 1% ostane vezana u ćelijama te se ugrađuje u organska jedinjenja. U biljkama postoje tri glavna procesa koja čine jedan kontinuitet u vodnom režimu, a to su usvajanje, kretanje i odavanje vode (Wang i sar., 2019). Dominantan način usvajanja vode od strane biljaka je onaj putem korijenovog sistema iz zemljišta, ali zbog izuzetne važnosti vode većina vrsta je dodatno usvaja i putem listova kao i putem svih drugih metamorfoziranih organa (Zarebanadkouki i sar., 2019). Najveća apsorpcija se odvija u tzv. zoni korijenovih dlačica, koja se nalazi iza meristema u vrhu korijena a na njoj je povećana kontaktna površina sa zemljištem. Starije ćelije iznad ove zone imaju manju sposobnost usvajanja vode zbog očvrstelih ćelijskih zidova koji su oplutnjali ili lignifikovani. Nakon ulaska vode u ćelije korijena voda se najprije kreće kroz same ćelije, prolazeći nekoliko slojeva parenhimskog tkiva dok ne dođe do zone endodermisa, pri čemu mora proći barijeru tzv. „Kasparijev pojas“ i doći do provodnih sudova. Nakon toga voda se kreće uzlazno putem sistema provodnih sudova, odnosno cjevčica ksilema. Pokretačka sila za ulazak vode u ksilem nastaje zbog stvaranja negativnog pristika unutar cjevčica koji se stvara zbog ascendentnog odavanja vode prema listovima, a kretanje kroz ćelije primarne kore je stimulirano razlikom osmotskog potencijala između vode u ksilemu i vode zemljišnog rastvora na površini korijena (Čereković i sar., 2013). Kretanje vode kroz ćelije na putu od usvajanja do ulaska u provodne sudove može biti apoplastno,

simplastno i transcelularno (Jonhson i sar., 2013). Apoplastno kretanje vode se odvija kroz sistem spojenih ćelijskih zidova svih ćelija, dok u simplastnom putu voda prolazi kroz ćelijsku membranu i kreće se kroz citoplazmu zaobilazeći vakuolu. Transcelularni put vode obuhvata kretanje kroz citoplazmu pri čemu dolazi i do prolaska kroz tonoplaste i vakuole svih ćelija (Slika 1.). Apoplastno kretanje vode se odvija po principu difuzije, dok su za simplastno i transcelularno kretanje zaslužne i difuzija i osmoza. Nakon ulaska u sistem provodnih sudova, odnosno u cjevčice traheja, glavna pokretačka sila vode je negativni hidrostatički pritisak koji se stalno održava zahvaljujući isparavanju vode kroz listove. Pri tome su sve molekule vode u ovom vodenom stubu povezane kohezionim silama koje sprečavaju kidanje vodenih „niti“, dok sile adhezije omogućavaju vodenim molekulama da se čvrsto pripiju za zidove provodnih cjevčica i održe kontinuitet vodenog stuba. Odavanje vode se najvećim dijelom odvija u obliku vodene pare u procesu poznatom kao transpiracija. Ovaj proces se odvija kroz stome, odnosno male otvore koje formiraju parovi specijalizovanih ćelija u epidermisu listova. Difuzija vodene pare kroz stome u atmosferu se odvija duž gradijenta hemijskog potencijala pa se prema Fikovom zakonu može reći da je količina isparene vode onolika kolika je razlika u koncentracijama vode unutar ćelije i u atmosferi (Leonardi i sar., 2000).



Slika 1: Šematski prikaz puteva kretanja vode kroz ćelije korijena biljaka (Original)

Parametri koji ukazuju na vodni status u biljkama su vodni potencijal i relativni sadržaj vode (eng. relative water content, RWC) (Stanković i sar., 2006). U pogledu sadržaja slobodne energije voda se može opisati na termodinamički način, pa se može upotrijebiti izraz hemijski potencijal. U nauci

se još koristi i izraz vodni potencijal ( $\psi_w$ ) a on se može koristiti za procjenu stanja hidratacije ćelije, tkiva ili čak cijele biljke. Vodni potencijal je ranije nazivan kao „snaga usisavanja“ a može se definisati kao razlika između hemijskog potencijala vode u ćeliji i hemijskog potencijala čiste vode pri istoj temperaturi i atmosferskom pritisku prema parcijalnoj molarnoj zapremini vode. Jednačina vodnog potencijala koja se upotrebljava za procjenu hidratacije kod biljaka glasi:

$$\psi_w = \psi_s + \psi_p + \psi_g + \psi_m$$

gdje je :

$\Psi_s$  – potencijal rastvorenih supstanci u vodi (koji opada s porastom koncentracije rastvorenih supstanci)

$\Psi_p$  – potencijal pritiska (fizička sila koja djeluje na vodu u okolini u kojoj se ona nalazi). Kad je voda podvrgnuta negativnom pritisku potencijal je manji od 0 MPa a vodni potencijal je smanjen; vodni potencijal raste sa pozitivnim pritiskom, tj. ako je potencijal pritiska  $> 0$  MPa.

$\Psi_g$ - gravitacioni potencijal, može imati značajan efekat kada se voda transportuje vertikalno, na dužinama većim od 5-10 metara, ali se ovaj potencijal može izostaviti ako se opisuje međućelijski transport, ili transport vode unutar malih biljaka.

$\Psi_m$  – matriks potencijal, koji dovodi do adhezije molekula vode na površinu različitih struktura, npr. ćelijskog zida i koloida, smanjujući vodni potencijal. Zbog malih vrijednosti matriks potencijala i njegove teške mjerljivosti, uticaj istog na vodni potencijal biljke se obično zanemaruje.

Vrijednost vodnog potencijala u zemljištu se najčešće kreće od -0,01 do -0,2 MPa, u biljkama od -0,1 do -10 MPa, dok je u atmosferi njegova vrijednost od -10 do -100 MPa (Stanković i sar., 2006). Gradijent vodnog potencijala je pokretačka sila za ascendentni tok vode od zemljišnog rastvora do korijena, od korijena kroz stablo do listova, i iz listova u atmosferu. U ćelijama listova najdominantniji uticaj imaju osmotski potencijal i hidrostatički pritisak (turgorov potencijal) koji nastaje usljed prodiranja vode u vakuolu usljed razlike u njenoj osmotskoj koncentraciji u odnosu na okolinu. Zbog toga dolazi do povećanja njene zapremine i pojačanog pritiska na protoplast i ćelijski zid, a taj pritisak se još naziva i turgorov pritisak, ili turgor (Cosgrove, 2016). Ćelija koja ima pozitivan turgorov pritisak se još naziva i turgidna, a ukoliko elastičnost njenog ćelijskog zida vrši pritisak u povratnom smjeru kažemo da je turgor potpun. Ukoliko biljne ćelije gube vodu

njihov turgor se smanjuje, popušta pritisak vakuole na protoplast te nastupa uvenuće (Weisz i sar., 1989). U tom slučaju ćelijski zid se skuplja dok ne dostigne donju granicu elastičnosti tj. dok se zapremina ćelije ne smanji za više od 20%. pri čemu dolazi do odvajanja protoplasta od ćelijskog zida i do nastanka plazmolize. Količina usvojene i odate vode zavisi od mnogih faktora sredine od kojih su najvažniji dostupnost vode u zemljištu, temperatura, vlažnost vazduha, ali i same kongenitalne osobine biljne vrste. Kada je količina vode koju biljka izgubi transpiracijom u atmosferu veća od one koju je usvojila iz zemljišta putem korijena, tada govorimo o vodnom stresu, vodnom deficitu ili sušnom stresu. Prema jačini moguće je razlikovati blagi, srednji i jaki vodni stres. Mjera jačine stresa je smanjenje vodnog potencijala ćelije od 1 bara (blagi), 1-10 bara (srednji) i više od 10 bara (jak stres), (Stanković i sar. 2006). Većina biljaka se susreće sa prolaznim dnevnim varijacijama sadržaja vode te doživljava blagi vodni deficit u toplim i suvim sunčanim danima, ali kada u ekosistemima nastupi dugotrajni nedostatak vode, od nekoliko nedjelja ili čak mjeseci dolazi do uvenuća sa većim posljedicama te do letalnog ishoda (Sanders i Arndt, 2012). U tom slučaju biljke nemaju više sposobnost da povrate izgubljenu vodu i uspostave svoju prijašnju masu jer su nastala trajna oštećenja vegetativnih organa.

## **2.2. NEDOSTATAK VODE (SUŠA) KAO ABIOTIČKI EKOLOŠKI FAKTOR**

U hijerarhiji biljnih potreba, voda se nalazi na drugom mjestu, odmah iza potrebe za energijom sunčeve radijacije (Lestari i sar., 2011). Ipak, od svih ekoloških faktora voda ima najznačajnije formativno dejstvo na biljke. To je naročito izraženo ukoliko se uzme u obzir njen uticaj na nadzemne dijelove, od kojih posebno listovi pokazuju izuzetnu varijabilnost i jasnu zavisnost morfoloških i anatomskih osobina u skladu sa većom ili manjom vlažnošću staništa (Xu i sar., 2009). Dostupnost vode je najvažniji faktor koji uslovljava aktuelni raspored biljnog svijeta na Zemlji u smislu geografske distribucije specifičnih tipova vegetacije (Kröel-Dulay i sar., 2004). Temperaturne varijacije duž geografske širine rezultat su nejednakog zagrijavanja Zemlje čemu doprinose njen sferični oblik i nagnutost ose, što se upravo proporcionalno reflektuje na distribuciju dostupne vode za biljke. Suša je meteorološki pojam, a označava produženi vremenski period u mjesecima ili čak godinama kada neka regija zabilježi nedostatak u opskrbi vodom, bila to podzemna ili površinska voda (Tate i Gustard, 2000). Nedostatak vode može biti zemljišni i atmosferski, a pri atmosferskoj suši relativna vlažnost vazduha je ispod 60 %. Do vodnog deficita može da dođe i u uslovima kada nije umanjena količina same vode, nego je ona u takvom obliku koji je nedostupan biljkama. To se dešava na zaslanjenim staništima gdje prisustvo visokih

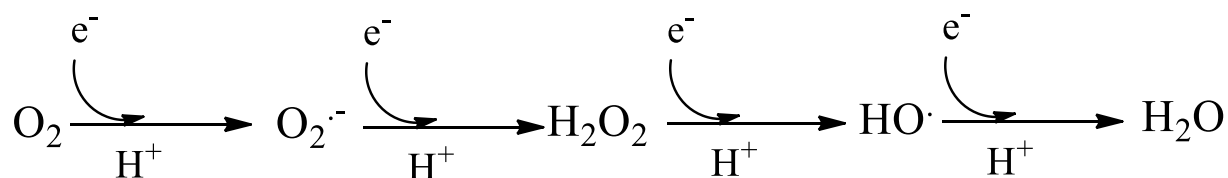
koncentracija soli otežava osmotske procese kojima biljke usvajaju vodu (Sofa i sar., 2015). Osim visokih, niske temperature takođe ograničavaju količinu dostupne vode budući da formirani kristali leda nisu adekvatan oblik za usvajanje, sa čime su suočene vrste polarnih područja i tundri (Beck i sar., 2007). Ovakvo stanje u kojem nije smanjena količina vode u životnoj sredini biljaka, nego je ona u neadekvatnom obliku za usvajanje predstavlja tzv. fiziološku sušu. Biljke su tokom evolucije života na Zemlji pronašle razna rješenja u adaptaciji na život u područjima sa ograničenom količinom vode. Uporedno formiranje više različitih životnih formi na istom ekološkom području je od izuzetnog evolutivnog značaja, pa je onda i razumljivo da sve adaptacije počivaju na molekularno-biohemijском nivou, što rezultuje prilagođavanjem anatomskih i ekofizioloških osobina. Prema nekim procjenama, oko 90% obradivog zemljišta je pod uticajem jednog ili više stresnih faktora životne sredine (Dita i sar., 2006), od čega je oko 26% ugroženo nedostatkom vode (Shao i sar., 2008). Smatra se da u poređenju sa svim ostalim vrstama abiotičkog stresa kojima su biljke izložene, suša najviše utiče na njihov rast i produktivnost kao i da gubici prinosa u poljoprivrednoj proizvodnji uzrokovani sušom vjerovatno premašuju gubitke uzrokovane svim ostalim faktorima zajedno (Foolad, 2007). U fiziološkom smislu može se reći da suša predstavlja odsustvo vlage koja je neophodna da bi se biljka normalno razvijala i da bi završila životni ciklus (Zhu, 2002). U uslovima suše kod biljaka dolazi do niza fizioloških, biohemijских i molekularnih promena kao što su zatvaranje stoma, smanjenja intenziteta fotosinteze, promjene ekspresije gena, redukcija nadzemnog dijela biljke, korijena te fotosintetički aktivne površine i kao rezultat svega redukovana je produkcija biomase (Kranner, 2002). Biljke najčešće prepoznaju stres na nivou membrana i to zahvaljujući prisustvu receptornih proteina za koje se vezuju signalni molekuli (npr. G proteini, receptori abscisinske kiseline-ABA itd.) (Wu i Urano, 2018). Reakcija na stres započinje percepcijom signala, vezivanjem liganda (signalnih molekula) za receptore na nivou membrana i aktiviranjem kaskada intracelularnih signalnih reakcija koje prenose informaciju o stresu kroz ćeliju (transdukcija signala). Zatim dolazi do ekspresije određenih gena i sinteze stres proteina, ćelija reaguje u specifičnom metaboličkom odgovoru i kao rezultat svega nastaje određena fiziološka reakcija. Dejstvo stresnih faktora na biljke može biti primarno, ali i sekundarno nastalo kao rezultat indukcije sekundarnih stresogenih faktora pod dejstvom primarnih faktora. Zbog toga je razumijevanje mehanizama homeostaze jona i tolerancije biljaka na sušu uopšte od ključnog značaja i generiše jednu od glavnih tema istraživanja današnjice.



## 2.3. GENEZA OKSIDATIVNOG STRESA U BILJNIM ĆELIJAMA U USLOVIMA SUŠE

### 2.3.1. Reaktivne vrste kiseonika

Sva živa bića trebaju kiseonik za efikasnu proizvodnju energije u mitohondrijama. Kiseonik kao krajnji akceptor elektrona kod svih aerobnih organizama neophodan je u procesu disanja pri kojem se organska materija (energetski supstrat) razlaže do ugljen dioksida i vode uz oslobađanje ekvivalentne količine energije. Pored toga što je neophodan za život, kiseonik može biti izuzetno toksičan gas. Kada se kaže toksičnost kiseonika prije svega se misli na to da u procesu njegove jednovalentne redukcije mogu nastati reaktivne vrste kiseonika - ROS. Većina ovih vrsta je kratkoživeća, a mogu nastati termolizom, elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim procesima i hemijskim procesima (Acworth, 2003). Najreaktivnije hemijske vrste su superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) (Halliwell i Gutteridge, 1999). ROS se najviše poistovjećuju sa slobodno radikalskim oblicima kiseonika, međutim postoje i neradikalski oblici. Slobodni radikal je hemijska vrsta koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona koji postoje u atomskoj ili molekularnoj orbitali samostalno. Dva elektrona u molekulu kiseonika su smještena u dvije degenerisane molekulske orbitale te imaju paralelni spin i to je osnovno (triplet) stanje  $O_2$  koje je najstabilnija forma koja postoji. Zbog suprotnog spina, kiseonik u ovakvom stanju preferira prihvatanje elektrona jedan po jedan pa to čini u procesu jednovalentne redukcije, što objašnjava njegovo sporo reagovanje sa većinom neradikala (Slika 2.).



Slika 2. Šematski prikaz postepene, jednovalentne redukcije kiseonika do vode (Original)

#### *Singlet kiseonik ( $^1O_2$ )*

Ovaj oblik ROS ne sadrži nesporene elektrone pa se ubraja u neradikalske vrste i predstavlja prvo pobuđeno elektronsko stanje  $O_2$ , a može nastati apsorpcijom energije koja dovodi do promjene spina iz triplet stanja u singlet stanje (Foote i sar., 1985). Zbog toga što je singlet kiseonik veoma reaktivan, vjeruje se da on ima veoma karatak poluživot u biološkim sistemima

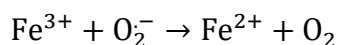
(oko 200 ns) te ga je zbog toga teško detektovati (Gorman i Rodgers, 1992). Međutim, postoje istraživanja koja ukazuju da poluživot singlet kiseonika u ćelijama može biti mnogo duži od 200 ns, čime omogućava njegovu veću migraciju čak i preko ćelijskih membrana te da može sam djelovati kao signalna molekula (Skovsen i sar., 2005).

#### *Superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ )*

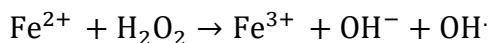
Superoksid radikal nastaje redukcijom kiseonika jednim elektronom (Fridovich, 1995). Međutim, nastanak  $O_2^{\cdot-}$  može uticati na formiranje reaktivnijih ROS oblika kao što su hidroksil radikal i češće singlet kiseonik (Halliwell, 2006). Prenosom elektrona na  $O_2^{\cdot-}$  nastaje peroksidni jon ( $O_2^{2-}$ ) koji je neradikalni oblik sa slabom O-O vezom. Dalje, prenosom još dva elektrona na  $O_2^{2-}$  raskida se O-O veza i nastaju dva oksidna jona  $O^{2-}$ . U biološkim reakcijama proizvod dvoelektronske redukcije kiseonika je vodonik peroksid, a četvoroelektronski voda.

#### *Hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ )*

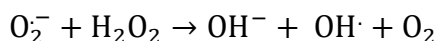
Hidroksil radikal je jako reaktivan i kratkoživeći oblik slobodnog radikala a predstavlja neutralnu formu hidroksilnog jona. Najveća količina hidroksil radikala nastaje pri raspadu vodonik peroksida ili u atmosferi prilikom reakcije atomskog kiseonika sa vodom. Hidroksil radikal, ( $OH^{\cdot}$ ) sa kratkim vremenom života od oko  $10^{-6}$  s u vodi, je trenutno najmoćniji oksidans od svih ROS oblika i u mogućnosti je da brzo oksiduje većinu organskih jedinjenja. Neki autori smatraju da  $OH^{\cdot}$  može da oksiduje u potpunosti gotovo svako jedinjenje (Laurie i Waterhouse, 2006). Krajem 19. vijeka naučnik Fenton je opisao reakciju vodonik peroksida sa Fe u kojoj nastaje  $OH^{\cdot}$ . Hidroksil radikal takođe nastaje iz  $H_2O_2$  u prisustvu superoksidnog anjona (Haber-Vajsova reakcija). Reakcija se odigrava sporo, uz katalitičko dejstvo jona željeza. Prvi korak ovog katalitičkog ciklusa uključuje redukciju feri jona u fero jon:



Sljedeći korak je Fentonova reakcija:



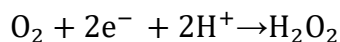
Neto reakcija:



Ova reakcija je nazvana po naučniku Fricu Haberu (Fritz Haber) i njegovom studentu Vajsu (Joseph Joshua Weiss).

### *Vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Vodonik peroksid je neradikalna vrsta ROS, jer nema nesparene elektrone a nastaje kao netastabilan proizvod redukcije kiseonika:



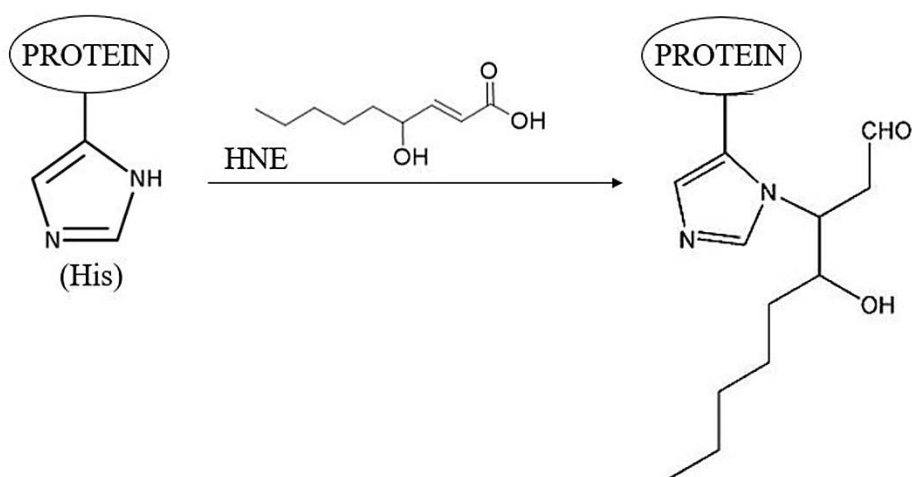
Nastali vodonik peroksid u prisustvu jona željeza ili bakra daje reaktivne hidroksilne radikale i/ili hipohloritnu kiselinu (HOCl) u prisustvu Cl<sup>-</sup> (hloridnog anjona). Osim toga što direktno može da reaguje sa nekim molekulama (npr. sa proteinima) njegova toksičnost se i indirektno ispoljava kroz reakciju sa superoksid radikalom u prisustvu prelaznih metala (Fe, Cu ili Mn) i stvaranja visokoreaktivnog hidroksil radikala (Fentonova reakcija).

### **2.3.2. Oksidativni stres u uslovima suše**

Jedna od neizbježnih posljedica vodnog deficita je povećana proizvodnja ROS u različitim ćelijskim organelama, naročito u onima u kojima su prisutne visoke koncentracije kiseonika, a to su hloroplasti, peroksizomi i mitohondrije. Naime, najčešći način izbjegavanja prekomjerne transpiracije listova u uslovima suše jeste proces zatvaranja stominih otvora koje je posredovano signalnom transdukcijom putem ABA, a negativna posljedica ovog procesa jeste narušavanje odnosa CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> u ćelijama, što za sobom povlači i štetne uticaje na fotosintetički aparat (Medrano i sar., 2002; Lehmann i Or, 2015). Nedostatak CO<sub>2</sub> uzrokuje disbalans između apsorbirane i usvojene svjetlosne energije koja u tom slučaju biva alternativno usmjerena na kiseonik, što dovodi do hiperprodukcije ROS (Takahashi i Murata, 2008). Remećenje normalnog toka u procesima fotosinteze i ćelijskog disanja uzrokovano nedostatkom CO<sub>2</sub> uslovljava i poremećaj regeneracije NADP<sup>+</sup>, zbog čega nastupa pojačano „curenje“ elektrona prema kiseoniku i intenzivnije proizvodnje superoksid anjon radikala i vodonik peroksida (Veljović-Jovanović, 1998; Noctor i sar., 2002). Nadalje, reakcija između superoksida i vodonik peroksida u prisustvu jona prelaznih metala (Fe<sup>+2/+3</sup> i Cu<sup>+1/+2</sup>) uslovljava nastanak hidroksil radikala (Akashi i sar., 2004). Dosadašnja istraživanja uticaja suše na nastajanje toksičnih oblika kiseonika ukazuju na činjenicu da se u uslovima suše gradi najviše hidroksilnog radikala što je posljedica povećane koncentracije jona Fe i Cu u biljnim tkivima (Kukavica i sar., 2009; Morina i sar., 2010). Takođe je pokazano da suša

povećava brzinu proizvodnje vodonik peroksida dobijenu preračunavanjem, i do 70 %, dok Mehlerova reakcija doprinosi 10% (Noctor i sar., 2002). U normalnim fiziološkim uslovima proizvodnja i uklanjanje ROS su dobro regulisani ćelijskim metabolizmom. Kad su biljne ćelije izložene nepovoljnim uslovima duži period, proizvodnja ROS će preovladati nad sistemima uklanjanja. Tada u ćelijama nastupa stanje tzv. oksidativnog pritiska koji se definiše kao pomak ravnoteže u ćelijskim oksidaciono-redukcionim reakcijama u smjeru oksidacije. Pošto reaktivne vrste kiseonika iscrpe antioksidativni kapacitet ćelije dolazi do nekontrolisanih oksidacija biopolimera, što naravno utiče na njihovu strukturu i funkciju izazivajući oksidativni stres. Ta oštećenja obuhvataju polinezasićene masne kiseline, ugljene hidrate, proteine i nukleinske kiseline (Hendry, 1993). Pri tome se narušava pre svega redoks homeostaza jona, jonski balans, prenos signala u ćeliji, genska transkripcija i niz drugih procesa. Reakcija ROS sa organskim supstratima je kompleksna čak i u *in vitro* uslovima, a u biološkim sistemima dolazi do još većih komplikacija zbog osobina površine membrane, elektro potencijala i osobina veza unutar makromolekula. Dokazano je da u uslovima suše povećan nivo ROS, prije svega superoksid anjon radikal i hidroksil radikal indukuje lipidnu peroksidaciju (Navari-Izzo i sar., 2002; Pandey i sar., 2010). Oštećenja membranskih lipida u biljnim ćelijama su skoro isključivo povezana sa reakcijama peroksidacije, a najviše na položajima dvostrukih veza polinezasićenih masnih kiselina. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksil radikal, a obilježavaju ga tri stepena: inicijacija, propagacija i terminacija. Reakcija molekularnog kiseonika sa polinezasićenim masnim kiselinama spinski je onemogućena, stoga je peroksidacija moguća slobodno-radikalnim mehanizmom kojim se premošćuje spinska restrikcija. Peroksidacija nezasićenih masnih kiselina započinje napadom hidroksil radikala sposobnog da izdvoji atom vodonika iz metil grupe masne kiseline pri čemu nastaju slobodni lipidni radikali (Halliwell, 1991). Ukoliko ćelija ne raspolaže dovoljnom količinom antioksidativnih molekula dolazi do lančane reakcije (faza propagacije) u kojoj lipidni hidroperoksidi disosuju do lipoksidnog i peroksil-radikala koji reiniciraju peroksidaciju a te reakcije katalizuju atomi željeza. Reakcije se nastavljaju sve dok nastali radikali ne reaguju međusobno tokom faze terminacije, pri čemu nastaju tercijarni produkti oksidacije, stabilni i nereaktivni dimeri i polimeri. Negativne posljedice lipidne peroksidacije nastupaju zbog nakupljanja krajnjih proizvoda, odnosno aldehida i ketona. U tom smislu najveći problem predstavljaju 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) i malondialdehid (MDA) koji reaguju sa aminokiselinskim ostacima proteina i sa nukleinskim kiselinama dovodeći do značajnih oštećenja

ćelijskih struktura (Adams i sar., 1999). Tako je oksidacija proteina jedna od negativnih posljedica oksidativnog stresa nastalog zbog uticaja suše (Bartoli i sar., 2004). Najčešći ishod oksidativne modifikacije proteina je nastajanje tzv. karbonil proteina. Karbonilne grupe (-C=O) nastaju direktnom oksidacijom aminokiselinskih sekvenci na bočnim stranama polipeptidnog lanca, najčešće kod hidrofилnih aminokiselina kao što su prolin, arginin, lizin i treonin, čineći ih hidrofobnijim i podložnijim za agregaciju (Ciacka i sar., 2020). Osim ovog načina, karbonilne grupe mogu biti uvedene u proteine u sekundarnim reakcijama usljed djelovanja proizvoda lipidne peroksidacije (HNE i MDA) na mjestima histidinskih, cisteinskih i lizinskih ostataka (Slika 3.). Oksidativna oštećenja ovih bočnih aminokiselinskih ostataka u reakciji sa HNE se manifestuju kroz formiranje Šifovih baza (reagovanjem aldehidne grupe HNE sa amino grupom) ili kroz Majklovu reakciju (nukleofilna adicija). Takođe uvođenje karbonilne grupe nastupa u reakciji sa reaktivnim karbonil derivatima (keto amini, keto aldehidi) nastalim kao posljedica redukcije šećera ili njihovih produkata oksidacije sa lizinskim ostacima (glikooksidacija) (Grune i sar., 2003, Sullivan i sar., 2003). Proizvodi lipidne peroksidacije (npr. MDA) mogu takođe da štetno reaguju sa nukleinskim kiselinama, pri čemu je guanin u DNK molekulu najčešća meta napada, što dovodi do mutacija i na kraju do narušavanja fizioloških aktivnosti proteina. Važna osobina karbonilnih proteina je da je njihovo nastajanje nepovratno a nastale promjene u konformaciji dovode do smanjenja katalitičke aktivnosti enzima i same funkcije proteina (Xun-Liang i sar., 2012).

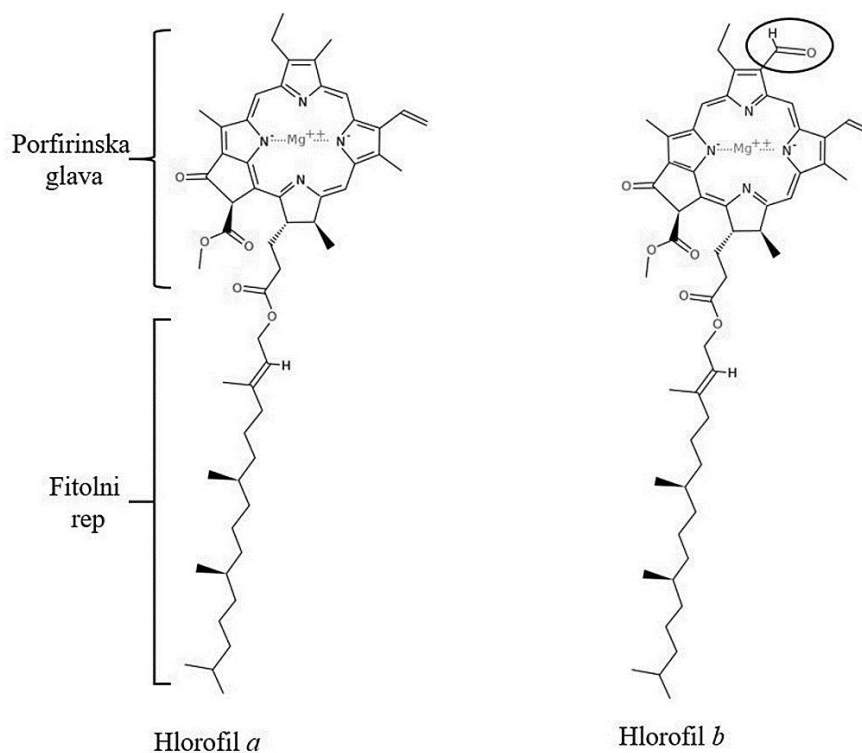


Slika 3. Reakcija HNE sa histidinskim ostatkom u bočnom aminokiselinskom nizu proteina (Original)

## 2.4. UTICAJ SUŠE NA PROCES FOTOSINTEZE

### 2.4.1. Fotosintetički pigmenti

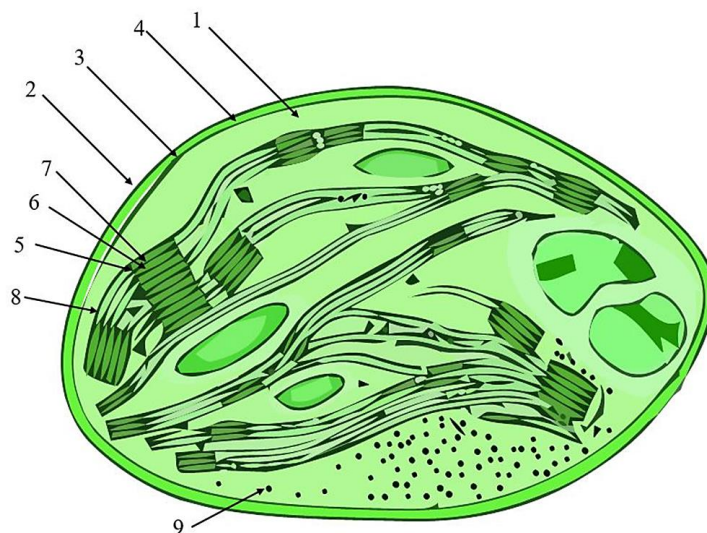
Hlorofili su glavni fotosintetički pigmenti a predstavljaju jedne od najvažnijih bioorganskih jedinjenja u biljnim ćelijama, prije svega zbog centralne uloge koju imaju u procesu svijetle faze fotosinteze. U hemijskom pogledu hlorofili su estri dikarbonske kiseline hlorofilina, u kojoj je jedna karboksilna grupa esterifikovana metanolom, a u druga alkoholom fitolom. Molekul hlorofila ima strukturu porfirinskog tipa: posjeduje četiri pirolova prstena koordinisana centralnim atomom magnezijuma u sredini (Woodward i sar., 1960). Raspored dvostrukih veza porfirinske strukture je konjugacioni (naizmjenični raspored jednostrukih i dvostrukih veza) što je od presudnog značaja za ulogu koju hlorofil ima u fotosintezi, jer konjugacija pomjera apsorpcioni maksimum ka većim talasnim dužinama, u vidljivu oblast sunčevog spektra. Postoji više vrsta hlorofila, a u višim biljkama su zastupljeni hlorofil *a* i hlorofil *b* koji se veoma malo razlikuju u sastavu bočnih lanaca (Slika 4.). Kod hlorofila *a* na poziciji C-7 vezana je metil (-CH<sub>3</sub>), a kod hlorofila *b* aldehidna (-CHO) grupa (Scheer, 2007).



Slika 4. Hemijska struktura hlorofila *a* i *b* (preuzeto sa wikimedia commons, kategorija CC-BY-SA: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorophyll\\_a.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorophyll_a.svg)).

Fotosintetički pigmenti karotenoidi su lipofilne organske komponente koje imaju ulogu pomoćnih pigmenta jer vrše apsorpciju svjetlosti na talasnoj dužini od 400 do 550 nm i prenos do hlorofila (Niyogi i sar., 2001). Karotenoidi obuhvataju dvije klase jedinjenja, karotene i ksantofile, koji su u hemijskom smislu ugljenovodonici sastavljeni od osam molekula izoprena kondenzovanih u dugački niz sa više dvostrukih veza (alkeni) i sa jononskim prstenovima na oba kraja. Poznato je više od 80 karotenoida a zajednička im je osnovna građa fitoen (40 C atoma). Najpoznatiji karoteni su  $\beta$ -karoten (provitamin A) i likopen, i oni su narandžaste boje. Ksantofili imaju žutu boju i oni su ustvari oksidovani oblici karotena koji sadrže kiseonik u okviru hidroksilne, keto ili karboksilne grupe. Poznati su lutein, violaksantin, neoksantin, zeaksantin.

Fotosintetički pigmenti su smješteni u hloroplastima. Hloroplasti su sa dvije lipoproteinske membrane, spoljašnjom i unutrašnjom, između kojih se nalazi međumembranski prostor širok 10-20 nm (Cooper i Hausman, 2007). Unutrašnjost hloroplasta ispunjava proteinski matiriks nazvan stroma koji sadrži tilakoidni sistem, genom hloroplasta (DNK, RNK), ribosome (70S), plastoglobule, skrob, metaboličke enzime, različite metabolite i međuprodukte metabolizma. Budući da imaju vlastitu DNK i ribosome, ove ćelijske organele imaju i određeni stepen nezavisnosti u sintezi proteina (Alberts i sar., 2002). Osim unutrašnje i spoljašnje membrane, hloroplasti imaju i treći membranski sistem nazvan tilakoidna membrana koji sadrži fotosintetičke pigmente organizovane u fotosisteme (Slika 5.). Tilakoidna membrana oblikuje mrežu pljosnatih okruglih pločica nazvanih tilakoidi (grč. thylakoides - vrećast), a one ograničavaju intratilakoidni prostor (lumen tilakoida) tako da hloroplasti imaju tri različita unutrašnja diela: međumembranski prostor, stroma i lumen tilakoida. Razlikuju se grana tilakoidi i stroma tilakoidi. Grana tilakoidi su gusto posloženi paralelno, jedan iznad drugog poput stubića, formirajući strukture nazvane granumi (lat. granum- zrnce, jer pod svetlosnim mikroskopom izgledaju kao zrnca), dok se stroma tilakoidi protežu kroz stromu i povezuju granume. Pretpostavlja se da su lumeni svih tilakoida međusobno povezani u jedinstven prostor. Molekularna struktura tilakoidnih membrana prilično je složena, a čine je različiti proteinski kompleksi u kojima se nalaze fotosintetički pigmenti (hlorofili, karotenoidi), koji učestvuju u svijetloj fazi fotosinteze.



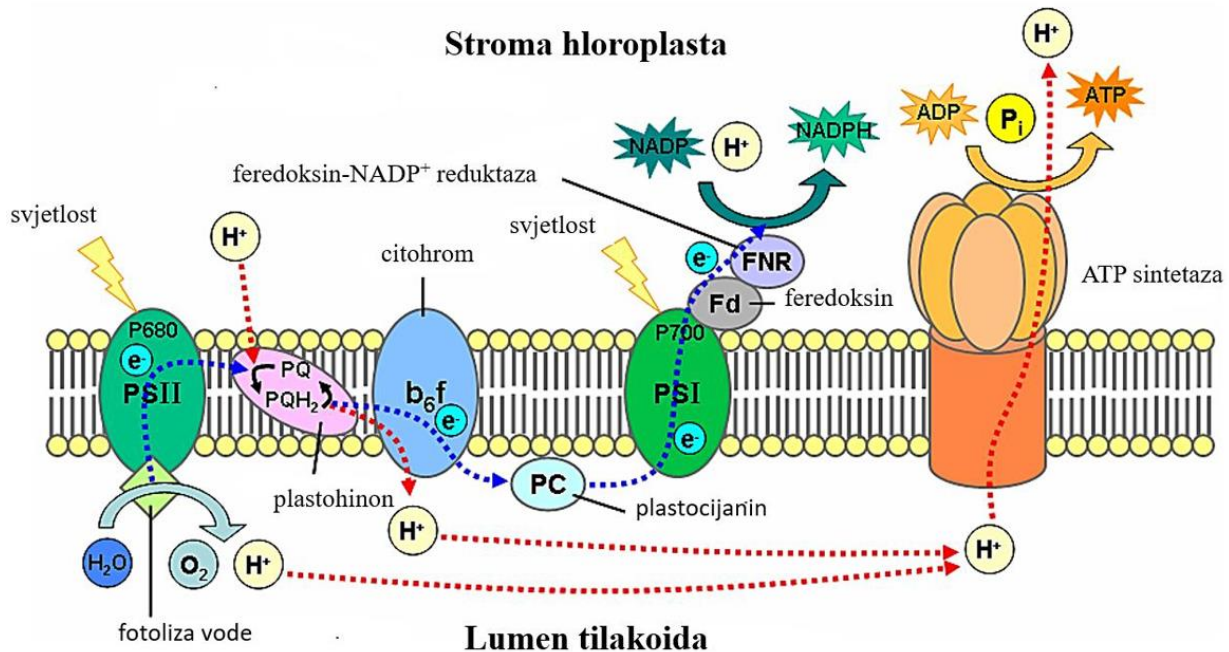
Slika 5. Šematski prikaz strukture hloroplasta: 1-stroma; 2- spoljašnja membrana; 3- unutrašnja membrana; 4- intermembranski prostor; 5- grana tilakodi; 6-lumen tilakodia; 7-tilakoidna membrana; 8- stroma tilakodi; 9- ribozomi (Original).

#### 2.4.2. Poremećaj fotosintetičkog metabolizma u uslovima suše

U energetsom smislu fotosinteza je oksidoredukcioni proces u kojem dolazi do oksidacije vode, koja je donor elektrona i protona te do redukcije ugljendioksida, gdje se uz pomoć svjetlosne energije sintetišu energetski bogata organska jedinjenja iz neorganskih prekursora. Fotosintezu čine dva procesa: svijetla faza koja se odvija u membranama tilakoida i tamna faza (Benson-Kalvinov ciklus) koja se odvija u stromi hloroplasta. Najkraće rečeno, u normalnim fiziološkim uslovima, tok elektrona u svijetloj fazi je usmjeren od fotosistema II (PS II) ka fotosistemu I (PS I) preko prenosioca elektrona i protona na  $\text{NADP}^+$ , pri čemu oba fotosistema djeluju kooperativno da bi podigli elektrone sa nivoa donora niskog potencijala (voda) do nivoa akceptora visokog potencijala (Slika 6.). Potom u tamnoj fazi kod većine biljaka prvo dolazi do vezivanja (asimilacije) atmosferskog  $\text{CO}_2$  za ribulozo-1,5-bisfosfat u reakciji koju katalizuje enzim ribulozo-1,5 bisfosfat karboksilaza/oksigenaza ili popularno nazvan *Rubisco* (Dhingra i sar., 2004). U prvoj fazi Kalvinovog ciklusa  $\text{CO}_2$  reaguje sa ribulozo-1,5-bisfosfatom pri čemu nastaje 3-fosfoglicerinska kiselina (3-PGK). Kako ovo jedinjenje ima 3 C atoma i napušta hloroplast kao prvi fotosintetički proizvod ovaj proces je nazvan C3 fotosinteza i on predstavlja dominantan način fotosintetičkog metabolizma u svijetu biljaka. Nakon toga, redukovani NADPH uz pomoć energije dobijene u svijetloj fazi (ATP) biva iskorišten za prevođenje 3-fosfoglicerata u gliceraldehid-3-

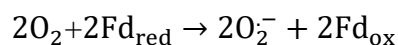


fosfat, a samo jedna šestina od ukupne dobijene količine ove trioze se u kasnijim reakcijama iskoristi za nastanak heksoza. Sve ostale molekule dobijenog gliceraldehid-3-fosfata bivaju konvertovane u ribulozo-1,5-bisfosfat, čime se zatvara ciklus pri čemu je ugljen-dioksid krajnji akceptor elektrona. U suštini, može se reći da je cilj Kalvinovog ciklusa asimilacija CO<sub>2</sub> a ovaj proces se odvija kroz više faza u kojem učestvuju brojni enzimi, a krajni ishod je nastanak saharoze koja se transportuje u biljci do tkiva potrošača gdje se razlaže na glukozu i fruktozu.



Slika 6. Šematski prikaz transporta elektrona u svjetloj fazi fotosinteze: PS I- fotosistem I, PS II- fotosistem II, ATP-adenozin trifosfat; ADP- adenzin difosfat; NADP-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; Pi-neorganski fosfat. Preuzeto sa wikimedia commons, kategorija CC-BY-SA: [https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=electron+transfer+light+photosynthesis&title=Special%3ASearch&go=Go&ns0=1&ns6=1&ns12=1&ns14=1&ns100=1&ns106=1#/media/File:Thylakoid\\_membrane.png](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=electron+transfer+light+photosynthesis&title=Special%3ASearch&go=Go&ns0=1&ns6=1&ns12=1&ns14=1&ns100=1&ns106=1#/media/File:Thylakoid_membrane.png)

U slučaju pretjeranog opterećenja aktivnosti elektron transportnog lanca zbog smanjene dostupnosti NADP<sup>+</sup> kao posljedice stresnih uslova, dolazi do „isticanja“ elektrona sa feredoksina prema kiseoniku što rezultira nastankom superoksid anjon radikala (Elstner i Osswald, 1994). Ovaj proces je poznat pod nazivom Melerova reakcija:



Alan Mehler je 1951. godine otkrio da hloroplasti mogu da koriste kiseonik kao primaoca elektrona a ova reakcija ima konkurenciju od strane cikličnog transporta elektrona kod fotosistema I (Heber i Walker, 1992; Bendall i Manasse 1995). U ovom procesu umjesto izdvajanja O<sub>2</sub>, dolazi do njegovog usvajanja, pri čemu nastaje ATP ali ne i NADPH. Iako je nastala količina ATP-a manja nego u uobičajenom transportu elektrona, ona je značajna kao izvor energije u stresnim uslovima. Međutim, negativna posljedica Melerove reakcije je što usljed redukcije O<sub>2</sub> dolazi do produkcije visoke koncentracije superoksid anjon radikala, a kasnije i vodonik peroksida što dovodi do intoksikacije u elektron transportnom lancu (Heber i Walker, 1992). Zbog toga se u stresnim uslovima intenzivira fenomen „fotohemijskog utišavanja“ koje se manifestuje prenosom energije sa hlorofila na karotene ili ksantofile koji preuzimaju elektrone na sebe i prelaze u pobuđeni oblik a na taj način štite fotosistem od tripletnog hlorofila ili singlet kiseonika. Ksantofili ispoljavaju važnu ulogu i u „nefotohemijskom utišavanju“ koje podrazumijeva „filtriranje“ energije koja ulazi u fotosistem. Ksantofilski ciklus se aktivira usljed stvaranja gradijenta protona na tilakoidnoj membrani, odnosno sniženja pH u lumenu tilakoida a temelji se na deepoksidaciji violaksantina u anteraksantin i zeaksantin prilikom intenzivne osvjetljenosti. Zeaksantin primljenu energiju emituje u obliku toplotne energije i tako sprječava oštećenja fotosistema (Demmig-Adams i Adams, 1996). Zbog toga se u stresnim uslovima protok energije kroz fotosintetički aparat mijenja i očituje se upravo povećanjem indeksa apsorpcije (Appenroth i sar., 2001, Lin i sar., 2009). Iako se ciklus ksantiofila uglavnom povezuje sa odgovorom na stres izazvan visokim intenzitetom svjetlosti dokazana je njegova uloga u adaptaciji biljaka na uslove suše izazvane visokim temperaturama (Peguero-Pina i sar., 2008) ili smrzavanjem (Sui i sar., 2007). Još neki literaturni podaci ukazuju da u uslovima vodnog deficita kod biljaka, dolazi do smanjenja kvantnog prinosa u fotosistemu II (PS II) te da ono može biti posljedica inaktivacije određenog broja racionih centara PS II što se vidi po njihovoj smanjenoj gustini (Bertamini i sar., 2007). U uslovima koji ograničavaju fiksaciju CO<sub>2</sub>, a to je prvenstveno suša, favorizuje se oksigenazna aktivnost enzima *Rubisco* čime se povećava fotorespiratorni tok, a formirani H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u peroksizomima se uklanja dejstvom katalaze. S obzirom na relativno visoke koncentracije prelaznih metala u fotosintetički aktivnim tkivima (prvenstveno Fe) povećana je proizvodnja OH• u tilakoidima kroz Fe-katalizovanu redukciju vodonik peroksida što predstavlja najveći opasnost za hloroplaste u uslovima sušnog stresa. Hidroksil radikal ima izuzetno jak oksidacioni potencijal jer je hemijski najreaktivniji oblik ROS, a osim toga ne postoji enzimska reakcija koja može direktno da ga

eliminira pa njegovo generisanje neminovno dovodi do reakcija koje oštećuju membrane tilakoida i fotosintetički aparat (Yokota i sar., 2002). Dokazano je da kod biljaka izloženih uticaju stresa dolazi do povećanog generisanja superoksid anjon radikala u tilakoidnim membranama hloroplasta, što dalje dovodi do oksidativnih oštećenja koja se manifestuju smanjenjem fluorescencije hlorofila *a* te do smanjenja kvantnog prinosa u fotosistemu II (Hideg i Schreiber., 2007). Oksidativni stres u ćelijama fotosintetičkih tkiva nastaje zbog pojačanog generisanja singlet kiseonika i superoksid anjon radikala u hloroplastima (Hideg i sar., 2002), a u takvim uslovima dolazi do fotoinhibicije u fotosistemu II te smanjenja koncentracije proteina D1 u reakcionom centru (Hideg i sar., 2007). Posljedica navedenih procesa je smanjena fotosintetička efikasnost kao i smanjen prinos.

### 2.4.3. Fotorespiracija u uslovima suše

Kod većine biljaka paralelno s fotosintezom, odvija se i proces fotorespiracije koji je često intenzivniji u odnosu na disanje u mraku. Fotorespiracija je usko povezana s fotosintezom, jer se odvija u uslovima intenzivne osvjetljenosti i visoke koncentracije kiseonika u odnosu na CO<sub>2</sub>. Zbog toga što enzim *Rubisco* može da ima i karboksilaznu i oksigenaznu aktivnost, CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> su konkurentni supstrati za jedno aktivno mjesto na supstratu, a *Rubisco* u oksigenaznoj reakciji koristi O<sub>2</sub> kao supstrat (Leegood, 1993). U fotorespiraciji učestvuju sukcesivno tri ćelijske organele, hloroplasti, peroksizomi i mitohondrije, a podrazumijeva se i citoplazma, koja ih okružuje. Biohemijski proces se sastoji od više segmenata, čiji su glavni sledeći koraci:

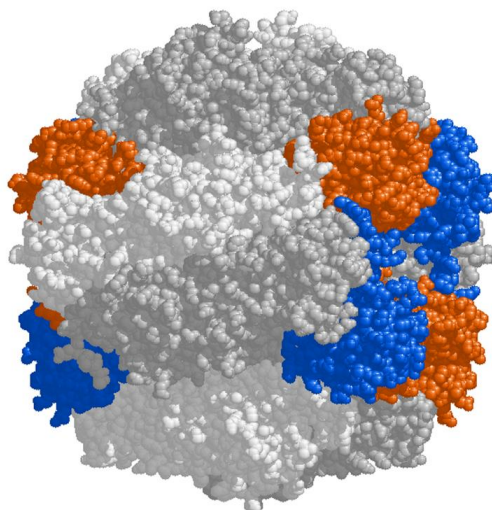
- oksigenacija ribulozo-1,5-bisfosfata i nastanak 3-fosfoglicerata i fosfoglikolata u hloroplastima u reakciji koju katalizuje *Rubisco* (fosfataza hidrolizuje 2-fosfoglikolat, u glikolat)
- oksidacija glikolata do glioksalata u peroksizomima (oslobađa se vodonik peroksid koga katalaza razgrađuje do vode i kiseonika),
- transaminacija glioksalata u glicin
- konverzija glicina u serin u mitondrijama
- regeneracija 3-fosfoglicerinske kiseline u saradnji sve tri organele

Temperatura značajno utiče na fotorespiraciju budući da je tad povećana koncentracija kiseonika u vazduhu i favorizovana je oksigenazna aktivnost *Rubisco*-a što ujedno umanjuje fotosintetičku aktivnost (Dai i sar., 1993). Osim visokih temperatura u sušnim uslovima visok intenzitet svjetlosti

i smanjena vlažnost također povećavaju fotorespiraciju uz istovremeno ograničenje asimilacije CO<sub>2</sub> fotosintezom (Pevalek Kozlina, 2003). Kao što je već pomenuto tokom suše tok elektrona može biti preusmjeren na O<sub>2</sub> u Melerovoj reakciji nakon čega se redukuje kiseonik do superoksid anjon radikala donacijom elektrona sa fotosistema I. U Melerovoj reakciji kao što se može zaključiti dolazi do formiranja potencijalno toksičnih vrsta kiseonika za razliku od cikličnog elektronskog transporta (Asada i Takahashi, 1987). Zato se fotorespiracija može okarakterisati i kao manje štetan izbor u uslovima suše, jer s jedne strane ona smanjuje fotosintezu i neto asimilaciju CO<sub>2</sub> ali se na taj način izbjegava produkcija superoksid anjon radikala u hloroplastima.

#### **2.4.4. Uticaj suše na aktivnost *Rubisco*-a**

Kao što je već pomenuto, prvi enzim tamne faze fotosinteze je ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (EC 4.1.1.39, *Rubisco*), a može da ima karboksilaznu ili oksigenaznu aktivnost. *Rubisco* se smatra jednim od najznačajnijih enzima u biološkom smislu, jer katalizuje hemijsku reakciju putem koje se neorganski ugljenik ugrađuje u organske komponente. Osim toga predstavlja jedan od najzastupljenijih proteina u listovima biljaka, pa tako spada u najdominantije proteine na Zemlji (Dhingra i sar., 2004). Ovaj enzim fiksira tri do deset molekula CO<sub>2</sub> u sekundi (Ellis, 2010). Zbog niskog Km za CO<sub>2</sub> (10-25 μM) afinitet za njegovo vezivanje je veoma izražen tako da je enzim aktivan i pri niskim koncentracijama ovog gasa (Eichelmann i Laisk, 1999; Kubien i sar., 2008). *Rubisco* je jedan od najobilnijih proteina u živom svijetu uopšte jer čini 50 % ili više od ukupne proteinske mase u fotosintetički aktivnim tkivima biljaka (Malkin i Niyogi, 2000) a odgovoran je za fiksiranje oko 200 milijardi tona CO<sub>2</sub> godišnje (Pevalek-Kozlina, 2003). Ovaj enzim ima molekulsku masu 560 kDa i sastoji se od osam velikih subjedinica (L) molekulske mase 55 kDa, te osam malih subjedinica (S) molekulske mase 15 kDa (Slika 7.). Velika subjedinica ima glavnu kataličku funkciju enzima (Andersson i Backlund 2008). Funkcija malih subjedinica nije potpuno jasna, iako se pretpostavlja da i one, na još nepoznat način, doprinose kinetičkim mogućnostima i specifičnostima (Spreitzer 2003, Genkov i Spreitzer 2009).



Slika 7: Model strukture enzima *Rubisco* u hloroplastima viših biljaka. Male subjedinice su prikazane narandžastom i plavom bojom, a velike svijetlo sivom i tamno sivom bojom (preuzeto sa wikimedia commons, kategorija CC-BY-SA: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rubisco.png>)

Aktivno mjesto *Rubisco*-a se nalazi na mjestu dodira C-terminusa u domenu jedne velike subjedinice sa N-terminusom u domenu druge. Kao kod većine dosad istraženih enzima sa  $\alpha/\beta$  strukturnim motivom i kod *Rubisco*-a je aktivni centar na C-terminusu  $\beta$ -nabrane ploče. Aminokiselinski ostaci u  $\beta$ -ploči i  $\alpha$ -heliksi sadrže evolutivno očuvane dijelove lanaca koji su esencijalni za vezivanje supstrata i katalitičku funkciju. Petlja 1 koja je determinisana kao sekvenca Lys175-Pro176-Lys177 i ima *cis*-konfiguraciju očuvana je u svim tipovima *Rubisco* molekula. Reakcija katalizovana ovim enzimom kao karboksilacija ili oksigenacija ostvaruje se kroz seriju povezanih koraka uz nastanak nestabilnih intermedijernih jedinjenja. Reakcija se odvija u tri ključne faze: aktivacija kondenzacijom  $\text{CO}_2$ , enolizacija supstrata i karboksilacija. Aktivacija uključuje kondenzaciju  $\text{CO}_2$  na deprotonovanom ostatku Lys201 i formiranje karbamata. Enolizacija ribulozo-1,5-bisfosfata u primarnoj fazi podrazumijeva abstrahovanje protona na C3 atomu, a donor protona je Lys175 (Hartman i sar., 1987). Jon  $\text{Mg}^{2+}$  pozicioniran na aktivnom mjestu igra ključnu ulogu u mehanizmu karboksilacije, jer formira stabilne koordinatne veze sa hidroksilnim grupama prelaznog intermedijera 2,3 endiola koji je neophodan za  $\text{CO}_2$  fiksaciju (Knight i sar., 1989). Nakon vezivanja *Rubisco*-a i RuBP prvi intermedijer, 2,3-endiol je nestabilno jedinjenje a njegovo dalje vezivanje za  $\text{CO}_2$  ili  $\text{O}_2$  zavisi od koncentracije gasova, temperature ili stabilnosti enzima i supstrata. Temperatura značajno utiče na fotosintezu budući da je tad povećana koncentracija kiseonika u vazduhu a kod *Rubisco*-a je favorizovana oksigenazna aktivnost, što

ujedno umanjuje fotosintetičku aktivnost i povećava fotorespiraciju (Perdomo i sar., 2017). Visoke temperature u uslovima suše dodatno doprinose intenzivnoj transpiraciju što uslovljava i progresivno zatvaranje stoma koje automatski ograničava i dostupnost CO<sub>2</sub>, što je usko povezano sa smanjenjem aktivnosti enzima *Rubisco*. Smanjenjem količine *Rubisco*-a dolazi do proporcionalnog smanjenja fiksacije CO<sub>2</sub>, a samim time i smanjenja neto fotosinteze (Prins i sar., 2007). Kao posljedica usporene reoksidacije dolazi do nagomilavanja redukovanog NADPH, pri čemu nema slobodnih akceptora koji bi primali elektrone (NADP<sup>+</sup>) te se oni dalje prenose na alternativne akceptore (Flexas i Medrano 2002). Tako nastala veća količina NADPH i ATP-a uslovljavaju povećanu redukciju plastohinona i zaustavljanje fotolize vode što vodi fotoinhibiciji (Mubarakshina i sar. 2006). Zbog toga dolazi do disbalansa između apsorbovane i iskorištene svjetlosne energije pa se ona rasipa u vidu toplotne energije, a sa povećanjem % termalne disipacije smanjuje se fotosintetička efikasnost. Dokazano je da je protein D1 primarno mjesto fotoinhibicije pa je kapacitet njegove izmjene (eng. turnover) od vitalnog značaja u procesu oporavka biljaka od ovog fenomena (Godde i Hefer, 1999). Da bi došlo do vraćanja PS II u normalu neophodna je *de novo* sinteza proteina D1, a ona se počinje odvijati kada stopa razgradnje prevazilazi stopu biosinteze u vrijeme fotoinhibicije. Najprije dolazi do degradacije proteina D1, a potom do sinteze novog prekursora koji se potom ugrađuje u tilakoidnu membranu, nakon čega se sklapa sa ostalim proteinima u PS II. Obradom C-terminusa dolazi do finalnog ugrađivanja D1 proteina što uslovljava smanjenje fotoinhibicije, a potpuni oporavak se dešava kada se biljka nađe u povoljnim uslovima. Ograničenje fiksacije CO<sub>2</sub> u uslovima suše uslovljava i pojačanu razgradnju RuBP i povećanje koncentracije intermedijernih šećernih fosfata kao što je ksiluloza-1,5-bisfosfat, što progresivno smanjuje kapacitet izmjene *Rubisco*-a. Inhibicija *Rubisco*-a šećernim fosfatima je uslovljena njegovom interakcijom sa *Rubisco* aktivazom, čija aktivnost zavisi od redoks statusa u hloroplastima te od odnosa ADP/ATP (Carmo-Silva i sar., 2015). Smatra se da je smanjenje hloroplastne koncentracije CO<sub>2</sub> u uslovima suše glavni razlog koji onemogućava inicijalnu aktivnost *Rubisco*-a i njegovu aktivaciju (Galmez i sar., 2011). U konačnici, kao posljedica smanjene aktivnosti Kalvinovog ciklusa dolazi do proteinske degradacije *Rubisco*-a koje najprije započinje u području velikih subjedinica (Parry i sar., 2002).

## **2.5. METABOLIČKE ADAPTACIJE BILJAKA NA SUŠU**

### **2.5.1. Anatomsko-morfološka prilagodavanja**

Biljke imaju veliku interspecijsku varijaciju u odnosu na stepen tolerancije na sušu, predominantno zasnovan na njihovim ekofiziološkim adaptacijama koje su razvile tokom evolucije (Bijlsma and Loeschcke 2005; Blum 2017). Generalno, u procesima prilagođavanja biljaka na sušu dolazi do aktiviranja i promjena u ekspresiji mnogih gena, što rezultuje brojnim biohemijskim, fiziološkim i najzad morfo-anatomskim promjenama (Kautz i sar., 2015). Najefikasniji način za čuvanje vode je smanjenje transpiracione površine kroz djelimičnu ili potpunu redukciju broja i površine listova. To se postiže uvrtnjem liske koji se pri određenoj dehidraciji cjevasto uvijaju, čime se štiti gornja površina na kojoj se nalaze stome, ograničava transpiracija, a ne sprječava apsorpcija CO<sub>2</sub>. Takođe, kod biljaka sušnih staništa tokom evolucije došlo je do pojačanog razvijanja kutikule, lignifikovanja ćelijskih zidova epidermisa i stvaranja omotača bijelih dlačica koje pojačavaju efekat „albada” i odbijaju intenzivnu sunčevu svjetlost. Korijen je obično ekstenzivnog tipa i prilagođen je intenzivnom upijanju vode te je više razvijen od izdanka. Palisadno tkivo je mnogo bolje razvijeno od sunderastog a nervatura listova je jako razgranata. Kod većine biljnih vrsta sušnih staništa stome su sitnije ali dosta brojne, čak i do 500 stoma po mm<sup>2</sup>. Često je prisutna žbunasta forma izdanka bez listova gdje funkciju fotosinteze preuzima stablo. Ipak najzastupljenije životne forme pustinskih kserofita su sukulentne životne forme sa sočnim mesnatim vegetativnim organima prilagođenim za skladištenje vode. U odnosu na to gdje skladište vodu biljke mogu da budu u formi stablovih sukulenti, gdje su listovi metamorfozirani u dlake i bodlje (biljke iz porodica Cactaceae, Euphorbiaceae) ili lisnatih sukulenti kao npr. kod vrsta roda *Aloe* ili *Agave*. Sve ove karakteristike su determinisane na molekularnom nivou a usklađene su sa evolutivno promijenjenim metaboličkim putevima koji omogućavaju bolje preživljavanje (Mundim i Pringle, 2018).

### **2.5.2. Evolutivne adaptacije fotosintetičkih puteva**

Sposobnost aklimatizacije biljaka na različite uslove sredine je direktno ili indirektno povezana sa njihovom sposobnošću da prilagode proces fotosinteze novonastalim uslovima, što zauzvrat utiče na biohemijske i fiziološke procese i posljedično na rastenje i razmnožavanje biljaka (Chandra i sar., 2008). Dostupnost vode biljkama je najvažniji faktor koji utiče na fotosintetičke procese jer od obezbjeđenosti biljke vodom prije svega zavisi turgidnot ćelija, odnosno otvorenost

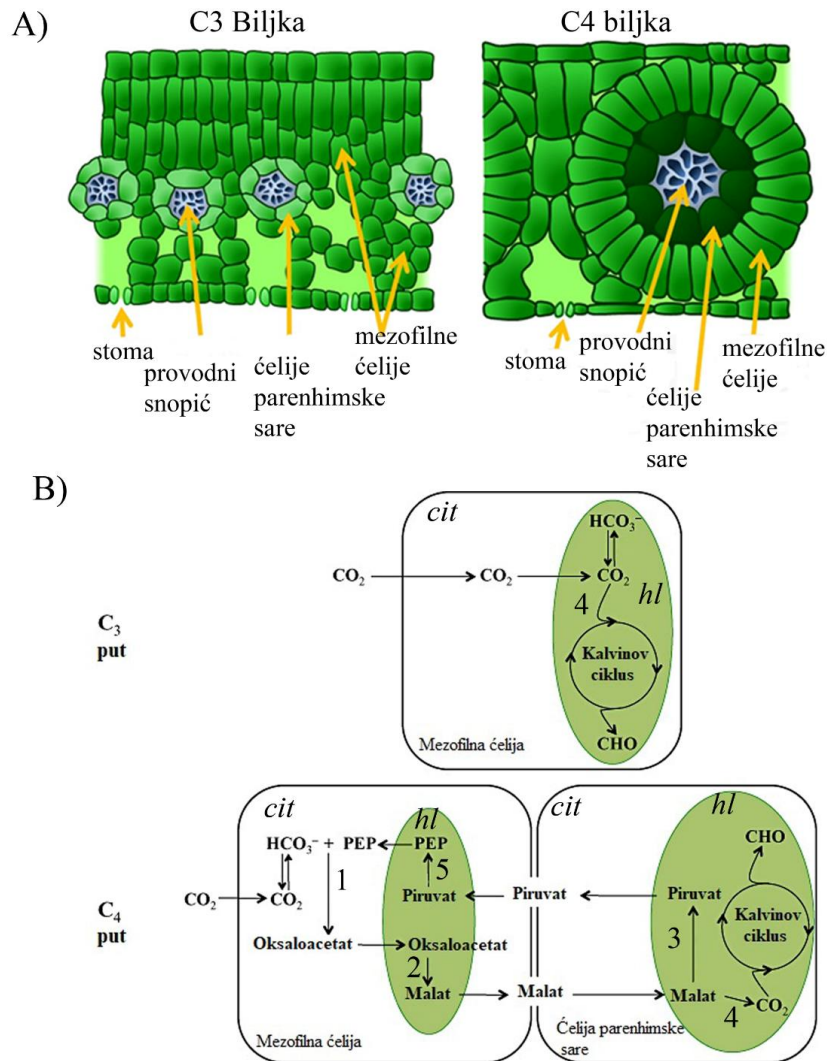
stominog aparata za ulaz CO<sub>2</sub>. Na sušnim staništima nedostatak vode obično je posljedica visokih temperatura koje naročito utiču na fotosintezu, pogotovo na tamnu fazu. Za većinu biljaka umjerene zone optimalni temperaturni opseg za odvijanje procesa fotosinteze nalazi se između 25 i 30 °C, a porast za oko 4 °C smanjuje karboksilaznu aktivnost *Rubisco*-a. Kod pustinjačkih biljaka optimalna temperatura za odvijanje procesa fotosinteze je 47 °C, dok je za biljke Arktika optimalna temperatura 15 °C (Škvorc, 2013). Tokom evolucije biljke koje žive na staništima sa ograničenom količinom vode i povišenom temperaturom razvile su neke druge načine fiksacije CO<sub>2</sub> u odnosu na C3 metabolizam. U godinama poslije otkrića Kalvinovog ciklusa pokazalo se da u tamnoj fazi fotosinteze postoje i drugi biohemijski procesi koji dopunjuju ovaj ciklus, ili se nadovezuju na neke njegove reakcije. Za razliku od C3 biljaka izvjesne vrste fiksiraju CO<sub>2</sub> na drugačiji način, tako da je prvi proizvod fotosinteze jedinjenje sa 4 atoma ugljenika (malat, aspartat, oksaloacetat), pa se taj proces zove C4 tip asimilacije CO<sub>2</sub> (Hatch i Slack, 1969; Ludwig, 2012). Listovi biljaka sa C4 metabolizmom imaju drugačiju anatomiju od biljaka sa C3 metabolizmom, budući da ih odlikuje prisustvo specifičnih tzv. „Kranz“ ćelija štapićastog oblika smještenih oko zone provodnih snopića (Slika 8., sekcija A). One su ustvari krupne ćelije zone parenhimske sare i sadrže hloroplasti agranalnog tipa. Ostale mezofilne ćelije posjeduju granalne hloroplasti a njihov sadržaj je drugačiji i po enzimima koje posjeduju. Naime, u mezofilnim ćelijama dominantan je enzim fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEPC, EC 4.1.1.31), dok se *Rubisco* i ostali enzimi Kalvinovog ciklusa nalaze u štapićastim ćelijama parenhimske sare koje okružuju provodni snopić (Lara i Andreo, 2011). Fiksacija CO<sub>2</sub> se odvija u ćelijama mezofila a Kalvinov ciklus u ćelijama sare. Karboksilacija fosfoenolpiruvata (PEP) se dešava uz pomoć bikarbonatnoj jona (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) u reakciji koju katalizuje PEPC u citoplazmi mezofilnih ćelija pri čemu nastaje oksaloacetat (Slika 8, sekcija B). U daljem procesu oksaloacetat se redukuje do malata ili se aminacijom prevodi do aspartata. Malat ili aspartat se transportuju u ćelije sare gdje se vrši dekarboksilacija pri čemu nastaju CO<sub>2</sub>, piruvat i NADPH. Oslobođeni CO<sub>2</sub> se uključuje u Kalvinov ciklus a piruvat se vraća u mezofil i služi za ponovnu sintezu PEP-a. Proizvodi fotosinteze se transportuju u floemske cjevčice i šalju u druge dijelove biljaka. Postoje tri različita podtipa ovog oblika fotosinteze u zavisnosti od načina dekarboksilacije u ćelijama sare: NADP- malatni tip sa malatom, NAD-malatni tip sa aspartatom i PEPC tip sa aspartatom. Najčešći je prvi navedeni način, pri kojem nastaju CO<sub>2</sub>, NADPH i piruvat a prisutan je kod kukuruza (*Zea mays*), šećerne trske (*Sacharum officinarum*) ili sirka (*Sorghum vulgare*) te kod vrsta trava oštrica iz roda *Cyperus* (Stanković,



2010). Prednost C4 biljaka u odnosu na C3 je u boljem fotosintetičkom kapacitetu koji može da bude i četverostruko veći (40 do 80 mg CO<sub>2</sub> dm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>). Osim toga PEPC ima mnogo nižu Km za CO<sub>2</sub> nego što to ima *Rubisco* (i do sedam puta) pa je njen afinitet za ugljendioksid visok čak i pri malim koncentracijama ovog gasa što je velika evolutivna prednost u uslovima intenzivne osvjetljenosti i visoke temperature kada je u atmosferi veća koncentracija kiseonika. Pored toga nema kompeticije između CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> za aktivno mjesto za PEPC. Takođe specifična anatomija listova C4 biljaka omogućava dobru izolovanost *Rubisco*-a u štapićastim ćelijama sare od sredine bogate kiseonikom tako da rjeđe dolazi do fotorespiracije. Zbog toga se C4 biljke često karakterišu kao visoko produktivne jer su bolje prilagođene uslovima suše, ekonomičnije troše vodu i daju bolji prinos (Cousins i sar., 2007).

Osim C4 fotosintetičkog puta u evoluciji biljaka razvio se još jedan specifičan tip asimilacije CO<sub>2</sub>, poznat pod nazivom CAM (eng. Crassulacean Acid Metabolism), nazvan po vrstama iz porodice Crasulaceae kod kojih je prvo otkriven (Winter i Smith, 1996). Za razliku od C4 biljaka kod kojih su fiksacija CO<sub>2</sub> i Kalvinov ciklus prostorno razdvojeni (štapićaste-Kranz ćelije i mezofilne ćelije), CAM biljke su ove dvije faze razdvojile vremenski (dan/noć). Inicijalna reakcija karboksilacije se kod njih dešava tokom noći kada su stome otvorene, da bi u toku dana nastavile normalno sa fotosintetičkim aktivnostima. CAM fotosinteza prvenstveno predstavlja strategiju za preživljavanje, a ne za visoku produktivnost. CAM biljke imaju 10-40 puta manju dnevnu produktivnost biljne biomase u odnosu na C3 biljke, odnosno 80-100 puta manju u odnosu na C4 biljke (Black, 1973). S obzirom na ovu prilagođenost, CAM biljke naseljavaju aridna, semiaridna i staništa slabo snabdjevena vodom. Karakteristična morfologija, fiziologija i konzervacija vode su osnovne osobine koje omogućavaju CAM biljkama da izbjegnu stres usljed nedostatka vode. Osnovna karakteristika CAM fotosintetičkog puta je modifikovani režim CO<sub>2</sub> fiksacije koja se odvija u nekoliko koraka (Osmond, 1978). Noću, kada su stome otvorene, CO<sub>2</sub> fiksacija se vrši u citoplazmi pomoću fosfoenolpiruvata (PEP) i katalizovana je fosfoenolpiruvat karboksilazom (PEPC), pri čemu nastaje oksaloacetat. Višak CO<sub>2</sub> tokom dana uslovljava visok parcijalni pritisak (*p*CO<sub>2</sub>) koji je dovoljan da izazove zatvaranje stoma, a prisustvo visoke koncentracije CO<sub>2</sub> u mezofilnim ćelijama ograničava kompeticiju sa O<sub>2</sub> za *Rubisco* i samim tim ograničava fotorespiraciju (Griffiths i sar., 2002). Nastali oksaloacetat se redukuje uz pomoć malat dehidrogenaze i daje malat koji se transportuje u vakuolu u kojoj se potom snižava pH. Povećavanjem akumulacije organskih kiselina, raste sadržaj CO<sub>2</sub>, koji se oslobađa

remobilizacijom organskih kiselina tokom dana, pa i ukupna fotosintetička efikasnost raste. Na kraju dana, kada je utrošena akumulirana organska kiselina, stome se mogu otvoriti i CO<sub>2</sub> se može fiksirati direktno pomoću *Rubisco*-a i uključiti u Kalvinov ciklus (Dodd i sar., 2002). U toku noći, CAM biljke glikolitičkim putem razgrađuju sintetisani skrob ili druge ugljene hidrate do trioza-fosfata, a od nastalih fosforilanih šećera se regeneriše PEP kao primarni akceptor CO<sub>2</sub> i time se ciklus završava.



Slika 8: Razlike u histološkoj građi lista (A) i mehanizmu fotosintetičkih puteva (B) između C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> biljaka: *cit*-citoplazma; *hl*-hloroplast; PEP- fosfoenolpiruvat; CHO- ugljeni hidrati; 1- fosfoenolpiruvat karboksilaza; 2- malat dehidrogenaza; 3- malat dekarboksilaza; 4- *Rubisco*; 5- piruvat ortofosfat dikinaza (Original).

### 2.5.3. Osmotska prilagodavanja

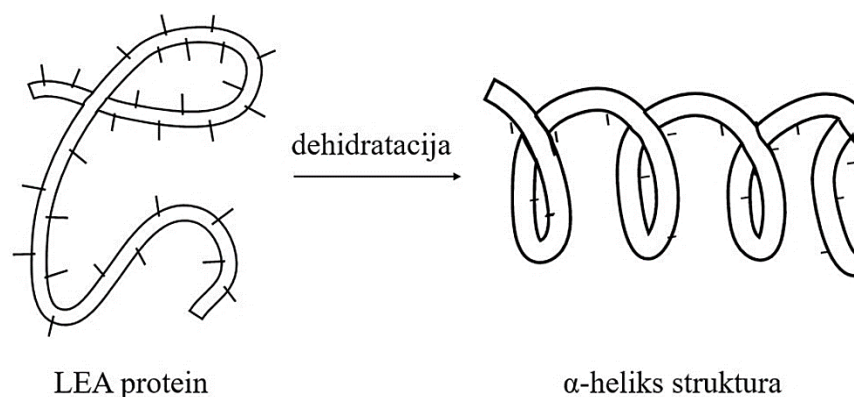
Smatra se da je kod biljaka koje su izložene dugotrajnim sušnim periodima osmotsko prilagođavanje od vitalnog značaja, a ono se sastoji u ukupnom povećanju brojnih rastvorenih komponenti u biljnoj ćeliji (Ahmed i Hasan, 2011). Na taj način ćelijski rastvor se pasivno koncentruje putem dehidracije pa tako osmotski potencijal korijena ostaje niži od osmotskog potencijala zemljišta. Tako se postiže kretanje vode iz zemljišta u biljku, a u ovom procesu veliku ulogu imaju osmoliti koji su veoma rastvorljivi i ne utiču na ćelijski metabolizam jer je njihovo naelektrisanje pri fiziološkim pH vrijednostima neutralno. Kompatibilna jedinjenja čija je odlika visok nivo akumulacije u citoplazmi u uslovima stresa mogu da budu jedinjenja koja sadrže azot, kao što su prolin i druge aminokiseline, ili neki od monosaharida ili disaharida kao što su glukoza, fruktoza ili saharoza, te neki oligosaharidi ili polisaharidi (Mohammadkhani i Heidari, 2008a). Kod većine biljaka aklimatizacija na sušu ogleda se u sintezi i akumulaciji slobodnih amino kiselina, prvenstveno prolina, kao ključnog osmolita koji doprinosi osmotskom prilagođavanju, regulišući osmotski potencijal u citoplazmi i omogućavajući time biljci zadržavanje vode i sprečavanje dehidracije (Caballero i sar., 2005). Akumulacija prolina se u uslovima vodnog deficita višestruko povećava u odnosu na normalan nivo u odsustvu stresa, što čini 80% ukupnog aminokiselinskog sastava (Oaks, 1996; Živanović i sar., 2020). Prolin, pored svog dejstva kao osmolita, predstavlja i značajan izvor rastvorljivog azota u stresnim uslovima (Mattioli i sar., 2009). Sadržaj prolina u tkivu biljaka rezultat je kako njegove sinteze iz glutamata pomoću enzima pirolin-5-karboksilat sintetaze (P5C), tako i inaktivacije njegove razgradnje, čime se povećava njegov sadržaj (Kavi Kishor i sar., 2005). Prednost povećane akumulacije prolina u uslovima stresa ogleda se između ostalog i u stabilizaciji membranskih sistema (Hayat i sar., 2012). Prolin pomaže biljci u prevazilaženju stresa tako što redukuje singlet kisoenik i time doprinosi smanjenju oštećenja tilakoidnih membrana (Reddy i sar., 2004). Biljke u aklimatizaciji na sušu mogu da uključe akumulaciju i nekih drugih kompatibilnih rastvorljivih jedinjenja u korijenu i listu, u koje spadaju različiti šećeri, polioli, ili npr. betain karakterističan kod biljaka iz porodice Plumbaginaceae (Samaras i sar., 1995). Šećeri, ne samo što predstavljaju izvor energije i direktno učestvuju u sintezi drugih jedinjenja, već doprinose stabilizaciji ćelijskih membrana (Hoekstra i sar., 2001) a takođe djeluju kao signalni molekuli i regulatori ekspresije gena koji mogu ukazati na metaboličke puteve od značaja za aklimatizaciju biljke na stres (Smeekens, 2000). Veliki broj biljnih vrsta u odgovoru na sušu akumulira saharozu, koja je efikasna i u energetsom smislu,

budući da se je ona relativno brz energetska izvor za ćelije. Osim saharoze, u aklimatizaciji biljne ćelije na vodni deficit značajni su i neki drugi šećeri, poput trehaloze, koja djeluje kao signalni molekul (Paul i sar., 2008). Biljke koje podnose ekstremni vodni deficit izazvan niskom temperaturom, odnosno smrzavanjem vode u podlozi povećavaju aktivnost trehaloza-6-fosfat-sintetaze jer na taj način ostvaruju maksimalno zadržavanje vode u ćeliji (Zentella i sar., 1999). Wu i saradnici (2006) proučavali su ekspresiju gena koji kodira polipeptid zadužen za sintezu trehaloze kod vrste *Ginkgo biloba*. Autori dovode u vezu otpornost ove vrste na sušu i niske temperature sa povećanom ekspresijom gena koji kodira trehaloza-6-fosfat-sintetazu, enzim ključan u prvoj reakciji sinteze trehaloze.

#### **2.5.4. Uloga LEA proteina**

Osim nakupljanja aminokiselina i ugljenih hidrata poznata je uloga proteina malih molekularnih masa u odbrani od stresa izazvanog sušom. U tom smislu, najpoznatiji su tzv. LEA proteini (skraćeno od eng. naziva Late Embryogenesis Proteins), koji su prvi put opisani prilikom istraživanja gena koji se učestalo eksprimiraju tokom završne faze isušivanja u razvoju sjemena, po čemu su i dobili naziv (Dure i sar., 1981). Akumulacija LEA proteina javlja se uglavnom u kasnim fazama razvoja sjemena, ali neki LEA proteini javljaju se i u drugim biljnim dijelovima u fiziološkom ili stresnom stanju. Smatra se da su LEA proteini smješteni u različitim vrstama ćelija i sa različitim koncentracijama, a u okviru ćelije preovlađujući su citoplazmatski oblici (Dure, 1993). Ipak, na subćelijskom nivou u različitim kompartmentima (citoplazma, jedro, mitohondrije, hloroplasti, vakuole, ER, peroksizomi i plazma membrana) pronađeni su različiti LEA proteini koji ispoljavaju svoju protektivnu funkciju (Schneider i sar., 1993). Opšta strukturna karakteristika LEA proteina je odsustvo tercijarne strukture, zbog čega se ubrajaju u neuređene strukturne forme, zatim njihov bazni aminokiselinski sastav i visok sadržaj glicina što ih čini izrazito hidrofiličnim molekulama. Pojedini autori LEA proteine klasifikuju u tri veće grupe (I, II i III) od kojih najdominantnija druga grupa, nazvana dehidrini (Xu i sar., 2008). Dehidrini sadrže ostatke bogate lizinom serinom koji su obično lokalizovani blizu N-terminusa, a na osnovu njihovih karakteristika mogu se podijeliti u više podgrupa. U suštini, smatra se da upravo zbog dominantnog sekundarnog nivoa organizacije i hidrofiličnosti LEA proteini doprinose zaštiti i stabilizaciji makromolekula i ćelijskih struktura tokom stresa, na sličan način koji to rade šaperoni, omogućavajući održavanje strukture globularnih proteina ili membrana nepromijenjenim (Sun i sar., 2013). Na molekularnom nivou, zaštitni efekti LEA proteina ispoljavaju se kroz različite mehanizme kao što su vezivanje

vode, sekvestracija jona, stabilizacija i renaturacija proteina, kao i bolje vezivanje membranskih struktura sa šećernim komponentama. Geni koji kodiraju LEA proteine su slični mnogim genima koji se eksprimiraju u vegetativnim tkivima biljaka izloženih uticaju suše, a tretmani isušivanja mogu često izazvati njihovu prerano razvijenu ekspresiju kod sjemena. Abscisinska kiselina (ABA) može takođe indukovati ekspresiju LEA gena kod sjemena i vegetativnih tkiva (Skriver i Mundy, 1990). Tako na primjer, u embrionalnim ćelijama zrelog sjemena pamuka u vrijeme sazrijevanja, D7 LEA proteini predstavljaju oko 4% ukupnih citoplazmatskih proteina (oko 0,34 mM) (Roberts i sar., 1993). Glavni problem kod dehidracije je taj što gubitak vode dovodi do kristalizacije ćelijskih komponenti, što posljedično oštećuje ćelijske strukture, a LEA proteini sadrže mnogo ostataka glicina i drugih polarnih aminokiselina pa imaju sposobnost da zadrže znatnu količinu vode te mogu zamijeniti vodeni omotač oko ćelijskih membranskih struktura. Dokazano je da su LEA proteini iz grupe dehidrina, D11 i D113 uključeni u “solvataciju” citoplazmatskih struktura (Baker i sar., 1988). Iako su LEA proteini sa dominantnom sekundarnom i nerazvijenom tercijskom strukturom, kod nekih može doći do konformacione promjene tokom suše (Slika 9.) Tako npr. poznato je da N-terminalni kraj LEA1 proteina i N-terminalni kraj LEA3 proteina, imaju sposobnost da formiraju  $\alpha$ -heliks koji može imati ulogu u zaštiti funkcionalnih proteina i održavanju normalnih fizioloških procesa u biljnim ćelijama pri nedostatku vode (Kyte i Doolittle, 1982).



Slika 9: Šematski prikaz formiranja  $\alpha$ -helix strukture LEA proteina pri dehidraciji (Original)

### **2.5.5. Prilagodavanja na nivou membranskih sistema**

Tokom suše, povišena koncentracija šećera osim osmoregulatorne uloge, ima veliki značaj u održavanju hidratacije ćelijske membrane čime se istovremeno sprječava fuzija prostora između fosfolipida (Ma i sar., 2009). Ovaj proces je poznat kao „šećerna vitrifikacija“, odnosno formiranje amorfne „staklaste“ površine u cilju sprječavanja membranske fuzije. Osim pojačane sinteze šećera, biljke tolerantne na sušu često smanjuju sadržaj ukupnih lipida u membranama (Gigon i sar., 2004). Smanjenje lipidnog sadržaja je generalno čest odgovor na stres i najčešće predstavlja uzrok smanjenja ukupne površine membrana oko ćelija, jer se tako postiže specifična interakcije između lipida i integralnih proteina u membrani koji su esencijalni za održavanje membranskog integriteta. Upotrebom 3-maleimido proksil radikala koji se inače koristi za označavanje SH proteinskih grupa ustanovljeno je da dehidratacija udvostručuje sadržaj tri dominantne proteinske grupe u membranama tilakoida hloroplasta. Naime, povećanje sulfhidrilnih grupa u cilju njihove oksidacije i formiranja disulfidnih mostova takođe doprinosi smanjenoj fluidnosti membrana što omogućava brzo obnavljanje fotosintetičkih procesa nakon rehidratacije (Navari-Izzo i sar., 1994). Membrane mitohondrija takođe imaju važnu ulogu kod izbjegavanja proizvodnje ROS u uslovima vodnog deficita efikasnim mehanizmima za rasipanje energije (Moller, 2001). Alternativni put oksidaze (AOX) je alternativa za citohrom-put kod mitohondrija koji skreće protok elektrona na elektron transportni lanac kako bi se produkovala voda redukcijom kiseonika (Vanlerberghe i McIntosh, 1997). Dokazano je da kod biljaka tolerantnih na sušu koegzistiraju tri aktivna sistema rasipanja energije: ATP-senzitivni kalijumski kanal u mitohondrijama (Pastore i sar., 1999), tzv. uncoupling protein koji koristi protonski gradijent za termogenezu (Pastore i sar., 2000) i alternativna oksidaza (Pastore i sar., 2001). Aktiviranje takvog sistema rasipanja energije izaziva značajno smanjenje proizvodnje mitohondrijskih ROS. Zapravo, kod biljaka tolerantnih na sušu, u mitohondrijama posredni proizvodi fotorespiratornog puta (glioksalat i hidroksipiruvat) aktiviraju alternativni put oksidaze (AOX), čime se uspostavlja kooperativni mehanizam rasipanja energije i izbjegavanje ROS u uslovima sušnog stresa kada se inhibira fiksacija CO<sub>2</sub> a fotorespiracija je na svom maksimumu (Pastore i sar., 2001; Pastore i sar., 2007).

### **2.5.6. Molekularni putevi signalinga u odgovoru na sušu**

Smatra se da je senzor suše na nivou ćelije integralni membranski protein, homodimer histidin kinaza koju aktivira povećanje osmolarnosti ćelije izazvano opadanjem turgora u ćeliji (ćelijskom

dehidratacijom). Histidin kinaza se još naziva i "osmosenzor" i ona pokreće kaskadu reakcija (transdukcija signala) koje vode ka ekspresiji gena indukovanih dehidratacijom (Urao i sar., 1999). Razvoj stresa takođe utiče i na fizičke osobine membrane, odnosno protein-lipid interakcije. To može da izazove promjene u propustljivosti membrana i reorganizaciju citoskeleta, što utiče na kanale za vodu (akvaporine) i jone (Jovanović i Stikić, 2012). Nakon percepcije signala, signalna transdukcija preko sinteze sekundarnih glasnika ( $Ca^{2+}$  joni ili npr. fosfatidna kiselina) dovodi do ekspresije gena indukovanih sušom (Shinozaki i sar., 2003). Proizvodi aktivnosti ovih gena mogu se podijeliti u dvije grupe:

- 1) prvu grupu čine funkcionalni molekuli koji su direktno uključeni u tolerantnost na stres kao što su antioksidativni enzimi, osmoprotektanti (npr. enzimi uključeni u biosintezu prolina), proteini koji štite makromolekule (šaperoni) te LEA proteini.
- 2) drugu grupu čine regulatori ekspresije gena i signalnih puteva (protein kinaze, fosfataze, transkripcioni faktori - TF, enzimi metabolizma fosfolipida).

Proučavanja transkripcione regulacije dehidratacije ćelije do koje dolazi u uslovima suše dovela su do otkrića tzv. ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta (Yoshida i sar., 2014). Dehidratacija ćelije u uslovima suše dovodi do povećanja endogenog sadržaja ABA u ćeliji, što uslovljava ekspresiju ciljnih gena koji kodiraju transkripcione faktore, signalne komponente i druge enzime. (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Geni koji odgovaraju na ABA, uglavnom su regulisani transkripcionim faktorima tipa bZIP (ABRE/ABF), koji se vezuju za ABRE *cis*-elemente u promotorima (Fujita i sar., 2005). Kod ABA-nezavisnog puta ciljni geni imaju u promotorima *cis*-sekvencu DRE/CRT za koju se vezuju transkripcioni faktori ERF/AP2 tipa, kao što su familije DREB1/CBF i DREB2. DREB1 tip transkripcionih faktora je uključen u odgovor na niske temperature, a DREB2 u odgovor na uslove suše i povišenu temperaturu u spoljašnjoj sredini (Sakuma i sar., 2006). Jovanović i sar. (2013) utvrdili su da ekspresiju gena DREB2 indukuju suša, povećan salinitet, ali i ABA nakon dužeg perioda djelovanja. Oni, takođe, ukazuju na moguću interakciju ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta (eng."cross talk"). Neki od transkripcionih faktora, koji su uključeni u odgovor na stres, regulisani su na posttranslacionom nivou putem modifikacija i obično su uključeni u brze i rane odgovore na stres. Od posttranslacionih modifikacija najzastupljenije su fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija. Sumoilacija (SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier) je proces koji podrazumijeva kovalentno vezanje proteina male molekulske mase (oko 12 kDa) sličnog ubikvitinu na ćelijske proteine, modifikujući na taj način

njihovu funkciju. Sumoilacija se često dešava kao odgovor na stres izazvan sušom kod hloroplastnih proteina (ferodoksin, proteini subjedinica PS1 i PS2), a u samoj reakciji dolazi do stvaranja izopeptidne veze između C-terminalnog kraja glicina i  $\epsilon$ -amino grupe lizina (Park i sar., 2011). Različiti geni aktivirani pod uticajem stresa mogu se podijeliti u dvije grupe: geni brzog i geni sporog odgovora. Geni brzog odgovora se aktiviraju vrlo brzo nakon izlaganja stresu (za nekoliko minuta) i često je to povećanje ekspresije prolaznog karaktera. Njihova indukcija ne zahtjeva sintezu novih proteina, jer su sve signalne komponente već prisutne. Tipični primjer su geni čija se ekspresija povećava u uslovima suše (npr. DREB/CBF), povećanog saliniteta, stresa izazvanog niskim temperaturama i u prisustvu ABA. Mnogi drugi geni se aktiviraju tek nakon nekoliko sati i njihova ekspresija je često kontinuirana, odnosno održava se na određenom nivou tokom stresa. Ovoj grupi pripadaju geni uključeni u odgovor na stres kao što su geni osjetljivi na sušu (RD - responsive to dehydration), aktivirani hladnoćom (KIN - cold induced), osjetljivi na hladnoću (COR - cold responsive), itd. Navedeni geni kodiraju sintezu LEA proteina, antioksidanata, osmolita i drugih proteina važnih u procesu stabilizacije biomembrana i učestvuju u regulaciji njihove aktivnosti (Mahajan i Tuteja, 2005).

### **2.5.7. Uloga abscisinske kiseline (ABA)**

Po hemijskoj strukturi ABA je seskviterpenoid ( $C_{15}H_{20}O_4$ ) (Xiong, 2007). Orijentacija karboksilne grupe na drugom ugljeniku određuje *cis* i *trans* izomere abscisinske kiseline, a u prirodi preovlađuje *cis* oblik. Zahvaljujući asimetričnom ugljenikovom atomu na poziciji 1' unutar prstena postoje dva enantiomera abscisinske kiseline: S, odnosno + i R, odnosno – enantiomer. Biosinteza ABA se dešava najvećim dijelom u hloroplastima, kao i u drugim plastidima (Cowan i Railton, 1985). Metabolički put počinje sa izopentenil-difosfatom (IPP), izoprenskom jedinicom, i vodi ka sintezi C40 ksantofila violaksantina, preko zeaksantina. Sinteza violaksantina iz zeaksantina je katalizovana zeaksantin epoksidazom (ZEP). Violaksantin se prevodi do C40 jedinjenja 9-cis-neoksantina. Ovaj molekul se dijeli i formira C15 jedinjenje- ksantoksal, prethodno nazvano ksantoksin, koji je neutralni inhibitor rasta sa sličnim fiziološkim svojstvima kao i ABA. Cijepanje C40 jedinjenja je katalizovano 9-cis-epoksi-karotenoid dioksidgenazom (NCED), koja je nazvana tako jer može da vrši cijepanje i 9-cis-neoksantina i 9-cis-violaksantina. Stalno prisustvo ovog biljnog hormona u manjim koncentracijama omogućava rast i diferencijaciju ćelija a njena povećana koncentracija neophodna je za zatvaranje stoma (Sakata i sar., 2014). Akumulacija ABA u uslovima suše pomaže u adaptaciji biljaka na sušu kao i na druge abiotičke



stresne faktore (Tuteja 2007). ABA se danas u svijetu veoma intenzivno proučava, jer je utvrđeno da predstavlja univerzalni "stresni hormon" čija akumulacija, posebno u korijenu, pomaže u adaptaciji biljaka na sve tipove vodnog deficita (suša, visoka i niska temperatura, povećan salinitet) (Nakashima i Yamaguchi Shinozaki, 2013). Samo S enantiomer je aktivan u izazivanju brzih odgovora, kao što je zatvaranje stoma. Koncentracija slobodne ABA u citoplazmi je regulisana katabolizmom, konjugacijom, i transportom (Aroca i sar., 2003). Na primjer, koncentracija citoplazmatske ABA se povećava tokom suše, kao rezultat sinteze u listu, redistribucije unutar ćelija mezofila, transporta iz korijena i transporta iz drugih listova. U biljnim ćelijama prisutna je redistribucija ABA između različitih ćelijskih kompartmenata i to prema transmembranskom pH gradijentu, pri čemu se akumulacija odvija u smjeru ka baznijoj sredini, odnosno citoplazmi (Hartung, 1983; Jovanović, 1998). Koncentracija ABA se smanjuje nakon ponovnog zalijevanja biljaka usljed degradacije i smanjenja brzine sinteze, ali i zbog transporta iz listova u druge organe (Zdunek i Lips, 2001). U prvim fazama suše kada zemljište tek počinje da gubi vodu i kada potencijal listova još uvijek nije pretrpio značajnije promjene, počinje da se akumulira ABA u korijenu. Potom iz korijena ona prelazi u ksilemske elemente i transportuje se kroz nadzemni dio stabla do listova i stoma (Davies i Zhang, 2005). Povećana koncentracija ABA u ksilemu dovodi do povećanja rasta korijenovog sistema, a takođe, može uticati na povećanje hidraulične provodljivosti korijena što može imati veliki uticaj na brzinu usvajanja vode u uslovima suše (Kang i sar., 2002).

#### **2.5.8. Mehanizam reakcije stoma**

Otvoranje i zatvaranje stoma u epidermisu biljaka omogućeno je njihovom anatomijom, prije svega ćelija zatvaračica koje poseduju zadebljale ćelijske zidove uz otvor i tanke, elastične nasuprot otvora stoma. Povećanje turgora isteže spoljašnje zidove koje potom povlače unutrašnje i otvor stoma se širi. Suprotno, kod smanjenja turgora, spoljašnji zidovi se skupljaju pa unutrašnji zatvaraju stomin otvor i sprečavaju transpiraciju vode. Mehanizam rada stoma, iako neosporno zasnovan na promjeni turgora, ima više aktuelnih hipoteza koje pokušavaju razjasniti fiziološke procese odgovorne za mehanizam njihovog rada (Vukadinović, 1999). Sve one su zasnovane na enzimskom objašnjenju koji se sastoji od niza vezanih reakcija koji se mogu šematski predstaviti na sljedeći način:

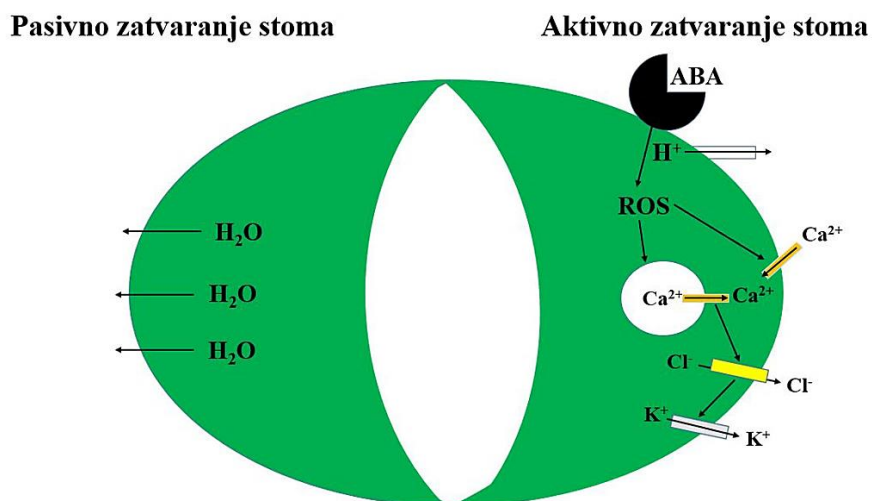
svjetlost  $\Rightarrow$  fotosinteza  $\Rightarrow$  povećanje pH  $\Rightarrow$  hidroliza skroba  $\Rightarrow$  malat  $\Rightarrow$  povećanje osmotskog pritiska  $\Rightarrow$  povećanje turgora  $\Rightarrow$  otvaranje stoma.

Glikolatna hipoteza zasniva se na analogiji  $\alpha$ -hidroksisulfonata i glikolne kiseline. S obzirom da je glikolna kiselina prekursor u biosintezi ugljenih hidrata u fotosintetičkim tkivima, njena biosinteza ujedno povećava koncentraciju ovih molekula a samim tim dolazi i do povećanja osmotskog potencijala u ćelijama zatvaračicama. Visoko specifični inhibitor  $\alpha$ -hidroksisulfonat posreduje u metabolizmu glikolne kiseline tako što inhibira katalitičku aktivnost glikolat oksidaze i na taj način dovodi do akumulacije glikolne kiseline a potom i do zatvaranja stoma (Zelitch, 1967).

Malat-kalijumska hipoteza zasniva se na koncentraciji malata u ćelijama zatvaračicama što utiče na sadržaj katjona, a najviše na koncentraciju kalijuma. Malat može da nastane u ćelijama zatvaračicama ili da biva transportovan u njih iz okolnih mezofilnih ćelija. Pretpostavlja se da se skrob koji nastane u hloroplastima ćelija zatvaračica nakon Kalvinovog ciklusa razgrađuje do glukoze a potom do fosfoenolpiruvata, koji uz katalitičko dejstvo fosfoenolpiruvat karboksilaze daje oksaloacetat. Daljom redukcijom oksaloacetata nastaje malat u reakciji koju katalizuje malat dehidrogenaza, a malat potom disosuje na  $H^+$  i malatni anjon. Visoka koncentracija malatnog anjona u vakuolama dovodi do izlaska  $H^+$  jona u susjedne epidermalne ćelije uz istovremeni ulazak  $K^+$  jona što dalje dovodi do porasta osmotske vrijednosti i turgora ćelija zatvaračica uz otvaranje stoma (Schnabl i sar., 1982, Asai i sar., 2000).

Savremeni pogled na mehanizam rada stoma pridaje najveću pažnju membranski vezanoj  $H^+$ -ATP-azi, koja kad je aktivna počinje izbacivati  $H^+$  iz ćelija zatvaračica što stvara negativan membranski potencijal (približno - 100 mV) uz hiperpolarizaciju membrane (Santellia i Lawson, 2016). Ta razlika potencijala izjednačava se ulaženjem  $K^+$  pomoću jonske pumpe (~100 mmol do 400-800 mmol) u zatvaračice iz okolnih ćelija uz difuziju  $Cl^-$  iz okolnih parenhimskih ćelija, pa se na taj način vrši neutralizacija viška pozitivnog naelektrisanja. Povećanje koncentracije elektrolita unutar ćelija zatvaračica izaziva porast negativne vrijednosti vodnog potencijala ( $\Psi$ ) što je praćeno ulaskom vode u ćelije, a potom do porasta turgora i otvaranja stoma. Stome se zatvaraju usljed smanjenja aktivnosti  $H^+$ -ATP-aze i otvaranja membranskog kanala za izlaz  $Cl^-$  iz ćelija zatvaračica te padom membranskog potencijala na standardnih ~-100 mV. Kanal za ulazak  $K^+$  se zatvara, otvara se kanal za izlaz  $K^+$  te se smanjuje elektrohemijski potencijal ćelija zatvaračica i vodni potencijal (koji postaje manje negativan). Na taj način uz izlazak vode dolazi do zatvaranja stoma, a to stimulišu nisko osvjetljenje ili mrak, ABA, vodni deficit, i visoka koncentracija  $CO_2$ .

U uslovima vodnog deficita mehanizam dejstva ABA se ostvaruje kao "hemijski signal suše" pri čemu se ovaj molekul vezuje za specifične receptore smještene na površini ćelijske membrane ili u unutrašnjosti ćelija zatvarčica stoma (Arve i sar., 2011; Xu i sar., 2012) (Slika 10.). Utvrđeno je da je tokom suše akumulacija vodonik peroksida glavni pokretač mehanizma ABA zavisnog puta zatvaranja stoma, ali da se ovaj proces odvija u kooperaciji ćelija zatvaračica i ćelija pomoćnica (Li i sar., 2014). Pri tom dolazi do alkalizacije ksilemskog sadržaja a uspostavljanje pH gradijenta utiče na distribuciju ABA i modifikuje stomatalni odgovor (Prokić i sar., 2006). Ekstracelularni receptori su uključeni u proces zatvaranja stoma, a intracelularni u inhibiciju otvaranja stoma (Schwartz i sar., 1994). Postoji i pretpostavka da su ekstraćelijski receptori neophodni u brzom, a intraćeljski u sporom odgovoru na ABA. Vezivanje ABA za receptore dovodi do akumulacije i brze difuzije sekundarnih glasnika kao što su inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) i joni  $\text{Ca}^{2+}$ , koji dalje u ćeliju prenose informaciju (Jovanović i Stikić, 2012). Dolazi do povećanja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi, koja je rezultat aktivacije  $\text{Ca}^{2+}$  kanala i njegovog oslobađanja iz različitih ćelijskih vezikula ili organela (vakuola endoplazmatičnog retikuluma, plastida, mitohondrija) u citoplazmu.  $\text{Ca}^{2+}$  joni, vezivanjem za kalmodulin, aktiviraju mnoge enzime, u prvom redu kinaze i fosfataze, koji kasnije fosforilišu druge enzime, što na kraju dovodi do zatvaranja stoma (Mengel i Kirkby 2001). Osim toga, povećana koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  jona u citoplazmi dovodi i do depolarizacije ćelijske membrane. Zatvaranjem stoma smanjuje se transpiracija i usvajanje  $\text{CO}_2$  što posljedično smanjuje i intenzitet fotosinteze (Chaves, 1991; Ashraf i Harris, 2013).

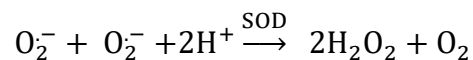


Slika 10: Šematski prikaz hidropasivnog i aktivnog zatvaranja stominog aparata (Original)

### 2.5.9. Antioksidativni metabolizam

Da bi kontrolisale proizvodnju ROS i prevazišle oksidativna oštećenja uzrokovana ovim reaktivnim vrstama, biljke su razvile različite metaboličke puteve antioksidativnog sistema zaštite koji uključuju brojne enzime i niskomolekularna neenzimska jedinjenja (Huseynova, 2012; Laxa i sar., 2019). Antioksidativni sistem ima vitalan značaj u svim ćelijama, a posebno u onima iz fotosintetički aktivnih tkiva, gdje enzimi kao što su superoksid dismutaza, askorbat peroksidaza, katalaza i peroksidaze Klase III neutrališu štetno dejstvo ROS molekula zajedno sa niskomolekularnim antioksidantima poput askorbata, glutationa, fenola i karotenoida (Abedi i Pakniyat 2010; Das i Roychoudhury 2014).

*Superoksid dismutaza* (SOD, EC 1.15.1.1) je metaloenzim koji predstavlja „prvu liniju ćelijske odbrane” u procesu neutralizacije ROS (Miller i sar., 2012). Otkriven je 1969. godine od strane naučnika Fridovicha i McCorda a njen mehanizam dejstva se ispoljava kroz katalitičku aktivnost u reakciji u kojoj se dvije molekule superoksid anjon radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) istovremeno disproporcioniraju do jednog molekula vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) i do jednog molekula kiseonika  $O_2$  (Boguszewska i Zagdanska, 2012).

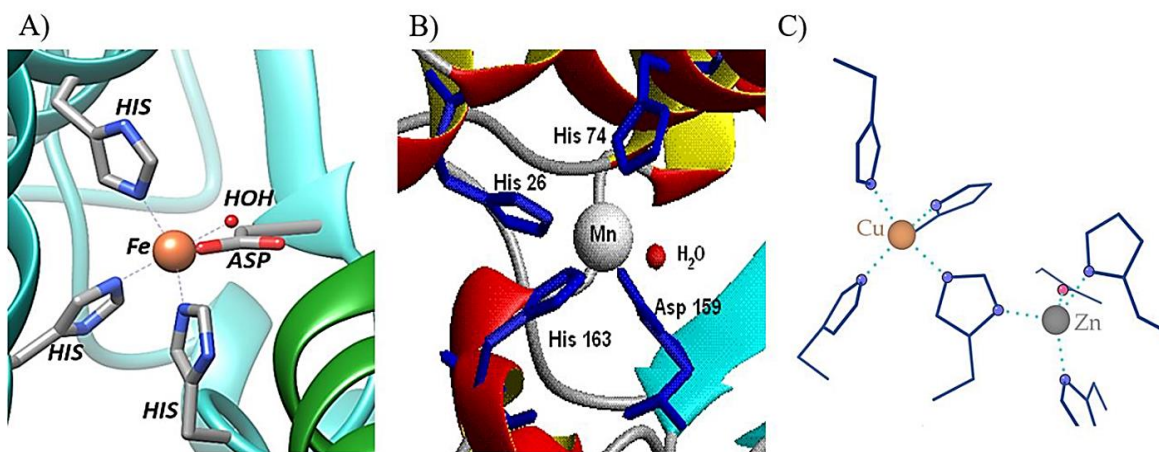


U zavisnosti od metalnog jona kojeg sadrže u aktivnom mjestu, SOD u ćelijama biljaka se mogu klasifikovati u tri različite grupe:

- 1) Superoksid dismutaza koja sadrži željezo (Fe SOD)
- 2) Superoksid dismutaza koja sadrži mangan (Mn SOD) i
- 3) Superoksid dismutaza koja sadrži bakar i cink (Cu-Zn SOD) (Slika 11)

Navedene izoforme su lokalizovane u različitim ćelijskim organelama pa je tako Fe SOD u hloroplastima, Mn SOD u mitohondrijama i peroksizomima, dok se Cu-Zn SOD nalaze u hloroplastima, citoplazmi i ekstracelularnom prostoru (Greene, 2002; Miller, 2004; Abreu i Cabelli, 2010). Poređenjem aminokiselinskih sekvenci ove tri izoforme zaključeno je da su Mn i Fe SOD stariji tipovi te da su najvjerojatnije nastali iz istog enzimskog “pretku” dok Cu-Zn SOD ima manje sekvencijalnih sličnosti sa njima i najvjerojatnije je nastala odvojeno u eukariotima (Kanematsu i Asada, 1990). Evolutivni razlog za odvajanje SOD sa različitim metalima je vjerovatno povezan sa različitom raspoloživošću rastvorljivih metalnih jona u biosferi u odnosu

na sadržaj kiseonika u atmosferi u različitim geološkim erama (Bannister i sar., 1991). Smatra se da je željezo vjerovatno prvo korišteno kao kofaktor zbog dovoljne raspoloživosti u rastvorljivom  $Fe^{2+}$  obliku u to vrijeme. Pošto se nivo kiseonika u okolini povećavao, došlo je do smanjenja raspoloživog željeza u okolini zbog njegove oksidacije, što je izazvalo pomjeranje za korištenje raspoloživog  $Mn^{3+}$ . Prisustvo Fe SOD je potvrđeno u biljkama iz porodica Gingkoaceae, Nymphaeaceae i Brassicaceae dok su Mn SOD otkrivene u kukuruzu (*Zea mays*), duvanu (*Nicotiana tabacum*), pasulju (*Phaseolus vulgaris*), lubenici (*Citrullus vulgaris*), više vrsta karanfila (*Dianthus* sp.), grašku (*Pisum sativum*), špinatu (*Spinacea oleracea*) i drugim (Woith i sar., 2017). Cu-Zn SOD su otkrivene u mnogobrojnim vrstama biljaka a postoje dvije različite grupe: prva grupa se sastoji od citoplazmatičnih oblika koji su homodimeri a druga grupa obuhvata hloroplastne i ekstracelularne forme koje su homotetrameri (Alcher i sar., 2002).



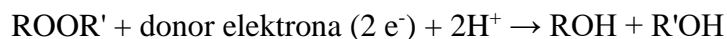
Slika 11. Prikaz vezivanja različitih metala sa aminokiselinama u aktivnom mjestu različitih izoformi superoksid dismutaze: A) Fe SOD, B) Mn SOD, C) Cu-Zn SOD (preuzeto sa wikimedia commons, kategorija CC-BY-SA):

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SODsite.gif>,

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Superoxide\\_dismutase\\_Cu\\_Zn\\_site.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Superoxide_dismutase_Cu_Zn_site.jpg),

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Iron\\_Superoxide\\_Dismutase\\_Active\\_Site.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Iron_Superoxide_Dismutase_Active_Site.png)

*Peroksidaze* su enzimi koji se klasifikuju kao oksidoreduktaze a katalizuju oksidaciju različitih supstrata sa vodonik peroksidom ili organskim peroksidom prema reakciji:



Članovi superfamilije peroksidaza su evolutivno povezani i razvrstani u tri klase:

- 1) Klasa I obuhvata peroksidaze unutarćelijskog prostora biljaka u koje spadaju citohrom C peroksidaza (CcP, E.1.11.1.5) i askorbat peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11)
- 2) Klasa II obuhvata peroksidaze koje se nalaze u vanćelijskom prostoru gljiva i bakterija u koje spadaju lignin peroksidaze (LiP, EC 1.11.1.14) i mangan peroksidaze (MnP, EC 1.11.1.13)
- 3) Klasa III peroksidaza (POD, EC 1.11.1.7), obuhvata enzime biljaka smještene u vakuolama, ćelijskom zidu i apoplastu, a tu spada i najpoznatija peroksidaza prvi put izolovana iz korijena rena po kojoj je i dobila naziv (eng. HRP–Horseradish Peroxidase)

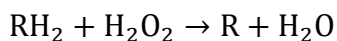
U antioksidativnom metabolizmu biljaka važne su i ne-hem peroksidaze iz familije glutathion peroksidaza (GPX), koje sadrže cistein u svom aktivnom mjestu, a prisutne su u više različitih izoformi u citoplazmi, mitohondrijama i hloroplastima (Chen i sar., 2017). Svaka od pomenutih peroksidaza se može naći u većem broju izoenzimskih formi, koje se razlikuju u zavisnosti od stepena diferencijacije tkiva kao i biljnog organa iz kog potiču (Yazdi i sar., 2002). Askorbat peroksidaza katalizuje redukciju  $H_2O_2$  pri čemu kao redukciono sredstvo koristi askorbat (Sharma i sar., 2012). APX predstavlja jedan od najrasprostranjenijih antioksidativnih enzima u biljnoj ćeliji i ključna je njena uloga kao centralnog molekula askorbat-glutathion ciklusa, a njene izoforme su pronađene u različitim ćelijskim organelama. Postoji najmanje pet izoformi različitih po svojoj kvarternarnoj strukturi, osjetljivosti na nedostatak askorbata i prisustvo vodonik peroksida, koje su detektovane u citoplazmi, membrani tilakoida, stromi hloroplasta i membrani peroksizoma (Asada, 1999; Logan i sar., 2006). Pokazano je da APX ima manji  $K_m$  za vodonik peroksid od katalaze i peroksidaza Klase III, odnosno da prema ovom molekulu pokazuje izražen afinitet (Gill i Tuteja, 2010).

Klasa III biljnih peroksidaza (EC 1.11.1.7. POD) su enzimi koji vrše katalitičke funkcije u oksidoredukcijskim reakcijama u kojima za supstrate mogu da koriste različita fenolna jedinjenja kao što su gvajakol, pirogalol, kafeična, ferulična i hlorogeična kiselina. Jedna od uloga im je ta što su uključene i u procese strukturnih promjena ćelijskog zida kao što su lignifikacija i suberinizacija. Lignini su amorfni heteropolimeri koji nastaju oksidativnim vezivanjem 3-*p*-hidroksicinamil alkohola (monolignola): *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohola u reakciji zavisnoj od  $H_2O_2$  u kojoj posreduju peroksidaze. Ovi enzimi generišu odgovarajuće radikale iz monolignola

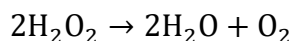
pri čemu nastaje hidrofobni heteropolimer kojeg grade hidroksivenil, gvajacil i siringil veze (Ros Barcelo i sar. 2007). Pored lignifikacije, peroksidaze su uključene i u procese unakrsnog vezivanja polisaharida ćelijskog zida. U taj proces je uključena i ferulična kiselina koja je kod dikotiledonih biljaka esterski vezana za terminalne arabinozne ostatke i galaktozu pektinskih polisaharida. Feruloil ostaci se mogu međusobno spajati oksidativnim vezivanjem a taj proces se dešava samo u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz posredstvo peroksidaza (Ralph i sar., 2004). Kao jedan od najvažnijih enzima antioksidativne odbrane protiv raznih abiotičkih i biotičkih agenasa, peroksidaze učestvuju u sintezi fitoaleksina (Passardi i sar., 2007) Osim opisane katalitičke uloge u ćelijskom zidu peroksidaze Klase III se takođe transportuju u vakuolu u kojoj su uključene u oksidoredukcijske procese, pri čemu kao donore elektrona koriste fenolna jedinjenja (Welinder i Gajhede, 1993). Najčešće se oksiduju flavonoli i hidroksicinamične kiseline pri čemu nastaju fenoksi radikali u čijoj ponovnoj redukciji važnu ulogu ima askorbat, kao sekundarni donor elektrona (Takahama, 2004). Ovaj mehanizam oksidoredukcijskih procesa u vakuoli predstavljen je kao askorbat/fenoli/peroksidaze system, a nazvan je kao Takahama ciklus i čini važan put uklanjanja vodonik peroksida u biljnim ćelijama, naročito u uslovima oksidativnog stresa (Takahama i Oniki 2006; Ferreres i sar., 2011; Veljović-Jovanović i sar., 2018). Ovaj sistem može da uklanja vodonik peroksid koji nastaje u samoj vakuoli ili tonoplastu, ali takođe i onaj koji nastane van vakuole pa naknadno u nju difunduje.

*Katalaza* (CAT, EC 1.11.1.6) je jedan od najrasprostranjenijih enzima u živom svijetu a osnovna uloga joj je razgradnja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O, čime se sprječava njena difuzija u druge ćelijske kompartmente. Zbog svoje široke distribucije, evolutivne adaptivnosti i velike katalitičke efikasnosti, CAT ima važnu ulogu u antioksidativnim sistemima u aerobnoj sredini. Katalaza je homotetramer, molekulske mase 240 kDa, koji ima u aktivnom mjestu Fe<sup>3+</sup> vezano za hem odnosno porfirinski dio enzima (Scandalios, 2005).

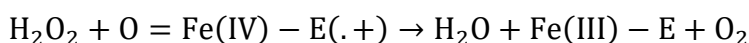
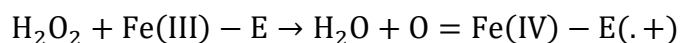
Pri niskim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (<1 μmol) CAT ispoljava peroksidaznu reakciju i redukuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeći različite donore vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina):



Pri visokim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (>1 μmol), CAT ga brzo uklanja kroz katalaznu reakciju, gdje je vodonik peroksid i donor i akceptor vodonika:



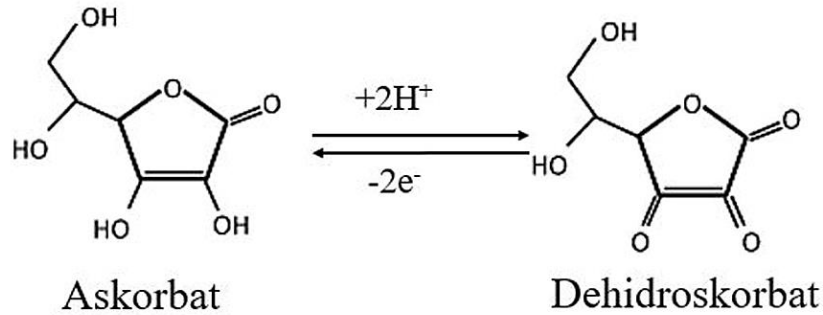
Ovaj proces je energetski efikasan, jer se u katalaznoj reakciji ne koriste redukujući ekvivalenti. To je značajno kad su povećane energetske potrebe ćelije, odnosno kada je povećan intenzitet kataboličkih procesa i respiracije, a formirana veća količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Scandalios, 2005). Katalaza ne može biti zasićena vodonik peroksidom bez obzira na njegovu koncentraciju, tako da enzimska aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije supstrata pri čemu jedna molekula katalaze konvertuje million molekula vodonik peroksida u vodu i kiseonik svake sekunde (Kruindenier i Verspaget, 2002). Ova reakcija se odvija u dva osnovna koraka:



Fe(III)-E u ovom slučaju predstavlja aktivno mjesto sa atomom željeza na grupi hema koja je vezana za enzim. Metal željeza nije u potpunosti oksidovan do +V te dobija još jedan elektron iz liganda hema a Fe(IV)-E (· +) ustvari predstavlja mezomerni oblik Fe(V)-E. Na taj način hem se označava kao radikalski oblik katjona (· +). U aktivnom centru enzimske molekule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaguje sa asparaginom na poziciji 147 i histidinom na poziciji 74, pri čemu se H<sup>+</sup> prebacuje između atoma kiseonika. Nakon toga oslobađa se nastali molekul vode i Fe(IV)=O, a ono reaguje s novim molekulom vodonik peroksida pri čemu nastaju Fe(III)-E, H<sub>2</sub>O i O<sub>2</sub>.

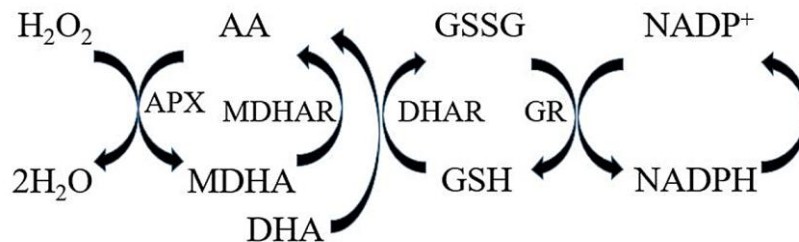
*Askorbinska kiselina* ili vitamin C je jedan od najvažnijih hidrosolubilnih antioksidanasa, a kod većine biljaka u visokim koncentracijama prisutan je najviše u fotosintetički aktivnim tkivima i to u u hloroplastima, citoplazmi, vakuolama i apoplastnom prostoru. Zahvaljujući reaktivnoj endiol grupi askorbinska kiselina ima redukujuću ulogu (Smirnoff, 1996). Redoks sistem askorbata u ćeliji čine njegov redukovan oblik, djelimično redukovan (monodehiroaskorbat) i oksidovan oblik (dehidroaskorbat). Oksidacijom redukovanog oblika nastaje monodehidroaskorbat radikal koji najčešće brzo prelazi u dehidroaskorbat (DHA) tako da su potpuno redukovani i oksidovani oblik najčešća stanja ovog molekula (Slika 12.). Najveći dio askorbinske kiseline se sintetiše iz glukoze u mitohondrijama (Barnes i sar., 2002). Prednost askorbata kao antioksidansa se ogleda i u tome što u slučaju povećane potrebe ćelije za njegovim antioksidativnim djelovanjem ne mora da se vrši njegova sinteza *de novo*. Reredukcija oksidovanog askorbata najviše zavise od aktivnosti enzima monodehidroksiaskorbat reduktaze i dehidroaskorbat reduktaze koje katalizuju redukciju oksidovanih formi ponovo do askorbata i time obnavljaju njegove rezerve (Sauvage i sar., 2014).





Slika 12: Šematski prikaz oksidacije askorbata u dehidroaskorbat (Original)

Askorbat može da direktno reaguje sa slobodnim radikalima ( $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ) i na taj način neutralize njihovo štetno dejstvo. Osim direktnog načina može da ispoljava antioksidativno dejstvo i na indirektan način, tako što služi kao supstrat za askorbat peroksidazu pri uklanjanju vodonik peroksida, što je jedan od koraka u askorbat-glutation ciklusu (AA-GSH), poznatijem i kao Halliwell-Asada ciklus (Slika 13.) (Foyer i Halliwell, 1976). U ovom ciklusu regeneraciju askorbata iz oksidovanih formi vrše monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR) i dehidroaskorbatreduktaza (DHAR) u prisustvu redukovanog glutationa (GSH) (Jiménez i sar.,1997). Centralnu ulogu u ciklusu ima askorbat peroksidaza koja koristi dvije molekule askorbata za redukciju vodonik peroksida pri čemu nastaju dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata. U hloroplastima askorbat deluje kao kofaktor za enzim violaksantin-deepoksidazu i tako posredno učestvuje u ksantofil ciklusu kao jednom od mehanizama zaštite ćelije od fotooksidacije (Smirnoff, 2018). Askorbat učestvuje u zaštiti drugih antioksidativnih molekula kao što je tokoferol, pri čemu ga održava u njegovom redukovanom obliku, a oksidovani oblik, tokoferol radikal regeneriše nazad u vitamin E.



Slika 13. Šematski prikaz Askorbat-Glutation ciklusa: AA-askorbat, APX-askorbat peroksidaza, MDHA-monodehidroaskorbat, MDHAR- monodehidroaskorbat reduktaza, DHA-dehidroaskorbat, DHAR-dehidroaskorbat reduktaza, GR- glutation reduktaza, GSSG-oksidovani glutation, GSH-redukovani glutation (Original).

*Glutation* je niskomolekularni tripeptid izgrađen od cisteina, glutaminske kiseline i glicina ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin). Ovaj molekul je najzastupljenije tiolno jedinjenje kod većine vrsta biljaka i prisutan je u skoro svim ćelijskim organelama (Queval i sar., 2011; Vidović i sar., 2015). U ćelijama se pretežno nalazi u redukovanom obliku (GSH), koji u kombinaciji sa oksidovanom formom GSSG, održava redoks ravnotežu u ćeliji (Foyer i Noctor, 2005). Zahvaljujući centralnom nukleofilnom ostatku cisteina on ima visok redukcionni potencijal koji omogućava uklanjanje  $H_2O_2$  i učestvuje u neenzimskim reakcijama sa ostalim ROS, kao što su singlet kiseonik, superoksid i hidroksil radikal (Blokhina i sar., 2003). Ipak, njegovom najvažnijom ulogom u biljnim ćelijama se smatra njegova antioksidativna sposobnost u kojoj regeneriše askorbinsku kiselinu preko ASH-GSH ciklusa. GSH u ovom ciklusu služi kao donor elektrona pri čemu se askorbat regeneriše iz njegove oksidovane forme dehidroaskorbata, a GSH prelazi u oksidovanu formu glutation-disulfid (GSSG) (Noctor i Foyer, 1998).

*Fenoli* su veoma rasprostranjeni proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka a antioksidativno dejstvo biljnih ekstrakata uglavnom se vezuje za njihovo prisustvo. Ova grupa jedinjenja obuhvata veliku grupu različitih strukturnih molekula (preko 8000), od najprostijih fenolnih kiselina, do kondenzovanih tanina. Manju antioksidativnu aktivnost ova jedinjenja pokazuju u konjugovanom obliku, sa jednim ili više molekula šećera (Leucuta i sar., 2005; Rice-Evans i sar., 2006). Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Fenolna jedinjenja se mogu klasifikovati na više načina, a najčešća podjela se zasniva na osnovu broja ugljenikovih atoma vezanih za njihov osnovni skelet (Robards i sar., 1999). Tako na primjer, ukoliko je osnovni skelet  $C_6$ , takva jedinjenja se karakterišu kao prosti fenoli, a takvi su katehol, rezorcinol ili hidrohionon. Derivati cimetine kiseline (kafeična i ferulična kiselina) osnovni skelet imaju organizovan kao  $C_3-C_6$ , dok  $C_6-C_3-C_6$  skelet imaju flavanoli (dihidrokvercetin), flavanoni (hesperidin, narigenin) ili antocijanini. U derivate antrahinona se mogu klasifikovati flavonoidi, flavoni (luteolin, apigenin, tangeretin), flavonoli (kvercetin, kaempferol) i flavonol glikozidi (rutin). Smatra se da je antioksidativna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksi radikala. Povećana stabilnost fenoksi radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi.

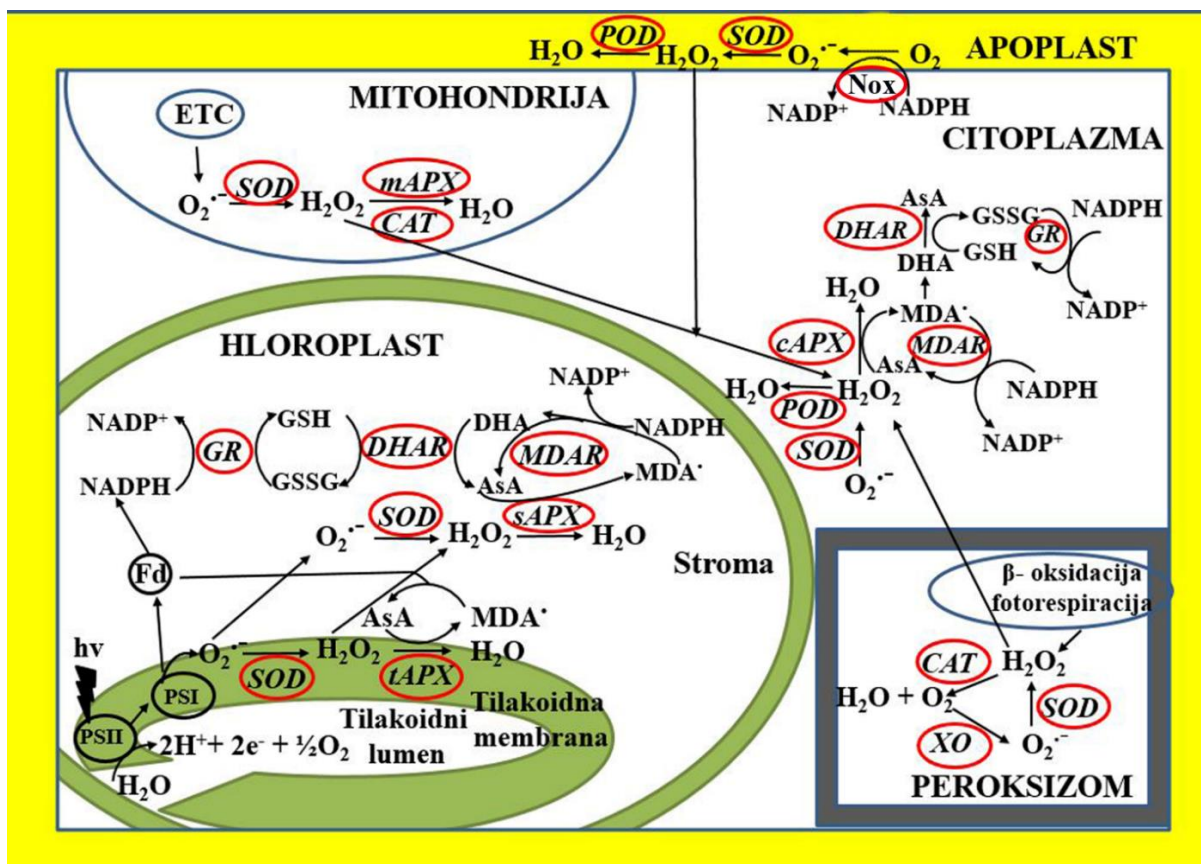
### 2.5.9.1. Antioksidativni metabolizam kod biljaka u uslovima suše

Reaktivne vrste kiseonika nastale fotorespiracijom i Melerovom reakcijom u toku suše aktiviraju antioksidativne mehanizme zaštite, u prvom redu superoksid dismutazu (SOD), askorbat i glutation peroksidazu (APX i GPX), ali i neenzimske antioksidante askorbat i glutation koji su najkarakterističniji kod ovog tipa abiotičkog stresa (Ciricao de Silva i sar., 2013, Dumanović i sar., 2021). Jedan od glavnih posrednika u nastanku ROS u biljnim ćelijama tokom stresa jeste membranska NADPH oksidaza, čijom se aktivnošću ove molekule naročito akumuliraju u apoplastu, što dovodi do aktiviranja puteva antioksidativnog sistema zaštite (Wang i sar., 2016). Antioksidativni odbrambeni sistem u biljnim ćelijama djeluje integrisano u nekoliko ćelijskih organela kroz različite enzimске i neenzimske mehanizme koji omogućavaju najadekvatniju adaptaciju ćelije na cjelokupno promijenjen redoks sistem (Slika 14.). Mehanizam dismutacije superoksid anjon radikala katalizovan superoksid dismutazom uključuje promjene oksidacionog stanja metala (Cu, Fe, Mn, Zn) koji je vezan za enzim, a dokazano je da kod suše uklanjanje  $O_2^{\cdot-}$  smanjuje rizik od nastanka  $OH^{\cdot}$  kroz Haber-Weiss-ovu reakciju, što je naročito izraženo kod biljaka tolerantnih na sušu (Yang i sar., 2008, Turkan i sar. 2005). Adaptacije na sušu se mogu ispoljavati i kroz lignifikaciju ćelijskih zidova u kojima posreduju peroksidaze Klase III, vršeći transfer elektrona na fenolna jedinjenja. Flavonol-peroksidazna reakcija u vakuolama mezofilnih ćelija može da se odvija kao „čistač“  $H_2O_2$  kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima (Takahama, 1989). Interakcija fenola i peroksidaza Klase III tokom suše može biti uključena u eliminaciju ROS u okviru sistema peroksidaze-fenoli-askorbat, pri čemu peroksidaze mogu da koriste fenole kao supstrate za transfer elektrona, a fenoli se obnavljaju preko askorbata zavisnog od redukovanog glutationa (Takahama i Oniki, 1997).

U uslovima suše veoma važna uloga pripada i drugim niskomolekularnim neenzimskim jedinjenjima, kakvi su karotenoidi, sa kojima ostale komponente antioksidativne odbrane ostvaruju kooperativni efekat. Uloga karotenoida u zaštiti biljaka od suše se u prvom redu reflektuje u sprječavanju fotooksidativnih oštećenja hloroplasta. Karotenoidi "hvataju" singlet kiseonik fizičkim mehanizmima, pri čemu se višak energije prenosi na strukturu karotenoida bogatu elektronima. Karotenoid se na taj način ekscituje u "tripletno" stanje ( $3Car^{\bullet}$ ), a zatim vraća u prvobitno stanje ( $1Car$ ) gubeći energiju toplotom. Pošto je ovo fizički mehanizam, struktura karotenoida ostaje nepromijenjena i karotenoid nastavlja zaštitno djelovanje protiv novih molekula singlet kiseonika. Relativna sposobnost hvatanja singlet kiseonika kod nekog karotenoida zavisi

od broja konjugovanih dvostrukih veza, a terminalni jononov prsten  $\beta$ -karotena (i srodnih karotenoida) nema uticaja (Young i Lowe, 2001). Antioksidativna aktivnost karotenoida zavisi od koncentracije kiseonika u sistemu. Pri niskim parcijalnim pritiscima kiseonika,  $\beta$ -karoten inhibira oksidaciju. Suprotno, inicijalna antioksidativna aktivnost  $\beta$ -karotena praćena je prooksidativnim reakcijama pri višim koncentracijama kiseonika (Stahl i Sies, 2003). Iako u uslovima nedostatka vode kompletan fotosintetički aparat trpi oštećenja, i sadržaj ukupnih karotenoida se smanjuje (Nazarli i sar. 2010.), koncentracija pojedinih vrsta se povećava kao rezultat antioksidativnog djelovanja protiv ROS nastalih u ovakvom stresu. Tako npr. sadržaj  $\beta$ -karotena se može povećati i do šest puta u ćelijama lista pšenice podvrgnute suši što se može dovesti u vezu sa kontrolom oksidacionih procesa na membranskom nivou, ograničavajući na taj način porast nivoa peroksida i lipidnih radikala (Bartoli i sar. 1999).

Razumijevanje metaboličkih mehanizma iz područja antioksidativnog metabolizma omogućavaju poboljšano uzgajanje biljaka koje tako u uslovima suše postaju konkurentne i ekspanzivne u zauzimanju prostora te efikasnije i ekonomičnije koriste uslove i resurse spoljašnje sredine.



Slika 14: Šematski prikaz antioksidativnog metabolizma i generisanja ROS u mitohondrijama, peroksisomima i hloroplastima ćelija fotosintetički aktivnih tkiva biljaka tokom suše. PSI-(fotosistem I), PSII-(fotosistem II), Fd-(ferodoksin), AsA-(redukovani askorbat), DHA (dehidroaskorbat), MDA·-(monodehidroaskorbil-radikal), GSH- (redukovani glutation), GSSG-( glutation disulfid, oksidovani glutation), tAPX-(tilakoidna askorbat peroksidaza), sAPX- (stromalna askorbat peroksidaza), mAPX-(askorbat peroksidaza iz mitohondrija), cAPX- (citolzna askorbat peroksidaza), MDAR-(monodehidroaskorbat reduktaza), DHAR-(dehidroaskorbat reduktaza), GR- (glutacion reduktaza), SOD (superoksid dismutaza), Nox (NADPH oksidaza), POD (peroksidaza Klase III), CAT (katalaza), ETC (electron transportni lanac), (Original).

## 2.6. ISTRAŽIVANJA O UTICAJU SUŠE NA VRSTU *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Najviše diskusije oko sistematskog položaja u okviru roda *Solanum* vodilo se kod paradajza, čija se pripadnost rodovima *Solanum* ili *Lycopersicon* mijenjala kroz istoriju. Iako ga mnogi taksonomi svrstavaju u rod *Solanum*, naziv *Solanum lycopersicum* L. nije još u potpunosti prihvaćen od strane oplemenjivača. Molekularni taksonomi, Knapp i sar. (2004) su u časopisu Prirodnjačkog muzeja Londona, predstavili i predložili novu sistematiku u porodici Solanaceae,

pri čemu vrste *L. esculentum*, *L. juglandifolium*, *L. ochranthum*, *L. sities*, *L. lycopersicoides*, *L. pennelli*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. parviflorum*, *L. chmeilewskii* i *L. cheesmaniae* vraćaju unutar roda *Solanum*. ([https://solgenomics.net/about/solanum\\_nomenclature.pl](https://solgenomics.net/about/solanum_nomenclature.pl)). Danas su u naučnoj literaturi u upotrebi naziv *Lycopersicon esculentum* Mill. (Kochieva i sar., 2002), ali i naziv *Solanum lycopersicum* L. (Daniel i sar., 2006). Nakon naučnog potvrđivanja Mendelovih radova iz 1866. od strane Huga de Vriesa i Karla Korensa, neke divlje i kultivisane vrste paradajza, duvana i petunije su već u 20. vijeku postale vodeće model biljke u genetičkim istraživanjima. Danas je paradajz jedna od najznačajnijih biljnih kultura koja se uzgaja i konzumira u čitavom svijetu, a kvalitativne karakteristike ploda imaju ogroman uticaj na ekonomski aspekt proizvodnje. U Republici Srbiji, kao i u zemljama regiona, dominantan je plastenički tip proizvodnje bez dodatnog zagrijavanja, ali se paradajz mnogo uzgaja i na otvorenom polju. U posljednjih desetak godina prosječni prinosi paradajza u Srbiji su iznosili od oko 9,5 t h<sup>-1</sup> (za period 2009-2011. ) do 13,5 t h<sup>-1</sup> (za period od 2012-2016) ili čak 16 t h<sup>-1</sup> (za period (2018) (Statistički godišnjak Srbije, 2012; Popović i sar., 2015; Ivanišević i sar., 2018). Poređenjem sa drugim zemljama prinosi paradajza u Srbiji su niski, pogotovo kada se uzme u obzir procjena da se u datim agroekološkim uslovima može ostvariti 50-80 t h<sup>-1</sup>. Smatra se da je genetski potencijal domaćih sorti i hibrida paradajza zastupljenih u proizvodnji dobar te da je uzrok ovako niskim prinosima neadekvatna tehnologija gajenja, što se u prvom redu odnosi na neadekvatno navodnjavanje (Takač i sar., 2007). Za optimalan rast i razvoj ovoj biljnoj vrsti neophodna je odgovarajuća količina vode tokom cijelog životnog ciklusa, a početne faze se smatraju najosjetljivijim (Foolad, 2007). Istraživanja o uticaju suše na biljke paradajza tokom vegetativnih fenofaza su naročito značajne ukoliko se uzme u obzir da asimilacija CO<sub>2</sub> i produkcija sekundarnih metabolita tokom ovog perioda determinišu reproduktivni period, tj. veličinu i kvalitativne karakteristike plodova (Chen i sar., 2015). Takođe još neki autori smatraju da je paradajz vrsta koja je osjetljiva na sušu u svim fenofazama životnog ciklusa, iako se smatra da postoje određene razlike u stepenu tolerancije na sušu u odnosu na hibrid, odnosno komercijalni kultivar (Wahb-Allah i sar., 2011; Sánchez-Rodriguez i sar., 2010). Negativni efekti suše na fotosintetičku aktivnost u listovima biljaka paradajza povećavaju stepen fotooksidativnih reakcija koje utiču na metabolizam a samim tim i na njihov rast i razvoj (Muños i sar., 2018). Tome najviše doprinose oksidativna oštećenja molekula hlorofila, naročito nakon izlaganja mladih sadnica umjerenoj ali dugotrajnoj suši (Al Hassan i sar., 2015). Ipak, mehanizmi tolerancije na dugotrajnu sušu u ćelijama listova paradajza i modifikacije fotosintetičkih puteva u

njima još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Razlog za to je možda što je većina autora koji su se bavili proučavanjem uticaja suše na razvoj i fiziološke karakteristike paradajza ispitivala odgovor vrste u kraćim vremenskim periodima (do jedne ili dvije nedjelje), iako postoje dokazi da izloženost biljaka produženom vodnom stresu može dati bolji, jasniji i mnogo realniji prikaz metaboličkog odgovora (Pennypacker i sar., 1990; Yuan i sar., 2015). Osim toga, i strategije u metaboličkim putevima antioksidativnog odgovora značajno variraju u zavisnosti od dužine vremenskog perioda tokom kojeg su biljke izložene suši (Tausz i sar., 2001; Osman, 2015; Junker i sar., 2017). Pojedini istraživači su ispitivali puteve antioksidativnog metabolizma kod paradajza u uslovima dugotrajne suše, ali se ipak u literaturi ne može izdvojiti određen mehanizam koji je opšte prihvaćen (Ünyayar i sar., 2005; Sanchez-Rodriguez i sar., 2010; Tapia et al., 2016). U tom smislu, neki autori naročito ističu značaj određenih metabolita ili biohemijskih puteva u detoksifikaciji ROS, gdje je poseban akcenat stavljen na kooperativni efekat između SOD i CAT (Sun i sar., 2007), iako nije zanemaren ni značaj uloge fenola (Kusvuran i Dasgan, 2017) kao ni redoks-stanja askorbata (Garchery i sar., 2013). Uzimajući u obzir da je uzgajanje paradajza najviše prisutno u semiaridnim regionima u kojima je suša posljedica progresivnih klimatskih promjena, istraživački interesi u ovoj oblasti su još uvijek aktuelni (Rivielli et al., 2013).

## **2.7. ISTRAŽIVANJA O UTICAJU SUŠE NA VRSTU *ZEA MAYS***

Kukuruz (*Zea mays* L.) je monokotiledona jednogodišnja biljna vrsta iz porodice trava (Poaceae), a od svojih srodnika, tj. drugih predstavnika iz ove porodice, najviše se razlikuje po krupnijoj i višoj stabljici te širim listovima (Kovačević i Rastija, 2009.). Literaturni podaci ukazuju da je centar porijekla kukuruza područje Srednje Amerike, tačnije današnje područje Meksika, a postoje dokazi da se tu uzgajao čak i 7000 do 8000 godina prije nove ere (Hastorf, 2009). Tu mu je bio centar diverziteta odakle se širio po ostalim područjima Srednje Amerike, a nekoliko hiljada godina kasnije i prema Sjevernoj Americi. Nakon Kolumbovog otkrića Amerike kukuruz je prenešen i na tlo Evrope, pa se uskoro poslije toga, tokom 16. vijeka počeo uzgajati i kod nas. Kukuruz predstavlja jednu od tri ekonomski najznačajnije vrste žitarica u svijetu pri čemu se oko 80% proizvedenog sjemena koristi za animalnu ishranu, a ostatak za ljudsku upotrebu (Ali i sar., 2010). Prema izvještajima Organizacije za ishranu i poljoprivredu (FAO) kukuruz je u ukupnoj svjetskoj proizvodnji u prosjeku na drugom mjestu u odnosu na ostale žitarice, a intenzivno se uzgaja na teritoriji Republike Srbije, približno na milion hektara. Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku Srbije za 2018. godinu, ostvaren je prosječni prinos od 7,7 t ha<sup>-1</sup>. Danas je

najveća svjetska proizvodnja kukuruza zastupljena u SAD, a smatra se da će do 2025. godine ova vrsta imati najveću ukupnu proizvodnju u odnosu na sve ostale, najviše zbog povećane potrebe i potrošnje na području zemalja u razvoju (Bekrić i Radosavljević, 2008). S obzirom da sa pšenicom i rižom spada u vodeće poljoprivredne biljne vrste u svijetu koje ishranjuju čitavu planetu, opravdana su i ogromna interesovanja za proučavanje njegovog metabolizma i načina uzgajanja u domenu raznih naučnih disciplina. Kad je u pitanju vodni režim, većina hibrida kukuruza vrlo ekonomično troši vodu te ima relativno mali transporacioni koeficijent, u prosjeku oko 250–400 mm, a u prilog tome ide i dobro ravijen korijenov sistem koji omogućava bolje usvajanje iz dubokih zemljišnih slojeva (Hayat i sar., 2020). Ipak osjetljivost kukuruza na sušu je naročito izražena tokom reproduktivnih fenofaza pri čemu dugotrajna suša može značajno da smanji prinos sjemena (Kovačević i Rastija, 2009). Poznato je da se listovi kukuruza odlikuju specifičnom anatomijom te da prisustvo specijalizovanih Kranz ćelija omogućava NADP-malatni tip C4 fotosinteze, a karboksilacija se odvija u citoplazmi mezofilnih ćelija (Vukadinović, 1999). Bez obzira na ove evolutivne prilagođenosti suša značajno utiče na smanjenje fotosintetičke aktivnosti u listovima kukuruza (Anjum i sar., 2011) a takođe je zabilježeno i smanjenje lisne površine i sadržaja hlorofila (Khan i sar., 2001, Yao i sar., 2012). Smatra se da je osjetljivost kukuruza na sušu izražena zbog posebno naglašenog zahtjeva za vodom tokom izduživanje i rasta ćelija jer biljke nemaju alternativu da odgode rast vegetativnih organa (Anđelković i sar., 2012). Kod mnogih hibrida kukuruza stres izazvan sušom dovodi do unutarćelijskog povećanja koncentracije superoksid anjon radikala i vodonik peroksida i do 45%, što posljedično dovodi i do povećanja sadržaja MDA usljed oksidativnih oštećenja membranskih struktura (Anjum i sar., 2017). Suša u toku reproduktivnih faza razvoja kukuruza dovodi do akumulacije ROS koje mogu izazovu membranska oštećenja ćelija u anterama prašnika što dovodi do steriliteta muških cvjetova (Kelliher i Walbot, 2012). Novija istraživanja na biljkama kukuruza ukazuju da stres izazvan sušom dovodi do povećanja koncentracije vodonik peroksida u apoplastu ćelija vršne zone korijena, odnosno u apikalnom meristemu, što onemogućava izduživanje ćelija i zaustavlja rast korijena (Voothuluru i sar., 2020). Autori u ovom slučaju smatraju da je povećanje koncentracije apoplastnog vodonik peroksida u nefotosintetičkom tkivu, kao što je meristem korijena najviše uzrokovano povećanom aktivnošću oksalat oksidaze, iako nisu isključili ni mogućnost njegovog generisanja posredstvom SOD i APX. Zbog zatvaranja stoma u listovima suša utiče na smanjenje fotosintetičkog intenziteta te mijenja metabolizam ugljenih hidrata i aminokiselina



(Mohammadkhani i Heidari., 2008 a). Mehanizmi tolerancije biljaka kukuruza na vodni deficit podrazumijevaju osmotska prilagođavanja i uključivanje antioksidativnih sistema odbrane. Utvrđena je pozitivna korelacija između otpornosti na sušu i ekspresije Cu/ZnSOD kod kukuruza, dok je kod većine hibrida potvrđena negativna korelacija POD i CAT aktivnosti (Malan i sar., 1990; Anjum i sar., 2011; Anjum i sar., 2017). Redoks stanje askorbata i mehanizam regeneracije ovog molekula imaju esencijalnu ulogu u detoksifikaciji nastalog vodonik peroksida kod većine genotipova kukuruza izloženih uticaju suše, pri čemu se doniranje elektrona za redukciju ROS najčešće vrši u kooperaciji sa askorbat peroksidazom (Chung i sar., 2011). Precizne analize mehanizama tolerantnosti na sušu u uslovima kontrolisanog stresa kod kukuruza pruža dragocjene podatke koji doprinose uspješnom oplemenjivanju genotipova koji imaju bolja adaptivna svojstva.

## **2.8. PRIMJENA ZEOLITA KOD GAJENJA BILJAKA**

Tokom prošle decenije naglo se povećao interes za korištenje prirodnih aluminosilikata radi poboljšanja metoda u uzgajanju biljaka. U tom smislu, najpoznatiji je zeolit, mineral za kojeg se vjeruje da posjeduje osobine vezivanja i uravnoteženog otpuštanja vode i mineralnih elemenata što može da doprinese boljem vodosnabdijevanju i mineralnoj ishrani biljaka. Termin zeolit prvi je upotrijebio švedski naučnik Kronsted kada je ispitujući strukturu različitih minerala otkrio da neki od njih imaju osobinu reverzibilnog otpuštanja vode prilikom zagrijavanja, a nazvao ih je zeolitima (kamenje koje ključa). Zeoliti su hidratizovani aluminosilikati alkalnih i zemnoalkalnih minerala sa otvorenom trodimenzionalnom strukturom, koja je sposobna reverzibilno vezati ili otpustiti vodu (Chibani i sar., 2016). Minerali sa ovakvom strukturom se sastoje od aluminijuma i silikotetraedra koji formiraju stabilne komplekse (Malopa i sar., 1999). Ovakva struktura zeolita, poput pčelinjeg saća, sadrži mnogobrojne kanale i šupljine koje se pune katjonima i molekulima vode (Karapinar, 2009). U hemijskom smislu zeolit se može predstaviti formulom:



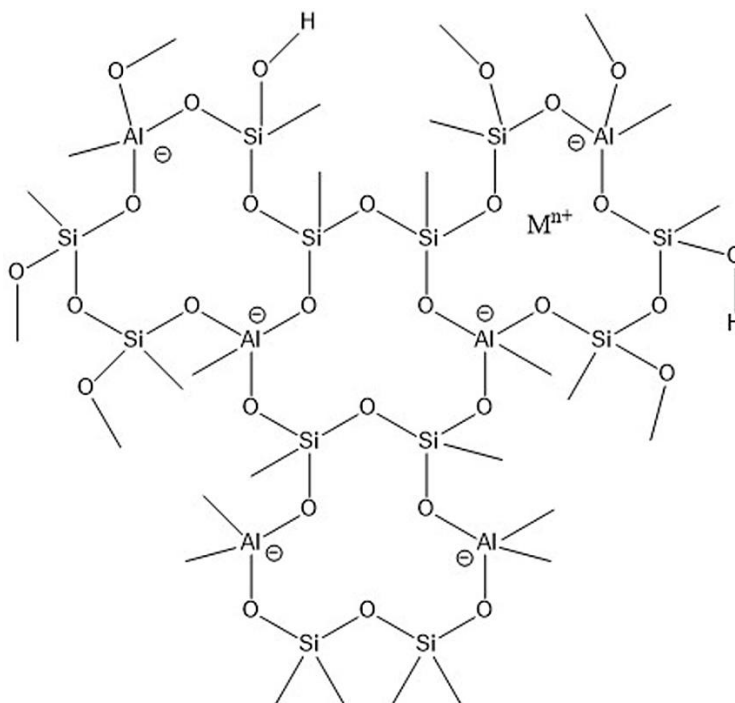
Gdje je

$M_{x/n}$  - vanmrežni katjon čije je naelektrisanje  $+n$

$[(AlO_2) \times (SiO_2)]$ - tetraedri silicijuma i aluminijuma koji zajedno grade mrežnu strukturu

$zH_2O$ - z vezanih molekula vode po jediničnoj ćeliji

Tetraedri silicijuma su elektroneutralni dok su tetraedri u kojima se nalazi jon aluminijuma elektronegativni pa je neophodan jon koji će izbalansirati taj nedostatak naelektrisanja. Taj katjon se naziva vanmrežni katjon. Mrežu kanala i šupljina čine Al i Si joni u tetraedru koji su iskoordinisani sa jonima kiseonika koje dijele s drugim zajedničkim Al i Si tetraedrima. Primarni tetraedri se mogu povezivati u sekundarne poliedarske gradivne jedinice. Ovakva struktura je prisutna kod često zastupljenog oblika prirodnog zeolita, tzv klinoptilolit, a šematski prikaz ovakve građe predstavljen je na Slici 15.



Slika 15: Tetraedalna struktura zeolita vrste klinoptilolit (preuzeto sa wikimedia commons, kategorija CC-BY-SA: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zeolite.jpg>)

Većina istraživanja o zeolitima su uglavnom bazirana na proučavanjima njihovih fizičko-hemijskih osobina, a dobijena saznanja ih čine atraktivnim za upotrebu u brojnim granama poljoprivrede. U tom smislu, osim visokog retencionog kapacijeta za vodu, mogu da sprječavaju promjenu pH te da utiču na biodostupnost hemijskih elemenata u zemljištu (Ming i Allen 2001; Coppola i sar., 2003; Pisarović i sar., 2003). Negativno površinsko naelektrisanje alumosilikatne strukture i izražen kapacitet za razmjenu katjona sa elementima iz zemljišnog rastvora utiču na koncentraciju metala koji su važni za nutritivni status biljaka (Mumpton, 1999). S obzirom na ekonomsku isplativnost i dostupnost u prirodi u posljednjih nekoliko godina intenzivno se

eksploatiše i koristi od strane poljoprivrednih proizvođača (Malekian i sar., 2011; Aghaalikhani i sar., 2012; Hazrati i sar., 2017; Jakkula i Wani, 2018). U tom smislu potvrđen je pozitivan uticaj na prinos kod mnogih biljnih vrsta (Colombani i sar., 2014, Chen i sar., 2017). Postoje istraživanja u kojima je dokazano da zeolit može umanjiti štetne efekte suše na rast biljaka zahvaljujući osobini apsorpcije i postepenog otpuštanja vode pa tako dovodi do povećanja dostupnosti vode biljkama u uslovima suše (Abdi i sar., 2006; Gholizadeh i sar., 2010). S druge strane, pokazano je da stepen sprečavanja suše može da zavisi i od koncentracije ovog alumosilikata u supstratu (Ghanbari i Ariaifar 2013). Osim toga neki autori su dokazali da primjena zeolita u cilju sprečavanja suše umjereno umanjuje određene markere vodnog stresa kod biljaka, iako ne ublažava u potpunosti njihov efekat (Kojić i sar., 2012; Nozari i sar., 2013; Porkashefi i sar, 2016). Takođe, neki autori smatraju da zeolit može da dovede i do promijenjenog režima mineralne ishrane jer može da utiče na biodostupnost kalcijuma, kalijuma, fosfora ili azota ukoliko se ne doda odgovarajuća prihrana (He i sar., 1999; Karami i sar., 2011). S obzirom da smanjena dostupnost vode značajno može da utiče na mineralnu ishranu biljaka, proučavanje vodnog stresa u dodatku zeolita može biti zanimljivo s aspekta mineralne ishrane u uslovima suše. Osim toga većina istraživanja vezanih za primjenu zeolita u cilju sprečavanja suše su fokusirana na fiziološke pokazatelje i karakteristike prinosa, dok su biohemijski mehanizmi adaptacije biljaka u ovim uslovima vrlo malo ispitani. To se naročito odnosi na komponente antioksidativnog metabolizma, od kojih značajno zavisi energetska status u ćeliji, što se odražava na kraju i na kompletan metabolizam i fiziološki status.

### 3. CILJEVI I ZADACI

Polazna hipoteza u ovom istraživanju je bila da primjena zeolita u sprečavanju ili ublažavanju posljedica stresa izazvanog sušom neće biti jednako efikasna kod dvije različite vrste biljaka. Sa dodatnom pretpostavkom da i količina zeolita u supstratu može da bude značajan faktor koji utiče na njegovu efikasnost, cilj ovog istraživanja je bio da se ispita učinak njegove primjene u sprečavanju nastanka oksidativnog stresa kod paradajza i kukuruza u uslovima suše te koliko je on bio zavisen od primjenjene koncentracije. S obzirom da odgovor biljaka na uslove suše može da bude specijes specifičan, dodatni cilj u ovom istraživanju je bio da se ispituju mehanizmi metaboličkog odgovora koji se aktiviraju kod ispitivanih vrsta biljaka na ovaj tip stresa. Planirano je da se realizacija ciljeva ostvari kroz sljedeće zadatke:

- Praćenje morfoloških parametara biljaka (rast i razvoj izdanka) i analiza anatomskih karakteristika listova
- Ispitivanje biohemijско-fizioloških karakteristika povezanih sa procesom fotosinteze: intenzitet fiksacije CO<sub>2</sub> i transpiracije, dimenzije i gustina stoma, relativni sadržaj vode u listovima, koncentracija fotosintetičkih pigmenata, sadržaj enzima Rubisco).
- Analiza proteinskih profila metodom elektroforeze u cilju detekcije proteina specifičnih u odgovoru na sušu
- Kvantitativna analiza sadržaja hemijskih elemenata
- Analiza parametara antioksidativnog metabolizma kao indirektnog pokazatelja intenziteta oksidativnog stresa (aktivnosti superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze, katalaze, peroksidaza Klase III, koncentracija askorbata, sadržaj fenola)
- Usporedna analiza dobijenih rezultata između ispitivanih biljnih vrsta i između primjenjenih koncentracija zeolita

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. ANALIZA FIZIČKO-HEMIJSKIH OSOBINA ZEOLITA

Za eksperiment je korišten zeolit pod nazivom pro Herba®, proizveden u kompaniji “Ekofarm zeol” Banja Luka (Slika 16.). Ovo je vrsta prirodnog zeolita- klinoptilolit, koji je je eksploatisan u obliku kamenog tufa sa njegovog prirodnog nalazišta na lokalitetu „Novakovići“ u mjestu Čelinac, u okolini Banja Luke. Komercijalno dostupan zeolit koji je nabavljen od ove kompanije je prečišćen i usitnjen do granulacije 0,1-2 mm.

A)



B)



Slika 16. Zeolit Pro Herba®, komercijalno dostupan u kompaniji Ekofarm zeol, d.o.o. Banja Luka, korišten u eksperimentu (A); Mješavina zeolita i supstrata korištenog za uzgoj biljaka u eksperimentu (B)

#### 4.1.1. Određivanje sadržaja oksida silicijuma i aluminijuma

U cilju hemijske karakterizacije zeolita izvršena je kvantifikacija silicijum dioksida ( $\text{SiO}_2$ ) i aluminijum oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) u akreditovanoj laboratoriji Instituta za ispitivanje materijala i konstrukcija Republike Srpske (IMK RS) u Banjoj Luci. Nakon sušenja uzorka na  $105\text{ }^\circ\text{C}$ , uzorak zeolita je analiziran standardizovanom metodom BAS EN 196-2, koja koristi tehniku rendgenske fluorescentne spektrometrije (XRF). Dobijeni rezultati sadržaja ispitivanih oksida izraženi su kao % u odnosu na masu uzorka.

#### **4.1.2. Određivanje sadržaja metala u zeolitu**

Kvalitativna karakterizacija i kvantifikacija sadržaja metala u zeolitu određena je metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije na aparatu Shimadzu 7000 AA, a prema uputstvima sadržanim u metodi ISO 11047. Prethodna ekstrakcija metala iz zeolita urađena je uz korištenje zlatotopke po metodi ISO 11466. U normalne sudove zapremine 250 mL odmjerena je masa od 3 g vazdušno suvog zeolita, te je pažljivo pipetom dodat 21 mL HCl i 7 mL HNO<sub>3</sub> (28 mL zlatotopke). Pripremljen rastvor ostavljen je 16 sati na sobnoj temperaturi, a zatim se zagrijavao 2 sata na rešou uz korištenje povratnog hladila. Nakon hlađenja rastvor je filtriran kroz filter papir (plava traka) u normalni sud od 100 mL i dopunjen sa bidestilovanom vodom do oznake. Radni rastvori standarda (serije standarda) za ispitivane elemente pripremljeni su iz komercijalno dostupnih sertifikovanih radnih rastvora (MERCK) koncentracije 1000 ppm. Razblaženja su pripremljena sa bidestilovanom vodom, a odabir koncentracija u seriji standarda za pojedini element su rađena u skladu sa očekivanim prosječnim vrijednostima sadržaja ispitivanog elementa u zeolitu. Koncentracije metala u pripremljenim rastvorima uzoraka zeolita su potom očitane na atomskom apsorpcionom spektrofotometru uz korištenje softverskog programa koji direktno očitava rezultate na osnovu jednačine kalibracione krive dobijene za svaki ispitivani element.

#### **4.1.3. Određivanje specifične površine zeolita**

Specifična površina uzorka zeolita određena je Brunauer-Emmett-Teller (BET) metodom, koja omogućava određivanje specifične površine praškastih uzoraka te ukupnu zapreminu pora čestica. Ova metoda je zasnovana na višeslojnoj adsorpciji inertnog azota na površinu čestica te se mjeri zapremina gasa koja zavisi od parcijalnog pritiska pri konstantnoj temperaturi. Analiza je izvršena na aparatu „FLOWSORB II 2300“ a rezultat je izražen kao m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

#### **4.1.4. Određivanje kapaciteta izmjene katjona (KKI)**

Određivanje kapaciteta katjonske izmjene zeolita urađeno je metodom titracije metilen plavim prema standardizovanoj proceduri za glinovite materijale, Američkog udruženja za testiranje materijala (The American Society for Testing Material), ASTM C 837 -81. Metoda se sastoji u direktnom titriranju kisele suspenzije zeolita rastvorom metilen plavog uz stalno miješanje i nanošenje kapi suspenzije staklenim štapićem na filter papir. Odmjereno je 2 g uzorka zeolita, a potom dodato 300 mL destilovane vode. Suspenzija je nakon mućkana inkubirana na

sobnoj temperaturi jedan sat. Nakon toga, pH suspenzije je podešen sumpornom kiselinom ( $5 \text{ mol/dm}^3$ ) do vrijednosti između 2,5-3,8. Nakon toga suspenzija je titrirana sa 5 mL rastvora metilen plavog (0,3 %), miješana je 1-2 minute, a potom je kap suspenzije staklenim štapićem prenešena na filter papir. Postupak je ponavljan, ali sada sa alikvotima od 1 mL metilen plavog do završne tačke titracije, kada se pojavio svijetloplavi krug oko mrlje tamno obojenih čestica zeolita. Kapacitet izmjene katjona je izračunat prema formuli:

$$\text{KKI} = E \times V/W \times 100$$

Gdje je:

KKI- kapacitet izmjene katjona ( $\text{mmol M}^+ / 100 \text{ g}$ )

E-količina metilen plavog (mmol)

V-zapremina metilen plavog utrošena za titraciju (mL)

W- masa osušenog uzorka

#### **4.1.5. Određivanje pH vrijednosti suspenzije zeolita**

Odmjerena masa uzorka zeolita (5 g) suspendovana je u 100 mL destilovane vode uz miješanje na magnetnoj mješalici u trajanju od 15 minuta. Nakon taloženja mjerena je pH vrijednost supernatanta uz pomoć pH-metra Hanna instruments 8521. Miješanje je nastavljeno a mjerenje se vršilo ponovo nakon 30 minuta, a potom nakon 1, 1,5, 2, 6, 24 i 48 h.

## **4.2. POSTAVKA EKSPERIMENATA**

### **4.2.1. Preliminarni eksperiment- istraživanje na biljkama paradajza**

Za preliminarni eksperiment korištene su biljke paradajza (*Solanum lycopersicum* L.), hibrida indeterminantnog tipa rasta stabla, Berberana F1 (Enza Zaden, Holandija). Nabavljene su sadnice starosti 60 dana sa 4-5 potpuno razvijenih listova (sertifikovani sadni materijal), proizvedene iz nekalemljenog rasada u kompaniji „Adria Hithil d.o.o. company“ u Čapljini (Bosna i Hercegovina). Postavka eksperimenta je izvršena u stakleniku Instituta za hortikulturu, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci (Slika 17.). Sadnice su presađene u plastične posude promjera 26 cm, napunjene sa 12,5 L zemljišta za uzgoj biljaka (TS3 Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Njemačka). Jedna polovina biljaka (30 sadnica) je presađena u čisto zemljište, a

druga polovina u mješavinu zemljišta i zeolita (u omjeru 80:20) da bi na taj način sadržaj zeolita u posudama bio 20% u odnosu na ukupnu masu supstrata.



Slika 17. Preliminarni eksperiment postavljen za istraživanje na biljkama paradajza u stakleniku Instituta za hortikulturu Poljoprivrednog fakulteta u Banjoj Luci: A) Spoljašnji izgled staklenika; B) Sadnice paradajza nakon presađivanja, starosti 60 dana; C) Unutrašnjost staklenika; D) Sadnice paradajza prije izazivanja suše (Original).

Nakon toga biljke su raspoređene u 4 bloka sa po 15 biljaka (Randomised block system) u kontrolisane uslove: prosječna temperatura vazduha 26,5 °C, relativna vlažnost vazduha 70%, fotoperiod 12/12 h svjetlo/mrak, uz optimalno navodnjavanje česmenskom vodom sistemom „kap po kap“ i potrebne standardne agro-tehničke mjere, a nakon toga ostavljene da se aklimatizuju na date uslove 15 dana. Nakon perioda aklimatizacije otpočeo je tretman suše, odnosno računanje početka eksperimentalnog perioda u trajanju od 28 dana (od 27.04. do 25.05.2016.), u kojem su biljke iz podijeljenih blokova tretirane kao četiri različite grupe (sa 15 sadnica u svakoj grupi):



- 1) Grupa K (kontrola)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u čisto zemljište bez dodatka zeolita
- 2) Grupa KZ (kontrola + zeolit)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa zeolitom
- 3) Grupa S (suša)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u čisto zemljište bez dodatka zeolita
- 4) Grupa SZ (suša + zeolit)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa zeolitom.

#### **4.2.2. Istraživanje na biljkama paradajza u drugoj godini**

Postavka eksperimenta u drugoj godini na biljkama paradajza urađena je na isti način kao u preliminarnom eksperimentu, s tim da je u ovom slučaju promijenjena koncentracija zeolita u supstratu. Korišten je prostor istog staklenika sa istim uslovima, a nabavljene su sadnice istog hibrida paradajza (Berberana F1) starosti 60 dana. Za ovaj eksperiment zasađeno je 90 sadnica, koje su raspoređene u 6 blokova (po 15 u svakom bloku). U supstrat biljaka iz dva bloka (trećina ukupne količine-30 sadnica) dodat je zeolit u omjeru sa zemljištem 5:95, tako da je njegov udio u ukupnoj masi supstrata bio 5%. Takođe, u supstrat biljaka iz sljedeća dva bloka (30 sadnica), dodat je zeolit u omjeru sa zemljištem 10:90, tako da mu je udio u ukupnoj masi supstrata bio 10%. Preostala trećina biljaka (30 sadnica) zasađena je u čisto zemljište. Nakon perioda aklimatizacije od 15 dana otpočeo je tretman suše, odnosno računanje početka eksperimentalnog perioda u trajanju od 28 dana (od 05.05. do 02.06. 2017.), u kojem su biljke iz podijeljenih blokova tretirane kao šest različitih grupa (sa 15 sadnica u svakoj grupi):

- 1) Grupa K (kontrola)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u čisto zemljište bez dodatka zeolita
- 2) Krupa KZ5 (kontrola + 5% zeolita)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 5% zeolita
- 3) Krupa KZ10 (kontrola + 10% zeolita)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 10% zeolita
- 4) Grupa S (suša)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u čisto zemljište bez dodatka zeolita

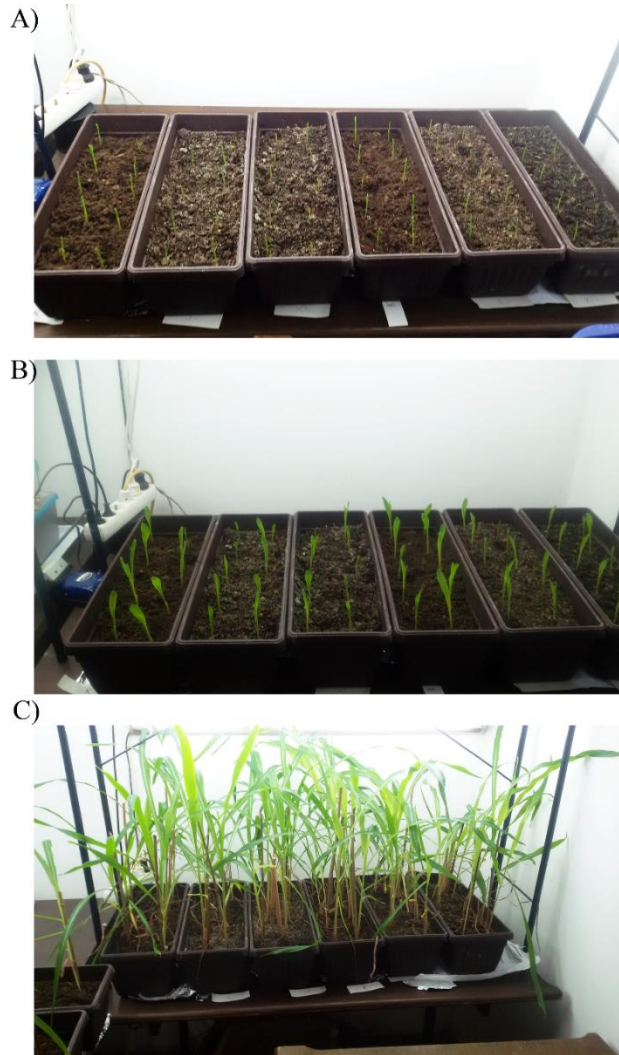
- 5) Grupa SZ5 (suša + 5% zeolita)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 5% zeolita
- 6) Grupa SZ10 (suša + 10% zeolita)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 10% zeolita

#### 4.2.3. Istraživanje na biljkama kukuruza

Za eksperiment je odabrano sjeme kukuruza (*Zea mays* L.) nabavljeno iz Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ u Beogradu, hibrid ZP 606. Sjemena su naklijana tako što su stavljena u petrijevke sa filter papirom, prethodno navlaženim destilovanom vodom i inkubirane u termostatu na 36 °C u trajanju od 6 dana. Nakon isključivanja, klijanci su posađeni u plastične posude (dimenzija 45 x 15 cm, zapremine 5 L) napunjene zemljištem za uzgoj biljaka TS3 Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Njemačka. U svaku posudu je zasađeno po 10 biljaka (ukupno 60). Jedna trećina biljaka (20 klijanaca, po 10 u dvije posude) posađena je u čisto zemljište. Druga trećina je posađena u zemljište pomiješano sa zeolitom u omjeru 5:95, tako da je udio zeolita u odnosu na ukupnu masu supstrata bio 5%. Preostala trećina je posađena u zemljište pomiješano sa zeolitom u omjeru 10:90, tako da je udio zeolita u odnosu na ukupnu masu supstrata bio 10%. Eksperiment je postavljen u laboratoriju za botaniku Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci, u kontrolisanim uslovima: prosječna temperatura vazduha 26 °C, relativna vlažnost vazduha 68%, fotoperiod 12/12 h svjetlo/mrak (jačina 50,6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Slika 18.). Biljke su zalijevane svaki drugi dan sa 25 mL česmene vode (svaka biljka) i ostavljene u ovakvom režimu 21 dan. Nakon toga, otpočeo je tretman suše, odnosno računanje početka eksperimentalnog perioda u trajanju od 48 dana, u kojem su biljke tretirane kao šest različitih grupa (sa 10 sadnica u svakoj grupi):

- 1) Grupa K (kontrola)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u čisto zemljište bez dodatka zeolita
- 2) Krupa KZ5 (kontrola + 5% zeolita)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 5% zeolita
- 3) Krupa KZ10 (kontrola + 10% zeolita)- biljke kod kojih je konstantno primjenjivano optimalno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 10% zeolita
- 4) Grupa S (suša)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u čisto zemljište bez dodatka zeolita

- 5) Grupa SZ5 (suša + 5% zeolita)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 5% zeolita
- 6) Grupa SZ10 (suša + 10% zeolita)- biljke kojima je potpuno uskraćeno navodnjavanje, posađene u zemljište pomiješano sa 10% zeolita



Slika 18. Eksperiment sa biljkama kukuruza postavljen u Laboratoriji za botaniku, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci: A) Klijanci nakon petog dana od sadnje u supstratu; B) Mlade sadnice nakon dvanaest dana rasta; C) Izgled sadnica neposredno prije početka izazivanja suše, (Original).

### 4.3. UZORKOVANJE BILJAKA

Uzorkovanje biljaka paradajza iz preliminarnog eksperimenta obavljeno je četiri puta (uvijek u jutarnjem periodu između 9 i 11 h):

- 1) Prvo uzorkovanje- na početku eksperimentalno perioda, označeno kao „nulti dan“
- 2) Drugo uzorkovanje- nakon 15. dana
- 3) Treće uzorkovanje- nakon 21. dana
- 4) Četvrto uzorkovanje- nakon 28. dana (kraj eksperimentalnog perioda).

Uzorkovanje biljaka paradajza iz eksperimenta u drugoj godini istraživanja obavljeno je tri puta (uvijek u jutarnjem periodu između 9 i 11 h AM):

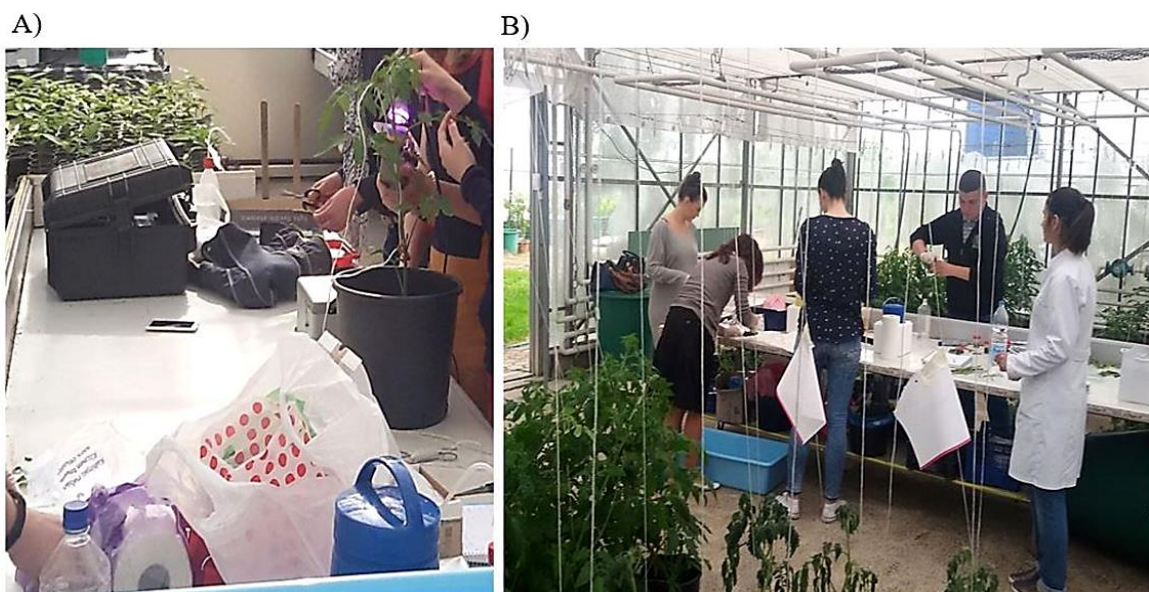
- 1) Prvo uzorkovanje- na početku eksperimentalno perioda, označeno kao „nulti dan“
- 2) Drugo uzorkovanje- nakon 15. dana
- 3) Treće uzorkovanje- nakon 28. dana (kraj eksperimentalnog perioda).

Prvo uzorkovanje kod biljaka paradajza nakon nultog dana obavljeno je kada su primjećeni prvi znaci gubitka turgora listova (dan 15), dok je posljednje uzorkovanje (dan 28) obavljeno u vrijeme vidljivog uvenuća biljaka. Za analize su uzimani listovi, a sva uzorkovanja završena su prije početka formiranja plodova. Morfološke analize kao i mjerenje intenziteta transpiracije i fotosinteze urađeno je neinvazivnim metodama u prostorijama staklenika, a nakon toga je obavljano uzimanje uzoraka, po 3 ponavljanja iz svake grupe (1 biljka kao jedno ponavljanje) (Slika 19.). Sa svake biljke uziman je složeni list iznad treće cvjetne grane, tako da su sakupljene sve pojedinačne lisne ploče bez drški, a potom je od svakog uzorka odvojen dio za različitu vrstu analize. Uzorci za proteinske ekstrakcije su spakovani u lađice od aluminijumske folije, obilježeni i potopljeni u tečni azot. Uzorci za anatomske analize su potopljeni u posude sa pripremljenim fiksativom. Uzorci za analizu otisaka stoma i relativnog sadržaja vode su pakovani u plastične kese, dok su uzorci koji su predviđeni za sušenje i ekstrakciju fenola pakovani u papirne kese. Svi uzorci su nakon uzimanja isti dan proslijeđeni u laboratoriju na dalje postupke za odgovarajuće analize.

Uzorkovanje biljaka kukuruza obavljeno je tri puta (uvijek u jutarnjem periodu između 9 i 11 h AM):

- 1) Prvo uzorkovanje- na početku eksperimentalnog perioda, označeno kao „nulti dan“
- 2) Drugo uzorkovanje- nakon 42. dana
- 3) Treće uzorkovanje- nakon 48. dana (kraj eksperimentalnog perioda).

Uzorkovanje biljaka kukuruza nakon nultog dana prvi put je obavljeno tek u 42. danu jer su tada nastupili prvi znaci uvenuća, a posljednje u 48. danu kada su biljke već potpuno izgubile turgor. Uzorkovanje je završeno dok biljke nisu ušle u reproduktivnu fazu, odnosno dok su bile u fenofazi listanja. U svakom uzorkovanju sakupljani su svi listovi sa jedne biljke a iz svake grupe uzimana su po tri ponavljanja (jedna biljka kao jedno ponavljanje). Svaki uzorak je podijeljen na više dijelova raspoređenih za različitu vrstu analize. Za proteinske ekstrakcije uzorci su odmah potopljeni u tečni azot, za određivanje relativnog sadržaja vode uzorci su pakovani u plastične kese, dok su dijelovi uzoraka predviđeni za sušenje i analizu sadržaja hemijskih elemenata pakovani u papirne kese. Svi uzorci su proslijeđeni odmah nakon uzimanja u laboratoriju na analize.



Slika 19. Uzorkovanje biljaka paradajza u stakleniku tokom preliminarnog eksperimenta: A) Mjerenje intenziteta fotosinteze u listovima; B) Priprema uzoraka za transport u laboratoriju, (Original).

## 4.4. ANALIZE UZORKOVANIH BILJAKA

### 4.4.1. Morfološke analize

Morfološke analize biljaka paradajza (u obe godine istraživanja) obavljene su u prvom uzorkovanju (nulti dan) te nakon 28. dana, a uključile su mjerenje visine izdanka biljaka i broja

formiranih složenih listova po biljci. Za ove analize korištena je BBCH kodirajuća skala za fenofazu biljaka (16 606\* za prvo uzorkovanje i 63 603\* za drugo uzorkovanje).

Morfološke analize biljaka kukuruza obavljene su u sve tri tačke uzorkovanja (nulti dan, 42. dan i 48. dan), a izvršeno je mjerenje visine izdanka biljaka.

#### **4.4.2. Anatomske analize**

Za anatomske analize korišteni su listovi biljaka paradajza iz preliminarnog eksperimenta (nulti dan i 28. dan) te iz eksperimenta iz druge godine istraživanja (nulti dan, 15. dan i 28. dan). Uzorci su najprije potopljeni u rastvor za fiksaciju FAA (formaldehid-sirćetna kiselina-etanol) a potom je izvršena njihova dehidracija serijom rastvora etanola rastuće koncentracije (Sass, 1951). Nakon toga uzorci su ukalupljeni u parafinske blokove, a potom su napravljeni presjeci tkiva debljine 10  $\mu\text{m}$  na rotacionom mikrotomu. Uzorci su obojeni 1% floroglucinolom a potom fotografisani i analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (Leica DM500 stereomicroscope) koji je opremljen sa digitalnom kamerom Leica EC3 i softverom za histološke analize (Leica Acquire software). Određivani su sljedeći parametri: debljina abaksijalnog i adaksijalnog epidermisa, debljina palisadnog i sunderastog mezofila, dijametar provodnog snopića te dijometri zona ksilema i floema. Svaki uzorak je analiziran u 10 vidnih polja a rezultati su izraženi u  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4.3. Analiza stoma**

Za ovu analizu korišteni su listovi biljaka paradajza iz oba eksperimenta a uzorci su uzeti u svim tačkama uzorkovanja. Otisci stoma uzimani su sa naličja listova (abaksijalni epidermis) prethodno premazanih bezbojnim lakom za nokte i osušeni na vazduhu 15 minuta (Petrović i Štrbac, 1996). Nakon toga otisci su uzimani trakicama bezbojnog selotejpa a potom su prenešeni na mikroskopska stakla. Analize su obavljene koristeći iste mikroskopske tehnike i softver koji su korišteni i za anatomske analize listova a određivani su sljedeći parametri: broj stoma/ $\text{mm}^2$ , dužina i širina stominog aparata, dužina i širina stominog otvora. Širina stominog aparata je mjerena kao udaljenost između bočnih spoljašnjih zidova ćelija zatvaračica, dok je dužina stominog aparata mjerena kao udaljenost između gornjih zidova ćelija zatvaračica. Širina stominog otvora je mjerena kao udaljenost između unutrašnjih zidova ćelija zatvaračica a dužina kao udaljenost između gornje i donje ivice na mjestu spajanja ćelija zatvaračica koje formiraju poru stominog otvora. Svaki parametar po uzorku analiziran je u 10 vidnih polja, a rezultati su izraženi u  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.4. Određivanje relativnog sadržaja vode i svježe i suve mase listova

U listovima biljaka paradajza (iz oba eksperimenta) i kukuruza prilikom svakom uzorkovanja određen je relativni sadržaj vode modifikovanom metodom koju su opisali Barrs i Weatherley (1962). Prvo je mjerena svježa masa (na analitičkoj vagi KERN ASL 220- 4 N). Potom su listovi stavljeni na vatu natopljenju destilovanom vodom i tako držani u frižideru na 4<sup>0</sup> C u trajanju od 24 h da bi se mogla izmjeriti turgidna masa. Suva masa je izmjerena nakon sušenja listova na 95 °C u trajanju od 24 h. Dijeljenjem svježe i suve mase se dobio njihov odnos a za izračunavanje relativnog sadržaja vode je korištena formula:

$$\text{Relativni sadržaj vode} = 100 \times [(\text{svježa masa} - \text{suva masa}) / (\text{turgidna masa} - \text{suva masa})]$$

Rezultati relativnog sadržaja vode su izraženi u %, a odnos svježe prema suvoj masi kao g g<sup>-1</sup>.

#### 4.4.5. Određivanje fotosintetičke aktivnosti i intenziteta transpiracije

Aparat za mjerenje protoka gasova (portable photosynthesis system, LCI-SD, Leaf Chamber Analysis System, ADC Bio Scientific Ltd., Hoddsdon, UK) koji posjeduje mjernu komoru površine 6,25 cm<sup>2</sup>, povezanu sa izvorom svjetla (fotosintetički aktivna radijacija-PAR= 1016 ± 6 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) korišten je za određivanje fotosintetičke aktivnosti listova (A) i intenziteta transpiracije (E). Analize su rađene u listovima paradajza (oba eksperimenta, tokom svakog uzorkovanja). Fotosintetička aktivnost je određena na osnovu sadržaja asimilovanog ugljenika odnosno CO<sub>2</sub> i izražena je kao μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, dok je intenzitet transpiracije određen na osnovu protoka izmjerene količine vode kroz stomine otvore i izražen kao mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### 4.4.6. Određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata

Određivanje koncentracije hlorofila i karotenoida rađeno je u listovima paradajza (oba eksperimenta, u svakom uzorkovanju). Uzimano je po 0,5 g biljnog tkiva, koje je potom homogenizovano u avanu sa 5 mL 100% acetona a homogenat je potom profiltriran kroz filter papir u normalni sud od 25 mL. Nakon razblaženja do 25 mL u normalnom sudu, mjerene su apsorbance na 662, 644 i 440 nm uz aceton kao slijepu probu na spektrofotometru UV-1800 UV-Vis SHIMADZU. Za proračun su korištene formule Holma (1954) i Von Wettsteina (1957) da bi se dobile vrijednosti koncentracija u mg/mL:

$$\text{hlorofil } a = 9,784 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644}$$

$$\text{hlorofil } b = 21,426 \times A_{644} - 4,650 \times A_{662}$$

$$\text{karotenoidi} = 4,695 \times A_{440} - 0,268 (a + b)$$

Za preračunavanje koncentracije u mg/g svježe mase korištena je formula:

$$c \text{ (mg/g)} = (c \text{ (mg/mL)} \times V \times R / m) \times 1000$$

pri čemu je:

V- (zapremina ekstrakta),

R- razblaženje

m-masa uzorka

1000-faktor za prevođenje u mg

#### **4.4.7. Ekstrakcija proteina za analizu aktivnosti antioksidativnih enzima i elektroforezu**

Proteinske ekstrakcije izvršene su iz listova biljaka paradajza (oba eksperimenta) i kukuruza nakon svakog uzorkovanja. Uzorci biljnog tkiva (0,5 g) su sprášeni u tečnom azotu do praha uz pomoć tučka i avana, a zatim homogenizovani sa 4 mL ekstrakcionog pufera. Korišten je 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6,4 koji je sadržavao 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid, 0,2% deterdžent TWEEN 20 i 5% polivinilpirolidon. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 10000 rpm na temperaturi od 4 °C. Odvojen je supernatant koji je korišten za analizu aktivnosti peroksidaza Klase III i katalaze te za nativnu i SDS elektroforezu. Za ekstrakciju askorbat peroksidaze korišten je 1 g biljnog tkiva koje je homogenizovano sa 5 mL 90 mM Na-fosfatnog pufera pH 7,8 koji je sadržavao 8% glicerol, 1 mM EDTA (etilen diamin tetrasirćetna kiselina), 5 mM askorbat i 5% polivinilpirolidon. Homogenat je centrifugiran 15 minuta na 13000 rpm na 4 °C, a za analizu je potom odvojen supernatant.

#### **4.4.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina**

Koncentracija ukupnih proteina određena je prema metodi koju su opisali Lowry i saradnici (1951), koristeći goveđi serum albumin (BSA) kao standard. U reakciji peptidnih veza i bakarnih jona u alkalnoj sredini nastaje kompleks koji uz oksido-redukcionu reakciju fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom daju postojanu boju čija se apsorbaca mjeri na 550 nm. U reakciji za analizu sadržaja ukupnih proteina korišteno je 200 µL uzorka i 3 mL rastvora pripremljenog miješanjem: 1) 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH; 2) 1% CuSO<sub>4</sub>; 3) 2 % K-Na tartarata, u omjeru 98:1:1. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta dodato je 0,6 mL Folin-Ciocalteu



reagensa (razblaženog destilovanom vodom u omjeru 1:3) i uzorci su inkubirani narednih 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Za mjerenje je korišten spektrofotometar UV-1800 UV-vis SHIMADZU. Na osnovu dobijenih apsorbanci preračunata je koncentracija proteina (*mg/mL*) iz jednačine kalibracione krive za BSA ( $y = 0.617 X + 0.046$ ,  $R^2 = 0.9922$ ).

#### **4.4.9. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza Klase III**

Peroksidazna aktivnost je određena modifikovanom metodom koju su opisali Teisseire i Guy, (2000). Peroksidaze katalizuju oksidaciju pirogalola do purpurogalina u prisustvu vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), pri čemu se prati prosječno povećanje apsorbance na 430 nm u toku jednog minuta (talasna dužina koja odgovara nastanku proizvoda oksidacije pirogalol-purpurogalin,  $\epsilon_{430} = 12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Reakciona smjesa u staklenoj kivetu (3 mL) je sadržavala 50  $\mu\text{L}$  uzorka (proteinskog ekstrakta), 10 mM pirogalol i 3 mM  $H_2O_2$  u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6,4 zagrijanom na 37 °C. Aktivnost peroksidaza je izražena kao  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina min}^{-1}$ .

#### **4.4.10. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze**

Katalazna aktivnost određena je metodom koju je opisao Aebi (1984). Reakciona smjesa u kvarnoj kivetu (3 mL) je sadržavala 100  $\mu\text{L}$  uzorka (proteinskog ekstrakta) i 0,03%  $H_2O_2$  u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6,8 zagrijanom na 37 °C, pri čemu je praćeno prosječno smanjenje apsorbance u toku jednog minuta na 240 nm. Katalazna aktivnost je preračunata na osnovu koncentracije proteina, promjene apsorbance i molarnog ekstinkcionog koeficijenta za  $H_2O_2$  na 240 nm ( $\epsilon_{240} = 43.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i izražena kao  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina min}^{-1}$ .

#### **4.4.11. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze**

Aktivnost askorbat peroksidaze je određena modifikovanom metodom koju su opisali Nakano i Asada (1981). Reakciona smjesa u kvarnoj kivetu (3 mL) je sadržavala 50  $\mu\text{L}$  uzorka (proteinskog ekstrakta) te 0,5 mM askorbat i 0,1 mM  $H_2O_2$  u 50 mM Na-fosfatnom puferu pH 7, zagrijanom na 37 °C. Pri tom je praćeno prosječno smanjenje apsorbance na 290 nm u toku jednog minuta. Na osnovu promjene apsorbance, koncentracije proteina i molarnog ekstinkcionog koeficijenta ( $\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) preračunata je APX aktivnosti i izražena kao  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina min}^{-1}$ .

#### 4.4.12. Nativna elektroforeza

Tehnika native poliakrilamidne gel elektroforeze (PAGE) korištena je za razdvajanje i analizu enzimskih izoformi peroksidaza Klase III i superoksid dismutaza iz proteinskih frakcija uzoraka paradajza (iz oba eksperimenta). Iz proteinskih frakcija dobijenih iz listova kukuruza ova tehnika je korištena za iste analize, kao i za razdvajanje katalaznih izoformi. Za određivanje enzimske aktivnosti elektroforetskim metodama potrebno je očuvati proteine u nativnoj konformaciji, odnosno ne izazivati njihovu denaturaciju u uzorcima. Zbog toga se takva metoda naziva nativna elektroforeza. Diskontinuirana PAGE je urađena korištenjem 10% gela za razdvajanje izoformi SOD i POD Klase III i 8% gela za razdvajanje CAT izoformi te 5% gela za koncentrovanje. Gelovi su pripremljeni na sljedeći način:

*Gel za koncentrovanje 5% (5 mL)*

0,5 M Tris pH 6,8 - 0,63 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30% - 0,83 mL

Destilovana voda - 3,4 mL

Amonijum persulfat (APS) 10% -50  $\mu$ L

Tetra metilen diamin (TEMED)- 5  $\mu$ L

*Gel za razdvajanje 10% (10 mL)*

1,5 M Tris pH 8,8- 0,63 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30%- 3,3 mL

Destilovana voda- 4 mL

APS- 100  $\mu$ L

TEMED- 5  $\mu$ L

*Gel za razdvajanje 8% (10 mL)*

1,5 M Tris pH 8,8- 2,5 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30%- 2,7 mL

Destilovana voda- 4,6 mL

APS- 100  $\mu$ L

TEMED- 6  $\mu$ L

Pufer za elektroforezu je sadržavao 0,025M Tris i 0,192 M glicin pH 8,3.

#### *Priprema uzoraka:*

Pomiješano je 100  $\mu$ L uzorka (proteinska frakcija) sa 50  $\mu$ L pufera za uzorke (10% glicerol, 50 mM Tris pH 6,8, 0,1% bromfenol plavo.) Na osnovu koncentracije proteina u uzorcima izražene kao mg/mL preračunate su zapremine svih uzoraka koje treba nanijeti da bi u bunarčićima bilo po 15  $\mu$ g proteina.

Nakon nanošenja uzoraka na gelove, na aparatu za elektroforezu (BIO-RAD Mini-PROTEAN® TGX™ Tetra Vertical Electrophoresis Cell ) podešena je jačina električne struje od 18 mA i napon od 100 V, a kad su uzorci prešli u gel za razdvajanje, napon je povećan do 160 V do kraja trajanja elektroforeze.

#### *Specifično bojenje peroksidaze Klase III*

Nakon elektroforeze gelovi su inkubirani u rastvoru koji je sadržavao: 0,01% 4-hloro- $\alpha$ -naftol (rastvoren u metanolu-5 mL) i 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rastvorene u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6,4 (45 mL). Nakon 10 minuta peroksidazne izoforme su detektovane kao ljubičaste trake na providnom gelu.

#### *Specifično bojenje superoksid dismutaze*

Gelovi su 30 minuta inkubirani u mraku, u rastvoru koji je sadržavao 0,02% NBT (nitroblue tetrasolium), 0,004% riboflavin, 0,004% TEMED i 2 mM EDTA u 0,1 M Tris puferu pH 7,8. Nakon toga, gelovi su isprani destilovanom vodom i osvijetljeni od UV svjetlom a SOD izoforme su detektovane kao bijele trake na ljubičastom gelu.

#### *Specifično bojenje katalaze*

Gelovi su prvo inkubirani 5 minuta u 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, potom su isprani u destilovanoj vodi, a nakon toga su potopljeni u rastvor koji je sadržavao 1% kalijum heksacijanoferat K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] i 1% feri hlorid (FeCl<sub>3</sub>). Katalazne izoforme su detektovane kao žute trake na zelenom gelu.

Nakon završenog bojenja, svi gelovi su skenirani, a potom je izvršena kvalitativna analiza enzimskih izoformi POD, SOD i CAT određivanjem Rf vrijednosti svih detektovanih traka na

gelu. Za SOD izoforme izvršena je i kvantitativna analiza njihovog sadržaja metodom denzitometrije uz pomoć softverskog programa TotalLab (ImageMaster TotalLab TL 120 software, Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA). Sadržaj SOD po uzorku je dobijen zbirom iznosa svih izoformi u jednom uzorku a predstavljen je kao relativna jedinica-U.

#### **4.4.13. Određivanje molekulske mase peroksidaznih izoformi modifikovanom SDS elektroforezom**

Za peroksidazne izoforme urađena je dodatna karakterizacija modifikovanom SDS-PAGE radi određivanja njihovih molekulskih masa u nativnoj konformaciji, prema metodi koju su opisali Meisrimler i saradnici (2014). Korišten je 12% gel za razdvajanje i 5% gel za koncentrovanje. Udio SDS-a iznosio je 0,1% (w/v) u svim rastvorima i gelovima. Uzorci su pripremani na isti način kao i za nativnu PAGE, s tim da je jedina razlika bila dodatak SDS-a (0,1%) u pufer za uzorke. Nakon završetka elektroforeze, gelovi su inkubirani u rastvoru koji je sadržavao: 1 mM 3,3-diaminobenzidin (DAB) i 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 0,1M Na-fosfatnom puferu pH 6,4. Nakon 15 minuta POD izoforme su detektovane kao plavo-zelene trake na providnom gelu. Molekulske mase razdvojenih POD izoformi su određene poređenjem sa proteinima poznatih molekulskih masa iz korištenog standarda (Dual Colour, Bio-Rad, Njemačka, opsega molekulskih masa 10-240 kDa). Standardna kriva je napravljena kao zavisnost logaritma molekulskih masa standarda od R<sub>f</sub> vrijednosti, a iz dobijene jednačine određivane su molekulske mase POD izoformi u uzorcima.

#### **4.4.14. SDS elektroforeza**

SDS-PAGE je korištena za razdvajanje proteina na osnovu molekulskih masa, a urađena je po metodi koju je opisao Laemmli (1970). Korišteni su 5% gel za koncentrovanje i 12% gel za razdvajanje pripremljeni prema sljedećoj proceduri:

*Gel za koncentrovanje 5% (5 mL)*

0,5 M Tris pH 6,8 - 0,63 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30% - 0,83 mL

Destilovana voda - 3,4 mL

SDS (10%)- 50 µL

Amonijum persulfat (APS) 10% -50 µL

Tetra metilen diamin (TEMED)- 5  $\mu$ L

*Gel za razdvajanje 10% (10 mL)*

2,5 M Tris pH 8,8- 0,63 mL

Akrilamid/metilenbisakrilamid 30%- 4 mL

Destilovana voda- 3,3 mL

SDS (10%)- 100  $\mu$ L

APS- 100  $\mu$ L

TEMED- 4  $\mu$ L

Pufer za elektroforezu je sadržavao 0,025M Tris i 0,192 M glicin pH 8,3. Uzorci su pomiješani u omjeru 1:2 sa puferom za uzorke (0,05 M Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,1 M ditiotreitrol-DTT, 10% glicerol, 0,001% bromfenol plavo) i kuvani 15 minuta na 100 °C. Nanešeno je po 15  $\mu$ g proteina iz svakog uzorka a pomoću elektroda gelovi su povezani sa električnim napajanjem, pri čemu je napon podešen na 100 V do prelaska uzoraka u gel za razdvajanje, a potom na 150 V. Nakon završetka, gelovi su inkubirani 24 h u rastvoru za bojenje (0,1% CBB-coomassie brilliant blue, 50% metanol i 10% sirćetna kiselina), a potom obezbojavani u rastvoru koji je sadržavao 50% metanol i 7% sirćetnu kiselinu. Razdvojeni proteini su detektovani kao plave trake na providnom gelu. Molekulske mase proteina određene su na osnovu standardne krive dobijene za proteinski marker (Fischer BioReagents, opsega 20-118 kDa), čija je jednačina pravca predstavljena kao zavisnost  $\log M_r$  od  $R_f$  vrijednosti. Nakon određivanja molekulskih masa, dodatno je metodom denzitometrije uz pomoć softverskog programa TotalLab izvršena kvantifikacija sadržaja proteina sa molekulskom masom od 55 kDa, koja je predstavljena kao sadržaj enzima *Rubisco*. Analiza elektroforegrama dobijenih iz proteinskih frakcija izolovanih iz biljaka kukuruza su pored sadržaja *Rubisco*-a uključili i kvantifikaciju sadržaja proteina sa malim molekulskim masama (22, 18, 16 i 14 kDa).

#### **4.4.15. Određivanje koncentracije redukovanog i oksidovanog askorbata**

Sadržaj redukovanog askorbata (AA) i dehidroaskorbata (DHA) određeni su u listovima biljaka paradajza iz preliminarnog eksperimenta, modifikovanom spektrofotometrijskom metodom koju su opisali Kukavica i Veljović-Jovanović (2004). Biljno tkivo (2 g) je sprašeno u

tečnom azotu pomoću tučka i avana, a zatim homogenizovano sa 2 mL 5% perhlorne kiseline. Homogenat je centrifugiran 15 minuta na 13000 rpm na 4 °C i za analize je odvojen supernatant. Za određivanje koncentracije redukovanog askorbata, 100 µL dobijenog supernatanta je dodavano u reakcionu smjesu u kvarcnoj kiveti (3 mL) koja je sadržavala 0,3 M Na-fosfatni pufer pH 7,6 i jednu jedinicu (1 U) askorbat oksidaze (prečišćeno standardno jedinjenje). Pri tom je praćeno smanjenje apsorbance na 262 nm tokom jednog minuta ( $\epsilon_{262} = 14.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Mjerenje koncentracije ukupnog askorbata određeno je praćenjem porasta apsorbance u 1 minuti na 262 nm u reakcionoj smjesi kvarcne kivete (3 mL), koja je sadržavala 0,007 mM DTT u 0,15 M Na-fosfatnom puferu pH 7,6 i 100 µL ekstrakta uzorka. Dehidroaskorbat je izračunat iz razlike ukupnog i redukovanog askorbata, a oba oblika su izražena kao µmol g<sup>-1</sup> svježe mase.

#### **4.4.16. Određivanje koncentracije fenola**

Uzorkovani listovi paradajza (iz oba eksperimenta) i kukuruza osušeni su na sobnoj temperaturi i samljeveni u prah pomoću električnog mlina za mljevenje. Za ekstrakciju je odmjeravano 0,1 g uzorka i homogenizovano tučkom u avanu sa 3 mL metanola koji je zakišljen sa 0,1% HCl (krajnja koncentracija). Smjesa je inkubirana 50 minuta na ledu u tamnom, a potom centrifugirana 15 minuta na 10000 rpm na 4 °C. Odvojen je supernatant (600 µL) i pomiješan sa 400 µL destilovane vode i 600 µL hloroforma te inkubiran 45 minuta na ledu u tamnom, uz povremeno miješanje (svakih 5 minuta). Nakon toga uzorci su ponovo centrifugirani 15 minuta na 10000 rpm na 4 °C i pokupljen je supernatant za analize. Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijskom metodom koju su opisali Singleton i Rosi (1965). U reakcionu smjesu u epruvete pomiješano je 100 µL uzorka, 450 µL Folin-Ciocalteu reagensa (razblaženog sa destilovanom vodom u omjeru 1:3) te 450 µl 1 M rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ovako pripremljen uzorak za analizu se nakon miješanja inkubirao u mraku 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izvršeno je spektrofotometrijsko očitavanje absorbance razvijenog plavog obojenja na 765 nm, uz metanol kao slijepu probu. Ukupni fenoli su kvantifikovani na osnovu jednačine pravca kalibracione krive za galnu kiselinu ( $y = 0,003 X - 0,0226$ ;  $R^2 = 0,9975$ ) i izraženi kao ekvivalent galne kiseline po gramu suve mase (mg GAE g<sup>-1</sup> suve mase).

#### **4.4.17. LC-MS/MS određivanje odabranih fenolnih jedinjenja**

Kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktima listova paradajza (preliminarni eksperiment) urađena je primjenom LC-MS-MS tehnike. Korišten je Agilent Technologies 1200

Series Rapid Resolution tečni hromatograf, kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), kontrolisan od strane MassHunter ver. B.03.01. softvera (Agilent Technologies). Za hromatografsko razdvajanje korištena je Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm × 50 mm × 1,8 μm (Agilent Technologies) reverzo-fazna kolona pri temperaturi od 45 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0,05% mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1 mL/min. Primjenjen je gradijentni mod, koji je podrazumjevao sljedeći odnos faza: 0 minuta 30% B, 6 minuta 70% B, 9 minuta 100% B, 12 minuta 100% B, sa vremenom rekvilibracije od 3 minuta. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μL. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N<sub>2</sub>) temperatura 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM (multiple reactions monitoring) modu. Ostali optimizovani parametri dati su u Tabeli 1. Kalibracioni standardi koncentracija 0,0015 μg/mL do 25,0 μg/mL pripremljeni su sekvencijalnim razblaživanjem (1:1) osnovnog miksa koncentracije 100 μg/mL smješom metanol-voda (3:7).

Tabela 1. LC-MS/MS parametri za kvantifikaciju standardnih fenolnih jedinjenja

Jedinjenje	Retenciono vrijeme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekurzor m/z	Jon proizvod m/z	Koliziona energija (V)
Galna kiselina	0,58	90	169	125	10
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,08	80	137	93	10
Kafična kiselina	1,18	100	179	135	10
<i>p</i> -kumarična kiselina	1,69	90	163	119	9
Ferulična kiselina	1,90	90	193	134	11
Rutin	2,33	135	609	300	42
Kvercetin	3,74	130	301	151	15
Naringenin	3,87	130	271	151	16
Kaemferol	4,55	130	285	285	0
Apigenin	4,71	130	269	117	25

#### 4.4.18. Određivanje sadržaja metala u listovima biljaka

Kvalitativna analiza i kvantifikacija odabranih hemijskih elemenata izvršena je u uzorcima listova kukuruza metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije na aparatu Shimadzu 7000 AA, a prema uputama sadržanim u metodi ISO 11047. Prethodna ekstrakcija teških metala iz biljnog materijala urađena je uz korištenje azotne i sumporne kiseline prema metodi koju su opisali Lisjak i saradnic (2009). U normalne sudove zapremine 100 mL odvagano je 0,5 g suvog sprasenog biljnog tkiva, a potom je pažljivo dodato 5 mL HNO<sub>3</sub> i 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pripremljen

rastvor ostavljen je 6 sati na sobnoj temperaturi, a zatim je zagrijavan na rešou do momenta dok se biljni materijal u potpunosti nije razgradio (otprilike pola sata). Nakon hlađenja rastvor je filtriran kroz filter papir (plava traka) u normalni sud od 50 mL i nadopunjen sa bidestilovanom vodom do oznake. Koncentracije metala u pripremljenim rastvorima uzoraka biljnog materijala su potom očitane na atomskom apsorpcionom spektrofotometru Shimadzu 7000 AA koji posjeduje softverski program koji direktno očitava rezultate na osnovu jednačine kalibracione krive dobijene za svaki ispitivani element.

#### **4.4.19. Statistička obrada podataka**

Rezultati svih analiza predstavljeni su kao rezultat tri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je u programu OriginPro 8, a razlike između prosječnih vrijednosti rezultata utvrđene su analizom varijanse (One-Way ANOVA), a za procjenu statističke značajnosti korišten je Tukey test na nivou značajnosti 5 % ( $p < 0.05$ ).



## 5. REZULTATI

### 5.1. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE ZEOLITA

U pripremljenom rastvoru nakon hemijske digestije zeolita, izvršena je kvantifikacija i karakterizacija njegovog hemijskog sastava na atomskom apsorpcionom spektrofotometru a dobijeni rezultati su predstavljeni u Tabeli 2. Hemijski sastav analiziranog zeolita ukazuje da on ne odstupa mnogo od uobičajene strukture zeolita u kojoj su dominantni  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  te da su potencijalni supstituenti za izmjenu katjona K, Ca i Mg. Utvrđene su i primjese teških metala, pri čemu je detektovano najviše Fe, a potom Mn, Zn, Cu i Ni, dok su Pb, Co i Cd utvrđeni samo u tragovima. Rezultati dobijeni mjerenjem specifične površine i ukupnog kapaciteta jonske izmjene predstavljeni su u Tabeli 3. Izmjerene pH vrijednosti suspenzije zeolita predstavljene su takođe u Tabeli 3. S obzirom da je pH destilovane vode prije dodatka zeolita iznosio 5,8 može se uočiti nagli porast pH vrijednosti nakon dodatka zeolita već u prvih 15 minuta kad je izmjerena vrijedost iznosila 8,2. Nakon toga uočeno je postepeno opadanje pH vrijednosti tokom sljedećih sat vremena do 7,35, da bi se takva vrijednost zadržala i nakon drugog sata. Praćenje pH vrijednosti je nastavljeno i tokom sljedeća dva dana a nakon 48 h uočeno je da se pH vrijednost suspenzije zeolita vrlo malo izmijenila jer je izmjerena vrijednost 7,3.

Sadržaj metala (ppm)												Sadržaj metalnih oksida (maseni udio %)	
K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	Pb	Co	Cd	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{SiO}_2$	
4957,95	3094,87	1382,09	1236,90	178,92	33,60	6,67	2,79	0,25	0,23	0,05	10,92	69,59	

Tabela 3. Fizičko-hemijske osobine zeolita analizirane BET metodom (specifična površina), titracijom metilen plavim (kapacitet izmjene katjona) i pH vrijednost									
Specifična površina (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Kapacitet izmjene katjona (mmol M <sup>+</sup> /100 g)	pH suspenzije							
		15'	30'	60'	90'	120'	6 h	24 h	48 h
61	347	8,25	7,83	7,45	7,35	7,35	7,30	7,30	7,30

## 5.2. PRELIMINARNI EKSPERIMENT NA BILJKAMA PARADAJZA

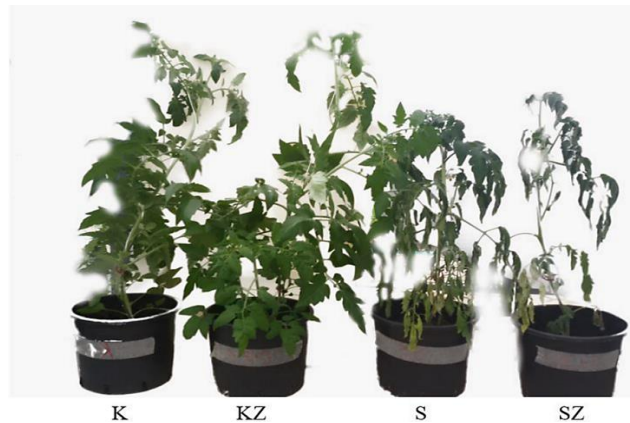
Za preliminarni eksperiment biljke paradajza su bile podvrgnute uticaju suše u trajanju od 28 dana, pri čemu je u supstrat dodato 20% zeolita. Sadnice su bile podijeljene u četiri grupe: 1) grupa kontrola (K) koja je tokom eksperimenta navodnjavana optimalnom količinom vode pri čemu u supstrat nije dodat zeolit; 2) grupa kontrola i zeolit (KZ) koja je takođe tokom eksperimenta navodnjavana optimalnom količinom vode, ali je u supstrat dodat zeolit; 3) grupa suša (S) su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda pri čemu u supstrat nije dodat zeolit i 4) grupa suša i zeolit (SZ) su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda ali je u supstrat dodat zeolit. Za morfo-anatomske analize uzorkovanje i mjerenje je obavljeno na početku eksperimentalnog perioda (dan 0) i na kraju eksperimentalnog perioda, 28. dana. Uzorkovanje biljaka za fiziološke analize i mjerenje parametara antioksidativnog metabolizma obavljeno je četiri puta: Dan 0, kao i nakon 15., 21. i 28. dana.

### 5.2.1. Morfo-anatomske analize

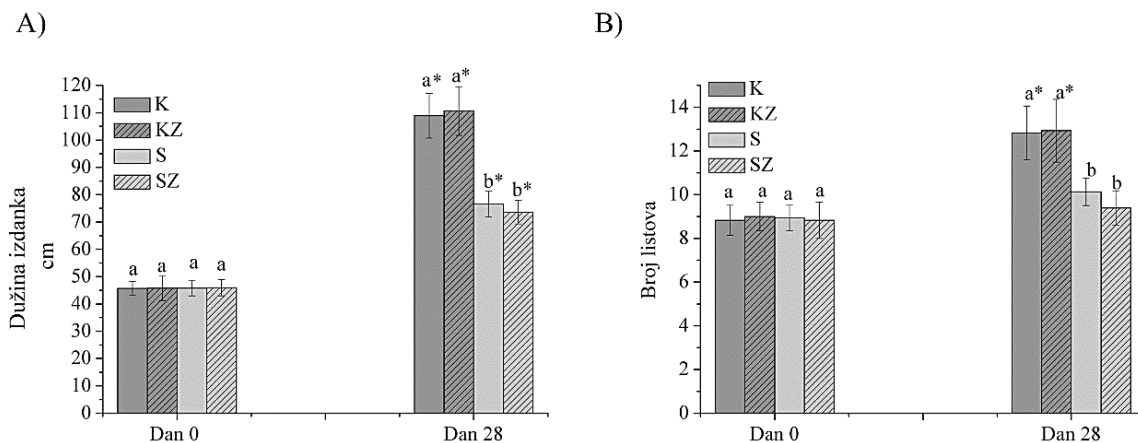
#### *Morfološki parametri*

Tokom cijelog eksperimenta vršena je observacija svih biljaka u cilju praćenja simptoma uvenuća i promjena na listovima koje bi ukazale na pojavu vodnog deficita. Kod svih biljaka koje su imale zadovoljavajući vodni režim, nezavisno od toga jesu li imale zeolit u supstratu (grupe K i KZ), nisu uočene nikakve promjene koje bi ukazivale na vodni stres. S druge strane kod biljaka kojima je uskraćena voda (grupe S i SZ) uočen je gubitak turgora u trećoj sedmici (nakon 21. dana). Do kraja četvrte sedmice eksperimenta simptomi suše su postali intenzivniji, pa je kod listova osim gubitka turgora uočeno i uvijanje te umjerena pojava hloroze. Ono što je interesantno

je da su, na kraju posljednje sedmice, simptomi vodnog deficita bili uočljiviji kod biljaka koje su imale zeolit u supstratu (grupa SZ) u odnosu na one koje su tretirane sušom u običnom supstratu (grupa S). Biljke iz svih eksperimentalnih grupa uzorkovanih nakon 28 dana predstavljene su na slici 20.



Slika 20. Morfolgija biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) na završetku eksperimentalnog perioda (nakon 28 dana): K- grupa kontrola; KZ- grupa kontrola i zeolit; S- grupa suša; SZ- grupa suša i zeolit.



Slika 21. Dužina izdanka (A) i broj listova po biljci (B) kod paradajza (*Solanum lycopersicum*) tokom eksperimentalnog perioda od 28 dana: K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok simbol \* označava statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Tokom trajanja eksperimenta u vremenu od 28 dana biljke iz svih tretiranih grupa su značajno povećale dužinu izdanka u odnosu na prvi dan. Ipak, porast izdanka tokom eksperimenta je bio značajno veći kod biljaka iz kontrolnih grupa (K i KZ) u odnosu na biljke pod uticajem suše (grupe

S i SZ). Tako je tokom eksperimentalnog perioda izdanak povećan u prosjeku za 58% kod kontrolnih grupa, dok je tokom istog vremena povećanje izdanka kod biljaka u uslovima suše u prosjeku iznosilo 40% (Slika 21, sekcija A). Suša je takođe usporila formiranje novih listova kod biljaka, tako da je tokom eksperimentalnog perioda prosječan broj listova po biljci bio povećan u prosjeku za 32% kod kontrolnih grupa (K i KZ), dok kod biljaka iz grupa S i SZ nije uočeno značajno povećanje u odnosu na prvi dan (Slika 21, sekcija B).

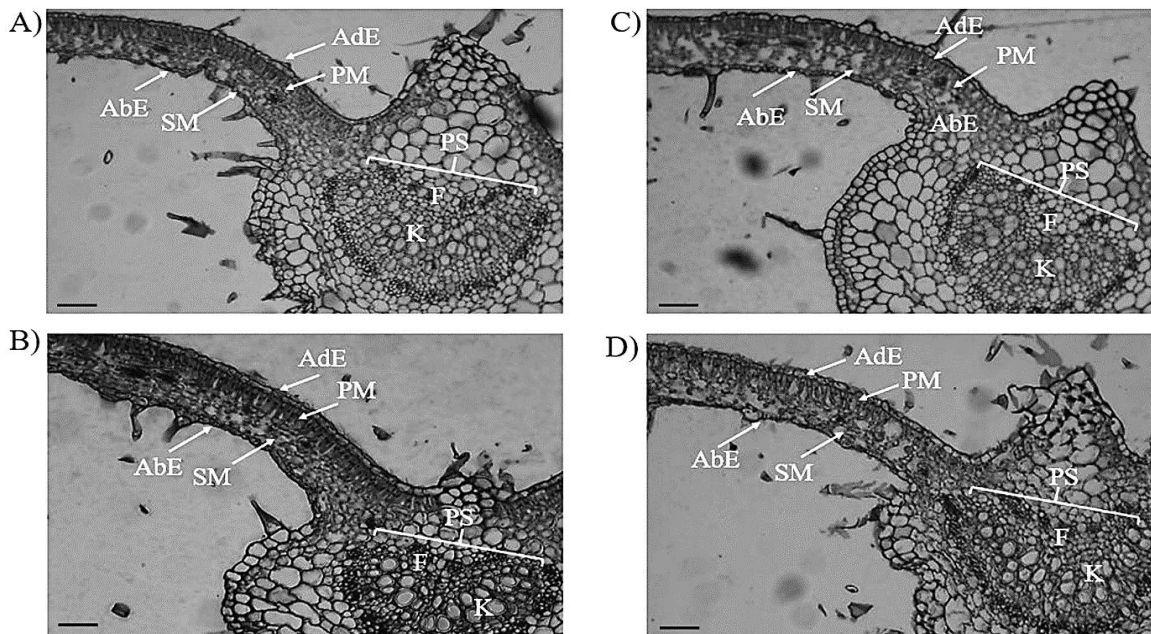
#### *Anatomske analize*

U Tabeli 4. predstavljeni su rezultati anatomskih analiza u strukturi listova paradajza. Uočeno je da je tokom eksperimentalnog perioda od 28 dana debljina adaksijalnog epidermisa povećana kod kontrolnih grupa (K i KZ) dok je usljed suše kod biljaka iz grupa S i SZ ovaj ćelijski sloj bio značajno smanjen nakon istog perioda. S druge strane, sloj abaksijalnog epidermisa je kod biljaka iz sve četiri grupe imao manju debljinu u odnosu na vrijednosti izmjerene na početku eksperimenta (dan 0), s tim da je uticaj suše intenzivirao ovo smanjenje kod biljaka iz grupa S i SZ, pa su kod njih vrijednosti ovog parametra bile značajno manje u odnosu na kontrolne grupe. Promjer palisadnog mezofila se tokom eksperimentalnog perioda značajno povećao kod kontrolnih grupa biljaka (kod grupe K za 6,5 % i kod grupe KZ za 9,5%), dok kod biljaka koje su bile pod uticajem suše (grupe S i SZ) nije uočena značajna promjena u vrijednostima ovog parametra. Poređenjem debljine palisadnog mezofila među svim testiranim grupama biljaka uzorkovanih na kraju eksperimenta (dan 28) najveća vrijednost ovog parametra uočena je kod grupe KZ, dok su biljke iz grupa S i SZ imale najmanje vrijednosti istog parametra. Kad je u pitanju debljina sunđerastog mezofila, uočeno je da su tokom eksperimentalnog perioda samo biljke iz grupe KZ povećale ovaj sloj ćelija u odnosu na početno stanje, dok kontrolne biljke bez zeolita u supstratu (grupa K) nisu značajno promijenile debljinu ovog sloja. Pod uticajem suše, kod biljaka iz grupa S i SZ uočeno je značajno smanjenje debljine sunđerastog sloja ćelija tokom eksperimentalnog perioda. Poređenjem debljine sunđerastog mezofila među svim testiranim grupama biljaka uzorkovanih u 28. danu uočen je sličan trend razlika kao kod mjerenja palisadnog mezofila: najveća vrijednost zabilježena je kod grupe KZ, a potom kod grupe K, dok su grupe S i SZ imale najmanji promjer ovog sloja ćelija. Iako je uočeno da na strukture palisadnog i sunđerastog sloja utiču i suša i tretman sa zeolitom, odnos promjera ova dva mezofila ukazuje na to da je uticaj suše bio dominantniji. Na to ukazuje činjenica da je odnos debljine palisadnog prema sunđerastom mezofilu značajno povećan samo kod grupa na koje je uticala suša (grupe S i SZ), dok kod

kontrolnih grupa (K i KZ) nije uočena ovakva promjena. U provodnom tkivu uočen je sličan trend promjena pod uticajem suše i tretmana sa zeolitom kao i u mezofilnim tkivima. Naime, tokom eksperimentalnog perioda dijametar cijelog provodnog snopića (uključujući ksilem i floem) se nije značajno promijenio kod kontrolne grupe biljaka (grupa K) dok je kod onih koje su imale zeolit u supstratu (grupa KZ) on značajno povećan. S druge strane, vrijednosti ovog parametra značajno su se smanjile pod uticajem suše nevezano za to da li je u supstratu bio prisutan zeolit, tako da je na kraju eksperimentalnog perioda kod grupa S i SZ zabilježena najmanji dijametar provodnog snopića u odnosu na ostale grupe. Kod kontrolnih grupa biljaka (K i KZ) zona ksilemskih provodnih sudova značajno se povećala tokom eksperimentalnog perioda dok kod biljaka uzgajanih u uslovima suše nije uočena značajna promjena u vrijednostima ovog parametra. Shodno tome, zbog uticaja suše kod biljaka iz grupa S i SZ uočene su najmanje vrijednosti zone ksilema, a najveće kod kontrolnih biljaka koje su imale zeolit u supstratu (grupa KZ). Dijametar zone floemskih provodnih sudova se tokom eksperimentalnog perioda značajno povećao kod kontrolnih grupa biljaka (K i KZ) dok je usljed uticaja suše uočeno smanjenje vrijednosti ovog parametra kod grupa S i SZ. Primjeri poprečnih presjeka listova kod tretiranih biljaka paradajza predstavljeni su na Slici 22.

Tabela 4. Anatomska karakterizacija poprečnog presjeka lista kod biljaka paradajza (K- kontrola, KZ- kontrola uz zeolit, S- suša, SZ- suša uz zeolit) uzorkovanih na početku (dan 0) i na kraju (dan 28) eksperimentalnog perioda: DAdE-debljina adaksijalnog epidermisa, DPM-debljina palisadnog mezofila, DSM- debljina sunderastog mezofila, DAbE-debljina abaksijalnog epidermisa, DPM/DSM- odnos palisadnog prema sunderastom mezofilu, DPS-dijametar provodnog snopića, DZK-dijametar zone ksilema, DZF-dijametar zone floema. Sve veličine su izražene u  $\mu\text{m}$  kao srednja vrijednost od 10 mjerenja  $\pm$  SD. Različita mala slova *a, b, c* označavaju statistički značajnu razliku između poređenih grupa biljaka u okviru istog vremenskog perioda uzorkovanja, a simbol \* označava statistički značajnu razliku kod iste grupe biljaka u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Vrijeme uzorkovanja	Dan 0				Dan 28			
	K	KZ	S	SZ	K	KZ	S	SZ
<b>DAdE</b>	15,20 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>	15,37 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	15,51 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	15,41 $\pm$ 1,65 <sup>a</sup>	16,59 $\pm$ 1,43 <sup>a*</sup>	15,91 $\pm$ 1,18 <sup>a*</sup>	14,66 $\pm$ 1,56 <sup>b*</sup>	14,24 $\pm$ 0,83 <sup>b*</sup>
<b>DPM</b>	65,47 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>	69,56 $\pm$ 13,89 <sup>a</sup>	63,14 $\pm$ 4,63 <sup>a</sup>	66,15 $\pm$ 4,93 <sup>a</sup>	70,07 $\pm$ 7,11 <sup>a*</sup>	76,78 $\pm$ 3,24 <sup>b*</sup>	63,68 $\pm$ 3,22 <sup>c</sup>	64,72 $\pm$ 4,20 <sup>c</sup>
<b>DSM</b>	96,25 $\pm$ 4,29	94,38 $\pm$ 7,48 <sup>a</sup>	92,73 $\pm$ 9,25 <sup>a</sup>	93,73 $\pm$ 8,28 <sup>a</sup>	98,53 $\pm$ 6,03 <sup>a</sup>	108,66 $\pm$ 8,11 <sup>b*</sup>	80,45 $\pm$ 9,46 <sup>c*</sup>	82,12 $\pm$ 6,19 <sup>c*</sup>
<b>DAbE</b>	11,78 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	11,89 $\pm$ 1,80	11,97 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>	11,90 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	10,10 $\pm$ 1,25 <sup>a*</sup>	10,29 $\pm$ 1,28 <sup>a*</sup>	9,02 $\pm$ 1,14 <sup>b*</sup>	9,45 $\pm$ 1,46 <sup>b*</sup>
<b>DPM/DSM</b>	0,69 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,70 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,80 $\pm$ 0,11 <sup>b*</sup>	0,79 $\pm$ 0,11 <sup>b*</sup>
<b>DPS</b>	454,33 $\pm$ 43,97 <sup>a</sup>	442,68 $\pm$ 46,84 <sup>a</sup>	432,49 $\pm$ 48,27 <sup>a</sup>	431,77 $\pm$ 45,29 <sup>a</sup>	454,16 $\pm$ 17,94 <sup>a</sup>	468,67 $\pm$ 42,10 <sup>b*</sup>	396,72 $\pm$ 21,16 <sup>c*</sup>	392,59 $\pm$ 17,09 <sup>c*</sup>
<b>DZK</b>	162,03 $\pm$ 25,90 <sup>a</sup>	170,59 $\pm$ 22,60 <sup>a</sup>	160,36 $\pm$ 13,11 <sup>a</sup>	165,76 $\pm$ 12,21 <sup>a</sup>	175,08 $\pm$ 12,58 <sup>a*</sup>	181,41 $\pm$ 17,96 <sup>b*</sup>	160,76 $\pm$ 14,29 <sup>c</sup>	162,77 $\pm$ 15,39 <sup>c</sup>
<b>DZF</b>	46,94 $\pm$ 8,43 <sup>a</sup>	49,09 $\pm$ 6,71 <sup>a</sup>	47,58 $\pm$ 4,17 <sup>a</sup>	48,39 $\pm$ 6,22 <sup>a</sup>	55,11 $\pm$ 4,76 <sup>a*</sup>	56,09 $\pm$ 8,79 <sup>a*</sup>	42,76 $\pm$ 5,27 <sup>b*</sup>	43,79 $\pm$ 5,19 <sup>b*</sup>



Slika 22. Poprečni presjeci listova paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih na kraju eksperimentalnog perioda (28. dana) iz grupe K (A), grupe KZ (B), grupe S (C) i grupe SZ (D), uvećani pod mikroskopskim povećanjem 10 puta: AdE-adaksijalni epidermis, AbE-abaksijalni epidermis, PM-palisadni mezofil, SM-sunderasti mezofil, PS-provodni snopić, K-ksilem, F-floem. Skala bar = 100  $\mu$ m.

### 5.2.2. Parametri povezani sa fotosintezom i karakteristike stoma

#### *Relativni sadržaj vode i odnos svježe i suve mase*

Izmjerene vrijednosti relativnog sadržaja vode i odnosa svježe prema suvoj masi kod biljaka iz grupa S i SZ počele su da se progresivno smanjuju već od petnaestog dana eksperimentalnog perioda, da bi posljednjeg dana vrijednosti oba parametra bile statistički značajno manje u odnosu na one koje su dobijene u kontrolnim grupama biljaka (K i KZ) (Slika 23, sekcije C i D). Ipak nije uočena značajna razlika u izmjerenim vrijednostima pomenutih parametara između biljaka iz grupa S i SZ. Tako se od prvog do posljednjeg dana eksperimentalnog perioda RSV kod biljaka grupe S smanjio za 43% a kod biljaka grupe SZ za 45%. U istom vremenu se odnos svježe prema suvoj masi kod biljaka grupe S smanjio za 53% a kod biljaka grupe SZ za 54%.

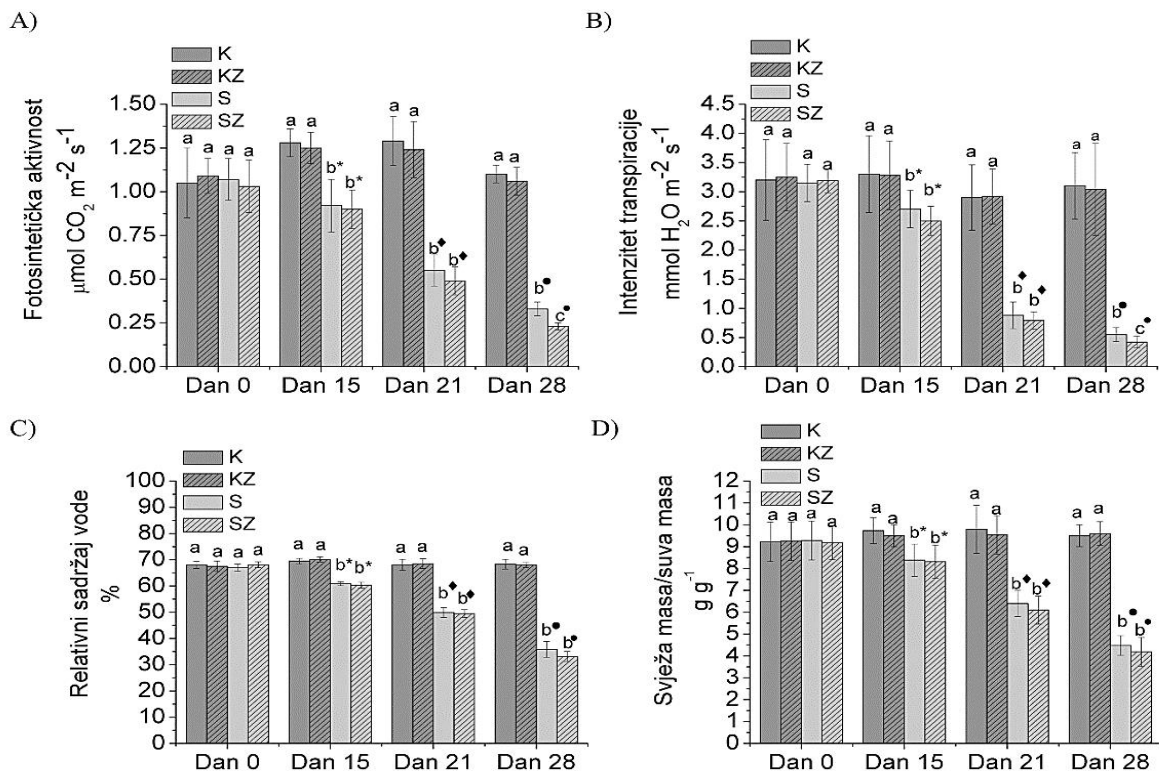
### *Intenzitet transpiracije i fotosinteze*

Tokom eksperimentalnog perioda kod svih biljaka sa zadovoljavajućim vodnim režimom (grupe K i KZ) nije bilo značajnih oscilacija u fotosintetičkoj aktivnosti i intenzitetu transpiracije (Slika 23, sekcije A i B). S druge strane suša je indukovala progresivno smanjenje fotosintetičke aktivnosti i intenziteta transpiracije već od petnaestog dana i taj se trend nastavio do kraja eksperimentalnog perioda. Tako su nakon 28 dana fotosintetička aktivnost i intenzitet transpiracije bili značajno manji kod biljaka grupe S u odnosu na kontrolne grupe (K i KZ), a kod biljaka iz grupe SZ vrijednost ovih parametara je bila najmanja u odnosu na sve grupe. Usljed uticaja suše kod biljaka iz grupe S, fotosintetička aktivnost se od prvog do posljednjeg dana eksperimenta smanjila za 70% a intenzitet transpiracije za 85%. Usljed kombinovanog uticaja suše i zeolita kod biljaka iz grupe SZ, fotosintetička aktivnost se od prvog do posljednjeg dana eksperimentalnog perioda smanjila za 77% a intenzitet transpiracije za 91%.

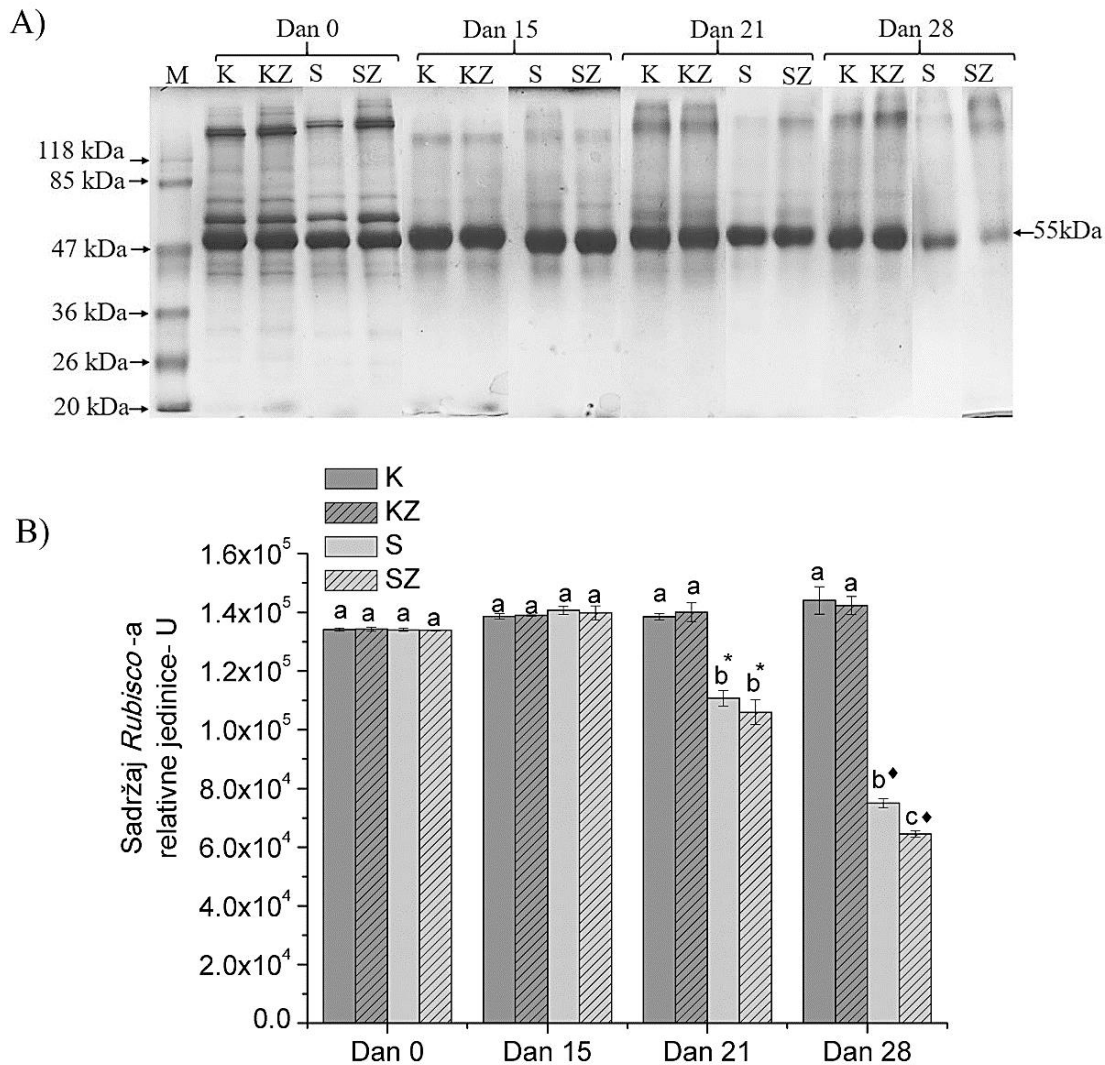
### *Sadržaj Rubisco-a*

Elektroforegram dobijen nakon SDS-elektroforeze proteinskih ekstrakata listova svih ispitivanih grupa biljaka uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda predstavljen je na Slici 24, sekcija A. Analizom razdvojenih proteina i poređenjem sa standardnim proteinskim markerom poznatih molekulskih masa utvrđeno je da je najdominantniji protein u svim uzorcima onaj koji ima molekulsku masu 55 kDa. Brojni literaturni podaci dokazuju da se SDS-PAGE analizom proteinskog ekstrakta kod listova biljaka kao najdominantnija proteinska traka sa molekulskom masom 55 kDa izdvaja velika subjedinicu enzima *Rubisco*. Zbog toga se kvantitativna analiza ove proteinske trake mjerena metodom denzitometrije u softverskom programu Total Lab može smatrati relevantnom kao relativni sadržaj (količina) enzima *Rubisco*. Kod kontrolnih grupa biljaka sa optimalnim vodnim režimom (grupe K i KZ) nisu uočene značajne oscilacije u količini *Rubisco*-a tokom cijelog eksperimentalnog perioda (Slika 24, sekcija B). S druge strane suša je indukovala progresivno smanjenje sadržaja ovog enzima u listovima biljaka iz grupa S i SZ počevši od 21. dana, da bi na kraju eksperimentalnog perioda on bio najmanji u listovima biljaka tretiranih zeolitom u uslovima suše (SZ grupa). Kod biljaka iz grupe S sadržaj *Rubisco*-a se od prvog do posljednjeg dana eksperimentalnog perioda smanjio za 40% a kod biljaka iz grupe SZ za 48% u istom periodu.





Slika 23. Fotosintetička aktivnost (A), intenzitet transpiracije (B), relativni sadržaj vode (C) i odnos svježe prema suvoj masi (D) kod listova paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimenta (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ ● označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).



Slika 24. Elektroforegram dobijen nakon SDS PAGE analize proteinskog ekstrakta (A) i sadržaj enzima *Rubisco* u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanim u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): M- proteinski marker poznatih molekulskih masa; K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

### Koncentracija fotosintetičkih pigmenata

Tabela 5: Koncentracija ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe mase) i odnos fotosintetičkih pigmenata u listovima paradajza tokom eksperimentalnog perioda. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost od tri mjerenja  $\pm$  SD. K- kontrola, KZ- kontrola uz zeolit, S- suša, SZ- suša uz zeolit. Različita mala slova *abc* označavaju statistički značajnu razliku između poređenih grupa biljaka u okviru istog vremenskog perioda uzorkovanja, a različiti simboli \*♦♦ označavaju statistički značajnu razliku kod iste grupe biljaka u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Parametar	Grupa biljaka	Dan 0	Dan 15	Dan 21	Dan 28
Hlorofil <i>a</i>	K	$0,92 \pm 0,08^a$	$1,41 \pm 0,29^{a*}$	$1,49 \pm 0,10^{a*}$	$1,56 \pm 0,21^{a♦}$
	KZ	$0,91 \pm 0,04^a$	$1,39 \pm 0,23^{a*}$	$1,48 \pm 0,08^{a*}$	$1,60 \pm 0,28^{a♦}$
	S	$0,91 \pm 0,06^a$	$1,36 \pm 0,32^{a*}$	$1,25 \pm 0,15^{b♦}$	$0,89 \pm 0,11^b$
	SZ	$0,90 \pm 0,09^a$	$1,35 \pm 0,15^{a*}$	$1,21 \pm 0,55^{b♦}$	$0,83 \pm 0,13^b$
Hlorofil <i>b</i>	K	$0,33 \pm 0,04^a$	$0,48 \pm 0,06^{a*}$	$0,53 \pm 0,05^{a*}$	$0,55 \pm 0,06^{a*}$
	KZ	$0,36 \pm 0,05^a$	$0,45 \pm 0,06^{a*}$	$0,50 \pm 0,10^{a*}$	$0,54 \pm 0,12^{a*}$
	S	$0,32 \pm 0,05^a$	$0,41 \pm 0,09^{a*}$	$0,33 \pm 0,02^b$	$0,19 \pm 0,09^{b♦}$
	SZ	$0,30 \pm 0,09^a$	$0,41 \pm 0,07^{a*}$	$0,26 \pm 0,04^b$	$0,12 \pm 0,02^{c♦}$
Karotenoidi	K	$0,24 \pm 0,07^a$	$0,32 \pm 0,04^a$	$0,37 \pm 0,07^{a*}$	$0,41 \pm 0,10^{a*}$
	KZ	$0,25 \pm 0,05^a$	$0,33 \pm 0,06^a$	$0,37 \pm 0,05^{a*}$	$0,42 \pm 0,08^{a*}$
	S	$0,25 \pm 0,08^a$	$0,33 \pm 0,06^a$	$0,32 \pm 0,02^b$	$0,27 \pm 0,05^b$
	SZ	$0,26 \pm 0,03^a$	$0,33 \pm 0,07^a$	$0,31 \pm 0,04^b$	$0,25 \pm 0,04^b$
Ukupni hlorofil	K	$1,25 \pm 0,05^a$	$1,89 \pm 0,21^{a*}$	$2,02 \pm 0,09^{a*}$	$2,11 \pm 0,06^{a♦}$
	KZ	$1,27 \pm 0,04^a$	$1,84 \pm 0,15^{a*}$	$1,98 \pm 0,04^{a*}$	$2,14 \pm 0,98^{a♦}$
	S	$1,23 \pm 0,05^a$	$1,77 \pm 0,29^{a*}$	$1,58 \pm 0,09^{b♦}$	$1,08 \pm 0,10^{b♦}$
	SZ	$1,20 \pm 0,07^a$	$1,76 \pm 0,06^{a*}$	$1,47 \pm 0,23^{b♦}$	$0,95 \pm 0,15^{c♦}$
Hlorofil <i>a/b</i>	K	$2,79 \pm 0,10^a$	$2,93 \pm 0,15^a$	$2,81 \pm 0,08^a$	$2,83 \pm 0,23^a$
	KZ	$2,53 \pm 0,51^a$	$3,08 \pm 0,55^a$	$2,96 \pm 0,28^a$	$2,96 \pm 0,78^a$
	S	$2,84 \pm 0,11^a$	$3,31 \pm 0,47^a$	$3,79 \pm 0,19^{b*}$	$4,68 \pm 0,25^{b*}$
	SZ	$3,00 \pm 0,25^a$	$3,29 \pm 0,44^a$	$4,65 \pm 0,67^{b*}$	$6,92 \pm 0,91^{c♦}$
Ukupni hlorofil/ karotenoidi	K	$5,21 \pm 0,14^a$	$5,90 \pm 0,35^a$	$5,46 \pm 0,18^a$	$5,14 \pm 0,14^a$
	KZ	$5,08 \pm 0,56^a$	$5,57 \pm 0,49^a$	$5,35 \pm 0,12^a$	$5,09 \pm 0,55^a$
	S	$4,92 \pm 0,77^a$	$5,36 \pm 0,27^a$	$4,93 \pm 0,10^a$	$4,00 \pm 0,15^{b*}$
	SZ	$4,61 \pm 0,54^a$	$5,30 \pm 0,11^a$	$4,74 \pm 0,56^a$	$3,80 \pm 0,34^{b*}$

Kod kontrolnih grupa, to jest kod biljaka sa optimalnim navodnjavanjem, nezavisno od prisustva zeolita u supstratu (K i KZ) tokom vremena uočeno je povećanje sadržaja obe vrste hlorofila, tako da je do kraja eksperimentalnog perioda hlorofil *a* u odnosu na prvi dan bio povećan u prosjeku za 42% a hlorofil *b* za 40% (Tabela 5). Kod biljaka koje su bile pod uticajem suše, nezavisno od prisustva zeolita u supstratu (grupe S i SZ) do 15. dana povećanje koncentracije obe vrste hlorofila bilo je slično kao i kod kontrolnih biljaka te do tog perioda nije uočena značajna razlika u sadržaju pigmenata između svih testiranih grupa. Međutim, počevši od 21. dana uticaj suše je indukovao manji trend porasta sadržaja pigmenata, tako da je do kraja eksperimentalnog perioda koncentracija hlorofila *a* kod grupa S i SZ bila približna vrijednostima koje su detektovane prvog dana, te je bila značajno manja u odnosu na kontrolne grupe. Suša je još intenzivnije

smanjila sadržaj hlorofila *b* pa je nakon 28 dana koncentracija ovog pigmenta kod grupa S i SZ bila manja i od početnih vrijednosti koje su izmjerene prvog dana eksperimentalnog perioda. Zanimljivo je da su u listovima biljaka koje su imale zeolit u supstratu u uslovima suše izmjerene značajno manje vrijednosti sadržaja hlorofila *b* čak i odnosu na vrijednosti izmjerene kod biljaka iz grupe S, koje nisu tretirane zeolitom.

U tom slučaju, ukoliko posmatramo koncentraciju ukupnog hlorofila, može se reći da je za razliku od kontrolnih grupa (K i KZ) kod kojih je uočeno njeno povećavanje tokom cijelog eksperimentalnog perioda, suša indukovala smanjenje sadržaja pigmenata počevši od 21. dana, a ono je do kraja eksperimentalnog perioda bilo najizraženije kod biljaka koje su imale zeolit u supstratu (Tabela 5). Veća osjetljivost hlorofila *b* na uticaj suše u odnosu na osjetljivost hlorofila *a* vidljiva je iz njihovog odnosa kod grupa S i SZ, kod kojih je uočeno povećanje ovog parametra. Odnos hlorofila *a* prema hlorofilu *b* je bio najizraženiji kod grupe SZ, naročito na kraju eksperimentalnog perioda kada je uočena značajno veća vrijednost u odnosu na ostale grupe biljaka, uključujući i grupu S.

Kad je u pitanju koncentracija karotenoida, uočeno je da se ona do kraja eksperimentalnog perioda značajno povećala u listovima kontrolnih grupa biljaka (K i KZ), dok u listovima biljaka iz grupa S i SZ nije došlo do povećanja sadržaja ove grupe pigmenata (Tabela 5). Tako je počevši od 21. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda koncentracija karotenoida bila statistički značajno manja u listovima biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na one iz grupa K i KZ. Ukoliko uporedimo odnos ukupnog hlorofila prema karotenoidima, uočeno značajno povećanje ove stope kod biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na kontrolne grupe (K i KZ) ali tek nakon 28 dana. To znači da su karotenoidi bili najotpornija grupa pigmenata prema uticaju suše te da se njihov odnos prema koncentraciji hlorofila promijenio tek na kraju eksperimentalnog perioda, nezavisno od prisustva zeolita u supstratu.

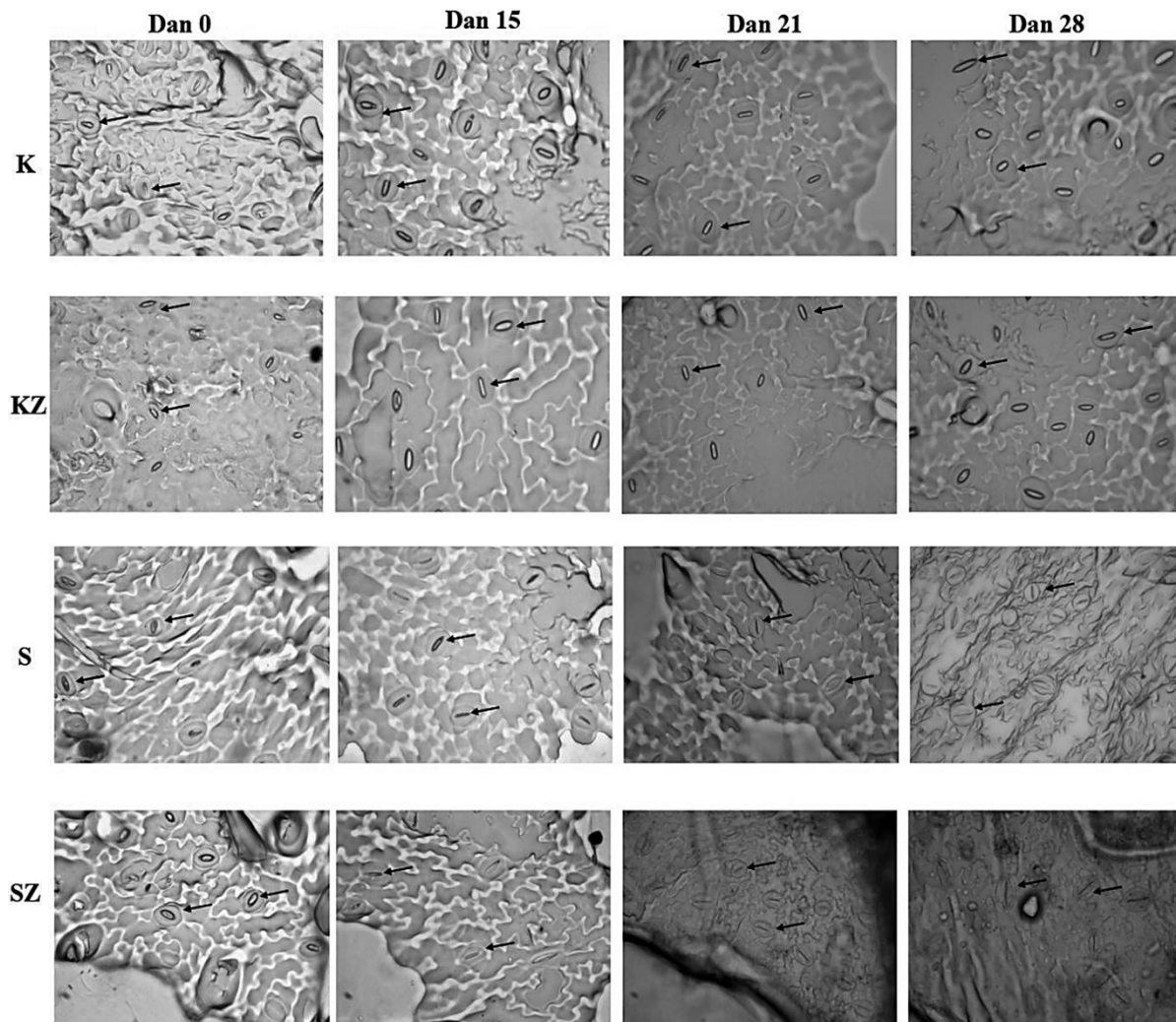
#### *Karakteristike stoma*

Karakteristike stoma dobijene mikroskopskim analizama predstavljene su u Tabeli 6. Tokom eksperimentalnog perioda nije uočeno značajno variranje u broju stoma ni kod jedne kontrolne grupe biljaka (K i KZ) dok je počevši od 21. dana došlo do značajnog povećavanja broja stoma po mjerenoj površini lista kod svih biljaka koje su bile pod uticajem suše (grupe S i SZ). Tako su u posljednjem danu tretmana, biljke iz grupe S imale značajno veći broj stoma u poređenju sa onima

iz grupa K i KZ, dok je tretman sa zeolitom u uslovima vodnog deficita dodatno intenzivirao povećanje broja stoma, pa je kod biljaka iz grupe SZ izmjeren najveći broj stoma po površini lista u odnosu na sve ostale grupe biljaka. Uporedno sa povećavanjem broja stoma po mm<sup>2</sup> suša je indukovala i smanjenje dimenzija stominog aparata (dužina i širina) nezavisno od toga da li su biljke u supstratu imale zeolit. Tako su na kraju eksperimentalnog perioda biljke iz grupa S i SZ imale statistički značajno manji stomin aparat u odnosu na one iz kontrolnih grupa (K i KZ). Kad je u pitanju sam stomin otvor primjećeno je da se njegova dužina značajno smanjila pod uticajem suše, pa su na kraju eksperimentalog perioda grupe iz biljaka S i SZ imale kraći stomin otvor u odnosu na biljke iz grupa K i KZ. Od svih rezultata koji su dobijeni analizom stoma, najzanimljiviji su oni koji se odnose na širinu stominog otvora, koji ujedno upućuju i na regulaciju njihovog zatvaranja i vodni režim biljaka. Interesantno je da je suša indukovala početak zatvaranja stominog otvora već nakon 15 dana, pa je kod biljaka iz grupa S i SZ stomin otvor bio značajno uži u odnosu na onaj kod biljaka iz grupa K i KZ. Dok kod kontrolnih biljaka (K i KZ) tokom eksperimentalnog perioda nije dolazilo do značajnijeg odstupanja u širini stominog otvora, dotle je kod biljaka iz grupa S i SZ u svakoj sljedećoj tački uzorkovanja primjećeno da se širina stominog otvora značajno smanjuje. Takođe je važno istaći da su na kraju eksperimentalnog perioda biljke iz grupe SZ imale manji stomin otvor čak i u odnosu na biljke iz grupe S. U tom smislu se može reći da je uticaj zeolita intenzivirao efekat suše kod ovih biljaka, s obzirom na to da se od stomin otvor pod uticajem suše od početka do kraja eksperimentalnog perioda smanjio za 60% a pod kombinovanim uticajem suše i zeolita za 70%. Primjeri otisaka stoma uzimanih sa abaksijalnog epidermisa biljaka paradajza tokom četiri faze u okviru eksperimentalnog perioda predstavljeni su na slici 25.

Tabela 6: Karakteristike stoma uzorkovanih sa abaksijalnog epidermisa listova paradajza tokom eksperimentalnog perioda: BS/mm<sup>2</sup>- broj stoma po mm<sup>2</sup> površine lista; DSA-dužina stominog aparata; ŠSA-širina stominog aparata; DSO- dužina stominog otvora; ŠSO- širina stominog otvora. Veličine su izražene u μm kao srednja vrijednost od 10 mjerenja ± SD. K- kontrola, KZ- kontrola uz zeolit, S- suša, SZ- suša uz zeolit. Različita mala slova *abc* označavaju statistički značajnu razliku između poređenih grupa biljaka u okviru istog vremenskog perioda uzorkovanja, a različiti simboli \*♦● označavaju statistički značajnu razliku kod iste grupe biljaka u odnosu na prethodni period uzorkovanja (p < 0,05).

Parametar	Grupa biljaka	Dan 0	Dan 15	Dan 21	Dan 28
BS/mm <sup>2</sup>	K	120,85 ± 10,93 <sup>a</sup>	118,86 ± 12,67 <sup>a</sup>	124,56 ± 5,34 <sup>a</sup>	126,05 ± 4,31 <sup>a</sup>
	KZ	119,81 ± 9,24 <sup>a</sup>	120,87 ± 10,92 <sup>a</sup>	122,89 ± 4,77 <sup>a</sup>	129,61 ± 6,78 <sup>a</sup>
	S	121,90 ± 9,89 <sup>a</sup>	124,91 ± 8,87 <sup>a</sup>	136,77 ± 4,31 <sup>b*</sup>	175,39 ± 12,64 <sup>b*</sup>
	SZ	120,24 ± 10,94 <sup>a</sup>	123,61 ± 13,95 <sup>a</sup>	141,23 ± 5,55 <sup>b*</sup>	207,14 ± 15,23 <sup>c*</sup>
DSA	K	17,95 ± 1,08 <sup>a</sup>	18,22 ± 0,99 <sup>a</sup>	19,59 ± 1,40 <sup>a</sup>	18,21 ± 0,48 <sup>a</sup>
	KZ	18,91 ± 0,25 <sup>a</sup>	18,93 ± 0,56 <sup>a</sup>	19,08 ± 0,25 <sup>a</sup>	19,66 ± 0,12 <sup>a</sup>
	S	18,95 ± 0,80 <sup>a</sup>	16,92 ± 0,23 <sup>a</sup>	16,42 ± 0,25 <sup>b*</sup>	14,56 ± 0,33 <sup>b*</sup>
	SZ	18,25 ± 0,99 <sup>a</sup>	16,33 ± 0,74 <sup>a</sup>	16,69 ± 0,44 <sup>b*</sup>	13,16 ± 1,12 <sup>b*</sup>
ŠSA	K	12,83 ± 0,79 <sup>a</sup>	12,71 ± 0,44 <sup>a</sup>	13,34 ± 1,13 <sup>a</sup>	13,52 ± 0,89 <sup>a</sup>
	KZ	12,39 ± 0,54 <sup>a</sup>	12,99 ± 0,76 <sup>a</sup>	13,05 ± 1,45 <sup>a</sup>	14,01 ± 0,98 <sup>a</sup>
	S	12,07 ± 0,84 <sup>a</sup>	11,86 ± 0,36 <sup>a</sup>	10,48 ± 0,64 <sup>b*</sup>	10,29 ± 0,50 <sup>b*</sup>
	SZ	12,55 ± 0,83 <sup>a</sup>	11,51 ± 0,76 <sup>a</sup>	10,15 ± 0,43 <sup>b*</sup>	9,85 ± 0,88 <sup>b*</sup>
DSO	K	10,96 ± 0,20 <sup>a</sup>	11,31 ± 0,48 <sup>a</sup>	12,42 ± 0,38 <sup>a</sup>	12,30 ± 0,16 <sup>a</sup>
	KZ	10,60 ± 0,44 <sup>a</sup>	11,91 ± 0,84 <sup>a</sup>	12,65 ± 0,54 <sup>a</sup>	12,59 ± 0,98 <sup>a</sup>
	S	11,01 ± 0,32 <sup>a</sup>	10,56 ± 0,56 <sup>a</sup>	10,53 ± 0,25 <sup>b</sup>	9,51 ± 0,39 <sup>b*</sup>
	SZ	10,91 ± 0,37 <sup>a</sup>	10,13 ± 0,69 <sup>a</sup>	10,17 ± 0,33 <sup>b</sup>	8,90 ± 0,95 <sup>b*</sup>
ŠSO	K	3,32 ± 0,47 <sup>a</sup>	3,11 ± 0,55 <sup>a</sup>	3,04 ± 0,15 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,23 <sup>a</sup>
	KZ	3,22 ± 1,24 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,44 <sup>a</sup>	3,31 ± 0,43 <sup>a</sup>
	S	3,18 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,47 <sup>b*</sup>	1,80 ± 0,19 <sup>b*</sup>	1,28 ± 0,02 <sup>b*</sup>
	SZ	3,28 ± 0,94 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,23 <sup>b*</sup>	1,61 ± 0,13 <sup>b*</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>c*</sup>



Slika 25. Otisci stoma uzimanih sa abaksijalnog epidermisa listova kod biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): K- kontrola, KZ- kontrola uz zeolit, S- suša, SZ- suša uz zeolit. Strelice označavaju pojedinačne primjere stoma analiziranih pod mikroskopskim povećanjem (10 puta).

### 5.2.3. Parametri antioksidativnog metabolizma

#### *Aktivnost i izoenzimski profil superoksid dismutaze*

Specifičnim bojenjem gela dobijenog nakon native elektroforeze za detekciju aktivnosti superoksid dismutaze utvrđeno je prisustvo po tri SOD izoforme ( $R_f$  SOD1= 0,64;  $R_f$  SOD2= 0,68;  $R_f$  SOD3= 0,75) u svakoj grupi biljaka na početku eksperimentalnog perioda (Dan 0). Tokom trajanja eksperimenta nije došlo do promjene izoenzimskog profila ni kod jedne grupe biljaka iako je uočeno da je usljed suše aktivnost SOD izoformi nakon 15. dana postajala izraženija (u smislu

intenziteta traka na gelu) kod grupa S i SZ u poređenju sa onima kod grupa K i KZ (Slika 27). Analizom aktivnosti superoksid dismutaze metodom denzitometrije u softveru TotalLab pokazano je da se tokom eksperimentalnog perioda ukupna aktivnost ovog enzima značajno povećavala kod svih grupa biljaka, tako da je nakon svakog uzorkovanja (dan 15, dan 21 i dan 28) uočen porast njegovog sadržaja u listovima biljaka iz sve četiri testirane grupe (Slika 26, sekcija A). Ipak, uočeno je da je porast SOD aktivnosti bio značajno veći kod biljaka pod uticajem suše, i to već od petnaestog dana eksperimentalnog perioda, kada je detektovana veća aktivnost ovih enzima kod biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na one iz grupa K i KZ. Ovakav trend razlike u SOD aktivnosti između biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na one iz grupa K i KZ tokom trajanja suše postajao je intenzivniji, a nakon 28 dana je bio najizraženiji (u prosjeku 30% veća aktivnost kod biljaka iz grupa S i SZ).

#### *Aktivnost askorbat peroksidaze*

Aktivnost askorbat peroksidaze se kod biljaka iz kontrolnih grupa (K i KZ) povećala nakon 15. dana eksperimentalnog perioda, i ostala približno iste vrijednosti do kraja tretmana (Slika 26, sekcija C). Kod biljaka iz grupa S i SZ takođe se povećala APX aktivnost nakon 15. dana, ali je ovo povećanje bilo izraženije nego kod kontrolnih grupa biljaka. Statistički značajno veća APX aktivnost pod uticajem suše uočena je u svakoj tački uzorkovanja nakon 15. dana eksperimentalnog perioda, a nakon 28. dana je bila veća u prosjeku za 30% kod biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na one iz grupa K i KZ. U tom smislu se može reći da je suša dovela do sličnog trenda promjene u aktivnosti superoksid dismutaze i askorbat peroksidaze nezavisno od toga da ali su biljke imale zeolit u supstratu.

#### *Aktivnost Katalaze*

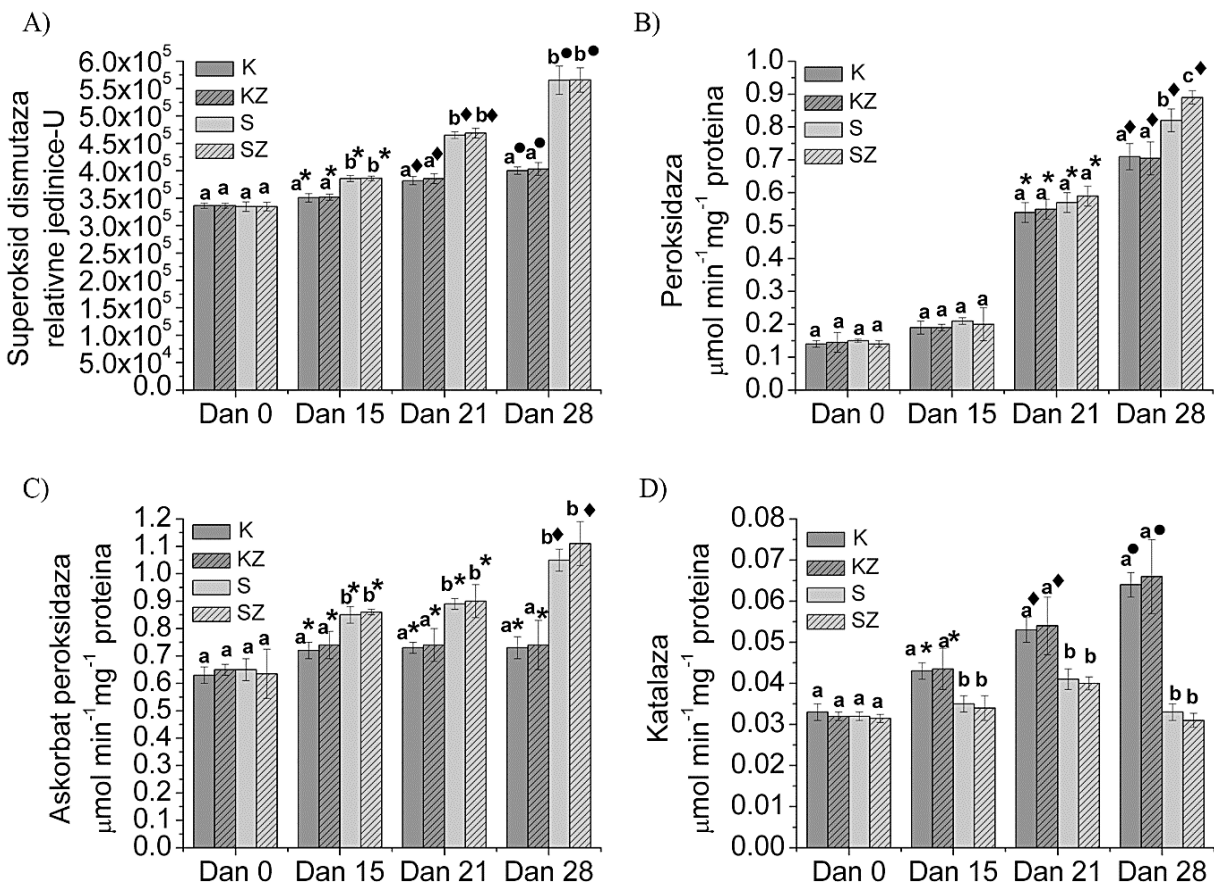
Aktivnost katalaze se kod biljaka iz kontrolnih grupa (K i KZ) povećavala tokom eksperimentalnog perioda, pa je kod njih nakon svake tačke uzorkovanja uočena značajno veća aktivnost ovog enzima u odnosu na mjerenje u prethodnom periodu (Slika 26, sekcija D). Za razliku od biljaka iz kontrolnih grupa, biljke koje su bile pod uticajem suše (grupe S i SZ) su imale nepromijenjenu CAT aktivnost tokom eksperimentalnog perioda. To znači da je suša u određenoj mjeri inhibirala aktivnost ovog enzima budući da se ona povećavala kod biljaka sa optimalnim navodnjavanjem. U tom smislu se može reći da je suša indukovala suprotan trend promjena CAT



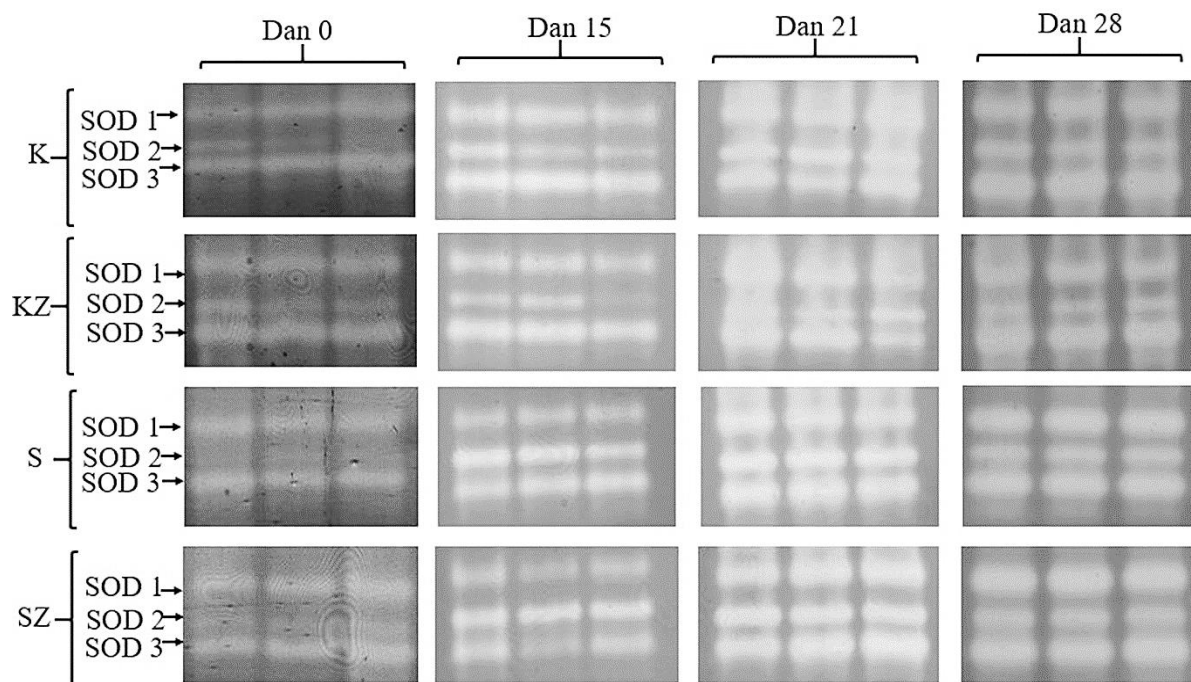
aktivnosti u odnosu na APX, jer je od petnaestog dana pa do kraja eksperimentalnog perioda CAT aktivnost bila značajno manja kod biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na biljke iz grupa K i KZ.

### *Aktivnost i izoenzimski profil peroksidaza Klase III*

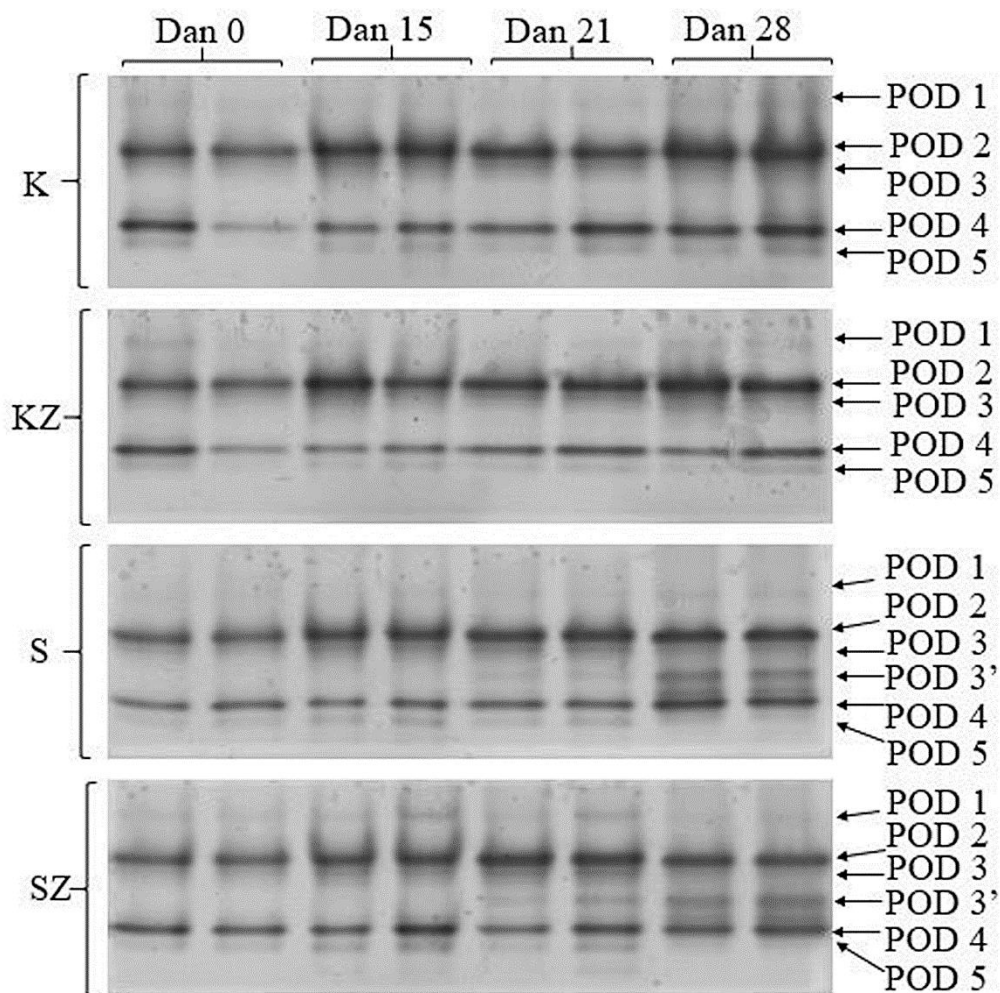
Kad je u pitanju peroksidazna aktivnost (POD), rezultati dobijeni spektrofotometrijskim mjerenjem oksidacije pirogalola pokazali su da se kod svih grupa biljaka aktivnost ovog enzima značajno povećavala nakon 21. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda (Slika 26, sekcija B). Međutim, nakon 28. dana uočeno je da se POD aktivnost značajnije povećala kod svih biljaka koje su bile pod uticajem suše (grupe S i SZ) u odnosu na one iz kontrolnih grupa koje su optimalno navodnjavane (grupe K i KZ). Najzanimljiviji rezultat je da su u tom periodu (dan 28) biljke iz grupe SZ imale najveću POD aktivnost u odnosu na onu koja je izmjerena kod svih ostalih grupa biljaka. Specifičnim bojenjem gela na peroksidaznu aktivnost nakon native PAGE pokazano je da se kod kontrolnih grupa biljaka (K i KZ) izoenzimski profil nije promijenio tokom eksperimentalnog perioda te je kod ovih biljaka detektovano po pet POD izoformi:  $R_f$  POD1= 0,42;  $R_f$  POD2= 0,54;  $R_f$  POD3= 0,55;  $R_f$  POD 4= 0,72;  $R_f$  POD5= 0,77 (Slika 28). S druge strane, kod biljaka iz grupa S i SZ nakon 21. potvrđeno je prisustvo nove POD izoforme, označene kao POD3' jer je njena  $R_f$  vrijednost iznosila 0,60 i bila je pozicionirana između izoformi 3 i 4 (Slika 27). Takođe, primjećeno je da je vidljivost ove izoforme na gelu mnogo izraženija nakon dana 28, odnosno da se debljina trake izoforme POD3' još povećavala sa produženjem suše. Da bi se odredile približne molekulske mase POD izoformi u native konformaciji korištena je metoda modifikovane SDS elektroforeze (Meisrimler i sar., 2014). Nakon bojenja gela sa TMB-om u kontrolnim uzorcima (K i KZ) detektovane su dvije izoforme sa ~ molekulskim masama 63 kDa i 43 kDa. U uzorcima S i SZ detektovane su tri izoforme sa ~ molekulskim masama 63 kDa, 49 kDa i 43 kDa (Slika 28). S obzirom da su izoforme POD3' (sa elektroforegrama iz native PAGE) i POD2 (sa elektroforegrama iz modifikovane SDS PAGE) karakteristične samo za produženi period suše zaključeno je da se radi o istoj izoformi, a da je ~ molekulska masa ove specifične izoforme 49 kDa (Slike 28 i 29).



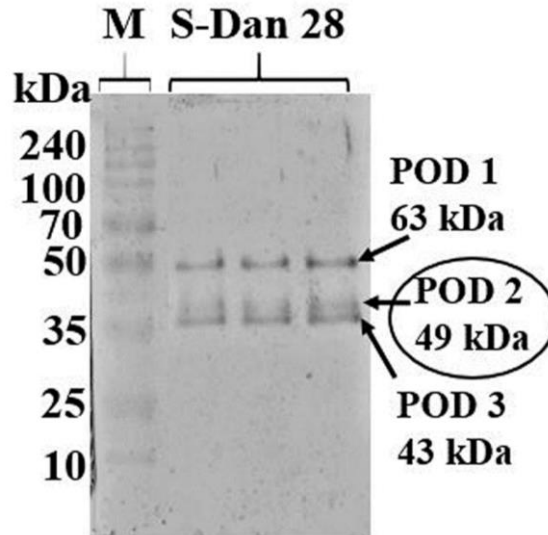
Slika 26. Aktivnost enzima antioksidativnog metabolizma u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): A) superoksid dismutaza; B) peroksidaze; C) askorbat peroksidaza; D) katalaza. K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ ● označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).



Slika 27. Izoenzimski profil superoksid dismutase (SOD) dobijen nakon native PAGE proteinskih frakcija izolovanih iz listova biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit.



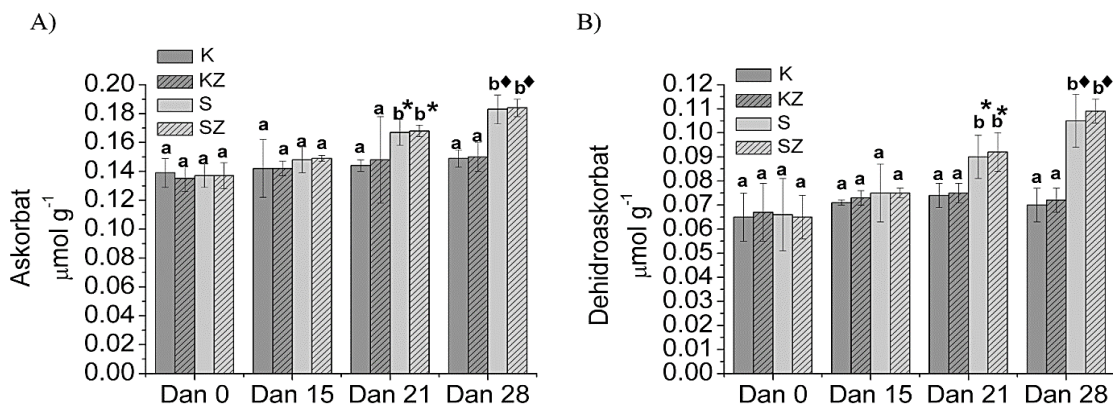
Slika 28. Izoenzimski profil peroksidaza Klase III (POD) dobijen nakon native PAGE proteinskih solubilnih frakcija izolovanih iz listova biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Specifično bojenje gela urađeno je 0,01% 4-hloro- $\alpha$ -naftolom u prisustvu 0,03%  $H_2O_2$ .



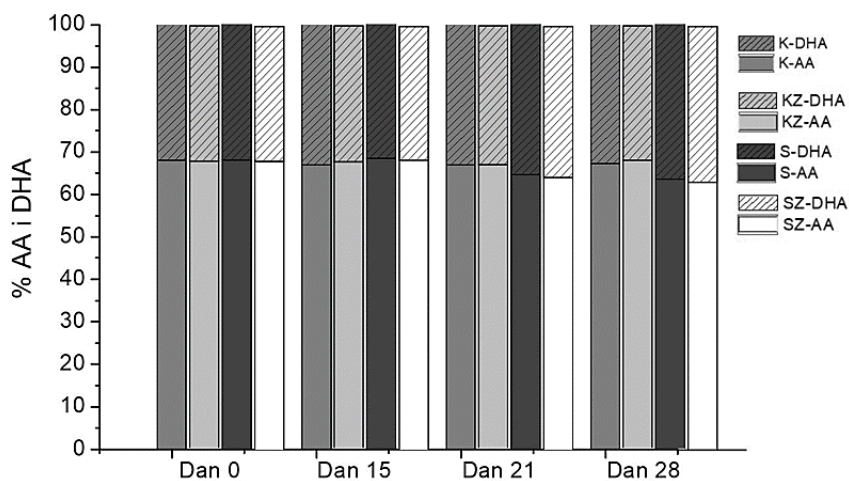
Slika 29. Izoforme peroksidaza Klase III (POD) razdvojene modifikovanom SDS elektroforezom u uzorcima proteinske frakcije dobijenih iz listova biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) koje su rasle u uslovima suše 28 dana (grupa S). Za određivanje molekulskih masa korišten je proteinski marker (M) Dual Colour, Bio-Rad poznatih molekulskih masa u opsegu od 10 kDa do 240 kDa.

#### *Koncentracija askorbata*

Dobijeni rezultati su pokazali da su se koncentracije oba oblika askorbata (oksidovani i redukovani) značajno počele povećavati pod uticajem suše nakon 21. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda (Slika 30, sekcije A i B). U tom smislu uočena je značajno veća koncentracija redukovanog askorbata u listovima biljaka iz grupa S i SZ u odnosu na one koje su izmjerene u listovima biljaka iz grupa K i KZ (prosječno za 15% veća nakon 21. dana te za 30% veća nakon 28. dana). Takođe, koncentracija dehidroaskorbata je u listovima biljaka iz grupa S i SZ bila veća za oko 20% u odnosu na onu koja je izmjerena u listovima biljaka iz grupa K i KZ nakon 21. dana te za 40% nakon 28. dana. Međutim ukoliko se pogleda % udio redukovanog, odnosno oksidovanog askorbata u odnosu na njegovu ukupnu koncentraciju može se reći da nije došlo do značajne promjene u njegovom redoks statusu, budući da je kod grupa S i SZ do 28. dana on bio promijenjen za približno 5% (Slika 31).



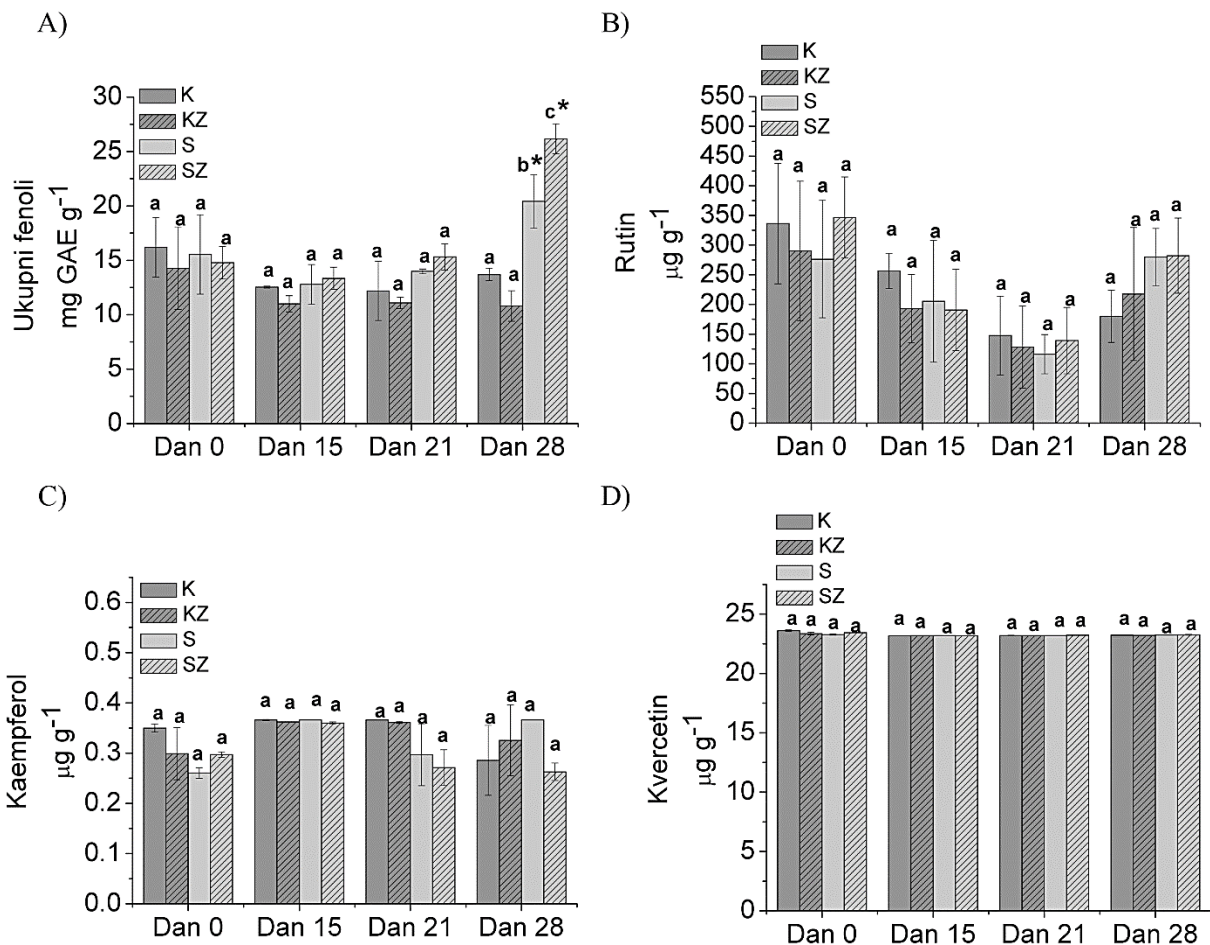
Slika 30. Koncentracija redukovane (A) i oksidovane (B) askorbinske kiseline ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).



Slika 31. Procentualni udio (%) redukovane (AA) i oksidovane (DHA) askorbinske kiseline u odnosu na njenu ukupnu koncentraciju ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): K- DHA- dehidroaskorbat kod grupe kontrola; K-AA- askorbat kod grupe kontrola; KZ- DHA- dehidroaskorbat kod grupe kontrola i zeolit; KZ-AA- askorbat kod grupe kontrola i zeolit; S-DHA- dehidroaskorbat kod grupe suša; S-AA- askorbat kod grupe suša; SZ-DHA- dehidroaskorbat kod grupe suša i zeolit; SZ-AA- askorbat kod grupe suša i zeolit.

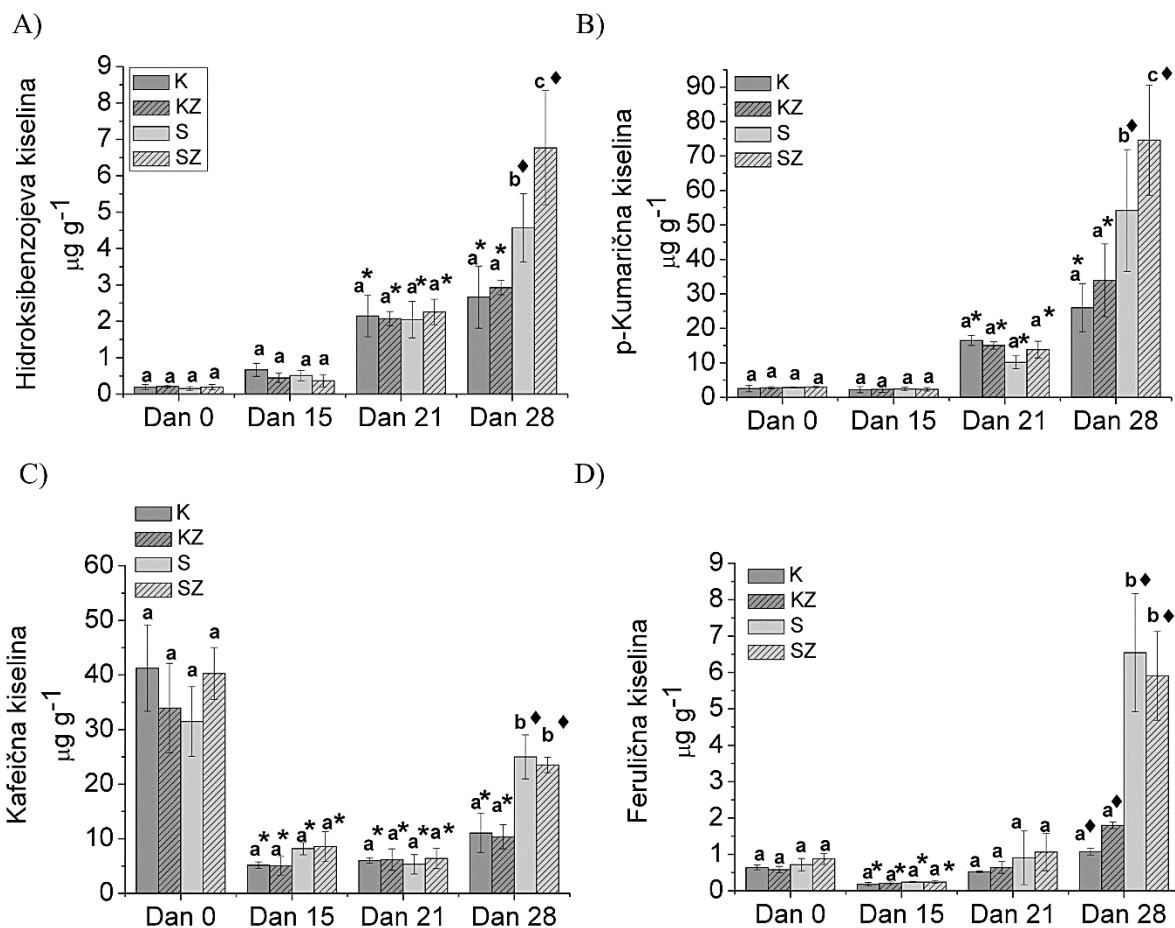
### *Koncentracija fenola*

Kad je u pitanju sadržaj ukupnih fenola rezultati su pokazali da se njihova koncentracija značajno povećala samo kod biljaka koje su bile pod uticajem suše i to tek nakon 28 dana (Slika 32, sekcija A). Potrebno je naglasiti da je sadržaj fenola u listovima biljaka iz grupe SZ bio značajno veći u poređenju sa onim koji je utvrđen kod svih ostalih grupa biljaka, uključujući i grupu S. Analiza pojedinačnih fenolnih jedinjenja HPLC metodom pokazala je da koncentracija svih detektovanih flavonoida (rutin, kvercetin, kaempferol) nije značajno oscilovala ni kod jedne grupe biljaka tokom eksperimentalnog perioda (Slika 32, sekcije B, C i D). S druge strane utvrđeno je da je sadržaj svih detektovanih fenolnih kiselina (hidroksibenzojeva, p-kumarična, ferulična i kafeična) različito oscilovao kod svih ispitivanih grupa biljaka. Kod hidroksibenzojeve i p-kumarične kiseline kod svih grupa utvrđen je trend porasta nakon 21. dana do kraja eksperimentalnog perioda dok je kod ferulične i kafeične kiseline primjećen suprotan trend promjene, u vidu značajnog smanjenja i to nakon 15. dana (Slika 33, sekcije A, B, C i D). Najvažniji rezultat koji je uočen jeste statistički značajno veća koncentracija svih detektovanih fenolnih kiselina u listovima biljaka koje su bile pod uticajem suše u poređenju sa onima iz kontrolnih grupa biljaka i to nakon dana 28. Važno je istaći da je sadržaj hidroksibenzojeve i p-kumarične kiseline nakon 28 dana bio značajno veći u listovima biljaka iz grupe SZ u odnosu na one koje su izmjerene u svim ostalim biljkama, uključujući i one iz grupe S. Kada se kod svih grupa biljaka pogleda koncentracija svih fenolnih kiselina u danu 28 može se zaključiti da je suša u najvećoj mjeri indukovala povećanje ferulične kiseline (u prosjeku za 80 % kod grupa S i SZ u odnosu na prosječnu vrijednost kod grupa K i KZ).



Slika 32. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE g<sup>-1</sup> suve mase) i detektovanih flavonoidnih jedinjenja (µg g<sup>-1</sup> suve mase) u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): A) Ukupni fenoli B) Rutin; C) Kaempferol; D) Kvercetin. K- grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok simbol \*označava statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).





Slika 33. Koncentracija detektovanih fenolnih kiselina ( $\mu\text{g g}^{-1}$  suve mase) u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15, dan 21 i dan 28): A) Hidroksibenzojeva kiselina; B) p-Kumarična kiselina; C) Kafeična kiselina; D) Ferulična kiselina. K-grupa kontrola; KZ-grupa kontrola i zeolit; S-grupa suša; SZ-grupa suša i zeolit. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ ● označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. ISTRAŽIVANJE NA BILJKAMA PARADAJZA U DRUGOJ GODINI

#### 5.3.1. Morfo-anatomske analize

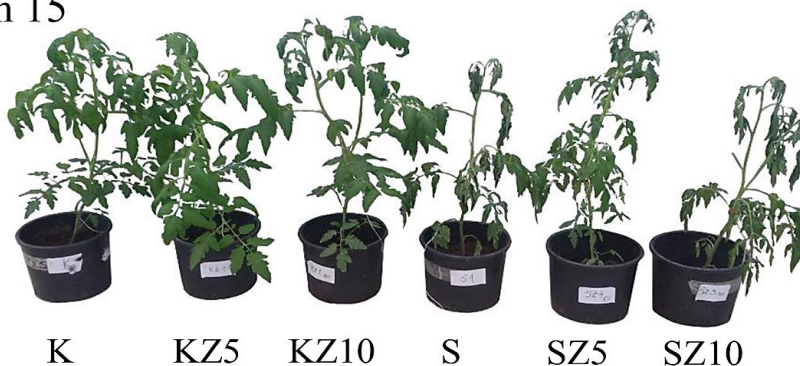
Tokom druge godine istraživanja, u supstrat biljaka paradajza dodato je 5% i 10% zeolita u supstrat a biljke su podvrgnute suši u trajanju od 28 dana. Sadnice su podijeljene u šest eksperimentalnih grupa: 1) grupa kontrola (K), koja je tokom eksperimentalnog perioda navodnjavana optimalnom količinom vode pri čemu u supstrat nije dodat zeolit; 2) grupa KZ5, koja je takođe optimalno navodnjavana ali je u supstrat dodato 5% zeolita; 3) grupa KZ10, koja je takođe optimalno navodnjavana ali je u supstrat dodato 10% zeolita; 4) grupa suša (S) su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda pri čemu u supstrat nije dodat zeolit; 5) grupa SZ5, su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda ali je u supstrat dodato 5% zeolita i 6) grupa SZ510, su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda ali je u supstrat dodato 10% zeolita. Za morfo-anatomske analize uzorkovanje i mjerenje je obavljeno na početku eksperimentalnog perioda (dan 0) i na kraju eksperimentalnog perioda 28. dana. Uzorkovanje biljaka za fiziološke analize i mjerenje parametara antioksidativnog metabolizma obavljeno je tri puta: Dan 0, kao i nakon 15. i 28. dana.

#### *Morfološki parametri*

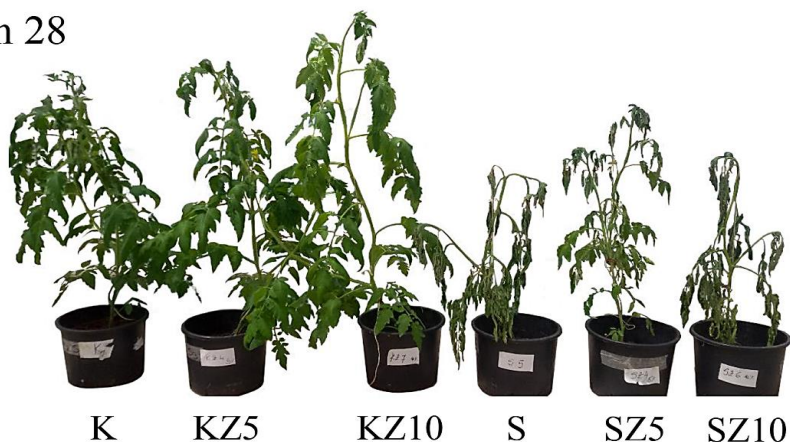
Tokom druge godine istraživanja uticaja zeolita na rast i morfološke karakteristike biljaka paradajza dobijeni su rezultati koji u određenoj mjeri potvrđuju rezultate iz preliminarnog istraživanja. U tom smislu može se konstatovati da u optimalnom vodnom režimu dodatna primjena zeolita u supstratu nije imala negativnih efekata u pogledu rasta i razvoja biljaka te da je čak kod grupe KZ10, nakon 28 dana uočen značajno veći rast izdanka u odnosu na grupe K i KZ5 (u prosjeku za 9%). S druge strane, suša je inhibirala rast izdanka pa je kod grupe S uočena značajno manja dužina biljaka u odnosu na sve kontrolne grupe (prosječno za 30%) (Slika 35, sekcija A). Kad su u pitanju grupe biljaka kojima je u supstrat dodat zeolit u uslovima suše, može se konstatovati da je efekat sprečavanja negativnih posljedica vodnog deficita zavisio od koncentracije dodatog zeolita. U tom smislu, uočeno je da je pri dodatku niže koncentracije zeolita (5%) rast biljaka manje inhibiran u odnosu na one biljke koje su gajene u supstratu sa 10% zeolita. Iako je rast biljaka iz grupe SZ5 bio značajno manji u odnosu na kontrolne biljke (K, KZ5 i KZ10), njihova dužina bila je veća u odnosu na biljke iz grupa S i SZ10, u prosjeku za 7%. Slična zapažanja su uočena i kod mjerenja broja listova, jer su u uslovima suše biljke imale prosječno 35% manje

listova u odnosu na one iz kontrolne grupe, dok je dodatak zeolita u supstrat donekle ublažio ovaj negativni efekat (grupe SZ5 i KZ5 su se razlikovale za oko 20% u pogledu ovog parametra) (Slika 35, sekcija B). Važno je napomenuti da je zeolit u koncentraciji od 10% pozitivno uticao na broj listova kod biljaka sa optimalnim vodnim režimom, s obzirom da su izmjerene vrijednosti nakon 28 dana kod biljka iz grupe KZ10 bile značajno veće u odnosu na sve ostale grupe biljaka. Takođe, kod praćenja simptoma uvenuća, nakon 15 dana eksperimentalnog perioda primjećeni su prvi znaci opadanja turgora listova kod grupa S i SZ10 dok su u isto vrijeme kod grupe SZ5 ovi simptomi bili vidljivo manji (Slika 34, sekcija A).

#### A) Dan 15

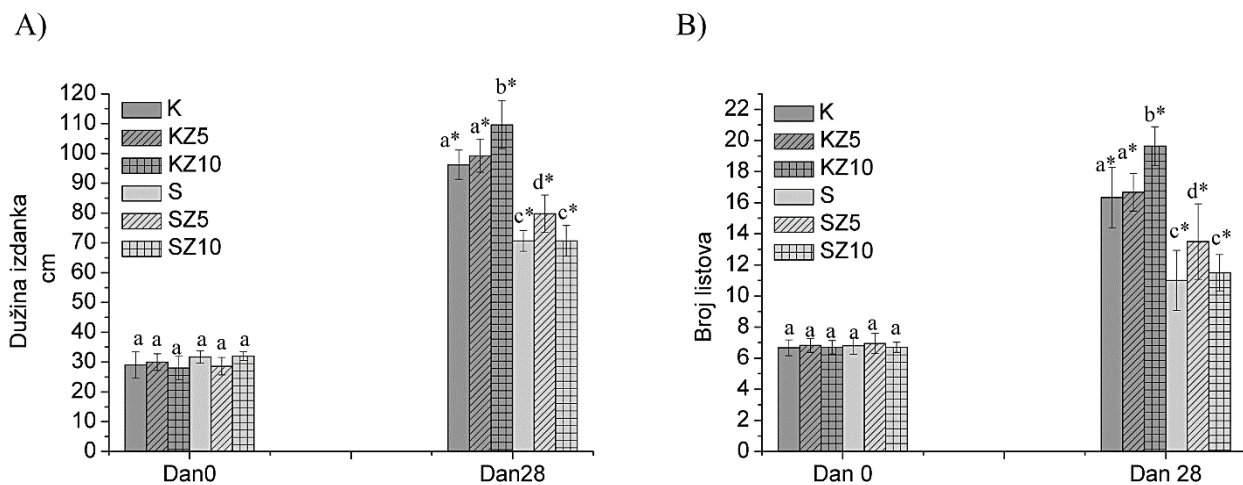


#### B) Dan 28



Slika 34. Morfolgija biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*): A) nakon 15. dana eksperimentalnog perioda; B) nakon 28. dana eksperimentalnog perioda: K- grupa kontrola; KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%.

Nakon 28 dana uticaja suše kod grupa S i SZ10 pored intenzivnijeg smanjenja turgora uočeni su počeci hloroze listova na donjim dijelovima stabljike te blago uvijanje lisnih ploča. Kod biljaka iz grupe SZ5 su se također pojavili navedeni simptomi iako je njihov intenzitet bio manje izražen u odnosu na one iz grupa S i SZ10 (Slika 34, sekcija B).



Slika 35. Dužina izdanka (A) i broj listova po biljci (B) kod paradajza (*Solanum lycopersicum*) tokom eksperimentalnog perioda od 28 dana: K- grupa kontrola; KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a, b, c, d* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, a simbol \* označava statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

#### Anatomske analize

Kad su u pitanju anatomske karakteristike u strukturi lista, uočeno je da se kod svih kontrolnih grupa biljaka (K, KZ5 i KZ10) debljina adaksijalnog epidermisa značajno povećala nakon 28 dana eksperimentalnog perioda, dok je debljina abaksijalnog epidermisa ostala nepromijenjena (Tabela 7.). S druge strane, suša je indukovala smanjenje debljine oba epidermisa (adaksijalnog nakon 15 dana a abaksijalnog nakon 28 dana), a dodatkom zeolita u supstrat u koncentraciji 10% nije došlo do sprečavanja ovih smanjenja, s obzirom da su dobijene slične vrijednosti navedenih parametara kod grupa S i SZ10. Izuzetak je uočen kod biljaka iz grupe SZ5 jer su debljine njihovih epidermisa bile približne onima koje su izmjerene kod kontrolnih grupa tokom cijelog eksperimentalnog perioda. Debljine ćelijskih slojeva palisadnog i sunderastog mefozila su se nakon 28 dana značajno povećale kod kontrolnih grupa biljaka (K, KZ5 i KZ10) ali je odnos debljine palisadnog prema

sunderastom sloju ostao nepromijenjen, što ukazuje na ravnomjerno povećavanje ovih struktura u navedenom periodu. S druge strane suša je dovela do značajnog redukovanja sunderastog mezofila, budući da se debljina ovog ćelijskog sloja počela značajno smanjivati već nakon 15 dana, da bi na kraju eksperimentalnog perioda on bio tanji za 14 % u odnosu na prvi dan. Osim sunderastog sloja, kod biljaka iz grupe S uočeno je i smanjenje palisadnog mezofila ali je ono bilo statistički značajno tek nakon 28 dana (u prosjeku za 9% u odnosu na prvi dan), što se odrazilo i na to da se istovremeno poveća odnos palisadnog prema sunderastom mezofilu. Dodatak zeolita u supstrat u koncentraciji 10% nije spriječio promjene u strukturama mezofilnog tkiva, s obzirom da je kod grupe SZ10 uočen sličan trend promjene navedenih parametara kao i kod grupe S, dok je dodatak zeolita u koncentraciji od 5% dao izvjesne rezultate. Naime, iako je debljina palisadnog mezofila kod grupe SZ5 bila značajno manja u odnosu na kontrolne grupe biljaka (K, KZ5, KZ10), ovo tkivo je imalo značajno veću debljinu u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupa S i SZ10. Takođe, debljina sunderastog mezofila kod grupe SZ5 bila je nepromijenjena nakon 15 dana, a prva promjena je uočena tek na kraju eksperimentalnog perioda kada je izmjerena manja vrijednost ovog parametra u odnosu na kontrolne grupe, a ovo smanjenje bilo je manjeg intenziteta nego kod grupa S i SZ10. Shodno tome, odnos palisadnog prema sunderastom mezofilu kod grupe SZ5 imao je približno istu vrijednost kao i kod kontrolnih grupa biljaka. Kad je u pitanju provodno tkivo, uočeno je da primjena zeolita u supstratu u koncentraciji od 10% uz optimalno zalijevanje pozitivno utiče na debljinu provodnih snopića, s obzirom da je kod grupe KZ10 nakon 28 dana ovaj parametar imao najveće izmjerene vrijednosti u odnosu na one koje su dobijene kod svih ostalih grupa biljaka. S druge strane, suša je uticala na smanjenje debljine provodnog snopića nakon 28 dana i to za približno 7% u odnosu na vrijednosti izmjerene na početku eksperimentalnog perioda i u odnosu na kontrolnu grupu biljaka u danu 28. Slična promjena u provodnom tkivu uočena je i kod grupe SZ10, dok je kod grupe SZ5 ona bila nešto manjeg intenziteta (za približno 5% u odnosu na početno stanje i u odnosu na kontrolnu grupu biljaka u danu 28).

Tabela 7. Anatomska karakterizacija poprečnog presjeka lista kod biljaka paradajza (K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%) uzorkovanih na početku (dan 0) te tokom 15. i 28. dana eksperimentalnog perioda: DAde-debljina adaksijalnog epidermisa, DPM-debljina palisadnog mezofila, DSM- debljina sunderastog mezofila, DAbE-debljina abaksijalnog epidermisa, DPM/DSM- odnos palisadnog prema sunderastom mezofilu, DPS-dijametar provodnog snopića. Sve veličine su izražene u  $\mu\text{m}$  kao srednja vrijednost od 10 mjerenja  $\pm$  SD. Različita mala slova *a, b, c* označavaju statistički značajnu razliku između poređenih grupa biljaka u okviru istog vremenskog perioda uzorkovanja, a simbol \* označava statistički značajnu razliku kod iste grupe biljaka u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Parametar	Grupa biljaka	Dan 0	Dan 15	Dan 28
DadE	K	16,03 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	16,39 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	16,75 $\pm$ 1,44 <sup>a*</sup>
	KZ5	16,26 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>	16,31 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	16,98 $\pm$ 0,98 <sup>a*</sup>
	KZ10	16,17 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	16,24 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	16,93 $\pm$ 1,53 <sup>a*</sup>
	S	15,99 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	16,03 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	15,11 $\pm$ 1,08 <sup>b*</sup>
	SZ5	15,89 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	16,33 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	16,44 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>
	SZ10	16,19 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	16,10 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	15,13 $\pm$ 1,34 <sup>b*</sup>
DPM	K	60,54 $\pm$ 8,85 <sup>a</sup>	62,53 $\pm$ 7,53 <sup>a</sup>	65,32 $\pm$ 7,29 <sup>a*</sup>
	KZ5	61,43 $\pm$ 6,53 <sup>a</sup>	60,08 $\pm$ 6,67 <sup>a</sup>	65,96 $\pm$ 4,41 <sup>a*</sup>
	KZ10	61,09 $\pm$ 6,99 <sup>a</sup>	61,72 $\pm$ 6,13 <sup>a</sup>	68,12 $\pm$ 5,54 <sup>a*</sup>
	S	60,33 $\pm$ 5,56 <sup>a</sup>	57,80 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	55,19 $\pm$ 3,00 <sup>b*</sup>
	SZ5	61,54 $\pm$ 8,67 <sup>a</sup>	60,06 $\pm$ 3,44 <sup>a</sup>	59,64 $\pm$ 4,43 <sup>c</sup>
	SZ10	61,32 $\pm$ 7,54 <sup>a</sup>	57,85 $\pm$ 3,89 <sup>a</sup>	55,10 $\pm$ 3,76 <sup>b*</sup>
DSM	K	80,92 $\pm$ 9,22 <sup>a</sup>	82,75 $\pm$ 8,83 <sup>a</sup>	88,22 $\pm$ 10,53 <sup>a*</sup>
	KZ5	79,54 $\pm$ 7,83 <sup>a</sup>	81,83 $\pm$ 9,71 <sup>a</sup>	88,80 $\pm$ 7,08 <sup>a*</sup>
	KZ10	81,22 $\pm$ 8,88 <sup>a</sup>	82,45 $\pm$ 8,95 <sup>a</sup>	87,89 $\pm$ 7,64 <sup>a*</sup>
	S	82,05 $\pm$ 7,75 <sup>a</sup>	75,37 $\pm$ 8,10 <sup>b*</sup>	70,25 $\pm$ 6,09 <sup>b</sup>
	SZ5	81,54 $\pm$ 8,90 <sup>a</sup>	81,03 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup>	78,01 $\pm$ 5,14 <sup>c</sup>
	SZ10	80,12 $\pm$ 9,04 <sup>a</sup>	72,14 $\pm$ 6,64 <sup>b*</sup>	69,43 $\pm$ 8,10 <sup>b</sup>
DabE	K	9,34 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	9,32 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	9,17 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>
	KZ5	9,42 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	9,30 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	9,24 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
	KZ10	9,56 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	8,96 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	9,06 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>
	S	9,44 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	8,17 $\pm$ 0,85 <sup>b*</sup>	8,00 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>
	SZ5	9,12 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	8,91 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	9,02 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>
	SZ10	9,22 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	8,67 $\pm$ 0,92 <sup>b*</sup>	8,33 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>
DPM/DSM	K	0,76 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
	KZ5	0,77 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	KZ10	0,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
	S	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,77 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,07 <sup>b*</sup>
	SZ5	0,74 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,76 $\pm$ 0,05 <sup>a, b</sup>
	SZ10	0,76 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,78 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,11 <sup>b*</sup>
DPS	K	551,99 $\pm$ 32,01 <sup>a</sup>	555,62 $\pm$ 44,52 <sup>a</sup>	556,73 $\pm$ 37,30 <sup>a</sup>
	KZ5	542,55 $\pm$ 34,34 <sup>a</sup>	547,28 $\pm$ 28,32 <sup>a</sup>	557,29 $\pm$ 48,57 <sup>a</sup>
	KZ10	549,49 $\pm$ 28,43 <sup>a</sup>	560,29 $\pm$ 26,33 <sup>a</sup>	598,48 $\pm$ 68,43 <sup>b*</sup>
	S	556,76 $\pm$ 21,89 <sup>a</sup>	539,96 $\pm$ 45,52 <sup>a</sup>	516,76 $\pm$ 21,89 <sup>c*</sup>
	SZ5	560,65 $\pm$ 37,89 <sup>a</sup>	552,56 $\pm$ 31,79 <sup>a</sup>	531,16 $\pm$ 37,89 <sup>a, c*</sup>
	SZ10	555,04 $\pm$ 44,32 <sup>a</sup>	548,90 $\pm$ 44,32 <sup>a</sup>	509,04 $\pm$ 44,32 <sup>a*</sup>

### **5.3.2. Parametri povezani sa fotosintezom i karakteristike stoma**

#### *Relativni sadržaj vode, odnos svježe i suve mase*

Relativni sadržaj vode u listovima biljaka sa optimalnim vodnim režimom je bio stabilan tokom cijelog eksperimentalnog perioda (kod grupa K, KZ5 i KZ10), dok je suša nezavisno od prisustva zeolita u supstratu uzrokovala opadajući trend vrijednosti ovog parametra nakon 15. dana, a ovo opadanje se progresivno nastavilo i do 28. dana. Ipak, uočeno je da je opadanje vrijednosti relativnog sadržaja vode bilo nešto manjeg intenziteta kod grupe SZ5, ali samo do 15. dana. U tom periodu sadržaj vode u listovima je bio manji kod grupe S za 27% u odnosu na onaj koji je izmjereno kod grupe K, dok je poređenjem vrijednosti ovog parametra između grupa KZ5 i SZ5 uočena razlika od 15%. U istom periodu razlika u relativnom sadržaju vode između grupa KZ10 i SZ10 je bila 31%. Nakon 28 dana trajanja suše sve biljke su imale približno istu vrijednost sadržaja vode u listovima bez obzira na prisustvo ili koncentraciju zeolita u supstratu (Slika 36, sekcija C).

Upravo proporcionalno sa opisanim promjenama relativnog sadržaja vode u listovima promijenjen je i odnos svježe prema suvoj masi (Slika 36, sekcija D). Vrijednosti stope svježe prema suvoj masi su kod svih grupa biljaka koje su bile pod uticajem suše počele da opadaju od 15. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda. Ipak, u 15. danu suše opisano smanjenje ovog parametra je bilo manjeg intenziteta kod grupe SZ5 u odnosu na ono kod grupa S i SZ10. Sa produženjem suše do 28. dana smanjenje vrijednosti stope svježe prema suvoj masi je dobilo približan intenzitet kod svih grupa biljaka (S, SZ5 i SZ10).

#### *Intenzitet fotosinteze i transpiracije*

Intenzitet fotosinteze se tokom cijelog eksperimentalnog perioda nije značajno mijenjao ni kod jedne grupe biljaka sa optimalnim režimom zalijevanja, bez obzira na prisustvo i koncentraciju zeolita u supstratu (Slika 36, sekcija A). S druge strane suša je indukovala statistički značajno smanjenje fotosintetičke aktivnosti počevši od 15. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda. Dodatak 10% zeolita u supstrat nije spriječilo smanjenje fotosintetičke aktivnosti indukovano sušom jer je vrijednost ovog parametra bila približna onoj koja je zabilježena kod biljaka iz grupe S. Dodatak 5% zeolita u supstrat je umjereno ublažio negativan uticaj suše na fotosintetičku

aktivnost, s obzirom da je nakon 15. vrijednost ovog parametra bila značajno veća kod grupe SZ5 u odnosu na onu koja je zabilježena kod grupa S i SZ10. Smanjenje fotosintetičke aktivnosti usljed uticaja suše nakon 28. dana zabilježeno je kod svih grupa biljaka bez statistički značajne razlike u njihovom intenzitetu. U tom smislu može se konstatovati da je dodatak 5% zeolita u supstrat ublažio smanjenje fotosintetičke uzrokovano sušom samo do 15. dana.

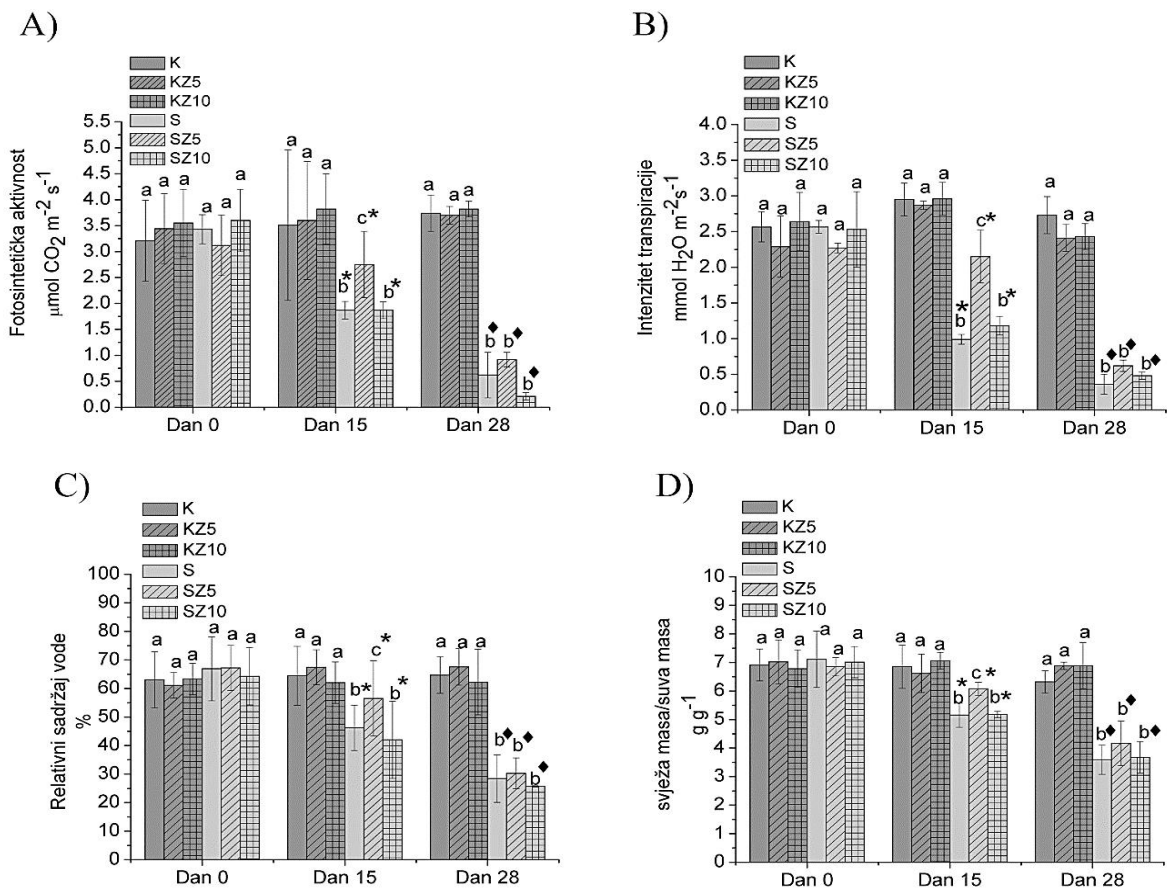
Kad je u pitanju intenzitet transpiracije uočeno je da se vrijednost ovog parametra nije značajno mijenjala tokom cijelog ekperimentalnog perioda kod svih kontrolnih grupa biljaka (K, KZ5 i KZ10). S druge strane suša je počela da umanjuje transpiraciju kod svih grupa biljaka koje nisu navodnjavane (S, SZ5 i SZ10) već od 15. dana. Ipak opadanje intenziteta transpiracije je bilo nešto manje kod biljaka iz grupe SZ5 u odnosu na ono koje je izmjereno kod grupa S i SZ10. Sa produženim periodom suše opadanje intenziteta transpiracije se nastavilo kod svih grupa biljaka, a nakon 28. dana vrijednosti ovog parametra su bile približno jednako umanjene kod grupa S, SZ5 i SZ10 bez statistički značajne razlike između njih (Slika 36, sekcija B).

#### *Sadržaj Rubisco-a*

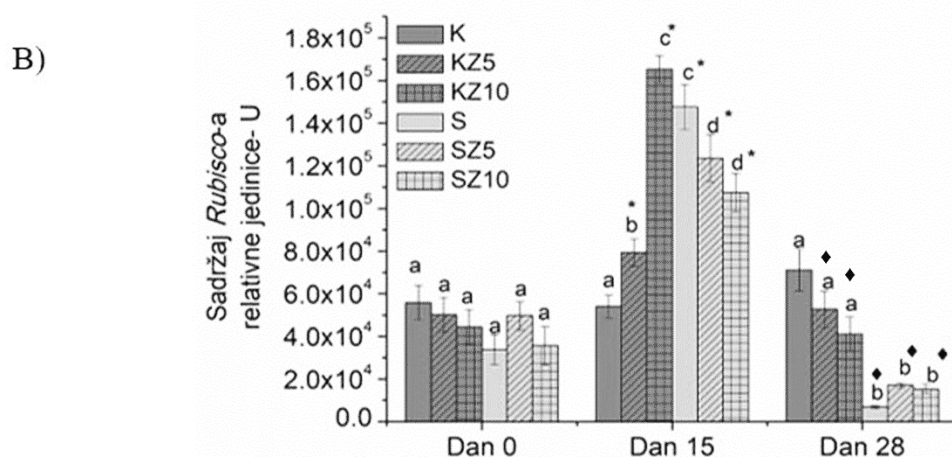
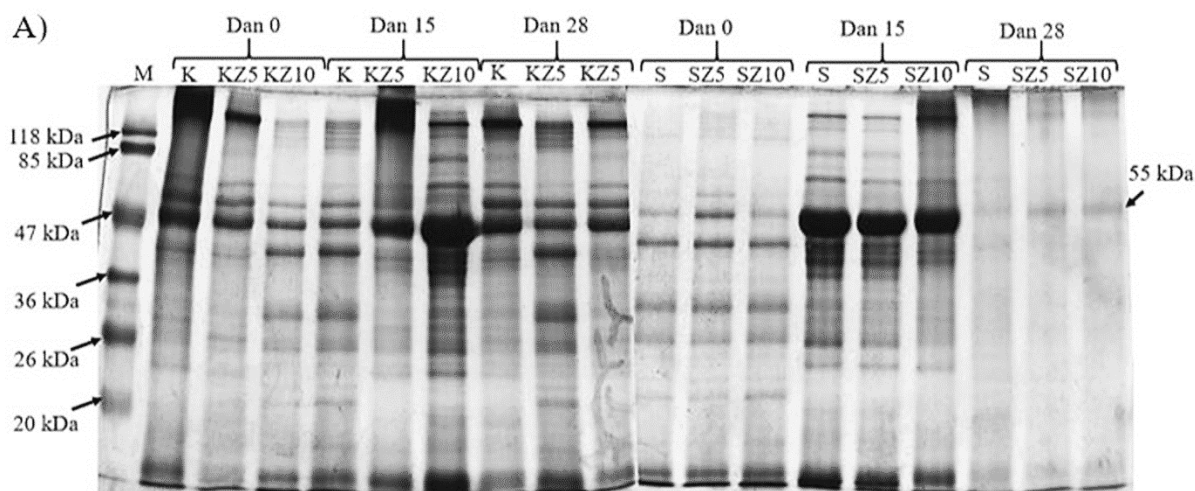
Elektroforegrami dobijeni nakon SDS-elektroforeze proteinskih ekstrakata listova svih testiranih grupa biljaka uzorkovanih u različitim fazama ekperimentalnog perioda predstavljeni su na Slici 37, sekcija A. Molekulske mase razdvojenih proteinskih traka izračunate su na osnovu jednačine pravca standardne krive za proteinske markere, pri čemu je najdominantniji protein u svakom uzorku bio onaj sa MW od 55 kDa (*Rubisco*). Metodom denzitometrije u softveru TotalLab određivana je količina ovog proteina i izražena kao sadržaj enzima *Rubisco* (Slika 37, sekcija B). Uočeno je da je dodatak zeolita u uslovima optimalnog zalijevanja biljaka imao uticaj na sadržaj *Rubisco*-a, jer je izmjereno njegovo povećanje u 15. danu ekperimentalnog perioda i to proporcionalno sa povećanjem koncentracije zeolita u supstratu. Međutim sa daljim rastom biljaka i produženjem ekperimentalnog perioda do 28. dana, sadržaj *Rubisco*-a se kod svih kontrolnih grupa ponovo smanjio na vrijednosti koje su bile slične onima u početnom mjerenju. Suša je takođe uticala na prolazno povećanje sadržaja *Rubisco*-a tokom 15. dana. Ipak, dodatak zeolita u supstrat (obe koncentracije) doveo je do statistički značajnog smanjenja sadržaja *Rubisco*-a pa se može reći da je ublažio efekat suše na sadržaj ovog enzima do 15. dana. Međutim, sa produženim trajanjem suše (do 28. dana) došlo je do intenzivnog smanjenja sadržaja *Rubisco*-a kod svih grupa biljaka pod uticajem suše, a ni jedna koncentracija zeolita u supstratu nije spriječila



ovaj efekat. U danu 28 prosječna količina *Rubisco*-a kod biljaka iz grupe S je bila manja za 88% u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupe K, dok je u poređenju ovog parametra između grupa KZ10 i SZ10 razlika iznosila 80%, a između grupa KZ5 i SZ5 razlika je iznosila 73%. Generalno se može reći da je zeolit imao uticaja na sadržaj *Rubisco*-a u uslovima optimalnog zalijevanja biljaka, uzrokujući prolazno povećanje njegovog sadržaja uporedo sa porastom koncentracije u supstratu, ali je istovremeno i umjereno izbalansirao povećanje sadržaja *Rubisco*-a uzrokovano sušom. Međutim, sa produžetkom sušnog perioda, ni sa jednom koncentracijom zeolita nije postignuto sprečavanje smanjenja sadržaja *Rubisco*-a koje bi bilo statistički značajno.



Slika 36. Fotosintetička aktivnost (A), intenzitet transpiracije (B), relativni sadržaj vode (C) i odnos svježe prema suvoj masi (D) kod listova paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, a različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).



Slika 37. Elektroforegram dobijen nakon SDS PAGE analize proteinskog ekstrakta (A) i sadržaj enzima *Rubisco* u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanim u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): M- proteinski marker poznatih molekulskih masa; K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5- grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova a, b, c, d označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, a različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija fotosintetičkih pigmenata

Tabela 8. Koncentracija ( $\text{mg g}^{-1}$  svježe mase) i odnos fotosintetičkih pigmenata u listovima paradajza tokom eksperimentalnog perioda. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost od tri mjerenja  $\pm$  SD. K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%) uzorkovanih na početku (dan 0) te tokom 15. i 28. dana eksperimentalnog perioda. Različita mala slova *a, b, c* označavaju statistički značajnu razliku između poređenih grupa biljaka u okviru istog vremenskog perioda uzorkovanja, simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku kod iste grupe biljaka u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Parametar	Grupa biljaka	Dan 0	Dan 15	Dan 28
Hlorofil <i>a</i>	K	$0,73 \pm 0,11^a$	$1,30 \pm 0,06^{a*}$	$1,48 \pm 0,66^{a\dagger}$
	KZ5	$0,67 \pm 0,11^a$	$1,34 \pm 0,09^{a*}$	$1,58 \pm 0,01^{a, b\dagger}$
	KZ10	$0,73 \pm 0,01^a$	$1,39 \pm 0,25^{a*}$	$1,80 \pm 0,86^{b\dagger}$
	S	$0,77 \pm 0,14^a$	$0,81 \pm 0,04^{b*}$	$0,71 \pm 0,20^{c\dagger}$
	SZ5	$0,75 \pm 0,05^a$	$0,93 \pm 0,17^{c*}$	$0,80 \pm 0,14^{c\dagger}$
	SZ10	$0,68 \pm 0,12^a$	$0,88 \pm 0,11^{b, c*}$	$0,75 \pm 0,03^{c\dagger}$
Hlorofil <i>b</i>	K	$0,34 \pm 0,02^a$	$0,67 \pm 0,04^{a*}$	$0,83 \pm 0,28^{a\dagger}$
	KZ5	$0,38 \pm 0,08^a$	$0,59 \pm 0,11^{a*}$	$0,92 \pm 0,03^{a, b\dagger}$
	KZ10	$0,37 \pm 0,08^a$	$0,65 \pm 0,07^{a*}$	$0,98 \pm 0,14^{b\dagger}$
	S	$0,35 \pm 0,05^a$	$0,39 \pm 0,09^b$	$0,31 \pm 3,00^c$
	SZ5	$0,33 \pm 0,03^a$	$0,37 \pm 3,44^b$	$0,35 \pm 4,43^c$
	SZ10	$0,32 \pm 0,10^a$	$0,33 \pm 0,02^b$	$0,33 \pm 3,76^c$
Karotenoidi	K	$0,25 \pm 0,07^a$	$0,36 \pm 0,05^{a*}$	$0,55 \pm 0,17^{a\dagger}$
	KZ5	$0,22 \pm 0,04^a$	$0,36 \pm 0,05^{a*}$	$0,60 \pm 0,18^{a\dagger}$
	KZ10	$0,27 \pm 0,01^a$	$0,38 \pm 0,03^{a*}$	$0,62 \pm 0,14^{a\dagger}$
	S	$0,25 \pm 0,01^a$	$0,33 \pm 0,01^{a*}$	$0,27 \pm 0,05^{b\dagger}$
	SZ5	$0,23 \pm 0,07^a$	$0,32 \pm 0,01^{a*}$	$0,26 \pm 0,04^{b\dagger}$
	SZ10	$0,25 \pm 0,04^a$	$0,34 \pm 0,02^{a*}$	$0,26 \pm 0,06^{b\dagger}$
Ukupni hlorofil	K	$1,07 \pm 0,13^a$	$1,97 \pm 0,11^{a*}$	$2,31 \pm 0,33^{a\dagger}$
	KZ5	$1,05 \pm 0,23^a$	$1,93 \pm 0,09^{a*}$	$2,50 \pm 0,21^{a, b\dagger}$
	KZ10	$1,11 \pm 0,07^a$	$2,04 \pm 0,33^{a*}$	$2,78 \pm 0,24^{b\dagger}$
	S	$1,13 \pm 0,09^a$	$1,21 \pm 0,07^b$	$1,02 \pm 0,08^{c*}$
	SZ5	$1,08 \pm 0,38^a$	$1,30 \pm 0,30^{b*}$	$1,14 \pm 0,13^{c\dagger}$
	SZ10	$1,01 \pm 0,27^a$	$1,22 \pm 0,07^{b*}$	$1,07 \pm 0,15^{c\dagger}$
Hlorofil <i>a/b</i>	K	$2,15 \pm 0,31^a$	$1,94 \pm 0,20^a$	$1,79 \pm 0,13^a$
	KZ5	$1,83 \pm 0,22^a$	$2,21 \pm 0,29^a$	$1,73 \pm 0,22^a$
	KZ10	$1,98 \pm 0,26^a$	$2,14 \pm 0,15^a$	$1,81 \pm 0,16^a$
	S	$2,19 \pm 0,15^a$	$2,10 \pm 0,30^a$	$2,36 \pm 0,09^b$
	SZ5	$2,21 \pm 0,24^a$	$2,44 \pm 0,57^a$	$2,38 \pm 0,12^b$
	SZ10	$2,12 \pm 0,08^a$	$2,51 \pm 0,29^a$	$2,37 \pm 0,11^b$
Ukupni hlorofil/ karotenoidi	K	$4,28 \pm 1,23^a$	$5,37 \pm 1,52^{a*}$	$4,20 \pm 1,30^{a\dagger}$
	KZ5	$4,71 \pm 1,05^a$	$5,36 \pm 1,32^{a*}$	$4,16 \pm 1,05^{a\dagger}$
	KZ10	$4,15 \pm 0,78^a$	$5,37 \pm 1,33^{a*}$	$4,31 \pm 1,67^{a\dagger}$
	S	$4,52 \pm 0,89^a$	$3,60 \pm 0,52^{b*}$	$3,70 \pm 0,79^a$
	SZ5	$4,69 \pm 1,29^a$	$4,06 \pm 0,79^b$	$4,26 \pm 1,19^a$
	SZ10	$4,11 \pm 1,19^a$	$3,59 \pm 0,62^b$	$4,11 \pm 1,02^a$

Praćenjem koncentracije fotosintetičkih pigmenta kod biljaka koje su imale optimalan režim navodnjavanja (grupe K, KZ5 i KZ10), utvrđeno je da su se tokom eksperimentalnog perioda koncentracije obe vrste hlorofila (*a* i *b*) postepeno značajno povećavale od 15. dana pa do 28. dana (Tabela 9.) Međutim, kod biljaka uzgajanih u prisustvu zeolita, povećanje sadržaja hlorofila *a* i *b* je bilo intenzivnije u odnosu na ono koje je uočeno kod biljaka iz kontrolne grupe uzgajanih bez zeolita. Nakon 28. dana, najviše hlorofila *a* imale su biljke iz grupe KZ10 (18% više od grupe K i 12% više od grupe KZ5), a takođe kod ove grupe biljaka u istom periodu izmjerena je i najveća koncentracija hlorofila *b* (15% više od grupe K i 6% više od grupe KZ5). Ovakav trend povećanja koncentracije hlorofila *a* i *b* kod biljaka sa optimalnim režimom navodnjavanja u prisustvu zeolita se odrazio istovremeno i na sadržaj ukupnog hlorofila pa je kod grupe KZ10 utvrđena njegova najveća koncentracija nakon 28 dana. Treba napomenuti da opisano povećanje koncentracije hlorofila *a* i *b* u dodatku zeolita nije promijenilo stopu koja ukazuje na odnos ove dvije vrste pigmenta, s obzirom da je odnos hlorofila *a* prema hlorofilu *b* bio bez statistički značajnih promjena u poređenju između grupa K, KZ5 i KZ10 tokom cijelog eksperimentalnog perioda. Kad su u pitanju karotenoidi, njihov sadržaj se takođe postepeno povećavao nakon 15. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda kod svih grupa biljaka sa optimalnim režimom navodnjavanja, ali na ovo povećanje nije uticalo prisustvo zeolita. S tim u vezi, tokom cijelog eksperimentalnog perioda nije uočena značajna razlika u stopi koja ukazuje na odnos ukupnog hlorofila prema karotenoidima u poređenju između grupa K, KZ5 i KZ10 (Tabela 8.).

Suša je usporila povećanje sadržaja hlorofila *a* već od 15. dana, ako se pogleda na povećanje koncentracije ovog pigmenta koje je uočeno kod svih biljaka sa optimalnim režimom navodnjavanja. Kod biljaka iz grupa S, SZ5 i SZ10 sadržaj hlorofila *a* od početka eksperimentalnog perioda pa do 15. dana imao je manji porast u odnosu na onaj kod kontrolnih grupa biljaka, ali je dodatak 5% zeolita u supstrat dao najbolje rezultate, jer je kod grupe SZ5% izmjerena najveća koncentracija ovog pigmenta u odnosu na sve grupe koje su bile pod uticajem suše (Tabela 8.).

Povećanje koncentracije hlorofila *b* je kod svih grupa biljaka koje su bile pod uticajem suše izostalo već nakon 15. dana i u takvom stanju se održalo do 28. dana, a dodatak zeolita ni u jednoj koncentraciji nije spriječio ovaj efekat suše.

Kad je u pitanju uticaj suše na koncentraciju ukupnog hlorofila, uočeno je da je do 15. dana dodatak zeolita imao izvjesnog efekta u sprečavanju njenih negativnih posljedica, s obzirom na to da je

vrijednost ovog parametra značajno povećana kod grupa SZ5 i SZ10 u poređenju sa mjerenjima od početka eksperimentalnog perioda, dok kod biljaka iz grupe S to nije bio slučaj. Sa produžetkom sušnog perioda, do dana 28, sadržaj ukupnog hlorofila se kod svih grupa biljaka smanjio, ali je kod grupe S to smanjenje bilo najuočljivije, budući da su u tom periodu vrijednosti ovog parametra bile manje nego u nultom danu. Kod biljaka iz grupa SZ5 i SZ10 vrijednost ukupnog hlorofila je u danu 28 opala do nivoa koji je bio približan onom iz početnog perioda tj. nultog dana.

Odnos hlorofila *a* prema hlorofilu *b* nije se značajno mijenjao pod uticajem suše sve do 28. dana kada je uočeno značajno povećanje vrijednosti ove stope kod svih biljnih grupa nezavisno od prisustva ili koncentracije zeolita u supstratu.

Suša je manje uticala na sadržaj karotenoida u odnosu na sadržaj hlorofila, budući da se kod grupa S, SZ5 i SZ10 njihova koncentracija do 15. dana povećavala približno istom mjerom kao i kod kontrolnih grupa (K, KZ5 i KZ10). Mjerenjem sadržaja karotenoida nakon 28. dana suše utvrđeno je smanjenje njihove koncentracije kod svih biljnih grupa koje su bile bez vode, a zeolit u supstratu nije spriječio ovaj efekat. Sadržaja karotenoida se smanjio približno do onog nivoa kojeg su biljke imale u nultom danu eksperimenta.

Stopa odnosa ukupnog hlorofila prema karotenoidima je najviše promijenjena kod biljaka iz grupe S, jer je kod njih već od 15. dana primjećeno opadanje vrijednosti ovog parametra, koje je takvo ostalo i do 28. dana. Dodatak zeolita u supstrat (obje koncentracije) ublažio je smanjenje vrijednosti odnosa ukupnog hlorofila prema karotenoidima, jer je ono bilo značajno manje nego kod biljaka koje su uzgajane bez njegovog prisustva. Ipak, u poređenju sa kontrolnim grupama biljaka koje su navodnjavane (K, KZ5 i KZ10) odnos ukupnog hlorofila prema karotenoidima je bila značajno manja.

#### *Karakteristike stoma*

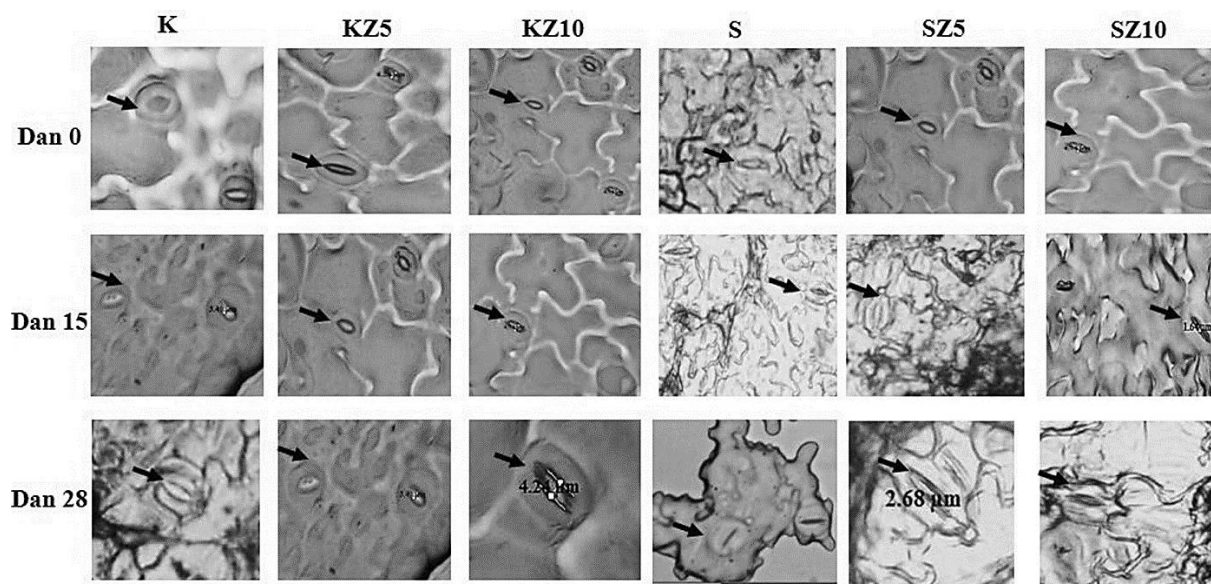
Svi izmjereni parametri koji definišu karakteristike stoma predstavljeni su u Tabeli 9. Dodatak zeolita (5 ili 10%) u supstrat u uslovima optimalnog navodnjavanja biljaka nije uticao ni na jedan izmjereni parametar vezan za karakteristike stoma, jer tokom trajanja eksperimentalnog perioda nije uočena statistički značajna razlika između grupa K, KZ5 i KZ10. Nakon 15. dana uticaja suše jedini parametar koji je bio značajno promijenjen jeste širina stominog otvora, jer je ona bila za 27% manja kod grupe S u odnosu na grupu K. Dodatak 10% zeolita u supstrat nije spriječio zatvaranje stominog otvora, s obzirom da je nakon 15. dana njegova prosječna širina kod grupe

SZ10 bila manja za 30% u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupe KZ10. Dodatak 5% zeolita u supstrat je do 15. dana spriječio uticaj suše na smanjenje stominog otvora jer do tada nije uočena značajna razlika u njegovoj širini između grupa SZ5 i KZ5. Nakon 28 dana suša je indukovala statistički značajne promjene svih praćenih karakteristika stoma, jer je u tom periodu kod grupe S u odnosu na grupu K uočeno sljedeće: povećanje gustine stoma po mm<sup>2</sup> za 15%, smanjenje stominog aparata (dužine za 30% i širine za 28%) te smanjenje stominog otvora (dužine za 19% i širine za 49%). Dodatak 10% zeolita u supstrat ni nakon 28 dana nije spriječio negativan uticaj suše na praćene karakteristike stoma, budući da su promjene koje su uočene u poređenju između grupa K i S imale istu dinamiku i intenzitet kod poređenja grupa KZ10 i SZ10. S druge strane dodatak 5% zeolita u supstrat je donekle spriječio negativni uticaj suše jer su kod svih praćenih karakteristika stoma uočene značajne razlike između grupe SZ5 u poređenju sa grupama S i SZ10. Međutim uočene su i razlike u izmjerenim parametrima između grupe SZ5 sa kontrolnim grupama (K, KZ5 i KZ10). U tom smislu može se reći da je dodatak 5% zeolita u supstrat spriječio zatvaranje stominog otvora usljed uticaja suše do dana 28, nakon čega je uočeno značajno smanjenje njegove širine (41% u odnosu na grupu KZ5). U konačnici, može se konstatovati da je dodatak 5% zeolita u supstrat donekle ublažilo promjene stominih karakteristika pod uticajem suše, iako ono nije u potpunosti ostvareno jer su zabilježena značajna smanjenja stominog aparata i otvora kao i povećanje gustine stoma po mm<sup>2</sup>. S druge strane dodatak 10% zeolita u supstrat nije ni malo spriječilo negativne posljedice suše jer su sve opisane promjene stominih karakteristika imale isti trend kao i kod biljaka koje su bile bez zeolita u sušnim uslovima. Primjeri otisaka stoma uzimanih sa abaksijalnog epidermisa listova biljaka paradajza iz svih eksperimentalnih grupa tokom tri faze u okviru eksperimentalnog perioda (Dan 0, 15 i 28) predstavljeni su na slici 38.

Tabela 9. Karakteristike stoma uzorkovanih sa abaksijalnog epidermisa listova paradajza tokom eksperimentalnog perioda: BS/mm<sup>2</sup>- broj stoma po mm<sup>2</sup> površine lista; DSA-dužina stominog aparata; ŠSA-širina stominog aparata; DSO- dužina stominog otvora; ŠSO- širina stominog otvora. Veličine su izražene u μm kao srednja vrijednost od 10 mjerenja ± SD. K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *abc* označavaju statistički značajnu razliku između poređenih grupa biljaka u okviru istog vremenskog perioda uzorkovanja, a različiti simboli \*♦ označavaju statistički značajnu razliku kod iste grupe biljaka u odnosu na prethodni period uzorkovanja (p < 0,05).

Parametar	Grupa biljaka	Dan 0	Dan 15	Dan 28
BS/mm <sup>2</sup>	<b>K</b>	131,64 ± 12,87 <sup>a</sup>	133,77 ± 17,43 <sup>a</sup>	133,21 ± 15,32 <sup>a</sup>
	<b>KZ5</b>	129,61 ± 7,33 <sup>a</sup>	134,21 ± 9,93 <sup>a</sup>	132,69 ± 12,57 <sup>a</sup>
	<b>KZ10</b>	131,60 ± 15,04 <sup>a</sup>	135,72 ± 5,99 <sup>a</sup>	131,09 ± 10,52 <sup>a</sup>
	<b>S</b>	130,66 ± 11,87 <sup>a</sup>	139,87 ± 16,15 <sup>a</sup>	156,22 ± 25,43 <sup>b*</sup>
	<b>SZ5</b>	132,55 ± 8,95 <sup>a</sup>	136,33 ± 11,32 <sup>a</sup>	143,77 ± 19,21 <sup>c*</sup>
	<b>SZ10</b>	133,71 ± 6,99 <sup>a</sup>	138,67 ± 14,91 <sup>a</sup>	152,79 ± 21,34 <sup>b*</sup>
DSA	<b>K</b>	18,88 ± 0,78 <sup>a</sup>	19,22 ± 0,39 <sup>a</sup>	20,19 ± 2,40 <sup>a</sup>
	<b>KZ5</b>	18,54 ± 1,23 <sup>a</sup>	19,54 ± 1,42 <sup>a</sup>	19,08 ± 0,25 <sup>a</sup>
	<b>KZ10</b>	18,95 ± 1,20 <sup>a</sup>	18,68 ± 1,97 <sup>a</sup>	19,44 ± 1,67 <sup>a</sup>
	<b>S</b>	17,97 ± 0,95 <sup>a</sup>	16,43 ± 1,48 <sup>a</sup>	14,29 ± 0,74 <sup>b*</sup>
	<b>SZ5</b>	18,45 ± 1,48 <sup>a</sup>	17,22 ± 1,90 <sup>a</sup>	16,22 ± 0,80 <sup>c*</sup>
	<b>SZ10</b>	19,01 ± 1,45 <sup>a</sup>	16,34 ± 2,05 <sup>a</sup>	13,98 ± 0,67 <sup>b*</sup>
ŠSA	<b>K</b>	12,45 ± 0,90 <sup>a</sup>	12,39 ± 0,17 <sup>a</sup>	12,98 ± 1,17 <sup>a</sup>
	<b>KZ5</b>	12,66 ± 0,11 <sup>a</sup>	13,29 ± 1,12 <sup>a</sup>	13,25 ± 1,05 <sup>a</sup>
	<b>KZ10</b>	12,97 ± 0,78 <sup>a</sup>	12,99 ± 1,16 <sup>a</sup>	12,48 ± 0,98 <sup>a</sup>
	<b>S</b>	13,05 ± 0,95 <sup>a</sup>	11,66 ± 0,98 <sup>a</sup>	9,35 ± 0,99 <sup>b*</sup>
	<b>SZ5</b>	12,73 ± 1,13 <sup>a</sup>	12,41 ± 0,49 <sup>a</sup>	10,64 ± 1,22 <sup>c*</sup>
	<b>SZ10</b>	12,69 ± 0,77 <sup>a</sup>	12,09 ± 0,98 <sup>a</sup>	8,95 ± 1,95 <sup>b*</sup>
DSO	<b>K</b>	11,56 ± 0,65 <sup>a</sup>	11,37 ± 0,46 <sup>a</sup>	11,33 ± 0,33 <sup>a</sup>
	<b>KZ5</b>	11,64 ± 0,95 <sup>a</sup>	12,23 ± 0,87 <sup>a</sup>	12,18 ± 1,43 <sup>a</sup>
	<b>KZ10</b>	10,77 ± 1,23 <sup>a</sup>	11,34 ± 0,56 <sup>a</sup>	11,57 ± 0,95 <sup>a</sup>
	<b>S</b>	11,09 ± 0,57 <sup>a</sup>	10,44 ± 0,46 <sup>a</sup>	9,17 ± 0,33 <sup>b*</sup>
	<b>SZ5</b>	11,49 ± 0,87 <sup>a</sup>	10,91 ± 0,74 <sup>a</sup>	10,02 ± 0,66 <sup>c</sup>
	<b>SZ10</b>	10,89 ± 0,67 <sup>a</sup>	10,99 ± 0,34 <sup>a</sup>	9,32 ± 0,98 <sup>b*</sup>
ŠSO	<b>K</b>	4,12 ± 0,43 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,85 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,16 <sup>a</sup>
	<b>KZ5</b>	4,22 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,94 ± 0,27 <sup>a</sup>	4,16 ± 0,47 <sup>a</sup>
	<b>KZ10</b>	4,32 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,48 ± 1,07 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,29 <sup>a</sup>
	<b>S</b>	3,98 ± 0,98 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,55 <sup>b*</sup>	2,06 ± 0,23 <sup>b♦</sup>
	<b>SZ5</b>	4,05 ± 0,56 <sup>a</sup>	3,79 ± 0,66 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,43 <sup>b*</sup>
	<b>SZ10</b>	4,02 ± 0,54 <sup>a</sup>	3,14 ± 0,22 <sup>b*</sup>	2,11 ± 0,33 <sup>b♦</sup>





Slika 38. Otisci stoma uzimanih sa abaksijalnog epidermisa listova kod biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Strelice označavaju pojedinačne primjere stoma analiziranih pod mikroskopskim povećanjem (10 puta).

### 5.3.3. Parametri antioksidativnog metabolizma

#### *Aktivnost i izoenzimski profil superoksid dismutaze*

Specifičnim bojenjem gela dobijenog nakon native elektroforeze za detekciju aktivnosti superoksid dismutaze kod svake biljne grupe utvrđeno je prisustvo po tri SOD izoforme ( $R_f$  SOD1= 0,67;  $R_f$  SOD2= 0,72;  $R_f$  SOD3= 0,78) i takav izoenzimski profil je bio konstantan od nultog do 28. dana (Slika 40.). Iako se broj SOD izoformi nije izmijenio pod uticaj suše, njihova ukupna aktivnost se povećavala, što je potvrđeno denzitometrijskom analizom razdvojenih traka na gelu koje su detektovane u uzorcima iz grupa S, SZ5 i SZ10. U kontrolnim grupama biljaka (K, KZ5 i KZ10) značajno povećanje SOD aktivnosti je detektovano tek kod mjerenja u 28. danu, s tim da je ono bilo najizraženije kod biljaka kojima nije dodavan zeolit (grupa K). Kod biljaka koje su bile pod uticajem suše (S, SZ5 i SZ10) SOD ukupna aktivnost značajno je porasla već nakon 15. dana, a trend porasta se nastavio i do 28. dana (Slika 39, sekcija A). Poređenjem ukupne SOD aktivnosti u 28. danu između različitih grupa biljaka uočeno je da je ona kod grupe S bila veća za

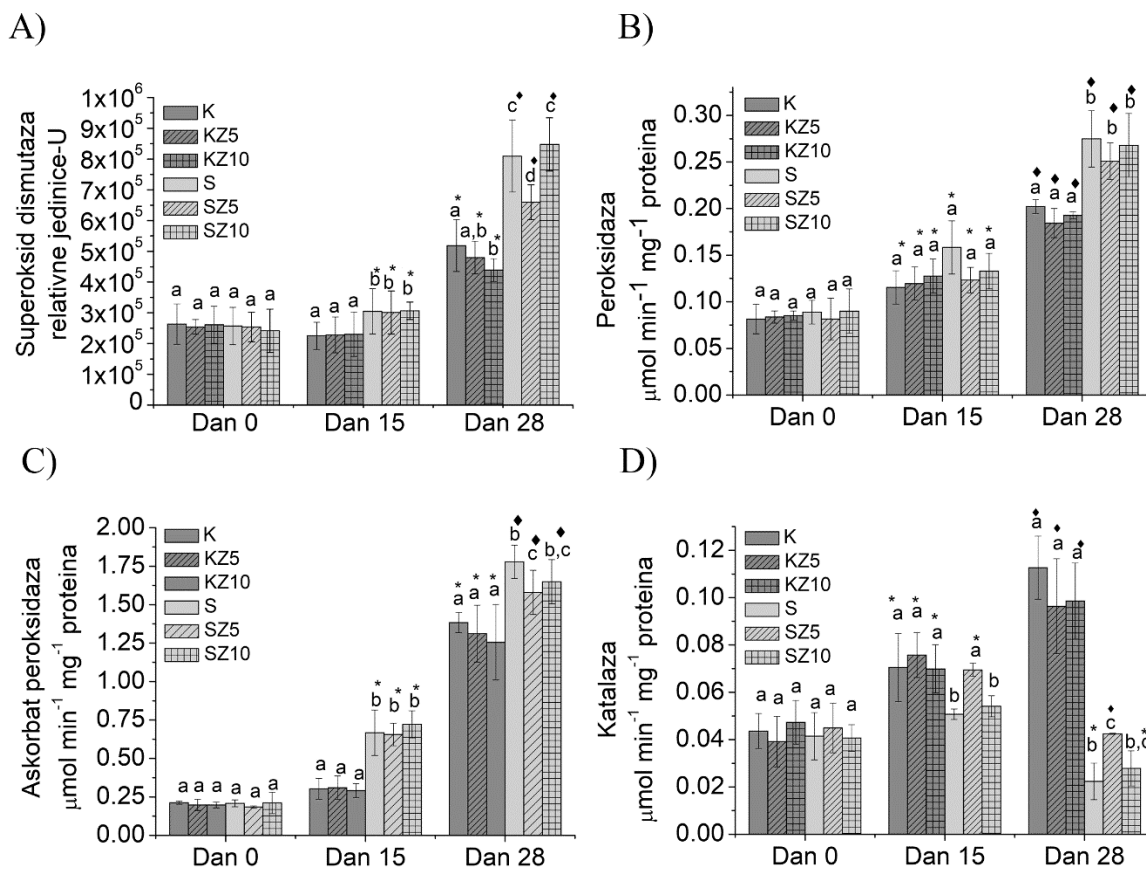
35% u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupe K, a aktivnost izmjerena kod grupe SZ10 je bila veća za 41% u odnosu na detektovanu aktivnost kod grupe KZ10. Najmanja razlika u SOD aktivnosti u 28. danu utvrđena je između grupa KZ5 i SZ5 i iznosila je 25%, što znači da je dodatak 5% zeolita u supstrat najviše ublažilo povećanje SOD aktivnosti izazvano sušom.

### *Aktivnost peroksidaza Klase III*

Peroksidazna aktivnost određena spektrofotometrijskim mjerenjem oksidacije pirogalola pokazala je da se kod svih grupa biljaka aktivnost ovog enzima progresivno povećavala od 15. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda. Međutim, rezultati su pokazali da je takvo povećanje bilo izraženije kod biljaka koje su bile pod uticajem suše, jer je nakon 28. dana POD aktivnost bila značajno veća kod grupa S, SZ5 i SZ10 u odnosu na sve kontrolne grupe (Slika 39, sekcija B). Takođe, dodatak obe koncentracije zeolita nije spriječio povećanje POD aktivnosti uzrokovano sušom. Specifičnim bojenjem gela na peroksidaznu aktivnost nakon native PAGE pokazano je da se kod kontrolnih grupa biljaka (K, KZ5 i KZ10) izoenzimski profil nije promijenio tokom eksperimentalnog perioda te je kod ovih biljaka detektovano po pet POD izoformi: Rf POD1= 0,42; Rf POD2= 0,54; Rf POD3= 0,55; Rf POD 4= 0,72; Rf POD5= 0,77 (Slika 41.). S druge strane, kod svih biljaka koje su bile pod uticajem suše nakon 21. potvrđeno je prisustvo nove POD izoforme, označene kao POD3' jer je njena Rf vrijednost iznosila 0,60 i bila je pozicionirana između izoformi 3 i 4 (Slika 41.).

### *Aktivnost askorbat peroksidaze*

Aktivnost askorbat peroksidaze je kod svih grupa biljaka imala vrlo sličan trend promjene kao i SOD aktivnost. Uočeno je da se kod biljaka sa optimalnim navodnjavanjem (K, KZ5 i KZ10) APX aktivnost značajno povećala tek nakon 28. dana, dok je suša indukovala povećanje aktivnosti ovog enzima nakon 15. dana te se taj trend povećanja nastavio sve do kraja eksperimentalnog perioda (Slika 39, sekcija C). Dodatak zeolita u supstrat je umanjio povećanje APX aktivnosti, tako da je 28. dana ovaj enzim imao značajno manju aktivnost (12%) kod grupe SZ5 u odnosu na grupu S.

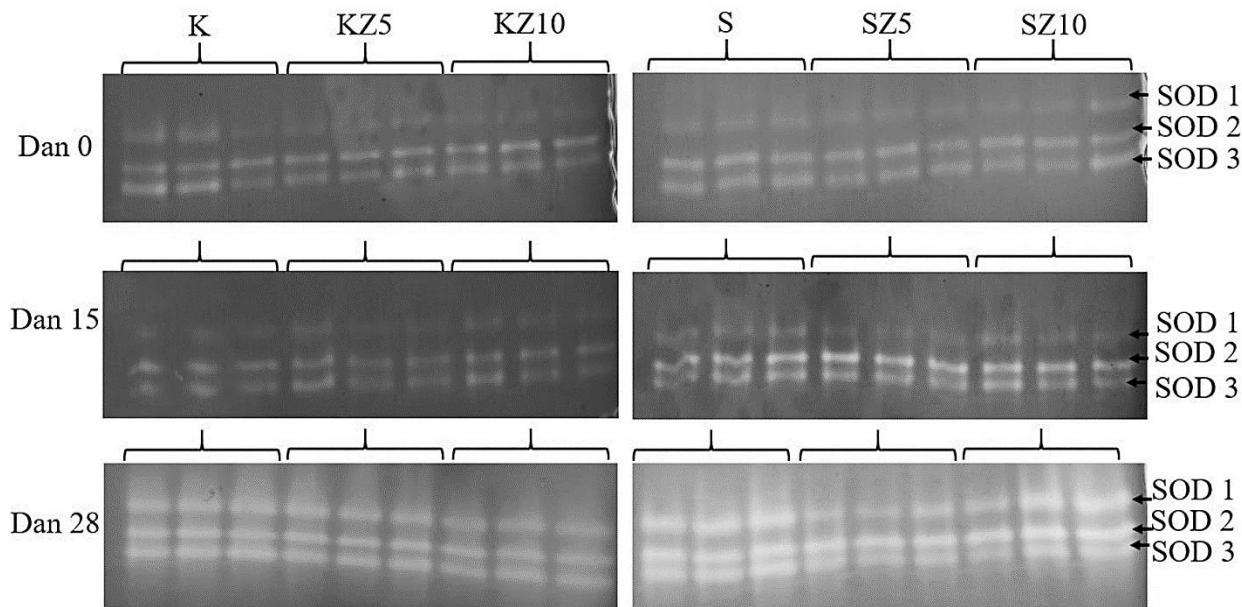


Slika 39. Aktivnost enzima antioksidativnog metabolizma u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): A) superoksid dismutaza; B) peroksidaza; C) askorbat peroksidaza; D) katalaza. K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

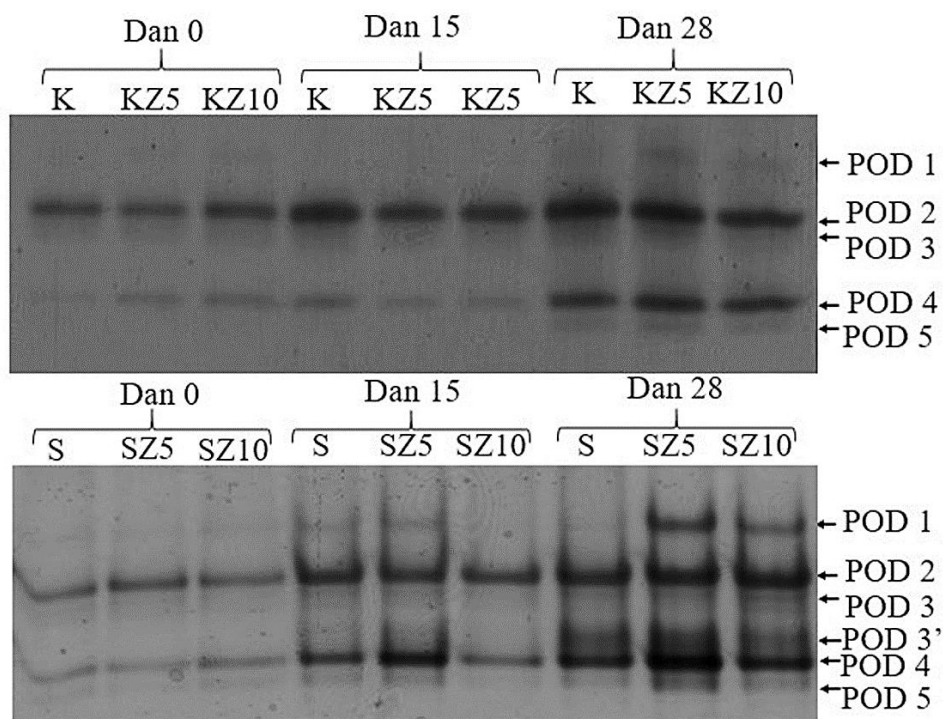
#### Aktivnost katalaze

Kod svih kontrolnih grupa biljaka (K, KZ5 i KZ10) uočeno je progresivno povećanje aktivnosti katalaze, jer je u svakoj tački uzorkovanja izmjereno statistički značajno povećanje ovog enzima (Slika 39, sekcija D). Nasuprot ovome, suša je uzrokovala smanjenje katalazne aktivnosti, jer je kod biljaka iz grupe S i SZ10 izostalo njeno povećanje koje je bilo prisutno kod kontrolnih biljaka u istom periodu. Izuzetak je bila CAT aktivnost kod grupe SZ5 koja se nije razlikovala u pogledu statističke značajnosti od one koja je izmjerena kod kontrolnih grupa u danu 15. Do 28. dana suše

zmanjenje CAT aktivnosti je postalo još izraženije pa je kod grupe S ovaj enzim imao manju aktivnost za 83% u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupe K. Takođe, u istom periodu CAT aktivnost kod grupe SZ10 je bila za 75% manja u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupe KZ10. Dodatak 5% zeolita u supstrat je u izvjesnoj mjeri ublažio smanjenje CAT aktivnosti jer je ona kod grupe SZ5 bila za 54% manja u odnosu na vrijednosti izmjerene kod grupe KZ5 te se statistički značajno razlikovala od aktivnosti enzima kod biljaka iz grupe S.



Slika 40. Izoenzimski profil superoksid dismutaze (SOD) dobijen nakon native PAGE iz proteinskih frakcija izolovanih iz listova biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%.



Slika 41. Izoenzimski profil peroksidaza klase III (POD) dobijen nakon native PAGE iz proteinskih frakcija izolovanih iz listova biljaka paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Specifično bojenje gela urađeno je 0,01% 4-hloro- $\alpha$ -naftolom u prisustvu 0,03%  $H_2O_2$ .

#### Koncentracija fenola

Tabela 10. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE  $g^{-1}$  svježe mase) u listovima paradajza (*Solanum lycopersicum*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 15 i dan 28): K- grupa kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S- grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, a različiti simboli \*  $\diamond$  označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe između u odnosu na prethodni period uzorkovanja ( $p < 0,05$ ).

Grupa biljaka	Dan 0	Dan 15	Dan 28
<b>K</b>	6,14 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	8,57 $\pm$ 0,61 <sup>a*</sup>	11,03 $\pm$ 0,47 <sup>a*</sup>
<b>KZ5</b>	5,47 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	8,25 $\pm$ 0,48 <sup>a*</sup>	10,48 $\pm$ 0,32 <sup>a*</sup>
<b>KZ10</b>	6,33 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	9,05 $\pm$ 0,49 <sup>a*</sup>	11,09 $\pm$ 0,61 <sup>a*</sup>
<b>S</b>	6,74 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	13,29 $\pm$ 0,95 <sup>b*</sup>	16,00 $\pm$ 1,57 <sup>b*</sup>
<b>SZ5</b>	5,53 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	9,09 $\pm$ 1,12 <sup>a*</sup>	12,85 $\pm$ 1,92 <sup>c*</sup>
<b>SZ10</b>	5,57 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	13,12 $\pm$ 0,21 <sup>b*</sup>	14,25 $\pm$ 1,65 <sup>b,c</sup>

Mjerenjem sadržaja ukupnih fenola utvrđeno je da se njihova koncentracija povećavala u listovima biljaka iz svih kontrolnih grupa (K, KZ5 i KZ10) pa je nakon svakog uzorkovanja uočen statistički značajan porast bez međusobne razlike po grupama. U tom smislu se može reći da dodatak zeolita u uslovima optimalnog navodnjavanja nije imao uticaja na sadržaj fenola (Tabela 10.). Povećanje sadržaja fenola je bilo intenzivnije tokom suše u odnosu na povećanje koje je uočeno kod optimalnog navodnjavanja, tj. kod kontrolnih grupa. Tako su mjerenjem koncentracije fenola nakon 15. dana suše kod grupe S i SZ10 dobijene vrijednosti koje su bile statistički značajno veće u odnosu na one koje su izmjerene kod kontrolnih grupa biljaka. Može se reći da je dodatak 5% zeolita u supstrat spriječio uticaj suše na intenzivno povećanje sadržaja fenola do 15. dana, jer je njihova koncentracija u listovima biljaka iz grupe SZ5 bila približna onoj koja je izmjerena kod grupa K, KZ5 i KZ10. Produžetak suše do 28. dana je dodatno povećao koncentraciju fenola pa je tako najveća vrijednost izmjerena kod grupe S (31% veća nego kod grupe K). Istovremeno je dodatak 5% zeolita imao najbolji efekat u sprečavanju akumuliranja fenola, s obzirom da je njihov sadržaj u listovima biljaka iz grupe SZ5 bio značajno manji nego kod grupe S (približno za 20%), iako su izmjerene vrijednosti bile veće nego kod kontrolnih grupa (K, KZ5 i KZ10).

#### **5.4. ISTRAŽIVANJE NA BILJKAMA KUKURUZA**

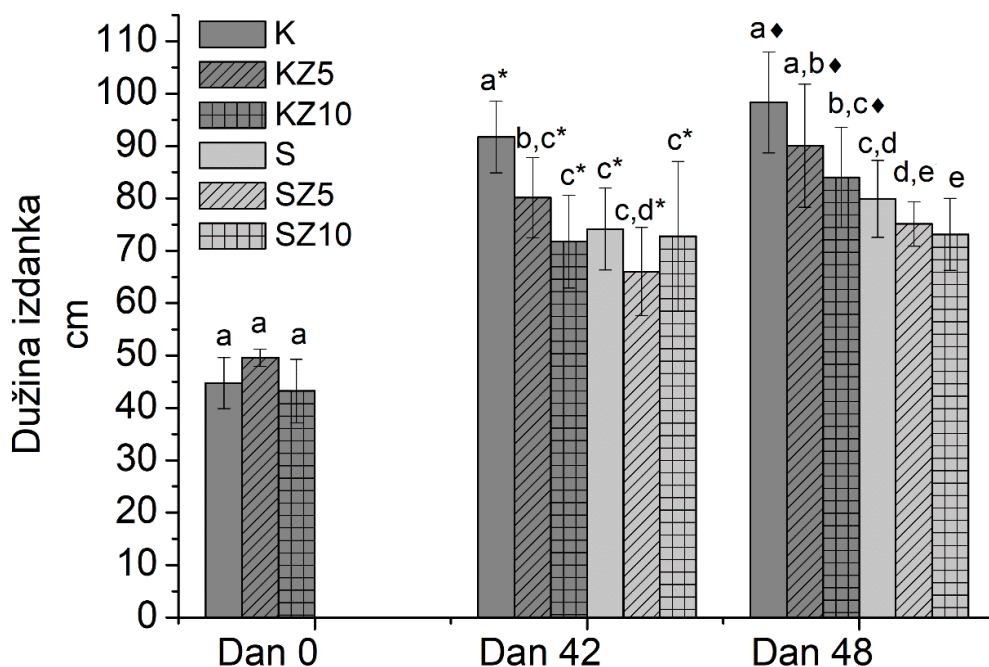
Istraživanje na biljkama kukuruza je takođe sprovedeno tokom druge godine eksperimentalnog dijela rada, pri čemu u supstrat dodato 5% i 10% zeolita, a biljke su podvrgnute uticaju suše u trajanju od 48 dana. Sadnice su bile podijeljene u šest eksperimentalnih grupa, na sličan način kao i biljke paradajza u drugoj eksperimentalnoj godini: 1) grupa kontrola (K), koja je tokom eksperimentalnog perioda navodnjavana optimalnom količinom vode pri čemu u supstrat nije dodat zeolit; 2) grupa KZ5, koja je optimalno navodnjavana ali je u supstrat dodato 5% zeolita; 3) grupa KZ10, koja je optimalno navodnjavana ali je u supstrat dodato 10% zeolita; 4) grupa suša (S) su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda pri čemu u supstrat nije dodat zeolit; 5) grupa SZ5 su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda ali je u supstrat dodato 5% zeolita i 6) grupa SZ10 su biljke koje nisu dobijale vodu tokom eksperimentalnog perioda ali je u supstrat dodato 10% zeolita. Uzorkovanje biljaka obavljeno je na početku eksperimentalnog perioda (Dan 0) te nakon 42. i 48. dana trajanja suše.

### 5.4.1. Morfologija biljaka

Dodatak zeolita u supstrat kod optimalno navodnjavanih biljaka kukuruza imao je drugačiji efekat u odnosu na onaj koji je uočen kod biljaka paradajza, s obzirom na to da je došlo do određenog usporavanja rasta izdanka. Nakon 42. dana eksperimentalnog perioda prosječna dužina izdanka kod biljaka iz grupa KZ5 i KZ10 je bila statistički značajno manja u odnosu na izmjerenu dužinu izdanka kod biljaka iz grupe K (Slika 43.). Do 48. dana uočen je dodatni značajan rast biljaka iz svih grupa koje su navodnjavane, ali je on bio manji u prisustvu zeolita. Najmanja dužina izdanka nakon 48. dana izmjerena je kod biljaka iz grupe KZ10 (15% manje u odnosu na grupu K i 5 % manja u odnosu na grupu KZ5). Zbog uticaja suše, usporen je rast izdanka kod svih biljaka koje nisu navodnjavane, što je i potvrđeno mjerenjem u 42. danu (Slika 43.). Nakon toga, do 48. dana sve biljke iz grupa koje nisu navodnjavane nisu dodatno porasle, a najmanja dužina izdanka izmjerena je kod grupe SZ10. U tom smislu konstatovano je da pored suše, dodatak zeolita u supstrat dodatno negativno utiče na rast biljaka kukuruza. Primjerci biljaka kukuruza iz svih ispitivanih grupa koji su uzorkovani nakon 42. i 48. dana eksperimentalnog perioda predstavljeni su na Slici 42.



Slika 42. Morfologija biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih nakon 48. dana eksperimentalnog perioda: K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%.



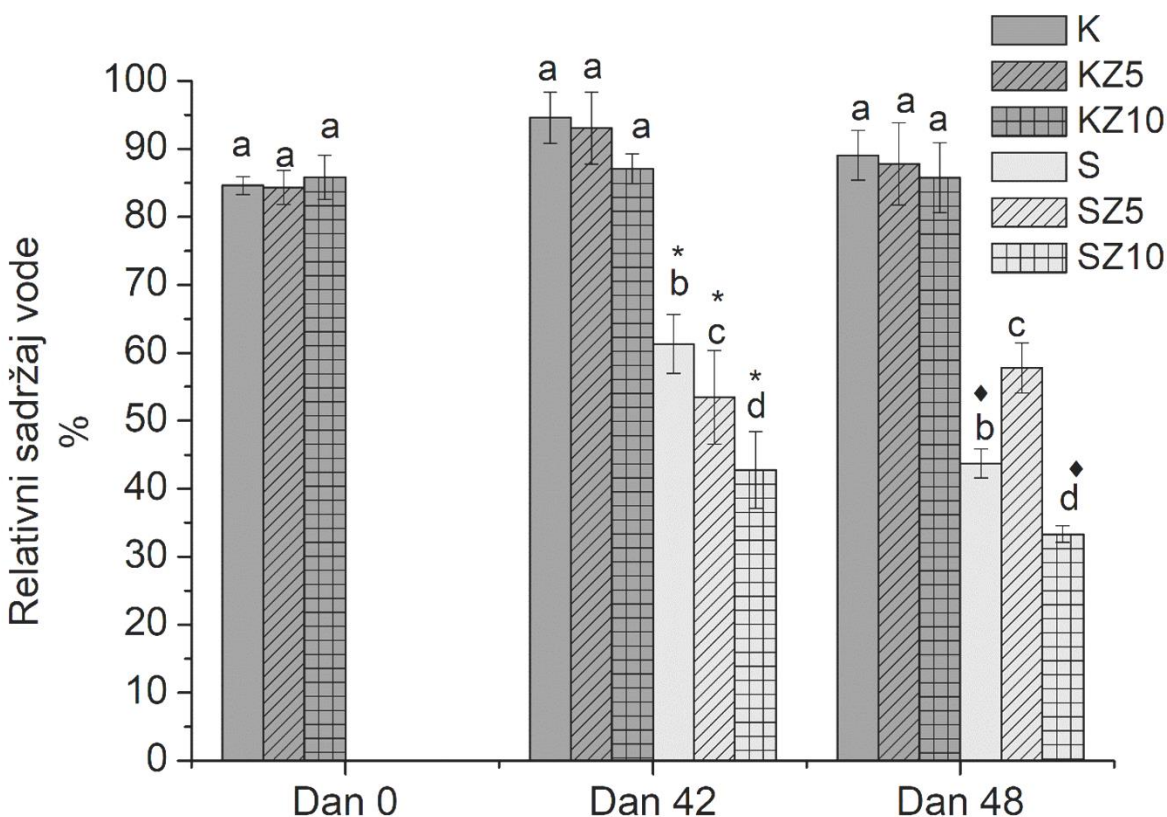
Slika 43. Prosječna dužina izdanka biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a, b, c, d, e* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja (vrijednosti iz nultog dana za grupe K, KZ5 i KZ10 su takođe tretirane kao vrijednosti iz nultog dana i za grupe S, SZ5 i SZ10, respektivno) ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2. Relativni sadržaj vode

Rezultati mjerenja relativnog sadržaja vode u listovima biljaka kukuruza ukazuju da tretman sa zeolitom u uslovima optimalnog navodnjavanja nije značajno uticao na ovaj parametar budući da su tokom cijelog eksperimentalnog perioda njegove vrijednosti bile bez značajnih oscilovanja kod grupa K, KZ5 i KZ10 (Slika 44.). Kod biljaka iz grupe S nakon 42. dana pa do kraja eksperimentalnog perioda došlo je do progresivnog smanjivanja sadržaja vode u listovima pa je nakon 48. dana on bio za 50% manji nego kod grupe K u istom periodu. Tretman sa zeolitom u uslovima suše je u zavisnosti od koncentracije različito uticao na sadržaj vode u listovima. Tako je kod grupe SZ5 nakon 42. dana uočen manji sadržaj vode u listovima u odnosu na onaj koji je



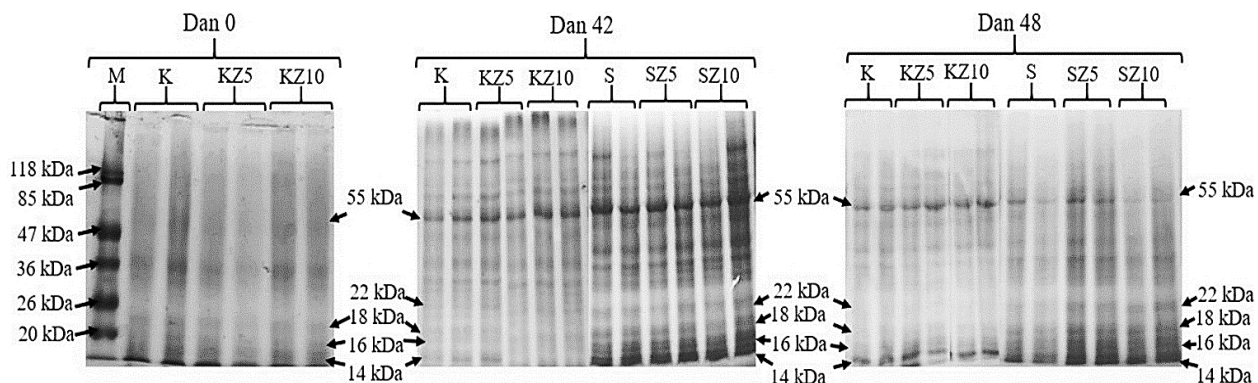
izmjeren kod grupe S (za 13%), ali je nakon 48. dana došlo do povećanja vrijednosti ovog parametra pa je sadržaj vode u listovima kod ove grupe bio veći za 24% nego kod grupe S. S druge strane, kod grupe SZ10, od 42. pa do 48. dana izmjeren je najmanji sadržaj vode u listovima biljaka u odnosu na sve testirane grupe. U tom smislu dodatak 10% zeolita u supstrat je najnepovoljnije uticao a relativni sadržaj vode u listovima biljaka u uslovima suše.



Slika 44. Relativni sadržaj vode (%) u listovima biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c*, *d* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja (vrijednosti iz nultog dana za grupe K, KZ5 i KZ10 su takođe tretirane kao vrijednosti iz nultog dana i za grupe S, SZ5 i SZ10, respektivno) ( $p < 0,05$ )

### 5.4.3. Karakterizacija proteina razdvojenih SDS-elektroforezom

Elektroforegrami dobijeni SDS-elektroforezom proteinskih ekstrakata svih testiranih grupa biljaka kukuruza uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda predstavljani su na Slici 45. Molekulske mase razdvojenih proteina izračunate su na osnovu jednačine pravca standardne krive za proteinske markere, a potom su metodom denzitometrije u softveru TotalLab izračunate količine pojedinih proteina koji su imali najuočljiviju dinamiku promjene među ispitivanim biljnim grupama.



Slika 45. Elektroforegram dobijen nakon SDS PAGE analize proteinskog ekstrakta dobijenog iz listova biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): M- proteinski marker poznatih molekulskih masa; K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. U frakcijama uzoraka obilježeni su proteini sa molekulskim masama od 55 kDa (*Rubisco*), 22 kDa, 18 kDa, 16 kDa i 14 kDa.

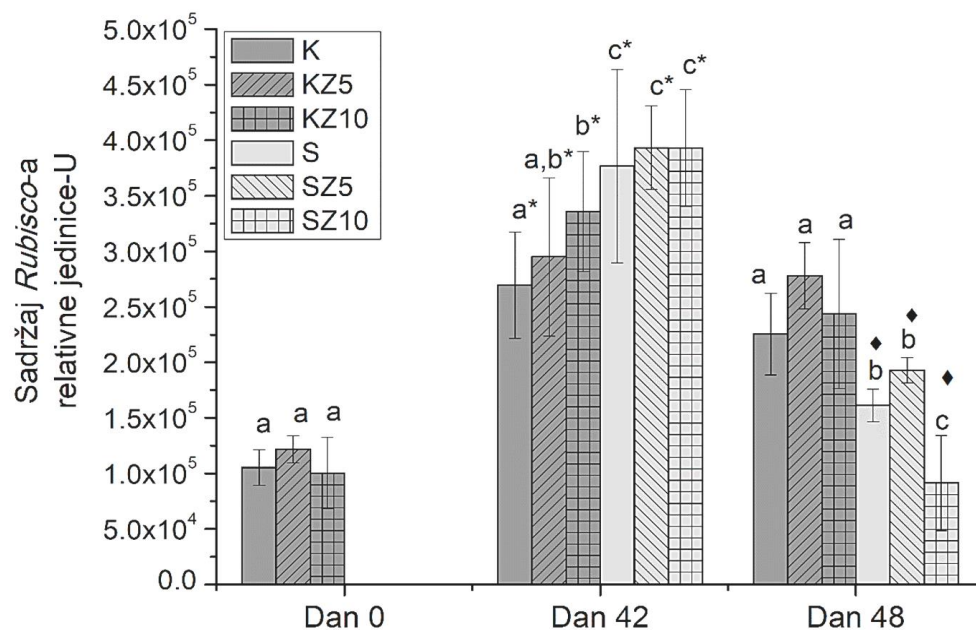
#### *Sadržaj Rubisco-a*

Rezultati su pokazali da se sadržaj enzima *Rubisco* (proteina molekulske mase od 55 kDa) značajno povećao od početka eksperimentalnog perioda do 42. dana kod svih ispitivanih biljnih grupa (Slika 46.). Međutim, uočeno povećanje sadržaja *Rubisco*-a je imalo različit inenzitet u zavisnosti od tretmana sa zeolitom, ali i u zavisnosti od režima navodnjavanja. Tako je do 42. dana količina ovog enzima bila značajno veća kod biljaka iz grupe KZ10 u odnosu na njegovu količinu kod grupe K (za 15%). Povećanje sadržaja ovog enzima je detektovano i kod svih biljaka koje su bile pod uticajem suše do 42. dana i to u većoj mjeri u odnosu na biljke iz kontrolnih grupa (za 27% kod grupe S u odnosu na grupu K, za 25% kod grupe SZ5 u odnosu na grupu KZ5 te za 15 % kod grupe SZ10 u odnosu na grupu KZ10).

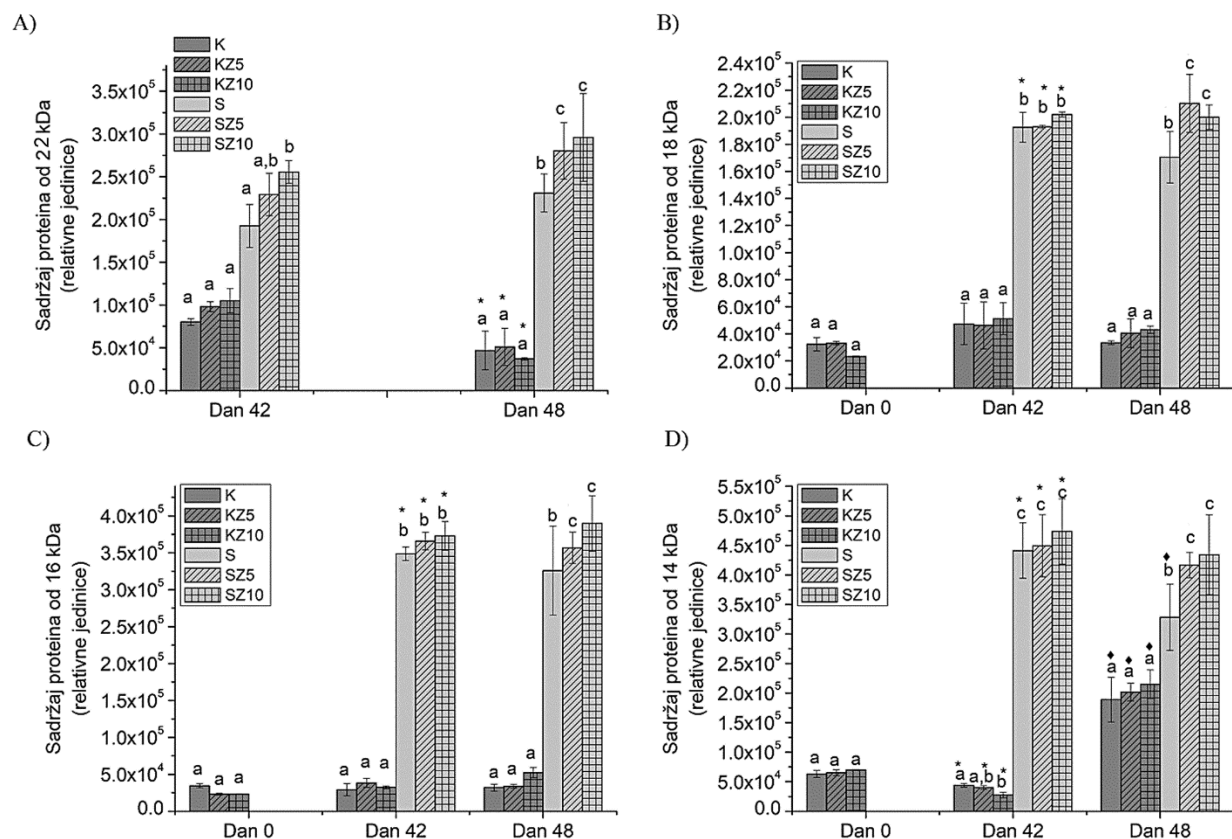
Nakon 42. dana sadržaj *Rubisco*-a se do 48. dana značajno smanjio kod svih kontrolnih grupa biljaka, bez značajne razlike u pogledu prisustva ili koncentracije zeolita. U istom periodu došlo je do intenzivnijeg smanjenja sadržaja ovog enzima i kod biljaka izloženih uticaju suše. Najznačajnije smanjenje sadržaja *Rubisco*-a uočeno je kod biljaka iz grupe SZ10 koje je pri tom bilo izraženije u odnosu na detektovano smanjenje kod grupa S i SZ5. Nakon 48. dana, količina *Rubisco*-a u listovima biljaka iz grupe S bila je za 27% manja u odnosu na njegovu količinu u listovima biljaka iz grupe K, dok je u poređenju između grupa SZ5 i KZ5 uočena manja razlika, od 17%. Najizraženije smanjenje sadržaja *Rubisco*-a uočeno je kod kombinovanog tretmana suše i zeolita, budući da je nakon 48. dana njegova količina kod biljaka iz grupe SZ10 bila manja za 64% u odnosu na količinu u listovima biljaka iz grupe KZ10.

#### *Sadržaj proteina malih molekulskih masa*

Analizom SDS elektroforegrama uočene su značajne promjene u količini proteina malih molekulskih masa koji su izolovani iz listova biljaka izloženih uticaju suše (Slika 47.). U periodu od 42. do 48. dana eksperimentalnog perioda, kod biljaka iz grupa S, ZS5 i SZ10 uočeno je značajno povećanje količine proteina sa molekulskim masama od 22, 18, 16 i 14 kDa. Količine navedenih proteina kod biljaka iz grupa K, KZ5 i KZ10 su manje oscilovale u istom periodu u odnosu na one koje su uočene kod biljaka tretiranih sušom, a takođe nije promjećeno značajno odstupanje u njihovom sadržaju u odnosu na tretman sa zeolitom (Slika 47.). Količina svih navedenih proteina je do 42. dana bila približno jednako uvećana kod svih biljaka koje su bile pod uticajem suše, bez obzira na prisustvo i koncentraciju zeolita u suspratu. Nakon toga, do 48. dana suše uočene su razlike u sadržaju navedenih proteina između biljaka uzgajanih bez zeolita i sa njegovim dodatkom, odnosno statistički značajno veća količina kod grupa SZ5 i SZ10 u odnosu na grupu S. Najizraženija razlika je uočena u sadržaju proteina molekulske mase od 14 kDa čija se količina kod biljaka iz grupe S smanjila u periodu od 42. do 48. dana, dok kod biljaka iz grupa SZ5 i SZ10 to nije bio slučaj. Tako je u 48. danu sadržaj ovog proteina kod grupe S bio značajno veći u odnosu na onaj kod kontrolnih biljaka (grupe K, KZ5 i KZ10), ali istovremeno i manji za 30% u odnosu na količinu kod grupe SZ5 i za 28% kod grupe SZ10 (Slika 47, sekcija D).



Slika 46. Sadržaj enzima *Rubisco* u listovima biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja (vrijednosti iz nultog dana za grupe K, KZ5 i KZ10 su takođe tretirane kao vrijednosti iz nultog dana i za grupe S, SZ5 i SZ10, respektivno) ( $p < 0,05$ ).



Slika 47. Sadržaj proteina malih molekularnih masa u listovima biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): A) Protein molekulske mase 22 kDa, B) Protein molekulske mase 18 kDa, C) Protein molekulske mase 16 kDa, D) Protein molekulske mase 14 kDa; K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja (vrijednosti iz nultog dana za grupe K, KZ5 i KZ10 su takođe tretirane kao vrijednosti iz nultog dana i za grupe S, SZ5 i SZ10, respektivno) ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.4. Koncentracija hemijskih elemenata

Rezultati mjerenja koncentracije hemijskih elemenata (makroelementi i mikroelementi) u listovima biljaka uzorkovanih na kraju eksperimentalnog perioda (dan 48) predstavljeni su u Tabeli 11. Tretman sa zeolitom u uslovima optimalnog navodnjavanja značajno je uticao na koncentraciju svih mjerenih elemenata u listovima, a ostvareni uticaj je zavisio od dodate količine u supstrat biljaka. Upravo proporcionalno sa povećanjem sadržaja zeolita u supstratu došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije kalcijuma u listovima pa je sadržaj ovog elementa kod grupe KZ5 bio manji u odnosu na onaj kod grupe K (za 13%), a kod grupe KZ10 još manji (za 20%). Kod grupe KZ5 izmjeren je manji sadržaj magnezijuma (za 32%), bakra (za 10%), gvožđa (za 24%) i cinka (za 12%) u odnosu na vrijednosti izmjerene kod grupe K, a jedino je sadržaj kalijuma bio bez statistički značajne promjene. Kod grupe KZ10 pored opisanog smanjenja koncentracije kalcijuma, uočeno je istovremeno povećanje koncentracije kalijuma (za 10%) i cinka (za 32%) u odnosu na vrijednosti izmjerene kod grupe K, dok je sadržaj magnezijuma, bakra i gvožđa bio bez značajnih razlika.

Suša je indukovala smanjenje koncentracije analiziranih elemenata, pa je kod grupe S u odnosu na grupu K uočeno smanjenje sadržaja kalijuma za 37%, kalcijuma za 35%, magnezijuma za 52%, bakra za 36% i gvožđa za 59%, dok je nasuprot njima, koncentracija cinka bila povećana za 25%. Dodatak 5% zeolita u supstrat nije spriječio smanjenje koncentracije niti jednog elementa osim bakra pa je kod grupe SZ5 njegov sadržaj bio veći za 22% u odnosu na grupu S, dok su koncentracije K, Ca, Mg i Fe imale vrijednosti približne onima kod grupe S. Osim toga, kod grupe SZ5 izostalo je povećanje koncentracije cinka koje je uočeno kod grupe S, a izmjerene vrijednosti su bile približne onima iz kontrolnih grupa (K, i KZ5). Dodatak 10% zeolita u supstrat u uslovima suše je dodatno smanjio koncentraciju svih makroelemenata, pa je kod grupe SZ10 izmjerena najmanja koncentracija K, Ca i Mg u odnosu na sve sve ispitivane grupe biljaka. Osim toga, sadržaj Cu i Fe u listovima biljaka iz grupe SZ10 nije se značajno razlikovao od koncentracija ovih elemenata kod grupe S. Sadržaj cinka u listovima biljaka iz grupe SZ10 bio je značajno manji nego kod grupe S i to u približnom nivou kao kod grupe SZ5.

Tabela 11. Koncentracija makroelemenata (kalijum, kalcijum, magnezijum) i mikroelemenata (bakar, gvožđe, cink) u suvoj masti listova kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih nakon 28. dana eksperimentalnog perioda: K- grupa kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a, b, c, d, e* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa biljaka u odnosu na jedan hemijski element ( $p < 0,05$ ).

Grupa biljaka	K (g kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>K</b>	27,72 ± 1,74 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,66 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,22 <sup>a</sup>	9,59 ± 2,21 <sup>a,b</sup>	129,64 ± 21,22 <sup>a</sup>	56,59 ± 6,67 <sup>a</sup>
<b>KZ5</b>	26,11 ± 2,21 <sup>a</sup>	4,09 ± 0,54 <sup>b</sup>	1,90 ± 0,14 <sup>b</sup>	8,66 ± 1,98 <sup>b</sup>	98,04 ± 10,81 <sup>b</sup>	49,90 ± 5,77 <sup>b</sup>
<b>KZ10</b>	30,69 ± 4,77 <sup>b</sup>	3,78 ± 0,32 <sup>c</sup>	2,82 ± 0,17 <sup>a</sup>	10,65 ± 2,21 <sup>a</sup>	127,02 ± 9,88 <sup>a</sup>	82,47 ± 13,33 <sup>c</sup>
<b>S</b>	17,42 ± 1,36 <sup>c</sup>	3,04 ± 0,66 <sup>d</sup>	1,34 ± 0,11 <sup>c</sup>	6,16 ± 1,21 <sup>c</sup>	53,17 ± 11,22 <sup>c</sup>	75,98 ± 7,78 <sup>c</sup>
<b>SZ5</b>	16,27 ± 2,09 <sup>c</sup>	3,14 ± 0,54 <sup>d</sup>	1,42 ± 0,21 <sup>c</sup>	7,96 ± 0,98 <sup>b</sup>	54,25 ± 7,87 <sup>c</sup>	53,14 ± 9,81 <sup>a,b</sup>
<b>SZ10</b>	13,38 ± 1,78 <sup>d</sup>	2,78 ± 0,32 <sup>e</sup>	1,09 ± 0,18 <sup>d</sup>	6,86 ± 2,21 <sup>c</sup>	51,42 ± 8,43 <sup>c</sup>	47,32 ± 5,56 <sup>b</sup>

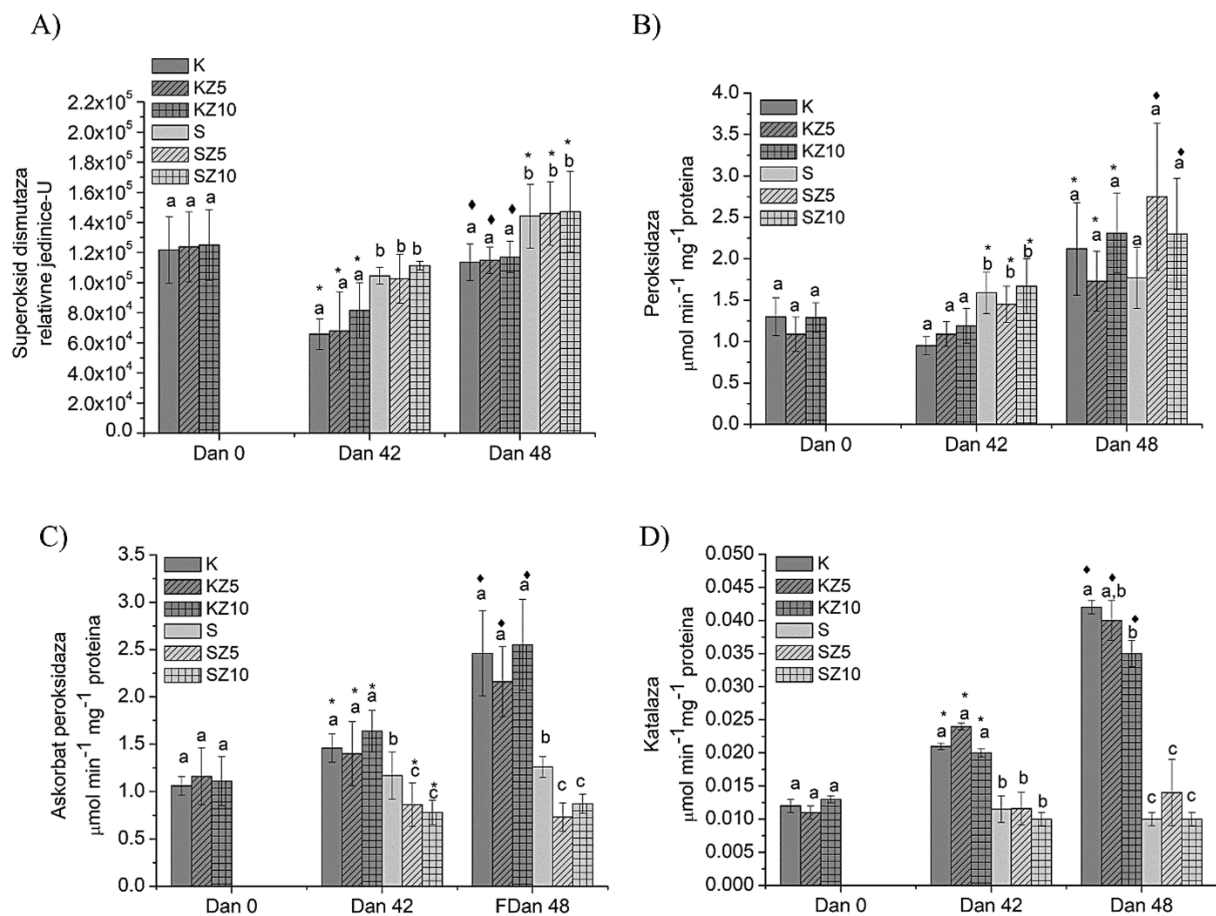
#### 5.4.5. Parametri antioksidativnog metabolizma

##### *Aktivnost i izoenzimski profil superoksid dismutaze*

Specifičnim bojenjem gela dobijenog nakon native elektroforeze za detekciju aktivnosti superoksid dismutaze utvrđeno je prisustvo po tri SOD izoforme u svim testiranim uzorcima (Rf SOD1= 0,36; Rf SOD2= 0,40; Rf SOD3= 0,83) (Slika 47.). Iako ni kod jedne grupe biljaka tokom trajanja eksperimenta nije došlo do promjene u izoenzimskom profilu ovog enzima, ipak su uočene određene promjene u njegovoj aktivnosti usljed uticaja suše. Nakon 42. dana i 48. dana SOD aktivnost je bila značajno veća kod svih biljaka izloženih uticaju suše u odnosu na njihove kontrolne grupe. Ipak, dodatak zeolita ni u jednoj koncentraciji nije spriječio opisano povećanje aktivnosti SOD budući da tokom cijelog eksperimenta nije uočena značajna razlika u njegovoj aktivnosti između grupa S, SZ5 i SZ10 (Slika 48, sekcija A).

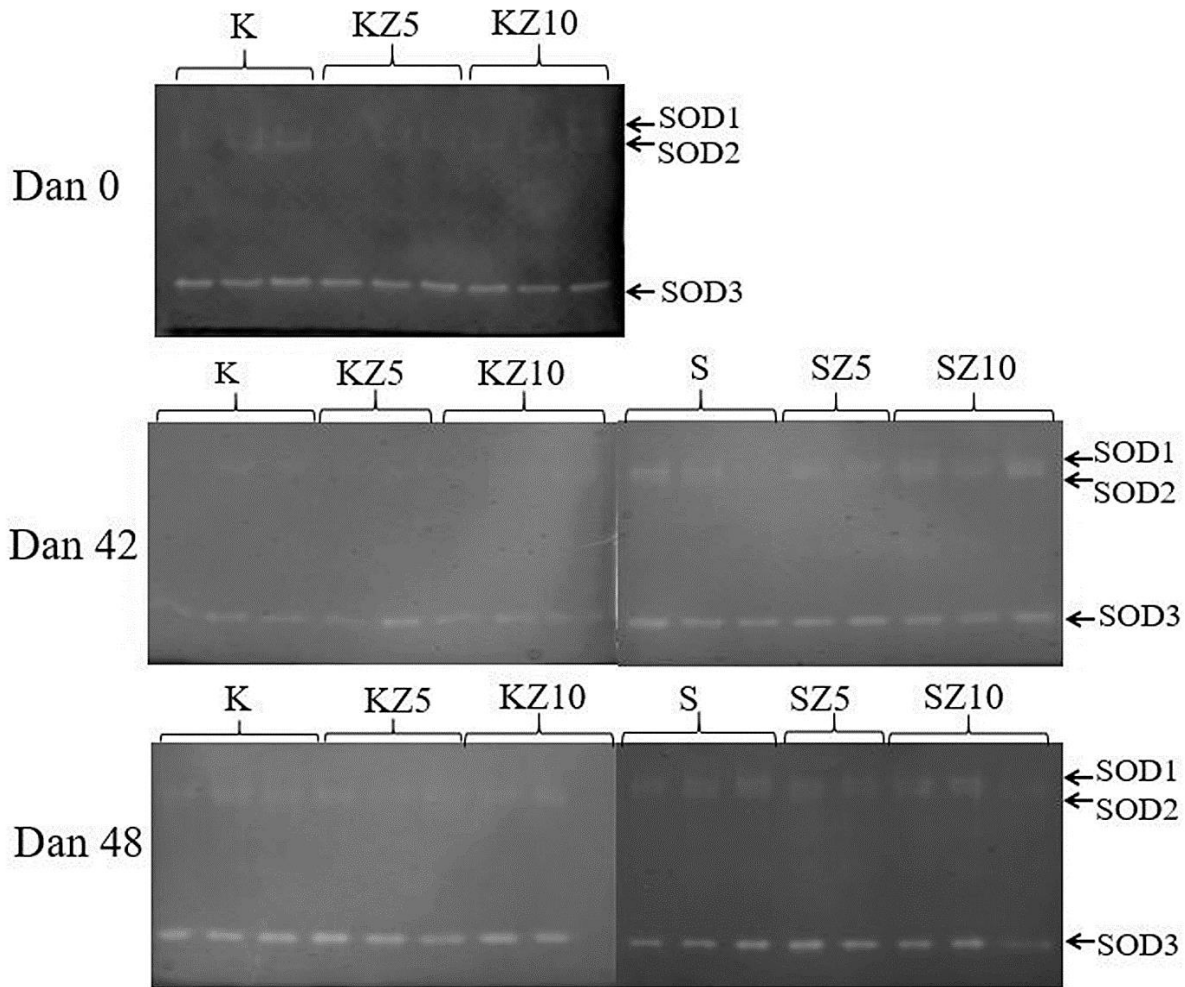
##### *Aktivnost askorbat peroksidaze*

Aktivnost askorbat peroksidaze se tokom cijelog eksperimenta progresivno povećavala kod svih biljaka sa optimalnim navodnjavanjem (grupe K, KZ5 i KZ10) ali bez međusobne razlike u odnosu na dodatak zeolita. S druge strane povećanje APX aktivnosti je izostalo pod uticajem suše pa je nivo ovog enzima kod grupe S ostao približno isti do 48. dana (Slika 48, sekcija C). Dodatak obe koncentracije zeolita je dodatno inhibirao APX aktivnost te je od 42. do 48. dana ona bila značajno manja kod grupa SZ5 i SZ10 u odnosu na sve ostale grupe biljaka.



Slika 48. Aktivnost enzima antioksidativnog metabolizma u listovima kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan, dan 42 i dan 48): A) superoksid dismutaza; B) peroksidaze; C) askorbat peroksidaza; D) katalaza; K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c*, označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja (vrijednosti iz nultog dana za grupe K, KZ5 i KZ10 su takođe tretirane kao vrijednosti iz nultog dana i za grupe S, SZ5 i SZ10, respektivno) ( $p < 0,05$ ).





Slika 49. Izoenzimski profil superoksid dismutaze (SOD) dobijen nakon nativne PAGE iz proteinskih frakcija izolovanih iz listova biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%.

#### *Aktivnost i izoenzimski profil peroksidaza Klase III*

Specifičnim bojenjem gelova za peroksidaznu aktivnost detektovano je ukupno devet različitih POD izoformi, a profili su bili neujednačeni u odnosu na biljnu grupu, odnosno tretman i vrijeme uzorkovanja (Slika 50.). Izmjerene su sljedeće Rf vrijednosti peroksidaznih izoformi: Rf POD1= 0,12; Rf POD2 = 0,15; Rf POD3 = 0,20; Rf POD 4 = 0,32; Rf POD5 = 0,36; Rf POD6 = 0,42; Rf POD7 = 0,51; Rf POD8 = 0,57; Rf POD9 = 0,81. Kod prvog uzorkovanja (nulti dan) u svim uzorcima detektovane su po četiri POD izoforme bez međusobnih razlika. U uzorcima iz

kontrolne grupe (K) uzetim 42. dana detektovane su izoforme POD1, POD 2, POD3, POD4, POD5 i POD6, a u uzorcima iz grupa tretiranih zeolitom (KZ5 i KZ10) pored ovih šest izoformi detektovane su i POD7 i POD8. U isto vrijeme (dan 42), u svim uzorcima iz grupa S, SZ5 i SZ10 detektovano je po 9 POD izoformi (po 8 koje su bile prisutne i u kontrolnim grupama, i po 1 nova-POD9). U uzorcima kontrolnih biljaka iz grupa K, KZ5 i KZ10 uzetim nakon 48. dana detektovane su izoforme POD1, POD3, POD4 i POD5, a uz njih i POD6 kod biljaka tretiranih zeolitom (uočeno je odsustvo ove izoforme kod grupe K). U svim uzorcima koji su uzeti nakon 48. dana suše (grupe S, SZ5 i SZ10) detektovane su izoforme POD1, POD2, POD3, POD4, POD5 i POD6, što znači da dodatak zeolita u suši nije uticao na promjenu peroksidaznog profila.

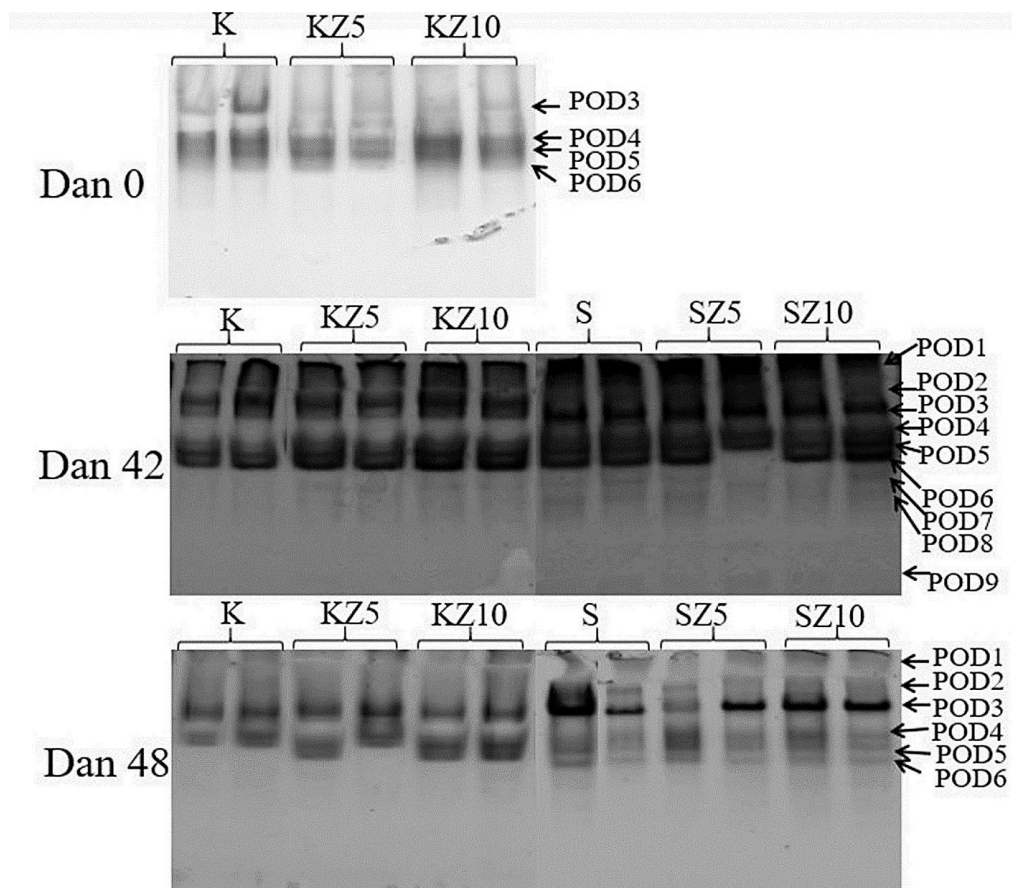
Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim mjerenjem peroksidazne aktivnosti ukazali su na trend povećanja POD aktivnosti kod svih ispitivanih grupa tokom eksperimentalnog perioda, ali je ono bilo intenzivnije kod biljaka izloženih uticaju suše (Slika 48, sekcija B). Nakon 42. dana, POD aktivnost je bila značajno veća kod svih biljaka izloženih uticaju suše u odnosu na njihove kontrolne grupe, ali nije uočeno značajno odstupanje koje bi ukazalo na razliku između grupa tretiranih zeolitom (približno jednake vrijednosti su izmjerene kod grupa S, SZ5 i SZ10). U periodu od 42. do 48. dana biljke iz grupe S nisu značajno promijenile peroksidaznu aktivnost, dok je kod grupa tretiranih zeolitom (SZ5 i SZ10) uočen dodatni porast aktivnosti POD.

#### *Aktivnost katalaze*

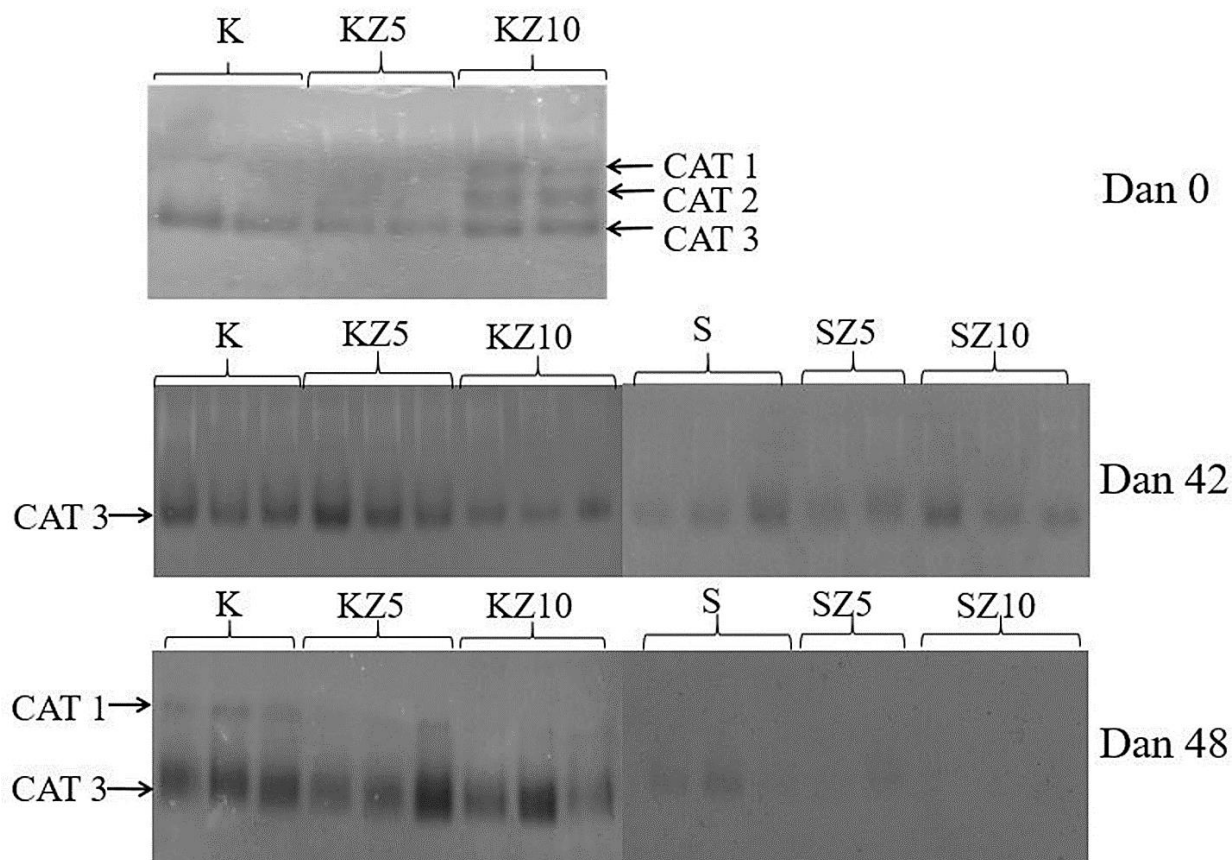
Nakon specifičnog bojenja gela za detekciju katalaze uočene su razlike u izoenzimskim profilima između testiranih grupa biljaka na početku eksperimentalnog perioda (Slika 51.). U uzorcima iz grupe K i KZ5 detektovana je po jedna izoforma, označena kao CAT3 ( $R_f = 0,36$ ). U uzorcima iz grupe KZ10 pored CAT3, detektovane su još dvije izoforme (pozicionirane iznad CAT3), označene kao CAT1 ( $R_f = 0,19$ ) i CAT2 ( $R_f = 0,28$ ). U uzorcima uzetim 42. dana kod svih ispitivanih biljaka detektovana je po jedna izoforma (CAT3). Nakon analize uzoraka uzetih 48. dana, u kontrolnim grupama (K, KZ5, KZ10) su detektovane dvije izoforme (CAT1 i CAT3). U isto vrijeme pod uticajem suše inhibirana je CAT1, a aktivnost CAT3 je vidno umanjena. Tretman sa zeolitom dodatno je inhibirao CAT aktivnost s obzirom da kod grupa SZ5 i SZ10 nije detektovana niti jedna izoforma u danu 48.

Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim određivanjem aktivnosti katalaze ukazuju na trend progresivnog povećanja sadržaja ovog enzima kod svih kontrolnih grupa (K, KZ5 i KZ10) tokom

cijelog eksperimentalnog perioda (od nultog do 48. dana). S druge strane kod svih biljaka izloženih uticaju suše aktivnost ovog enzima je bila značajno manja u odnosu na sve kontrolne grupe i to tokom cijelog eksperimentalnog perioda. Katalazna aktivnost je imala sličan trend smanjenja kod biljaka iz grupa S, SZ5 i SZ10 a izmjerene vrijednosti sadržaja ovog enzima se kod njih nisu značajno razlikovale (Slika 48. sekcija D).



Slika 50. Izoenzimski profil peroksidaza (POD) dobijen nakon nativne PAGE iz proteinskih frakcija izolovanih iz listova biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%.

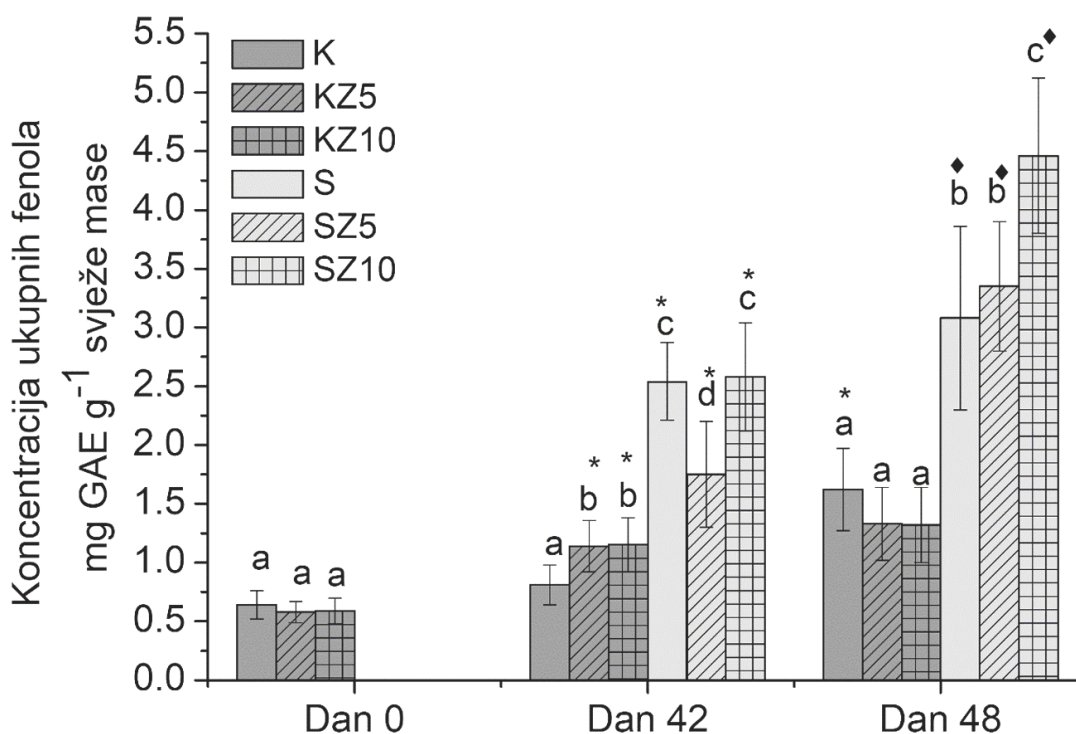


Slika 51. Izoenzimski profil katalaze (CAT) dobijen nakon native PAGE iz proteinskih frakcija izolovanih iz listova biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%.

#### *Koncentracija fenola*

Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije ukupnih fenola predstavljani su na Slici 52. U uslovima optimalnog navodnjavanja, tretman biljaka sa zeolitom doveo je do značajnog porasta sadržaja ukupnih fenola do 42. dana. U tom periodu kod grupa biljaka iz KZ5 i KZ10 sadržaj fenola je bio u prosjeku veći za 29% u odnosu na njihov sadržaj kod biljaka iz grupe K. U periodu između 42. i 48. dana vrijednost koncentracije fenola se ujednačila između svih kontrolnih grupa. Kod svih biljaka izloženih uticaju suše uočeno je povećanje sadržaja fenola tokom rasta u cijelom eksperimentalnom periodu pa su nakon uzorkovanja u 42. i 48. danu u listovima biljaka iz grupa S, SZ5 i SZ10 izmjerene značajno veće vrijednosti u odnosu na kontrolne grupe. Dodatak 5% zeolita u supstrat je do 42. dana donekle ublažio nakupljanje fenola

indukovano sušom, jer je kod grupe SZ5 njihova koncentracija bila značajno manja u odnosu na onu koja je izmjerena kod grupa S i SZ10 (u prosjeku za 30%). Međutim, do 48. dana sadržaj fenola kod grupe SZ5 je dodatno porastao i dostigao vrijednost koja se nije značajno razlikovala od one koja je izmjerena kod grupe S, dok je kod grupe SZ10 izmjerena najveća vrijednost (za 30% veća nego kod grupe S i za 25% veća nego kod grupe SZ5).



Slika 52. Koncentracija ukupnih fenola ( $\text{mg GAE g}^{-1}$  svježe mase) u listovima biljaka kukuruza (*Zea mays*) uzorkovanih u različitim fazama eksperimentalnog perioda (dan 0, dan 42 i dan 48): K- kontrola, KZ5- grupa kontrola i zeolit koncentracije 5%; KZ10- grupa kontrola i zeolit koncentracije 10%; S-grupa suša; SZ5-grupa suša i zeolit koncentracije 5%; SZ10-grupa suša i zeolit koncentracije 10%. Različita mala slova *a*, *b*, *c*, *d* označavaju statistički značajnu razliku između testiranih grupa u istom periodu, dok različiti simboli \* ♦ označavaju statistički značajnu razliku u okviru iste biljne grupe u odnosu na prethodni period uzorkovanja (vrijednosti iz nultog dana za grupe K, KZ5 i KZ10 su takođe tretirane kao vrijednosti iz nultog dana i za grupe S, SZ5 i SZ10, respektivno) ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. NEGATIVNI EFEKTI SUŠE NA METABOLIZAM BILJAKA PARADAJZA I KUKURUZA

Većina kultivara paradajza i kukuruza su osjetljivi na sušu koja gotovo neizbježno usporava njihov razvoj i produktivnost (Akhtar i sar., 2014; Chai i sar., 2016; Badr i sar., 2020). Nedostatak vode direktno usporava ćelijski rast i diobu u gotovo svim tkivima što dovodi do redukovanja rasta vegetativnih organa ali i do poremećaja u reproduktivnim funkcijama (Nelissen i sar., 2017). Morfologija biljaka paradajza i kukuruza korištenih u ovom eksperimentu ukazuje da dobijeni rezultati o uticaju suše na rast biljaka ne odstupaju od uobičajenih za ove dvije vrste (Slika 20, Slika 21, Slika 34, Slika 35, Slika 42, Slika 43). Posljedice suše kod većine biljaka su naročito izražene u ćelijama listova s obzirom da su oni centar fotosintetičke „mašinerije“ koja determiniše cjelokupni metabolizam. Zbog toga mnoge biljne vrste pribjegavaju anatomske-morfološkim modifikacijama listova u cilju bolje adaptacije na sušu. Tako je i modifikacija anatomskih struktura u listovima paradajza prepoznata kao značajna adaptivna strategija na stres izazvan sušom (Sam i sar. 2000; Kulkarni i Deshpande 2006). Scippa i sar., (2004) su pokazali da suša značajno smanjuje debljinu palisadnog ali i sунđerastog mezofila u listovima paradajza što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji (Tabela 4, Slika 22, Tabela 7). Autori su zaključili da su pomenute strukturne promjene listova posljedica smanjenja međućelijskog prostora ali i promjera samih ćelija da bi se donekle smanjila transpiraciona površina. Prema našim rezultatima, pod uticajem suše više je redukovan sунđerasti mezofil s obzirom da je DPM/DSM odnos bio povećan (Tabela 4, Tabela 7). S obzirom da je i stopa fiksacije CO<sub>2</sub> bila značajno smanjena, ovakvo izraženo smanjenje debljine sунđerastog ćelijskog sloja može se dovesti u vezu i sa smanjenom asimilacijom budući da je poznato da je ovo tkivo dominantno u procesu deponovanja ovog gasa (Aalto i Juurola, 2002). Osim opisane reorganizacije ćelija u parenhimu, suša takođe dovodi do značajnih promjena u vaskularnim tkivima (Chen i sar., 2006). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su pokazali da suša u listovima paradajza značajno povećava gustinu između ksilemskih sudova, a ovakva promjena se može smatrati posljedicom smanjenja konduktiviteta vode s obzirom da su osobine ksilema (broj traheja, gustina i promjer) direktno povezane sa vodnim režimom biljaka (Nijssen i sar. 2001). Smatra se da sušom indukovano zatvaranje stoma dovodi do smanjenja hidrauličkog konduktiviteta u trahejama ksilema što ima za posljedicu usporavanje toka vodenog stuba na relaciji zemljište-biljka-atmosfera (Čereković i sar. 2013; Wang i sar. 2019). Osim toga,

dokazano je da je povećanje gustine provodnih sudova u ksilemu pod uticajem suše važna strategija u izbjegavanju gasne embolije, koja je česta negativna posljedica usporenog toka vodenog stuba (Vilagrosa et al. 2012). Opisano “rearanžiranje” provodnih sudova u ksilemu zasnovano je na biohemijskim promjenama u ćelijskim zidovima i procesima intenzivne lignifikacije u ćelijama traheja (Voelker et al. 2011). Naši rezultati su pokazali da suša osim smanjenja ksilemske zone utiče i na redukovanje dužine floemskog sloja. Povećanje gustine između sitastih cijevi može biti posljedica poremećenog vodenog stuba u ksilemskim sudovima s obzirom da su ova dva tkiva povezana protokom vode (Hölttä i sar. 2009). Osim toga prelazak vode iz ksilema u floem je zavisno i od koncentracije osmotski aktivnih supstanci čije je zadržavanje povećano u uslovima ograničene fiksacije CO<sub>2</sub> pod uticajem suše (Sevanto, 2014). Generalno rečeno, sušom su indukovane anatomske modifikacije u mezofilu i vaskularnom tkivu, a usmjerene su na smanjenje transpiracije i održavanje fiziološke homeostaze.

Mnoga istraživanja su potvrdila da je zatvaranje stoma najraniji fiziološki odgovor na sušu koji ima za cilj sprečavanje gubitka vode transpiracijom (Tombesi i sar., 2015; Martin-StPaul i sar. 2017). Međutim, neizbježna posljedica zatvaranja stoma je redukovanje usvajanje CO<sub>2</sub> koje negativno utiče na fotosintezu (Hejník i sar. 2015). Između pojedinih autora postojala je diskusija o tome da li je ograničeno usvajanje CO<sub>2</sub> pod uticajem suše uslovljeno prvenstveno zatvaranjem stoma ili supresijom enzima uključenih u proces tamne faze fotosinteze (Flexas i Medrano 2002; Chaves i sar. 2009). Najzad je ustanovljeno da teorije stomatalnog i ne-stomatalnog inhibitornog mehanizma fiksacije CO<sub>2</sub> ne moraju nužno da isključuju jedna drugu (Maroco i sar. 2002; Anjum i sar. 2011). U ranom odgovoru na umjerenu sušu zatvaranje stoma je glavni inhibitor asimilacije (Flexas i sar., 2007), dok je supresija aktivnosti *Rubisco*-a dominantnija u ovom fenomenu kod intenzivne i dugotrajne suše (Lawlor i Cornic, 2002). Dokazano je da dugotrajna suša gotovo uvijek dovodi do smanjenja sadržaja *Rubisco*-a usljed poremećaja inhibicije njegove aktivnosti i smanjenja koncentracije metabolita uključenih u proces karboksilacije (Parry i sar., 2002). Više autora je proučavalo aktivnost ovog enzima u ranom odgovoru na sušu ali su dobijeni različiti rezultati. Naime, u listovima biljaka suncokreta (*Helianthus annuus*) izloženih suši sadržaj *Rubisco*-a je bio neznatno smanjen (Gimenez i sar., 1992), dok je u sličnim uslovima kod soje (*Glycine max*) i smrče (*Picea abies*) njegova aktivnost bila značajno inhibirana (Blödner i sar. 2007; Majumdar i sar., 2001). Primjećeno je da se sadržaj *Rubisco*-a razlikovao kod kontrolnih biljaka paradajza u preliminarlnom i ponovljenom eksperimentu, i to od nultog dana.

Najvjerojatniji razlog za ovu razliku je nešto kasnija postavka eksperimenta u 2017. godini, gdje su dužina dana i osvjetljenosti mogli da utiču na nešto veći sadržaj *Rubisco*-a, a ujedno i na veći intenzitet fotosinteze (Frosch i sar., 1986; Bauerle i sar. 2012). (Slika 23, Slika 24, Slika 36, Slika 37). Ipak, naši rezultati su pokazali da u listovima paradajza u ranom odgovoru na sušu prvo dolazi do zatvaranja stoma uz istovremeno smanjenje RWC, transpiracije i fiksacije CO<sub>2</sub>, pri čemu je sadržaj *Rubisco*-a ostao nepromijenjen. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima još nekih autora koji su ispitali uticaj umjerenog stresa izazvanog sušom (Cornic, 2000; Quick i sar., 1992). S druge strane, produženo trajanje suše je kod obe ispitivane vrste (paradajz i kukuruz) indukovalo značajno smanjenje sadržaja *Rubisco*-a (Slika 24, Slika 46). S obzirom da su kod paradajza mjerene i karakteristike stoma, može se reći da je u dugotrajnoj suši do smanjenja fiksacije CO<sub>2</sub> došlo usljed sinergističkog djelovanja mehanizma stomatalnog zatvaranja i smanjenja sadržaja *Rubisco*-a, koje je otpočelo nakon 21. dana i nastavilo se smanjivati do kraja eksperimenta. Zanimljivo je da je kod kukuruza sadržaj *Rubisco*-a tokom suše dugo vremena ostao stabilan, te se nije smanjivao ni nakon 42. dana, a tek je na kraju eksperimenta zabilježen značajno manji sadržaj u odnosu na kontrolne biljke (Slika 46). Relativno stabilniji sadržaj *Rubisco*-a u uslovima suše kod kukuruza u odnosu na njegov sadržaj kod paradajza može biti u vezi sa nedostatkom njegove aktivacije od strane *Rubisco* aktivaze. Naime, dokazano je da kod kukuruza u uslovima ograničenog protoka gasova izazvanog sušom sadržaj *Rubisco*-a ne mora biti smanjen ali da ne dolazi do njegove aktivacije jer je inhibiran enzim *Rubisco* aktivaza (Pedromo i sar., 2017). Inhibicija aktivnosti *Rubisco* aktivaze se javlja kao posljedica smanjenja protoka elektrona u oba fotosistema te tako dolazi do biohemijske limitacije fiksiranja CO<sub>2</sub> koje je više karakteristično za C4 biljke. U tom smislu se može reći da je sadržaj *Rubisco*-a kod kukuruza ostao stabilan sve dok nisu nastupili uslovi intenzivne suše, tek kada se RWC listova smanjio za više od 50%. Smanjenje fiksacije CO<sub>2</sub> gotovo neizbježno dovodi do usporavanja tamne faze fotosinteze a samim tim posljedično i do promjena u metabolizmu ugljenih hidrata. Ipak, u većini slučajeva biljke nastoje da zadrže vodu u ćelijama povećavanjem koncentracije osmotski aktivnih supstanci, i to obično akumulacijom šećera (Nio i sar., 2011). Osim toga, uslovi suše obično dovode do smanjenja sadržaja azota u biljkama te do poremećaja C/N odnosa. Povećanje C/N odnosa nastupa zbog smanjenog usvajanja NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u ćelijama korijena te zbog smanjene aktivnosti enzima uključenih u metabolizam asimilacije N u organska jedinjenja, kao što su nitrat reduktaza i glutamin sintetaza (Robredo i sar., 2011). Usljed nedostatka vode smanjuje se mogućnost transporta azota iz korijena



u nadzemne dijelove, gdje je ovaj element neophodan u biosintezi hlorofila i proteina uključenih u proces fotosinteze (Xu i Zou, 2005). Na taj način nedostatak azota kod ograničene fiksacije CO<sub>2</sub> ima za posljedicu nastajanje viška apsorbovane svjetlosne energije koja ne biva iskorištena za proces fotosinteze, nego se pojačava nivo termalne disipacije u antena pigmentima i intenzivira ciklus ksantofila, ali se pojačano generišu i ROS (Bascunan-Godoy i sar., 2018). Poznato je da su mitohondrije biljnih ćelija mjesta u kojima se ukrštaju putevi metabolizma ugljenika i azota kroz ciklus trikarbonskih kiselina i fotorespiraciju, a od aktivnosti enzima glutamat sintetaze i glutamat dehidrogenaze najviše zavisi način adaptivne strategije u balansiranju C/N odnosa. Snabdijevanje biljnih ćelija azotom u nadzemnim tkivima u uslovima suše može da se dešava i uz posredstvo endopeptidaza koje dovode do porasta nivoa slobodnih aminokiselina te uslovljavaju remobilizaciju azota u tkiva u kojima je on više potreban (Xu i Zhou, 2005). Dovoljna snabdjevenost azotom na taj način doprinosi poboljšanju aktivnosti glutamat sintetaze a samim tim i povećanju koncentracije prolina, budući da je glutamat njegov prekursor. Povećanje koncentracije prolina u uslovima suše ima značajnu ulogu zbog njegove osmoregulatorne funkcije. Međutim, pojedine biljne vrste u uslovima suše metabolizam azota usmjeravaju u biosintezu proteina koji imaju ulogu u osmoregulaciji. To su u prvom redu tzv. LEA proteini, odnosno njihova grupa nazvana dehidrini. Poznato je da su dehidrini proteini male molekulske mase (između 15 i 30 kDa) sa dominantnom sekundarnom strukturom koji mogu da daju značajan doprinos u osmotskom prilagođavanju na sušu (Close, 1996). Mohammadkhani i Heidari (2008 b) su pokazali da suša u listovima kukuruza indukuje pojačanu ekspresiju proteina iz grupe dehidrina, od kojih je najviše zastupljen protein sa molekulsom masom od 22 kDa. Isti autori su naveli da je koncentracija dehidrina tokom suše bila promjenljiva, odnosno da je smanjena koncentracija pojedinih proteina iz ove grupe tokom intenziviranja suše, dok se kod nekih sinteza povećavala. Osim toga, u ovom istraživanju je zaključeno da je ekspresija dehidrina bila izraženija u početku suše, a autori smatraju da je razlog za takav fenomen dostupna količina azota, koja je do tog trenutka još uvijek bila dovoljna da obezbijedi biosintezu proteina. Ovakvi zaključci se mogu dovesti u vezu i sa našim rezultatima dobijenim u istraživanju na biljkama kukuruza, budući da je nakon 42. dana suše elektroforetskim proteinskim profilom potvrđeno prisustvo proteina molekulske mase 22 kDa, čiji se sadržaj povećao do 48. dana (Slika 45, Slika 47). Osim toga, utvrđen je i povećan sadržaj proteina molekulskih masa 18 kDa, 16 kDa i 14 kDa. Povećanje sadržaja ovih proteina bilo je najizraženije u 42. danu suše, a nakon toga je zabilježeno umjereno

smanjenje njihove količine na elektroforegramu, kada je RWC opao ispod 50%, u 48. danu. Pojedini autori su povećanje koncentracije LEA proteina u suši doveli u vezu sa njihovim učestvovanjem u mehanizmima reparacije proteina (Wise i Tutanclife, 2004; Boucher i sar., 2006). Tako je ustanovljeno da kod lucerke (*Medicago trunculata*) u uslovima suše dolazi do povećane ekspresije LEA proteina iz grupe 5, MtPM25, koja se može dovesti u vezu sa mehanizmom popravke proteina kod kojih je došlo do gubitka native konformacije. Boucher i sar. (2006) su istakli da ovaj netipični LEA protein u svojoj neuređenoj strukturi pokazuje umjereno hidrofobni efekat koji mu omogućava slabu adsorpciju molekula vode raspoređenih u njegovom okruženju, koje tako čini pogodnim medijumom za rastvaranje proteinskih agregata koji se formiraju u suši. U posljednjih nekoliko godina dokazano je učestvovanje LEA proteina u aktivaciji gena koji kodiraju enzime antioksidativne odbrane (Huang i sar., 2018). Blagi osmotski stres izazvan sušom aktivira povećanu ekspresiju gena koji kodira biosintezu LEA proteina, OsLEA5, a pri tom dolazi do umjereno pojačanog generisanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i povećanja koncentracije ABA. OsLEA5 u ovom slučaju djeluje kao šaperon koji u interakciji sa transkripcionim faktorom ZFP5 (zinc finger protein ili „motiv cinkanih prstiju“) indukuje ABA zavisni put aktivacije gena OsAPX<sub>1</sub> koji kodira askorbat peroksidazu. U tom slučaju može se reći da pojačana ekspresija LEA proteina u uslovima suše pored osmoprotektivne uloge može imati značaj i u aktiviranju antioksidativnog metabolizma.

Mehanizmi antioksidativne zaštite su značajni u fotosintetički aktivnim tkivima budući da su ona bogata kiseonikom, a takva sredina je pogodna za nastanak ROS i biološke oksidacije ćelijskih struktura. Nastanak ROS je izražen u uslovima suše, jer kada su stome zatvorene dolazi do neusklađenosti između dostupnog CO<sub>2</sub> i apsorbovane svjetlosti, što dovodi do povećanog transfera elektrona na kiseonik. Zbog toga se može reći da suša osim toga što ima direktne posljedice na fotosintezu, ostvaruje i sekundarne negativne efekte koji se manifestuju kroz oksidativna oštećenja fotosintetičkog aparata. Naši rezultati dobijeni na biljkama paradajza su pokazali da suša dovodi do smanjenja obe grupe fotosintetičkih pigmenata, što ukazuje na to da je moglo doći do oksidativnih oštećenja hlorofila i karotenoida (Tabela 5). Ipak, odnos ukupnog hlorofila prema karotenoidima je bio nešto manji sa napredovanjem uticaja suše, što ukazuje na to da je metabolizam biljaka paradajza više bio usmjeren na očuvanje koncentracije karotenoida. Poznato je da suša dovodi do smanjenja koncentracije fotosintetičkih pigmenata (Kiani i sar., 2008) ali da s druge strane karotenoidi ispoljavaju svoje antioksidativno djelovanje tako što dovode do „prigušenja“ hlorofila u triplet stanju i smanjenja koncentracije singlet kiseonika (Jaleel i sar.,

2009). Zbog toga se može reći da su karotenoidi kod biljaka paradajza imali ulogu u antioksidativnom sistemu zaštite u fotosintetičkim tkivima u kojima je suša prouzrokovala oksidativna oštećenja.

U mnogim istraživanjima koja su se bavila proučavanjem mehanizama otpornosti biljaka paradajza i kukuruza na sušu potvrđeno je učešće antioksidativnog metabolizma u odbrani protiv ove vrste stresa (Zgallai i sar. 2006; Klunklin i Savage 2017; Laxa i sar. 2019; Avramova i sar., 2017). Međutim, pojedini autori su različito naglašavali važnost određenih metabolita ili biohemijškog puta u detoksikaciji ROS u listovima paradajza tokom suše pa je negdje kao najvažnija komponenta istaknuta kooperacija SOD i APX (Ünyayar i sar. 2005), dok su neki drugi autori istakli ulogu fenola (Kusvuran i Dasgan, 2017) ili redoks sistema askorbata (Garchery i sar., 2013). Smatra se da se mnogi hibridi kukuruza u antioksidativnoj odbrani protiv ROS molekula indukovanih sušom oslanjaju na sinergistički efekat SOD i neenzimskih komponenti koje uključuju askorbat i glutation (Loutfy i sar., 2020). U ćelijskom sistemu uklanjanja ROS molekula prvi korak najčešće uključuje reakciju disproporcionacije u kojoj SOD konvertuje dvije molekule superoksida u molekul  $O_2$  i  $H_2O_2$ , koji nakon toga biva razgrađen posredstvom APX ili CAT (Faize i sar., 2011). Ekspresija gena koji kodiraju APX u odgovoru na sušu može biti zavisna od genotipa, a utvrđena je kod mnogih biljnih vrsta koje su bile izložene ovoj vrsti stresa (Sofa i sar., 2015). Kod biljaka paradajza u oba eksperimenta detektovane su po tri SOD izoforme a osim promjene ukupne aktivnosti izoenzimski profil se nije mijenjao pod uticajem suše. Prema Rf vrijednostima razdvojenih SOD izoformi najvjerojatnije se radi o Fe SOD i Cu-Zn SOD, ako se uporede dobijene vrijednosti sa literaturnim rezultatima još nekih autora (Attia i sar., 2021). Autori su u solubilnim frakcijama izolovanim iz listova paradajza detektovali po četiri SOD izoforme, gdje druga po redu, čija je Rf 0,64 i treća, čija je Rf 0,73 predstavljaju Fe SOD, što se može povezati sa našim rezultatima zbog približnih vrijednosti rezultata (Slika 27). Isti autori su posljednju razdvojenu izoformu koja ima najveću aktivnost i čija je Rf 0,86 označili kao Cu-Zn SOD, što bi mogao biti slučaj i u našim rezultatima budući da je posljednja izoforma na gelu najdominantnija. Kod kukuruza su takođe identifikovane tri različite SOD izoforme, a njihove Rf vrijednosti (SOD2-0,40 i SOD3-0,83) su približne sa onima koji su dobili drugi autori (Lukić i sar., 2021) (Slika 49). Iako je u ovom slučaju teže govoriti o vrsti izoforme na osnovu Rf vrijednosti, ipak se prema nekim literaturnim podacima može reći da su u solubilnim frakcijama listova kukuruza prisutne sve tri različite izoforme SOD (Moharramnejad i Valizadeh, 2019). Autori su naveli da je prva

detektovana izoforma sa najmanjom Rf vrijednošću MnSOD, druga FeSOD, a posljednja Cu-Zn SOD, čija se aktivnost najviše povećavala kada su biljke kukuruza bile izložene uticaju suše. Naši rezultati su pokazali da u ćelijama listova paradajza tokom ranog odgovora na sušu dolazi do sličnog trenda povećanja aktivnosti SOD i APX (Slika 26, Slika 39). S obzirom da SOD čini prvu liniju odbrane protiv superoksid anjon radikala u fotosintetičkim tkivima, povećanje njegove aktivnosti se može povezati sa intenzivnom produkcijom  $H_2O_2$  i ulogom APX u njenoj neutralizaciji. Ovaj biohemijski put je često prisutan u fotosintetičkim tkivima s obzirom da su ona glavni izvor askorbata, koji je redukujući supstrat za APX u transferu elektrona na  $H_2O_2$ , pri čemu se regeneracija askorbata odigrava u tzv. Foyer-Halliwell-Asada ciklusu (Foyer i Noctor, 2011). Naši rezultati takođe ukazuju da je suša u listovima paradajza uticala na povećanje koncentracija redukovanog i oksidovanog askorbata nakon 21. dana, pri čemu je oksidovani askorbat (dehidroaskorbat) bio više povećan u odnosu na redukovani, iako se redoks status askorbata nije promijenio za više od 5%. (Slike 30. i 31.). Ovakvi nalazi ukazuju da se tokom ranog odgovora na sušu (do 15. dana) odigravala brza reredukcija oksidovanog askorbata posredstvom APX, a da je sa produženjem suše bila povećana potreba za njegovom sintezom pa su se samim tim povećavali njegova koncentracija i iskorištenje. Zanimljivo je da je kod biljaka paradajza suša indukovala suprotan trend promjene APX i CAT, budući da se aktivnost prvog navedenog enzima povećavala uporedo sa intenziviranjem suše, dok se aktivnost drugog istovremeno smanjivala (Slika 37). Ovakvi nalazi upućuju na to da je u procesu degradacije  $H_2O_2$  došlo do održavanja balansa između CAT i APX aktivnosti, što se može dovesti u vezu sa ćelijskim kompenzacionim mehanizmom u procesu supresije  $H_2O_2$  u listovima biljaka izloženih uticaju suše (Apel i Hirt, 2004). Supresija CAT aktivnosti u uslovima suše primjećena je i kod biljaka kukuruza, ali je kod njih za razliku od biljaka paradajza došlo i do smanjenja APX aktivnosti, iako je SOD aktivnost bila povećana (Slika 46). Iako je potvrđeno da se višak  $H_2O_2$  indukovan sušom kod nekih hibrida kukuruza uklanja u biohemijskom putu u kojem centralno mjesto zauzima APX (Mohammadkhani i Heidari, 2007; Chugh i sar., 2011), pojedini autori su pokazali da to ne mora biti jedini način. Anjum i sar. (2017) su proučavali uticaj suše na tri različita hibrida kukuruza i ustanovili da se nakon povećane SOD aktivnosti povećava i koncentracija  $H_2O_2$ , koji potom biva razgrađen aktiviranjem neenzimskih komponenti antioksidativnog metabolizma koje uključuju kooperativni efekat askorbata i glutationa. Mnogi drugi autori su takođe pokazali da degradacija  $H_2O_2$  produkovanog usljed stresa u biljnim ćelijama može da se odvija i neenzimskim putevima, direktno od strane askorbata

(Smirnoff, 2005; Karkonen i Fry, 2006; Zhang i sar., 2013). Nakon reagovanja fenola sa vodonik peroksidom, nastali fenoksi radikali u prisustvu askorbata generišu monodehidroaskorbat, a potom i dehidroaskorbat (Hasanuzzaman i sar., 2020). S obzirom da kod ispitivanih biljaka kukuruza u ovoj disertaciji nije mjerena koncentracija askorbata, ne može se tvrditi da se uz njegovo učešće odvijala razgradnja vodonik peroksida nakon povećanja SOD aktivnosti.

Ono što je zajedničko za obe ispitivane vrste u ovoj doktorskoj disertaciji jeste da se tokom suše povećala aktivnost peroksidaza Klase III (Slika 26, Slika 39, Slika 48). Osim toga, kod obe vrste, povećanje aktivnosti ovih enzima praćeno je povećanjem koncentracije ukupnih fenola (Slika 32, Slika 52). Aktiviranje fenilpropanoidnog puta i povećanje koncentracije fenola je primjećeno kod mnogih vrsta biljaka koje su bile izložene uticaju suše, pri čemu je naročito istaknut značaj flavonoida kao ROS „hvatača“ u fotosintetičkim tkivima (Finni i sar, 2011; Agati i sar., 2012). Peroksidaze Klase III su prepoznate kao enzimi antioksidativne odbrane koje su uključene u puteve uklanjanja  $H_2O_2$  u uslovima različitih vrsta stresa (Hiraga i sar., 2001). Mnoge studije su potvrdile da su peroksidaze Klase III ključni enzimi koji oksidacijom fenolnih jedinjenja dovode do polimerizacije lignina (Abedi i Pakniyat 2010; Hosseini i sar. 2015). Na taj način različite peroksidazne izoforme mogu da mijenjaju osobine ćelijskog zida tako što katalizuju unakrsna vezivanja fenolnih kiselina i oksidativno kuplovanje monolignola da bi nastao lignin (Lin i sar., 2001). Kao posljedica lignifikacije, ćelijski zidovi postaju čvršći jer dolazi do umrežanja diferulnične kiseline sa polisaharidima, ili sa ligninom vezanim za polisaharide, a ovaj proces onemogućava elongaciju i rast ćelija (Passardi i sar., 2004). Povećanje peroksidazne aktivnosti u listovima paradajza nakon dugotrajne suše može biti povezano sa modifikacijama mehaničkog tkiva. Dokazano je da su peroksidaze tokom suše uključene u mehanizam uvijanja listova zasnovan na procesu lignifikacije mehaničkog tkiva, da bi na taj način i fotosintetičke ćelije bile zaklonjene od viška svjetlosti koje bi prouzrokovalo oksidativna oštećenja (Terzi i sar. 2013). Osim toga, peroksidazama posredovan proces lignifikacije dovodi i do modifikacije ksilemskih provodnih sudova s ciljem smanjenja hidrauličkog konduktiviteta i smanjenja transpiracije u uslovima suše (Lucena i sar., 2003). Naši rezultati su pokazali da u listovima paradajza pod uticajem suše dolazi do sličnog trenda promjene aktivnosti peroksidaza Klase III i koncentracije hidroksicinamičnih kiselina (*p*-kumarične, ferulnične i kafeične kiseline). S obzirom da su fenolne kiseline supstrat peroksidazama u opisanom procesu lignifikacije ovakvi nalazi upućuju na povezanost ovih enzima sa procesima modifikacije mehaničkog tkiva. U tom slučaju se povećanje koncentracije ukupnih

fenola ne može povezivati sa procesima direktne antioksidativne zaštite u procesu neutralizacije ROS, s obzirom da je sadržaj flavonoida tokom suše ostao nepromijenjen (Slika 30). Naši rezultati takođe ukazuju na to da je peroksidazna izoforma koja je aktivirana u listovima paradajza u odgovoru na sušu povezana sa anatomskim modifikacijama mehaničkog tkiva i procesima lignifikacije ksilemskih provodnih sudova. Ova hipoteza može biti podržana rezultatima koje su dobili Lee i saradnici (2007), koji su istraživali povezanost peroksidazne aktivnosti sa procesom lignifikacije u listovima bijele djeteline pod uticajem suše. Autori su naveli da postoji visoka korelacija između sadržaja lignina i aktivnosti ovih enzima u terminalnoj fazi stresa izazvanog sušom i uputili na peroksidazama posredovanu polimerizaciju monolignola. Osim toga, molekulske mase POD izoformi indukovanih sušom u listovima bijele djeteline su bile u opsegu između 43-51 kDa što je u skladu sa našim rezultatima u kojima je dokazano indukovanje POD izoforme od 49 kDa. Iako su peroksidaze koje učestvuju u lignifikaciji najčešće vezane za ćelijski zid, vjerovatno se u ovom slučaju radi o solubilnim apoplastnim peroksidazama, budući da su u citiranom radu autori izolovali solubilnu frakciju. Najzad, sa nalazima Lee i saradnika (2007) naši rezultati se poklapaju i po pitanju aktivnosti APX, jer su autori istakli da je u ranom odgovoru na sušu ovaj ovaj enzim dominantan u uklanjanju  $H_2O_2$ , dok peroksidaze klase III bivaju aktivirane u terminalnim fazama stresa. Povećanje aktivnosti peroksidaza Klase III i indukcija nove POD izoforme (čija je  $R_f$  0,81) u listovima biljaka kukuruza nakon 42. dana suše bilo je takođe praćeno povećanjem sadržaja ukupnih fenola (Slika 48, Slika 50, Slika 52). Kod biljaka kukuruza ne može se govoriti o sigurnoj povezanosti procesa lignifikacije u kojem posreduju POD i fenoli, s obzirom da kod njih nisu mjerene anatomske karakteristike listova, a nije rađena ni HPLC analiza fenolnih jedinjenja. Ipak, postoje dokazi da u uslovima suše peroksidaze učestvuju u procesu lignifikacije traheja u ksilemu listova kukuruza pri čemu se povećava koncentracija *p*-kumarične, ferulične i kafeične kiseline (Alvarez i sar., 2008). Povećanje koncentracije fenola u listovima kukuruza indukovano sušom može da se tumači i kroz njihovo učešće u neutralizaciji ROS direktnim „hvatanjem“ radikala (Anjum i sar., 2017) ili u kooperaciji sa peroksidazama u vakuolama, što je dokazano kod pojedinih biljnih vrsta (Takahama i Oniki, 2006). Tokom suše hidroksicinamična kiselina i rutin služe kao supstrat peroksidazama, pri čemu je ova enzimska oksidacija udružena sa oksidacijom askorbata u ćelijskim vakuolama biljke *Vicia faba* (Takahama i Oniki, 1997).

Generalno rečeno, putevi antioksidativnog metabolizma u odgovoru na sušu su se donekle razlikovali kod ispitivanih biljaka kukuruza i paradajza s obzirom da su detektovane različite

strategije enzimskog odgovora koje su povezane sa razgradnjom  $H_2O_2$ . U tom smislu, može se reći da se biljke kukuruza nakon intenziviranja SOD aktivnosti nisu oslanjale na APX posredovanu degradaciju  $H_2O_2$ . Kod biljaka paradajza tokom napredovanja suše dolazilo je do postepenog uključivanja komponenti antioksidativnog sistema zaštite, pa je tako SOD/APX/Askorbat sistem pokazao brzi odgovor tokom ranog odgovora sa stres, dok je dugotrajna suša dovela do aktiviranja puteva koji uključuju POD i hidroksicinamične kiseline. Mehanizmi ranog odgovora su mogli da doprinesu očuvanju stabilne koncentracije fotosintetičkih pigmenata do 15. dana, a sa nastavkom uticaja suše aktiviranje peroksidazne aktivnosti i povećanje koncentracije fenola je proširilo spektar adaptivnih strategija koje su vodile ka anatomsko-morfološkim modifikacijama listova paradajza.

## **6.2. ULOGA ZEOLITA U SPREČAVANJU NEGATIVNIH EFEKATA SUŠE NA BILJKE PARADAJZA I KUKURUZA**

Primjena različitih vrsta zeolita može značajno da poboljša uzgoj brojnih biljnih vrsta, a najpoznatiji je klinoptilolit, koji se u poljoprivredi koristi prvenstveno zbog povećanja retencionog zemljišnog kapaciteta za vodu i mineralne materije (Shahsavari, 2019; Shamili i sar., 2020). Kristalnu strukturu zeolita čine  $SiO_4$  i  $AlO_4$  tetraedri međusobno povezani zajedničkim atomima kiseonika, a s obzirom da je valencija aluminijuma za jedinicu manja od valencije silicijuma, neutralizacija naelektrisanja se postiže vezivanjem katjona različite valencije (najčešće  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  ili  $K^+$ ). Vezivanje jona i adsorpcioni kapacitet zeolita najviše zavise od veličine pora unutar strukture ovih minerala te od veličine njihove specifične površine (Rhodes, 2007). Poroznost kristalne rešetke omogućava mobilnost adsorbovanih katjona unutar strukture zeolita koji se vezuju slabim elektrostatičkim silama, što istovremeno olakšava i njihovu razmjenu sa katjonima iz okolnog rastvora do uspostavljanja ravnoteže (Minceva i sar., 2008). Dokazano je da klinoptilolit ima izrazito visok afinitet za vezivanje  $NH_4^+$  jona što sprečava gubitak neorganskog azota u dublje slojeve zemljišta, a nakon njegovog reverzibilnog otpuštanja u područje rizosfere postaje dostupan biljkama za usvajanje (Zwingmann i sar., 2009). Zbog toga dodatak zeolita u supstrat biljaka može da doprinese povećanju sinteze proteina i poboljšanju rasta vegetativnih organa (Eslami i sar., 2020). Osim toga, u strukturi prirodnih klinoptilolita često je prisutna visoka koncentracija kalijuma, koji od svih izmjenjivih katjona biva najviše otpušten u zemljište. Na taj način zeoliti predstavljaju značajan izvor kalijuma za biljke utičući pozitivno na njihov rast i razvoj (Ahmad i sar., 2015). Li i sar. (2013) pokazali su da primjena zeolita kod uzgoja brokule (*Brassica*

*alboglabra*) poboljšava rast i razvoj listova ne samo zbog povećanja dostupnosti azota i kalijuma već i zbog postepenog otpuštanja fosfora u rizosferu. Povećanje dužine izdanka i broja listova kod biljaka paradajza u čiji supstrat je dodat zeolit uz optimalne uslove zalijevanja (Slika 35) može se povezati sa povećanjem dostupnosti makronutrijenata. Osim pozitivnog efekta zeolita na biljke paradajza koje su bile u uslovima optimalnog navodnjavanja, pokazano je da u manjem dodatku u supstrat on sprječava negativne efekte suše. Više autora je dokazalo da zeolit ima osobinu reverzibilnog vezivanja i otpuštanja vode što može značajno da doprinese u borbi protiv osmotskog stresa kod biljaka (Xiubin i Zhambin, 2001; Ghanbari i Ariafar, 2013; Al-Busaidi i sar., 2010). Zeoliti su prirodno hidrofilni materijali, ali afinitet prema vodi najviše određuje hemijski sastav njegove rešetke. Ukoliko je Si/Al odnos veći, povećava se stepen hidrofobnosti površine zeolita (Petrović i sar., 2011). Reverzibilno vezivanje i otpuštanje molekula vode za kristalnu rešetku zeolita zasniva se na formiranju vodoničnih veza u centrima njegove strukture koji imaju kiseli karakter. Takozvani Bronstedovi kiseli centri djeluju kao donori protona dok Lewisovi kiseli centri služe kao akceptori elektronskog para. Smatra se da je reverzibilno vezivanje i otpuštanje vode zasnovano na formiranju vodoničnih veza na mjestima kiselog centra zeolita i atoma kiseonika iz vode, kao i između atoma vodonika iz vode koji se veže sa kiseonikom iz zeolitne rešetke (Demuth i sar., 2001). Na taj način se postiže postepeno i sporo otpuštanje molekula vode u područje rizosfere, a upravo takav spori tok formira kapilarnu vodu koja je najdostupnija biljkama za usvajanje. Međutim, pojedini autori smatraju da sposobnost vezivanja vode kod prirodnih zeolita koji nemaju modifikovanu specifičnu površinu nije dovoljna da bi omogućila adekvatan retencioni kapacitet vode koji je pogodan za biljke (Ciesla i sar., 2019). Autori smatraju da povećanje zapremine i radijusa mezopora u unutrašnjoj strukturi zeolita kod kojih je vještački povećana specifična površina omogućava adekvatno vezivanje molekula vode, dok unutrašnji kanali u strukturi prirodnih zeolita imaju promjer oko 0,5- 0,7 nm, što je malo više od dijametra molekula vode te nije dovoljno za adekvatnu adsorpciju. S obzirom da je u našim eksperimentima korišten prirodni klinoptilolit koji je imao relativno malu specifičnu površinu, vrlo je vjerovatno da zbog toga nije ostvaren potpuni efekat u sprečavanju suše kod biljaka paradajza, nego samo djelimični. Osim toga, u supstrat, odnosno zemljište, zeolit nije dodavan u kombinaciji sa pijeskom, iako je učestao takav način njegove primjene u poljoprivredi. Ippolito i sar. (2011) su dokazali da efekat zeolita u sprečavanju suše zavisi od mehaničke usitnjenosti i od prostornog rasporeda u zemljištu u kombinaciji sa česticama pijeska. Autori su ustanovili da se kod dodavanja zeolita u supstrat bez



prethodnog miješanja sa pijeskom i zemljištem smanjuje matriks potencijal vode u njegovoj puderastoj strukturi te tako dolazi do gubitka vode u dublje slojeve zemljišta. Tako je zadržavanje vode bilo najveće pri matriks potencijalu od -100 do -300 kPa koji je postignut kod dodatka relativno manje količine zeolita pomiješanog sa pijeskom. Još neki autori koji su testirali ovakav način primjene zeolita nisu postigli značajniji uticaj na konzervaciju vode u zemljištu i prinos gajenih biljaka, a kao mogući razlog su naveli neadekvatnu upotrebu (Maksimović i sar., 2011; Avdalović i sar., 2012). Ovakvi zaključci bi mogli objasniti rezultate dobijene u našim istraživanjima na biljkama paradajza, s obzirom da je sprečavanje suše postignuto pri namjanjoj primjenjenoj koncentraciji zeolita, od 5%, dok je primjena od 20% bila kontraproduktivna. Veća gustina zeolita koji pri tom nije izmiješan sa pijeskom mogla je da doprinese smanjenju vodnog matriks potencijala i samom izostanku efekta koji bi spriječio sušu. Da je najveća primjenjena koncentracija zeolita (20%) negativno uticala na vodni režim biljaka paradajza upućuju i rezultati dobijeni mjerenjem fizioloških parametara i analize antioksidativnog metabolizma. S obzirom na to da su kod SZ grupe nakon 28 dana uticaja suše uočene najveće promjene stominog aparata koje su praćene značajnim smanjenjem intenziteta fotosinteze i transpiracije, a takođe je došlo do smanjenja sadržaja *Rubisco*-a i koncentracije hlorofila, može se reći da je prisustvo koncentracije zeolita od 20% kod ove grupe biljaka uslovalo najnepovoljniji vodni režim (Slika 23, Slika 24, Tabela 5, Tabela 6). Nepovoljan vodni režim kod biljaka iz grupe SZ je takođe doveo do najveće promjene u aktivnosti POD te u koncentraciji fenola, pri čemu su najviše bile povećane koncentracije hidroksibenzojeve i *p*-kumarične kiseline (Slika 26, Slika 32, Slika 33). Shodno tome, može se reći da neadekvatna primjena zeolita, odnosno njegov dodatak u supstrat u prekomjernim koncentracijama može uticati na pogoršanje vodnog režima koje potom uslovljava intenziviranje oksidativnog stresa. S druge strane, dodatak 5% zeolita u supstrat pokazao se kao najadekvatniji način primjene zeolita u našim uslovima, na šta upućuju i rezultati fizioloških parametara i antioksidativnog metabolizma. Naime, kod biljaka iz grupe SZ5 do 15. dana suše sačuvan je značajno veći sadržaj vode u listovima u odnosu na RWC u listovima biljaka iz grupa S i SZ10 (Slika 36, sekcija C). Povoljniji vodni režim kod grupe SZ5 direktno je uticao i na manje zatvaranje stominog otvora (Tabela 8) a samim tim i na intenzivniju fotosintezu i transpiraciju te na veći sadržaj *Rubisco*-a i koncentraciju hlorofila (Slika 36, sekcije A i B, Slika 37, Tabela 9). Najzad, sudeći prema parametrima antioksidativnog metabolizma, dodatak zeolita u koncentraciji od 5% uslovio je da se kod biljaka paradajza donekle uspori nastanak oksidativnog stresa, na šta

ukazuju manje aktivnosti SOD i APX, veća CAT aktivnost te manja koncentracija fenola (Slika 37, Tabela 10). S druge strane, kad su u pitanju biljke kukuruza, primjena zeolita nije dala rezultate čak ni u koncentraciji od 5%. Osim toga, primjećeno je da zeolit usporava rast izdanka kukuruza čak i kad biljke nisu rasle u uslovima suše. Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da negativne posljedice zeolita na biljke kukuruza u uslovima suše nisu povezane sa retencionim kapacitetom za vodu. Negativan efekat zeolita na biljke kukuruza može biti više povezan sa njegovim uticajem na režim mineralne ishrane. Iako su pojedini autori pokazali da zeolit može pozitivno uticati na rast biljaka kukuruza (Ahmed i sar., 2010; Lija i sar., 2014), treba uzeti u obzir da ovaj efekat može biti zavisan od testiranog genotipa, ali i od načina primjene, hemijskih osobina i koncentracije zeolita. Primjena zeolita u supstrat biljaka kukuruza testiranih u našem istraživanju indukovala je statistički značajno povećanje koncentracije kalijuma uz istovremeno smanjenje koncentracije kalcijuma (Tabela 11). Ovakva distribucija navedenih elemenata u listovima kukuruza mogla je nastupiti kao posljedica povećanog otpuštanja kalijumovih jona iz zeolita u zemljište, zbog čega su biljke kukuruza više usvajale ovaj element u odnosu na kalcijum. Dokazano je da u uslovima povećane koncentracije  $K^+$  u zemljištu može da dođe do smanjenog usvajanja  $Ca^{2+}$  jona zbog antagonizma između katjona (Jakobsen, 1993). Smanjen rast biljaka kukuruza u dodatku zeolita mogao je nastupiti usljed nedovoljnog usvajanja kalcijuma, ali se ne može isključiti mogućnost uticaja promijenjene koncentracije drugih hemijskih elemenata. Ippolito i sar. (2011) su pokazali da povećanje koncentracije zeolita u supstratu može umanjiti rast biljaka kukuruza zbog povećanog usvajanja natrijuma koji postaje mobilniji usljed povećanja pH zemljišta. Prirodni zeoliti, među kojima je i klinoptilolit obično povećavaju pH zemljišta usljed intenzivne katjonske izmjene, a samim tim se povećava dostupnost i usvajanje Cu, Cd, Zn, Ni i drugih elemenata koji mogu djelovati toksično na biljke u većim koncentracijama (Tahervand i Jalali, 2017). U našem istraživanju kod biljaka kukuruza tretiranih zeolitom u uslovima optimalnog zalijevanja najizraženije je bilo povećanje koncentracije Zn i to za više od 30% u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 11). Iako je cink element koji je biljkama neophodan u brojnim metaboličkim funkcijama (Hafeez i sar., 2013), povećanje njegove koncentracije može negativno uticati na fiziološke procese i izazvati metalostres, naročito izražen u fotosintetičkim tkivima (Subba i sar., 2014). Negativni uticaj zeolita na rast biljaka kukuruza se u tom slučaju može povezati sa povećanjem koncentracije usvojenog cinka, ali u tom slučaju takav efekat je mogao da nastupi i kod biljaka paradajza, s obzirom da su i kod njih primjenjeni isti zeolit i supstrat. Međutim, u rezultatima je

već dokazano da su biljke paradajza imale nešto veći rast izdanka i razvoj listova u prisustvu zeolita pa se kod njih ne može diskutovati o negativnom efektu cinka. Iako u biljkama paradajza nisu mjerene koncentracije hemijskih elemenata, selektivan uticaj zeolita na biljke paradajza i kukuruza može biti objašnjen na osnovu poznatih literaturnih podataka o toleranciji ovih vrsta na teške metale. Dokazano je da je kukuruz vrsta koja je osjetljiva na povećanje koncentracije Zn u zemljištu preko 11 ppm te da dolazi do metalostresa i usporavanja rasta izdanka ukoliko je usvojena koncentracija u listovima preko 81 ppm (Takkar i Mann, 1978). Ovakvi nalazi se uklapaju u rezultate dobijene u našem istraživanju s obzirom da je u listovima biljaka kukuruza kojima je dodato 10% zeolita izmjereno 82 ppm cinka (Tabela 11). Osim toga u samom zeolitu izmjerena je koncentracija cinka od 33,6 ppm (Tabela 2), čija je dostupnost u korijenovom sistemu mogla biti povećana sa porastom pH. S druge strane, paradajz je okarakterisan kao biljna vrsta koja je tolerantnija na povećanje koncentracije cinka u odnosu na kukuruz (Yamuna Devi i sar., 2020). Autori navode da su kod mnogih kultivara paradajza veoma intenzivni mehanizmi sekvestracije Zn jona u vakuolama ćelija fotosintetičkih tkiva u kojima fitohelatini i metalotionini uspješno sekvestriraju ove jone čak i kad njihova koncentracija pređe 200 ppm. Selektivan uticaj zeolita na biljke paradajza i kukuruza može biti zasnovan i na različitoj toleranciji ove dvije vrste na povećanje pH vrijednosti supstrata koje je indukovao ovaj mineral. Prethodno je već navedeno da se prema literaturnim podacima povećava pH vrijednost zemljišta u dodatku zeolita, a takođe su i naši rezultati pokazali da dolazi do porasta pH vodene suspenzije klinoptilolita od 5,8 do 7,3. Većini kultivara kukuruza najviše odgovara zemljište čiji je pH u opsegu 6- 6,5, a preko te vrijednosti dolazi do usporavanja razvoja listova (Adeoye i Agboola, 1985). S druge strane, optimalan pH za rast biljaka paradajza je u nešto širem opsegu, od 5,5- 7, pri čemu se toleriše i povećanje do 7,5 (Sainju i sar., 2003). Negativni efekti zeolita na biljke kukuruza su se dodatno manifestovali u uslovima suše, a takav fenomen je vjerovatno uzrokovan sinergističkim uticajem ova dva faktora. Sam uticaj suše je indukovao smanjenje koncentracije ispitivanih hemijskih elemenata, pri čemu je najveći uticaj bio na sadržaj magnezijuma (52%), kalijuma (36%) i kalcijuma (35%) u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 11). Takođe, u istom poređenju uočeno je smanjenje koncentracije mikroelemenata (Fe za 59% i Cu za 35%). Smanjenje koncentracije hemijskih elemenata u uslovima suše je očekivano ako se uzme u obzir činjenica da nedostatak vode u zemljištu gotovo uvijek uslovljava ograničenu mobilnost jona, a takođe i ograničava proces njihovog usvajanja putem korijenovog sistema (Ahanger i sar., 2016). Iako je pri dodatku 5%

zeolita u supstrat biljaka kukuruza postignuto nešto bolje zadržavanje vode u listovima (Slika 42) trend gubitka hemijskih elemenata je bio sličan onome koji je uočen i kod samog uticaja suše. Najintenzivnije smanjenje koncentracije hemijskih elemenata, a naročito makroelemenata (K, Ca i Mg) uočeno je kod biljaka kojima je dodatno 10% zeolita u uslovima suše, pri čemu je izmjeren i najmanji relativni sadržaj vode u njihovim listovima (Tabela 11, Slika 44). Iz toga se može zaključiti da je najveća primjenjena koncentracija zeolita mogla negativno uticati na vodni potencijal uz istovremeni uticaj na smanjenje dostupnosti hemijskih elemenata, što je sve skupa uslovalo da se biljke kukuruza sporije razvijaju i da budu pod uticajem većeg stresa, odnosno da je dodatak zeolita dodatno pogoršao uslove suše. U skladu sa ovim zaključkom su i vrijednosti parametara antioksidativnog metabolizma koje ukazuju da je prisustvo zeolita u suši kod biljaka kukuruza dodatno intenziviralo nastanak oksidativnog stresa. To je naročito bilo izraženo kod biljaka iz grupe SZ10 kod kojih je došlo do najveće inhibicije CAT izoformi te do najizraženijeg povećanja koncentracije fenola (Slika 51, Slika 52).

Ukoliko se uzmu u obzir svi rezultati dobijeni u istraživanjima na biljkama paradajza (preliminarni eksperiment sa 20% zeolita u supstratu i drugi eksperiment sa 5% i 10% zeolita u supstratu) mogu se izdvojiti određeni zaključci o pozitivnim ali i o negativnim efektima zeolita. Pozitivni efekti su najprije uočeni kod biljaka uzgajanih pod optimalnim vodnim režimom i to najviše kod primjenjene koncentracije zeolita od 10%, gdje su biljke paradajza na kraju eksperimenta imale značajno bolje mjerene morfološke parametre. Osim toga, kod ove grupe biljaka uočen je veći sadržaj enzima *Rubisco* i značajno veće koncentracije hlorofila a i b, a SOD aktivnost je bila nešto manja u odnosu na biljke bez zeolita u supstratu. Dodatak 5% i 20% zeolita u supstrat biljaka uzgajanih pod optimalnim vodnim režimom nije imao negativne posljedice, ali takođe nisu uočeni ni značajni pozitivni efekti (osim anatomskih karakteristika listova koje su bile bolje kod biljaka kojima je dodato 20% zeolita). Kad je u pitanju uloga zeolita u sprečavanju negativnih posljedica suše, može se reći da je taj efekat djelimično postignut jedino kod biljaka kojima je zeolit dodat u koncentraciji od 5%. Od svih biljaka koje su bile pod uticajem suše, manji gubitak vlažnosti u listovima je uočen jedino kod onih kojima je dodato 5% zeolita u supstrat, iako se takav trend održao samo do 15. dana eksperimenta. Shodno tome, kod ove grupe biljaka u odnosu na sve druge grupe biljaka pod uticajem suše uočeni su i sljedeći pozitivni efekti: veća dužina izdanka i broj listova, veći svi mjereni anatomske parametri listova, veći intenzitet fotosinteze i transpiracije, veći sadržaj hlorofila a, veći stomin otvor, blaži odgovor

antioksidativnog metabolizma, odnosno manja SOD i APX aktivnost te manja inhibicija CAT aktivnosti i manji sadržaj fenola. Sve navedene osobine nisu uočene kod biljaka kojima je dodato 10% zeolita u supstrat u uslovima suše. Zanimljivo je da je kod biljaka pod uticajem suše dodatak zeolita od 20% imao negativne posljedice, budući da je kod njih u odnosu na biljke bez zeolita uočeno sljedeće: manji intenzitet fotosinteze i transpiracije, manji sadržaj enzima Rubisco, manja koncentracija hlorofila b, veći broj stoma po mm<sup>2</sup>, manji stomin otvor, veća peroksidazna aktivnost te veća koncentracija fenolnih kiselina. Ukoliko bi se napravila gradacija efekata zeolita na biljke pod uticajem suše u odnosu na njegovu koncentraciju u supstratu moglo bi se reći da je dodatak od 5% imao pozitivan efekat, dodatak od 10% je bio neutralan, dok je dodatak od 20% imao negativan efekat.

Ako se uzmu u obzir svi rezultati dobijeni u istraživanju na biljkama kukuruza može se reći da dodatak zeolita u supstrat ni pri jednoj koncentraciji nije doveo do ublažavanja negativnih posljedica suše te da je čak sa povećanjem sadržaja zeolita u supstratu uočeno i proporcionalno povećanje negativnih efekata. To se naročito odnosi na karakteristike biljaka kojima je u uslovima suše dodato 10% zeolita u supstrat, budući da je kod ovih biljaka došlo do najuočljivijeg smanjenja dužine izdanka, smanjenja relativnog sadržaja vode listova i aktivnosti enzima *Rubisco*, uz istovremeno povećanje sadržaja fenola i inhibicije CAT izoformi na elektroforegramu. Takođe, kod ove grupe biljaka evidentno je i najveće smanjenje koncentracije K, Ca i Mg. Dodatak obe koncentracije zeolita u uslovima suše indukovao je intenzivnije povećanje količine proteina malih molekularnih masa u odnosu na ono koje je uočeno kod biljaka bez zeolita. Zanimljivo je da je dodatak zeolita u supstrat kod biljaka uzgajanih pod optimalnim vodnim režimom takođe imao negativne posljedice, budući da je njegova primjena od 10% dovela do značajnog smanjenja dužine izdanka. Osim toga, kod ove grupe biljaka uočeno je povećanje sadržaja fenola, te su indukovane nove POD i CAT izoforme, a došlo je i do smanjenja koncentracije Ca te do povećanja koncentracija K i Zn. Sveukupno gledajući, primjena zeolita kod biljaka kukuruza imala je negativan efekat i u uslovima optimalnog navodnjavanja i u suši.

## 7. ZAKLJUČAK

Istraživanjem koje je sprovedeno u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvaćene su dvije biljne vrste, paradajz (*Solanum lycopersicum*) i kukuruz (*Zea mays*), a analiza dobijenih rezultata uključila je metaboličke adaptacije biljaka na stres izazvan sušom te efekte koje je imao zeolit u sprečavanju negativnih posljedica ovog abiotičkog faktora. Nakon sumiranja svih rezultata i njihove uporedne analize između dvije biljne vrste može se konstatovati da ispitivani kultivari kukuruza i paradajza pored očekivanog metaboličkog odgovora koji je univerzalan kod biljaka u stanju stresa izazvanog sušom imaju donekle različit mehanizam antioksidativnog metabolizma. Te razlike su najviše izražene u putevima degradacije vodonik peroksida indukovano u ćelijama fotosintetičkih tkiva usljed uticaja suše.

Kad je u pitanju efekat koji je imala primjena zeolita na ispitivane biljne vrste mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Zeolit kod paradajza doprinosi poboljšanom rastu i razvoju izdanka ukoliko biljke imaju adekvatnu opskrbu vodom, dok u uslovima suše može da ublaži njene negativne posljedice ukoliko se primjeni u manjoj koncentraciji (5% u odnosu na ukupnu masu supstrata). Ublažavanje negativnih posljedica suše se manifestovalo kroz poboljšanje vrijednosti parametara fotosintetičkog metabolizma te kroz manji intenzitet oksidativnog stresa na šta ukazuju parametri antioksidativnog metabolizma.
- Veća koncentracija zeolita dodata u supstrat biljaka paradajza (20%) može dodatno da oteža stres izazvan sušom, a ovakav fenomen se može povezati sa nepovoljnim vodnim režimom supstrata zbog neadekvatno raspoređenih čestica zeolita. Intenziviran oksidativni stres kod dodatka 20% zeolita pokazan je na osnovu odgovora enzimskih, ali i neenzimskih komponenti antioksidativnog metabolizma.
- Primjena zeolita u supstratu kod optimalnog navodnjavanja biljaka kukuruza imala je negativan uticaj na rast izdanka zbog posljedica koje su nastale usljed neadekvatne distribucije i dostupnosti hemijskih elemenata.
- Pozitivan efekat zeolita koji se očekivao u procesu ublažavanja negativnih posljedica suše izostao je kod biljaka kukuruza, pri čemu je njegova primjena u koncentraciji od 10% dodatno otežala režim mineralne ishrane i prouzrokovala intenzivniji biohemijsko-

fiziološki odgovor na stres, na šta ukazuju vrijednosti sadržaja *Rubisco*-a, proteina malih molekulskih masa te parametara antioksidativnog metabolizma.

Uzimajući u obzir da je primjena zeolita u uslovima suše značajno zavisila od izbora biljne vrste ali i od načina i količine njegove primjene dobijeni rezultati pružaju novi aspekt u razmatranju njegove upotrebe u uzgoju biljaka te otvara mogućnost za nastavak istraživanja na ovu temu usmjeren prema selekciji biljne vrste a posebno prema primjenjenoj koncentraciji.

## 8. LITERATURA

- Aalto, T., Juurola, E. (2002): A three-dimensional model of CO<sub>2</sub> transport in airspaces and mesophyll cells of a silver birch leaf. *Plant, Cell & Environment* 25, 1399-1409.
- Abdi, G. H., Khosh-Khui M., Eshghi, S. (2006): Effects of natural zeolite on growth and flowering of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *International Journal of Agricultural Research* 1, 384-389.
- Abedi, T., Pakniyat, H. (2010): Antioxidant enzymes changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetic Plant Breeding* 46, 27-34.
- Abreu, I.A., Cabelli, D.E. (2010): Superoxide dismutases- a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (2), 263-274.
- Acworth, I. A. (2003): The handbook of redox biochemistry. *Esa Inc., Chelmsford, USA*
- Adams, L.K., Benson, E.E., Staines, H.J., Bremner, D.H., Millam, S., Deighton, N. (1999): Effects of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of in vitro plant cells. *Journal of Plant Physiology* 155 (3), 376-386.
- Adeoye, G. O., Agboola, A. A. (1985): Critical levels for soil pH, available P, K, Zn and Mn and maize ear-leaf content of P, Cu and Mn in sedimentary soils of South-Western Nigeria. *Fertilizer Research* 6, 65-71.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Aghaalikhani, M., Gholamhoseini, M., Dolatabadian, A., Khodaei-Joghan, A., Sadat Asilan, K., (2012): Zeolite influences on nitrate leaching, nitrogen-use efficiency, yield and yield components of canola in sandy soil. *Archives of Agronomy and Soil Science* 58, 1149-1169.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012): Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 196, 67-76.
- Ahanger, M. A., Morad-Talab, N., Abd-Allah, E. F., Ahmad, P. (2016): Plant growth under drought stress: Significance of mineral nutrients. In: Ahmad, P: *Water Stress and Crop plants: a Sustainable Approach* 2, John Wiley & Sons, Ltd. Published, 649-668.



- Ahmad, O. H., Azyumi, N. A., Jalloh, M. B. , Jol, H. (2015): Using clinoptilolite zeolite for enhancing potassium retention in tropical peat soil. In: *Advances in Tropical Soil Sciences. Universiti Putra Malaysia Press, Universiti Putra Malaysia, Serdang*, 112-127.
- Ahmed, J., Hasan, M. (2011): Evaluation of seedling proline content of wheat genotypes in relation to heat tolerance. *Bangladesh Journal of Botany* 40, 17-22.
- Ahmed, O. H., Sumalatha, G., Nik Muhamad, A. M. (2010): Use of zeolite in maize (*Zea mays*) cultivation on nitrogen, potassium and phosphorus uptake and use efficiency. *International Journal of the Physical Sciences* 5, 2393-2401.
- Akhtar, S.S., Li, G., Andersen, M.N., Liu, F. (2014): Biochar enhances yield and quality of tomato under reduced irrigation. *Agricultural Water Management* 138, 37-44.
- Alcher, R. G., Erturk, N., Heath L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1331-1341.
- Al-Busaidi, A., Yamamoto, T., Tanigawa, T., Rahman, H. A. (2010): Use of zeolite to alleviate water stress on subsurface drip irrigated barley under hot environments. *Irrigation and Drainage* 60, 473-480.
- Ali, Q., Ashraf, M., Anwar, F. (2010): Seed composition and seed oil antioxidant activity of maize under water stress. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87, 1179-1187.
- Al Hassan, M., Martinez Fuertes, M., Ramos Sanchez, F.J., Vicente, O., Boscaiu, M. (2015): Effects of Salt and Water Stress on Plant Growth and on Accumulation of Osmolytes and Antioxidant Compounds in Cherry Tomato. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 43(1), 1-1.
- Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y., Yokota, A. (2004): Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 72-78.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*, 793-807.
- Alvarez, S., Marsh, E. L., Schroeder, S. G., Schachtman, D, P. (2008); Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell & Environment* 31, 325–340.

- Andersson I., Backlund A. (2008): Structure and function of rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 275-291.
- Anđelković, V., Ignjatović Mičić, D., Vančetović, J., Babić, M. (2012): Integrisan pristup u poboljšanju tolerantnosti kukuruza na sušu. *Selekcija i Semearstvo* 8 (2), 1-18.
- Anjum, S.A., Wang, L.C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L.L., Zou, C.M. (2011): Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197, 177-185.
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M.F., Ali, I., Wang, L.C. (2017): Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids. *Frontiers in Plant Science* 8, 69.
- Apel, K., Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Appenroth, K. J., Stöckel, J., Srivastava, A., Strasser, R.J. (2001): Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environmental Pollutants* 115, 49-64.
- Aroca, R., Vernieri, P., Irigoyen, J. J., Sanches-Díay, M., Tognoni, F., Pardossi, A. (2003): Involvement of abscisic acid in the leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science* 165, 671-679.
- Arve, L. E., Torre, S., Olsen, J. E., Tanino, K. K. (2011): Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity. In: Shanker, A.: Abiotic Stress in Plants- Mechanisms and Adaptation. *InTech Europe*, 307-394.
- Asada, K., Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Kyle, D. J., Osmond, C. B., Arntzen, C. J.: Photoinhibition. *Elsevier, Amsterdam*, 227-287.
- Asada, K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-639.

- Asai, N., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kamada, H., Kondo, N. (2000): Role of Malate Synthesis Mediated by Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Guard Cells in the Regulation of Stomatal Movement. *Plant Cell Physiology* 41 (1), 10-15.
- Ashraf, M., Harris, P. J. C. (2013): Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.
- Attia, M. S., Osman M. S., Mohamed, A. S., Mahgoub H. A., Garada M. O., Abdelmouty, E. S., Abdel Latef, A. A. H. (2021): Impact of Foliar Application of Chitosan Dissolved in Different Organic Acids on Isozymes, Protein Patterns and Physio-Biochemical Characteristics of Tomato Grown under Salinity Stress. *Plants* 10, 338.
- Avdalović, J., Lopičić, Z., Adamović, V., Čosović, A. (2012): Mogućnost primene zeolita u tehnologijama vezanim za unapređenje i zaštitu životne sredine. *Ecologica* 19, 385-390.
- Avramova, V., AbdElgawad, H., Vasileva, I., Petrova, A.S., Holek, A., Mariën, J., Asard, H., Beemster, G.T.S. (2017): High Antioxidant Activity Facilitates Maintenance of Cell Division in Leaves of Drought Tolerant Maize Hybrids. *Frontiers in Plant Science* 8, 84.
- Badr, A., El-Shazly, H.H., Tarawneh, R.A., Börner, A. (2020): Screening for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) germplasm using germination and seedling traits under simulated drought conditions. *Plants* 9, 565.
- Baker, J., Steele, C., Dure, L. (1988): Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11, 277-291.
- Bahador, M., Tadayon, M.R. (2020). Investigating of zeolite role in modifying the effect of drought stress in hemp: Antioxidant enzymes and oil content. *Industrial Crops and Products* 144, 1-10.
- Bannister, W. H., Bannister, J. V., Barra, D., Bond J., Bossa, F. (1991): Evolutionary Aspects of Superoxide Dismutase: The Copper/Zinc Enzyme. *Free Radical Research Communications* 12 (1), 349-361.
- Barnes, J., Zheng, Y., Lyons, T. (2002): Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. In: Air pollution and plant biotechnology *Springer Japan*, 235-252.

- Bartoli, C. G., Simontachi, M., Tambussi, E., Beltrano, J. (1999): Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* 50, 375-383.
- Bartoli, C.G., Gómez, F., Martínez, D.E., Guiamet, J.J. (2004): Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 55(403),1663-1669.
- Bascuñán-Godoy, L., Sanhueza, C., Hernández, C.E., Cifuentes, L., Pinto, K., Álvarez, R., González-Teuber, M., Bravo, L.A. (2018): Nitrogen Supply Affects Photosynthesis and Photoprotective Attributes During Drought-Induced Senescence in Quinoa. *Frontiers in Plant Science* 9, 994.
- Bauerle, W. L., Oren, R., Way, D. A., Qian, S. S., Stoy, P. C, Thornton, P. E, Bowden, J. D., Hoffman, F. M., Reynolds, R. F. (2012): Photoperiodic regulation of the seasonal pattern of photosynthetic capacity and the implications for carbon cycling. *Proceeding of National Academy of Sciences of United States of America* 109 (22), 8612-8617.
- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T. (2007): Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* 32(3), 501-510.
- Bekrić, V., Radosavljević M. (2008): Savremeni principi upotrebe kukuruza. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi (PTEP)*12, 93-96.
- Bendall, D. S., Munasse, R. S. (1995): Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1229, 23-38.
- Bertamini, M., Zulini, L., Zorer, R., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. (2007): Photoinhibition of photosynthesis in water deficit leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. *Photosynthetica* 45, 426-432.
- Bijlsma, R., Loeschcke, V. (2005): Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 744-749.
- Black, C. C. (1973): Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO<sub>2</sub> uptake. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 253-286.

- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003): Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91, 179-194.
- Blödner, C., Majcherczyk, A., Kües, U., Polle, A. (2007): Early drought-induced changes to the needle proteome of Norway spruce. *Tree Physiology* 27, 1423-1431.
- Blum, A. (2017): Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, Cell & Environment* 40, 4-10.
- Boguszewska, D., Zagdańska, B. (2012): ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions. *Oxidative Stress- Molecular Mechanisms and Biological Effects*, 18, 342-362.
- Boucher, V., Buitink, J., Lin, X., Boudet, J., Hoekstra, F.A., Hundertmark, M., Renard, D., Leprince, O. (2010): MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant, Cell & Environment* 33, 418-430.
- Boudet, A.M. (2000): Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 81-96.
- Caballero, J.I., Verduzco, C.V., Galan, J, Jimenez, E. S. D. (2005): Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: A tissue differentiation requirement. *Journal of Experimental Botany* 39, 889–897.
- Carmo-Silva, E., Scales, J. C., Madgwick, P. J., Parry, M. A. J. (2015): Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource efficiency. *Plant, Cell & Environment* 38, 1817-1832.
- Chai, Q., Gan, Y., Zhao, C., Xu, H.L., Waskom, R.M., Niu, Y., Siddique, K.H. (2016): Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 36, 3.
- Chaves, M. M. (1991): Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42, 1-16.
- 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, 551–560.

- Chandra, S., Lata, H., Khan, I.A., ElSohly, M.A. (2008): Photosynthetic response of *Cannabis sativa* L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO<sub>2</sub> conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14, 299-306.
- Chaoui, A., El Ferjani, E. (2005): Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biologies* 328, 23-31.
- Chen, K.M., Wang, F., Wang, Y.H., Chen, T., Hu, Y.X., Lin, J.X. (2006): Anatomical and chemical characteristics of foliar vascular bundles in four reed ecotypes adapted to different habitats. *Flora* 201, 555-569.
- Chen, S., Zhou, Z.J., Andersen, M.N., Hua, T. (2015): Tomato yield and water use efficiency-coupling effects between growth stage specific soil water deficit. *Acta Agriculturae Scandinavica* 65(5), 460-469. *The Journal of Chemical Physics* 144, 244705.
- Chen, M., Ding, S., Zhang, L., Li, Y., Sun, Q., Zhang, C. (2017): An investigation of the effects of elevated phosphorus in water on the release of heavy metals in sediments at a high resolution *The Science of the Total Environment* 575, 330-337.
- Chen, M., Li, K., Li, H. et al. The Glutathione Peroxidase Gene Family in *Gossypium hirsutum*: Genome-Wide Identification, Classification, Gene Expression and Functional Analysis. *Scientific Reports* 7, 44743.
- Chibani, S., Chebbi, M., Lebegue, S., Bučko, T., Badavi, M. (2016): A DFT investigation of the adsorption of iodine compounds and water in H-, Na-, Ag-, and Cu- mordenite.
- Chugh, V., Kaur, N., Gupta, A. K. (2011): Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 4, 47-53.
- Chwastowski, J., Ciesielska, K., Ciesielski, W., Khachatryan, K., Kołoczek, H., Kulawik, D., Oszcze, D., Tomasik, P., Witczak, M. (2020): Structure and Physicochemical Properties of Water Treated under Nitrogen with Low-Temperature Glow Plasma. *Water* 12, 1314.
- Ciacka, K., Tyimiński, M., Gniazdowska, A., Krasuska, U., (2020): Carbonylation of proteins- an element of plant ageing. *Planta*, 252(1), 1-13.

- Cieśla, J., Franus, W., Franus, M., Kedziora, K., Gluszczyk, J., Szerement, J., Jozefaciuk, G. (2019): Environmental-Friendly Modifications of Zeolite to Increase Its Sorption and Anion Exchange Properties, Physicochemical Studies of the Modified Materials. *Materials* 12, 3213.
- Ciricao de Silva, E., Bandeira de Albuquerque, M., Diaz de Acevedo Neto, A., Diaz de Silva Junior, C. (2013): Drought and its consequences to plants-from individual to ecosystem. In: Agricultural and Biological Sciences, Responses of organism to water stress. *CC BY*.
- Close, T.J. (1996): Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97, 795-803.
- Cooper, G., Hausman, R. (2007): The Cell: A Molecular Approach. *Sinauer Associates, Massachusetts*, 458-462.
- Coppola, E., Battaglia, G., Bucci, M., Ceglie, D., Colella, A., Langella, A., Buondonno, A., Colella, C. (2003): Remediation of Cd- and Pb-polluted Soil by Treatment with Organozeolite Conditioner. *Clays and Clay Minerals* 51, 608-615.
- Colombani, N., Mastrocicco, M., Di Giuseppe, D., Coltorti, M. (2014): Variation of the hydraulic properties and solute transport mechanisms in a silty-clay soil amended with natural zeolites. *Catena* 123, 195-204.
- Cosgrove, D.J. (2016): Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes, *Journal of Experimental Botany*, Volume 67 (2), 463–476.
- Cousins, A. B., Baroli, I., Badger, M. R., Ivakov, A., Lea, P. J., Leegood, R. C., von Caemmerer, S. (2007): The role of phosphoenolpyruvate carboxylase during C4 photosynthetic isotope exchange and stomatal conductance. *Plant Physiology* 145(3), 1006–1017.
- Cowan, A. K., Railton, I. D. (1985): Chloroplasts and the biosynthesis and catabolism of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 4, 211-224.
- Čereković, N., Pagter, M., Kristensen, H.L., Pedersen, H.L., Brennan, R., Petersen, K.K. (2013): Effects of drought stress during flowering of two pot-grown blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 162, 365-373.

- Daniell, H., Lee, S. B., Grevich, J. Saski, C., Quesada-Vargas, T., Guda, C., Tomkins, J., Jansen, R. K. (2006): Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 1503.
- Dai, Z., Ku, M. S. B., Edwards, G. E. (1993): C4 photosynthesis: the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism and photorespiration. *Plant Physiology* 103, 83-90.
- Das, K., Roychoudhury, A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2, 53.
- Davies, W.J., Kudoyarova, G., Hartung, W. (2005): Long-distance ABA signalling and its relation to other signalling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 285-295.
- Demidchik V. (2015): Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109, 212–228.
- Demmig-Adams, B., Adams, W. W. (1996): The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1 (1), 21-26.
- Demuth, T., Benco, L., Hafner, J., Toulhoat, H. (2001): Adsorption of water in mordenite- An ab initio study. *International Journal of Quantum Chemistry* 84, 110-116.
- Dhingra, A., Portis, A.R., Daniell, H. (2004): Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6315–6320
- Dita, M.A., Rispaill, N., Prats, E., Rubiales, D., Singh K.B. (2006): Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147, 1–24.
- Dodd, A.N., Borland, A.M., Haslam, R.P., Griffiths, H., Maxwell, K. (2002): Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of Experimental Botany* 53, 569-580.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., Jačević, V. (2021): The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science* 11, 552969.



- Dure, L. (1993): Structural motifs in LEA proteins. In: Close, T.J., Bray, E.A. Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. *American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD*, 91–103.
- Dure, L., Greenway, S. C., Galau, G. A. (1981): Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20, 4162-4168.
- Eichelmann, H., Laisk, A. (1999): Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Content, Assimilatory Charge, and Mesophyll Conductance in Leaves. *Plant Physiology* 119, 179-189.
- Ellis J.R. (2010): Tackling unintelligent design. *Nature*, 463 (7278), 164-165.
- Elstner, E.F., Osswald, W. (1994): Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B* 102, 131–154.
- Eslami, M., Khorassani, R., Fotovat, A, Halajnia, A. (2020):  $\text{NH}_4^+$ - $\text{K}^+$  co-loaded clinoptilolite as a binary fertilizer. *Archives of Agronomy and Soil Science* 66, 33-45.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Hernandez, J.A. (2011): Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany* 62, 2599-2613.
- Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Duarte, P., Barceló, A.R., Sottomayor, M. (2011): Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an  $\text{H}_2\text{O}_2$  affair? *Journal of Experimental Botany* 62 (8), 2841-2854.
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., & Tattini, M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant signaling & behavior* 6, 709-711.
- Flexas, J., Medrano, H. (2002): Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89, 183-189.

- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmes, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., Ribas-Carbo, M. (2007): Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant, Cell & Environment* 30, 1284-1298.
- Foolad, M.R. (2007): Current status of breeding tomatoes for salt and drought tolerance. In: Jenks, M.A., P.M., Mohan Jain, S., Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops, (Eds.) Hasegawa, Springer, Dordrecht, Netherlands: 669-700.
- Foote, C. S., Valentine, J.S., Greenberg. A., Liebman, J.F. (1985): Active Oxygen in Chemistry. *Chapman and Hall, New York*.
- Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2011): Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155, 2-18.
- Fridovich, I. (1995): Superoxide Anion Radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), Superoxide Dismutases and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 18515-18517.
- Frosch, S., Tsala, G., Degli Agosti, R., Greppin, H. (1986): Effect of photoperiod length on leaf ontogenesis in spinach plants (*Spinacia oleracea* var. Nobel) as related to photosynthetic O<sub>2</sub> production, Rubisco capacity and total sugar content. *Archives Des Sciences Journal* 39, 263-275.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., OhmeTakagi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005): AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 3470-3488.
- Galmés, J., Ribas-Carbó, M., Medrano, H., Flexas, J. (2011): Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO<sub>2</sub> concentration under water stress. *Journal of Experimental Botany* 62 (2), 653-665.

- Garchery, C., Gest, N., Do, P.T., Alhagdow, M., Baldet, P., Menard, G., Fernie, A.R. (2013): A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. *Plant, Cell & Environment* 36, 159-175.
- Genkov, T., Spreitzer, R. J. (2009): Highly conserved small subunit residues influence rubisco large subunit catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 284 (44), 30105-30112.
- Ghanbari, M., Ariaifar, S. (2013): The effect of water deficit and zeolite application on Growth Traits and Oil Yield of Medicinal Peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 3, 33-39.
- Gholizadeh, A., Amin, M.S.M., Anuar, A.R., Saberioon, M.M. (2010): Water stress and natural zeolite impacts on phisiomorphological characteristics of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* l.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4, 5184-5190.
- 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, 909-930.
- Gimenez, C., Mitchell, V.J., Lawlor, D.W. (1992): Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology* 98, 516-524.
- Godde, D., Hefer, M. (1994): Photoinhibition and light-dependent turnover of the D1 reaction-centre polypeptide of photosystem II are enhanced by mineral-stress conditions. *Planta* 193, 290-299.
- Gorman, A. A., Rodgers, M.A. (1992): Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 14, 159-176.
- Griffiths, H., Helliker, B., Roberts, A., Haslam, R.P., Girnus, J., Robe, W.E., Borland, A.M., Maxwell, K. (2002): Regulation of Rubisco activity in CAM plants: better late than never. *Functional Plant Biology* 29, 689-696.

- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davles, K.J.A. (2003): Selective Degradation of Oxidatively Modified Protein Substrates by the Proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 709-718.
- Greene, R. (2002): Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book*, 5, 1-20.
- Hafeez, B., Khanif, Y. M., Saleem, M. (2013): Role of Zinc in Plant Nutrition-A Review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3, 374-391.
- Halliwell, B. (1991): Reactive oxygen species in living systems: source, Biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91 (3C), 14-22.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. *Oxford University Press, Oxford*.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* (141), 312-322.
- Hatch, M. D., Slack, C.R. (1969): Studies on the mechanism of activation and inactivation of pyruvate, phosphate dikinase. A possible regulatory role for the enzyme in the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochemical Journal* 112(5), 549-558.
- Hartman, F.C., Foote, R.S., Larimer, F.W., Lee, E.H. Machanoff, R., Milanez, S., Mitra, S., Mural, R.J., Niyogi, S. K. Smith, H.B., Soper, T.S., Stringer, C.D. (1987): Function of active-site residues of ribulose biphosphate carboxylaseoxygenase. In: von Wettstein, D., Chua, N.H.: *Plant Molecular Biology* 140, *Plenum Press, New York*.
- Hartung, W. (1983): The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. *Plant, Cell & Environment* 6, 427-429.
- Hastorf, C.A. (2009): Rio Balsas most likely region for maize domestication. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences of USA* 106, 4957-4958.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M., Fotopoulos, V. (2020): Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* 9, 681.

- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemini, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., Ahmad, A. (2012): Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, 7 (11), 1456-1466.
- Hayat, F., Zarebanadkouki, M., Ahmed, M. A., Buecherl, T., Carminati, A. (2020): Quantification of hydraulic redistribution in maize roots using neutron radiography. *Vadose Zone Journal* 19, e20084.
- Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Mokhtassi-Bidgoli, A., Modarres-Sanavy, S.A.M., Mohammadi, H., Nicola, S., 2017. Effects of zeolite and water stress on growth, yield and chemical compositions of Aloe vera L. *Agriculture and Water Management* 181, 66-72.
- He, Z. L., Alva, A. K., Calvert, D. V., Banks, D. J. (1999): Ammonia volatilization from different nitrogen fertilizers and effects of temperature and soil pH. *Soil Science* 164, 750-758.
- Heber, U., Walker, D. (1992): Concerning a Dual Function of Coupled Cyclic Electron Transport in Leaves. *Plant Physiology* 100 (4), 1621-1626.
- Hejrnák, V., Tatar, Ö., Atasoy, G.D., Martinková, J., Çelen, A.E., Hnilička, F., Skalický, M. (2015): Growth and photosynthesis of Upland and Pima cotton: response to drought and heat stress. *Plant, Soil and Environment* 61, 507-514.
- Hendry, G.A. (1993): Oxygen free radicals process and seed longevity. *Seed Science Research* 3, 141.
- Hideg, E., Schreiber, U. (2007): Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. *Photosynthesis Research* 92, 103-108.
- Hideg, E., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K., Asada, K. (2002): Detection of Singlet Oxygen and Superoxide with Fluorescent Sensors in Leaves Under Stress by Photoinhibition or UV Radiation. *Plant and Cell Physiology* 43 (10), 1154-1164.
- Hideg, E., Kos, P.B., Vass, I. (2007): Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum* 131(1), 33-40.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001): A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42, 462-468.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E. A., Buitink, J. (2001): Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 431-438.

- Holm, G. (1954). Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica* 4, 457-471.
- Hölttä, T., Cochard, H., Nikinmaa, E., Mencuccini, M. (2009): Capacitive effect of cavitation in xylem conduits: results from a dynamic model. *Plant, Cell & Environment* 32, 10-21.
- Hosseini, S. M., Hasanloo, T., Mohammadi, S. (2015): Physiological characteristics, antioxidant enzyme activities, and gene expression in 2 spring canola (*Brassica napus* L.) cultivars under drought stress conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39, 413-420.
- Hura, T., Hura, K., Grzesiak, S. (2008): Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194, 104-112.
- Huang, L., Jia, J., Zhao, X., Zhang, M., Huang, X., Ji, E. (2018): The ascorbate peroxidase APX1 is a direct target of a zinc finger transcription factor ZFP36 and a late embryogenesis abundant protein OsLEA5 interacts with ZFP36 to co-regulate OsAPX1 in seed germination in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 339-345.
- Huseynova, I. M. (2012): Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817 (8), 1516-1523.
- Ippolito, J. A., Tarkalson, D. D., Lehrsch, G. A. (2011): Zeolite Soil Application Method Affects Inorganic Nitrogen, Moisture, and Corn Growth. *Soil Science* 176, 136-142.
- ISO 11047. (1998). Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel and zinc - Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 11466. (1995). Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Ivanišević, D., Prodanović, R., Stajić, D. (2018): Ekonomika proizvodnje paradajza u zavisnosti od načina nabavke rasada. *Ekonomija, Teorija i Praksa* XI (3), 39-51.
- Jakkula, V.S., Wani, S.P. (2018): Zeolites: Potential soil amendments for improving nutrient and water use efficiency and agriculture productivity. *Scientific Reviews & Chemical Communications* 8(1), 119.

- Jakobsen, S. T. (1993): Interaction between Plant Nutrients III. Antagonism between Potassium, Magnesium and Calcium. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Soil and Plant Science* 43, 1-5.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. (2009): Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology* 11, 100–105.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., del Rio, L.A., Sevilla, F. (1997): Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114, 275-284.
- Jovanović Ž., Stanisavljević N., Mikić A., Radović S., Maksimović V. (2013): The expression of drought responsive element binding protein (DREB2A) related gene from pea (*Pisum sativum* L.) as affected by water stress. *Australian Journal of Crop Science* 7, 1590-1596.
- Jovanović Z., Stikić R. (2012): Strategies for improving water productivity and quality of agricultural crops in an era of climate change. In: Lee, T. S.: *Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments. InTech*, 77-102.
- Jovanović, Lj. (1998): Efflux of abscisic acid from the maize root cortex cells. *Iugoslavica physiologica et pharmacologica acta* 34 (1), 127-134.
- Junker, L.V., Kleiber, A., Jansen, K., Wildhagen, H., Hess, M., Kayler, Z., Ensminger, I. (2017): Variation in short-term and long-term responses of photosynthesis and isoprenoid-mediated photoprotection to soil water availability in four Douglas-fir provenances. *Scientific Reports* 7, 40145.
- 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, 162.
- Kanematsu, S., Asada, K. (1990): Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of Cu,Zn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiology* 3,381-391.

- Kang, S., Hu, X., Goodwin, I., Jerie, P. (2002): Soil water distribution, water use, and yield response to partial root zone drying under a shallow groundwater table condition in a pear orchard. *Scientia Horticulturae* 92, 277-291.
- Karami, A., Mohammadi, T.A., Mahboub, K. A. (2011): The Effect of Medium Containing Zeolite and Nutrient Solution on the Growth of *Dieffenbachia amoena*. *Scholars Research Library Annuals of Biological Research* 2, 378-383.
- Karapınar, N. (2009): Application of natural zeolite for phosphorous and ammonium removal from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 170 (2-3), 1186-1191.
- Karkonen, A., Fry, S. C. (2006): Effect of ascorbate and its oxidation products on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany* 57, 1633-1644.
- Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K.R.S.S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivaslu, N. (2005): Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88, 424-438.
- Kelliher, T., Walbot, V. (2012): Hypoxia triggers meiotic fate acquisition in maize. *Science* 337, 345-348.
- Kiani, S.P., Maury, P., Sarrafi, A., Grieu, P. (2008): QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Science* 175, 565–573.
- Khan, M.B., Hussain, N., Iqbal, M. (2001): Effect of water stress on growth and yield components of maize variety YHS 202. *Journal of Research (Science), Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan* 12, 15-18.
- Klunklin, W., Savage, G. (2017): Effect on quality characteristics of tomatoes grown under well-watered and drought stress conditions. *Foods* 6, 56.
- Knapp, S., Bohs, L., Nee, M., Spooner, D.M. (2004): Solanaceae—a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics* 5, 285-291.



- Knight, S., Andersson, I., Branden, C. I. (1989): Reexamination of the Three-Dimensional Structure of the Small Subunit of RuBisCo from Higher Plants. *Science* 244 (4905), 702-705.
- Kochieva, E. Z Ryzhova, N. N., Khrapalova, I. A, Pukhalskyi, V. A. (2002): Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in the Genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis. *Russian Journal of Genetics* 38, 958-966.
- Kojić, D., Pajević, S., Jovanović-Galović, A., Purać, J., Pamer, E., Škondrić, S., Grubor-Lajšić, G. (2012): Efficacy of natural aluminosilicates in moderating drought effects on the morphological and physiological parameters of maize plants (*Zea mays* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12, 113-123.
- Kovačević, V., Rastija, M. (2009.): Osnove proizvodnje žitarica- interna skripta. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
- Kranner, I. (2002): Gluhation status correlates with different degrees of dessication tolerance in three lichenes. *New Phytologist* 154, 451-460.
- Kröel-Dulay, G., Ódor, P., Peters, D., Hochstrasser, T. (2004): Distribution of Plant Species at a Biome Transition Zone in New Mexico. *Journal of Vegetation Science*, 15(4), 531-538.
- Kruidenier L., Verspaget H. W. (2002): Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease – radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 16,1997-2015.
- Kubien, D. S., Whitney, S. M., Moore, P. V., Jesso, L K. (2008): The biochemistry of Rubisco in *Flaveria*. *Journal of Experimental Botany* 59 (7), 1767-1777.
- Kukavica, B., Veljović-Jovanović, S. (2004). Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum* 122, 321-327.
- Kukavica, B., Mojović, M., Vucčinić, Ž., Maksimović, V., Takahama, U., Jovanović, S.V., (2009): Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology*, 50 (2), 304-317.

- Kulkarni, M., Deshpande, U. (2006): Anatomical breeding for altered leaf parameters in tomato genotypes imparting drought resistance using leaf strength index. *Asian Journal of Plant Sciences* 5, 414-420.
- Kusvuran, S., Dasgan, H.Y. (2017): Drought induced physiological and biochemical responses in *Solanum lycopersicum* genotypes differing to tolerance. *Acta Scientiarum Polonorum- Hortorum Cultus* 16, 19-27.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 5157,105-32.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lara M. V., Andreo C. S. (2011): C4 plants adaptation to high levels of CO<sub>2</sub> and to drought environments. In Shanker, A.: Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. *Rijika InTech*, 415-428.
- Laurie V. F., Waterhouse A. L. (2006): Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine: Potential effects on wine colour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4668-4673.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., Dietz, K.J. (2019): The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants* 8, 94.
- Lawlor, D.W., Cornic, G. (2002): Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* 25, 275-294.
- Leegood, R. C. (1993): Carbon metabolism. In: Hall, D. O., Scurlock, J. M. O., Bolhar-Nordenkamp, H. R., Leegood, R.C., Long, S. P.: Photosynthesis and production in a changing environment. *Chapman and Hall: London*, 247-267.
- Lehmann, P., Or, D. (2015): Effects of stomata clustering on leaf gas exchange. *New Phytologists* 207, 1015-1025.
- Leonardi, C., Baille, A., Guichard, S. (2000): Predicting transpiration of shaded and non-shaded tomato fruits under greenhouse environments. *Scientia Horticulturae* 84 (3-4), 297-307.

- Lestari, R., Ebert, G., Huyskens-Keil, S. (2011): The Effect of Light and Water Supply on Growth, Net CO<sub>2</sub> Assimilation Rate and Mineral Content of Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) Seedlings. *International Journal of Biology* 3 (3), 94-104.
- Li, J., Wee, C., Sohn, B. (2013): Effect of Ammonium- and Potassium-Loaded Zeolite on Kale (*Brassica alboglabra*) Growth and Soil Property. *American Journal of Plant Sciences* 4, 1976-1982.
- Li, Z.Z., Zhang, L., Li, S., Dong, H., Wang, Q.Y., Liu, X.P., Yao, Y.Q. (2014): Responses of stomata and Kranz anatomy of maize leaves to soil water shortages. *The Journal of Applied Ecology* 25(10), 2944-2950.
- Lija, M., Huruna, A. O., Kasim, S. (2014): Maize (*Zea mays*L.) nutrient use efficiency as affected by formulated fertilizer with Clinoptilolite Zeolite. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 26, 284-292.
- Lin, L., Nakagame, S., Yao, Y., Yoshioka, M., Shiraishi, N. (2001): Liquefaction mechanism of  $\beta$ -O-4 lignin model compound in the presence of phenol under acid catalysis. Part 2. Reaction behaviour and pathways. *Holzforschung* 55, 625-630.
- Leucuta, S., Vlase, L., Gocan, S., Radu, L., Fodorea, C. (2005): Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28, 3109-3117.
- Lin, Z. H., Chen, L. S., Chen, R.B., Zhang, F. Z., Jiang, H. X., Tang, N. (2009): CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Biology* 9, 43
- Lisjak M., Špoljarević M., Agić D., Andrić D. (2009). Praktikum iz Fiziologije biljaka. *Poljoprivredni fakultet u Osijeku*, 25.
- Logan, B.A., Kornyejev, D., Hardison, J., Holaday, A.S. (2006): The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynthetic Research* 88, 119-132.
- Loutfy, N., Azooz, M. M., Alhamd, M. F. A. (2020): Exogenously-applied Salicylic Acid and Ascorbic Acid Modulate some Physiological Traits and Antioxidative Defense System in *Zea mays* L. Seedlings under Drought Stress. *Egyptian Journal of Botany* 60, 313-324.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lucena, M. A., Romero-Arand, R., Mercado, J. A., Cuartero, J., Valpuesta, V., Quesada, M. A. (2003): Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum* 118, 422-429.
- Lukić, N., Trifković, T., Kojić, D., Kukavica, B. (2021): Modulations of the antioxidants defence system in two maize hybrids during flooding stress. *Journal of Plant Research* 134 (2), 237-248.
- Ludwig, M. (2012): Carbonic anhydrase and the molecular evolution of C4 photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* 35, 22-37.
- Ma, Y., Slewinski, T. L., Baker, R.F., Braun, D. M. (2009): Tiedyed1 encodes a novel, phloem-expressed transmembrane protein that functions in carbohydrate partitioning. *Plant Physiology* 149, 181-194.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.
- Majumdar, B., Venkatesh, M.S., Lal, B., Kumar, K. (2001): Response of soybean (Glycine max) to phosphorus and sulphur in acid alfisol of Meghalaya. *Indian Journal of Agronomy* 46, 500-505.
- Maksimović, L., Milić, S., Grahovac, N., Mladenović, D., Jakšić, S. (2011): Primena hidrogela u proizvodnji kupusa. *Tematski zbornik radova Melioracije 11, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za uređenje voda*, 157-164.
- Maksimović, L., Đalović, I., Adamović, D., Pejić, B. (2012): Dinamika vlažnosti zemljišta tokom 2012. godine u usevima nekih lekovitih biljnih vrsta pri konvencionalnoj i organskoj proizvodnji. *Bilten za alternativne biljne vrste* 44, 32–39.
- Malan, C., Greyling, M. M., Gressel, J. (1990): Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbred. *Plant Science* 69,157-166.
- Malekian, R., Abedi-Koupai, J., Eslamian, S.S., 2011. Influences of clinoptilolite and surfactant-modified clinoptilolite zeolite on nitrate leaching and plant growth. *Journal of Hazardous Materials* 185, 970-976.

- Malkin, R., Niyogi, K. (2000): Photosynthesis. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R. L. : Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists*, 568-628.
- Maroco, J.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C., Chaves, M.M. (2002): Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought—metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology* 29, 451-459.
- Martin-StPaul, N., Delzon, S., Cochard, H. (2017): Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecological Letters* 20, 1437-1447.
- Mattioli R., Constantino P., Trovato M. (2009): Proline accumulation in plants. *Plant Signaling and Behavior* 4, 1016-1018.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulías, J., Flexas, J. (2002): Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* 89, 895-905.
- Meisrimler, C.N., Buck, F., Lüthje, S. (2014). Alterations in soluble Class III peroxidases of maize shoots by flooding stress. *Proteomes* 2, 303-322.
- Mengel, K., Kirkby, E.A. (2001): Principles of Plant Nutrition, 5th Edition, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.
- Miller, A. F. (2004): Superoxid dismutases, active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 162-168.
- Minceva, M., Fajgar, R., Markovska, L., Meshko, V. (2008): Comparative Study of Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup>, Removal From Water Solution Using Natural Clinoptilolitic Zeolite and Commercial Granulated Activated Carbon. Equilibrium of Adsorption. *Separation Science and Technology* 43, 2117-2143.
- Ming, D. W., Allen, E. R. (2001). Use of natural zeolites in agronomy, horticulture and environmental soil remediation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 45(1), 619-654.
- Mohammadkhani, N., Heidari, R. (2007): Effects of Drought Stress on Protective Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Two Maize Cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 3835-3840.

- Mohammadkhani, N., Heidari, R. (2008 a): Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. *World Applied Sciences Journal* 3, 448-453.
- Mohammadkhani, N., Heidari, R. (2008 b): Effects of Drought Stress on Soluble Proteins in two Maize Varieties. *Turkish Journal of Biology* 32, 23-30.
- Moharramnejad, S., Valizadeh, M. (2019): key response of grain yield and superoxide dismutase in maize (*Zea mays*L.) to water deficit stress. *Journal of Plant Physiology and Breeding* 9 (2), 77-84.
- Moller, I. M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52,561–591.
- Morina, F., Jovanović, L., Mojovic, M., Vidović, M., Panković, D., Veljović- Jovanović, S., 2010. Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia plantarum*, 140 (3), 209-224.
- Mubarakshina, M., Khorobrykh, S., Ivanov, B. (2006): Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 1496-1503.
- Mumpton, F.A. (1999): La roca: Uses of Natural zeolites in agriculture and industry. *Geology, Mineralogy and Human Welfare* 96 (7), 3463-3470.
- Mundim, F. M., Pringle, E. G. (2018): Whole-Plant Metabolic Allocation Under Water Stress. *Frontiers in Plant Science* 9 (852).
- Muñoz, P., Munné-Bosch, S. (2018): Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. *Plant Physiology* 176, 1004-1014.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880.
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2013): ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports* 32, 959-970.

- Navari-Izzo F., Pinzino C., Quartacci, M. F., Sgherri, C. L. M. (1994): Intracellular membranes: kinetics of superoxide production and changes in thylakoids of resurrection plants upon dehydration and rehydration. *Proceeding of the Royal Society of Edinburgh 102 B*, 187-191.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F. and Sgherri, C., (2002): Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8),463-470.
- Nazarli, H., Zardashti, M. R., Darvishzadeh, R., Najafi, S. (2010): The Effect of Water Stress and Polymer on Water Use Efficiency, Yield and several Morphological Traits of Sunflower under Greenhouse Condition. *Notulae Scientia Biologicae 2*, 53-58.
- Nelissen, H., Sun, X.-H., Rymen, B., Jikumaru, Y., Kojima, M., Takebayashi, Y., Abbeloos, R., Demuyne, K., Storme, V., Vuylsteke, M., De Block, J., Herman, D., Coppens, F., Maere, S., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Beemster, G.T. and Inzé, D. (2018), The reduction in maize leaf growth under mild drought affects the transition between cell division and cell expansion and cannot be restored by elevated gibberellic acid levels. *Plant Biotechnology Journal 16*, 615-627.
- Nijse, J., Van der Heijden, G.W.A.M., Van Ieperen, W., Keijzer, C.J., Van Meeteren, U. (2001): Xylem hydraulic conductivity related to conduit dimensions along chrysanthemum stems. *Journal of Experimental Botany 52*, 319-327.
- Nio, S.A., Cawthray, G.R., Wade, L.J., Colmer, T.D. (2011): Pattern of solutes accumulated during leaf osmotic adjustment as related to duration of water deficit for wheat at the reproductive stage. *Plant Physiology and Biochemistry 49*, 1126–1137.
- Niyogi, K. K., Shih, C., Soon Chow, W., Pogson, B. J., Dellapenna, D., Björkman, O. (2001): Photoprotection in a zeaxanthin-and lutein deficient double mutant of Arabidopsis. *Photosynthetic Research 67*, 139-145 .
- Noctor, G., Veljović-Jovanović, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, H. (2002): Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of Botany 89*, 841-850.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998): A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *Journal of Experimental Botany 49*, 1895-1908.

- Nozari, R., Tohidi Moghadam, H. R., Zaheidi, H. (2013): Effect of cattle manure and zeolite applications on physiological and biochemical changes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] grown under water deficit stress. *Revista Científica UDO Agrícola* 13, 76-84.
- Oaks, A. (1996): Transport of amino acids to the maize root. *Plant Physiology* 41, 173-180.
- Osman, H.S. (2015): Enhancing antioxidant- yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. *Annals of Agricultural Sciences* 60, 389-402.
- Osmond, C.B. (1978): Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology* 29, 379-414.
- Pandey, H.C., Baig, M.J., Chandra, A., Bhatt, R.K. (2010): Drought stress induced changes in lipid peroxidation and antioxidant system in genus *Avena*. *Journal of Environmental Biology* 31 (4), 435-40.
- Park, H. J., Kim, W. Y., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J., Yun, D. J. (2011): SUMO and SUMOylation in plants. *Molecules and cells*, 32 (4), 305-316.
- Parry, M.A., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J., Keys, A.J. (2002): Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89, 833-839.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004): Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9, 534-540.
- Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., Obinger, C. (2007): Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos? *Gene* 397, 101-113.
- Pastore, D., Stoppelli, M. C., Di Fonzo, N., Passarella, S. (1999): The existence of the K<sup>+</sup> channel in plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 274, 26683-26690.
- Pastore, D., Fratianni, A., Di Pede, S., Passarella, S. (2000): Effect of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Letters* 470, 88-92.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., Passarella, S. (2001): Alternative oxidase in durum wheat mitochondria: activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role. *Plant and Cell Physiology* 42,1373-1382.



- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., Flagella, Z. (2007): Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: A case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany* 58, 195-210.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Zhang, Y. (2008): Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 59, 417-41.
- Peguero-Pina, J.J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrin, E., Moya, I. (2008): Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* 156, 1-11.
- Pennypacker, B.W., Leath, K.T., Stout, W.L., Hill, R.R. (1990): Technique for simulating field drought stress in the greenhouse. *Agronomy Journal* 82, 951-957.
- Perdomo, J. A., Capó-Bauçà, S., Carmo-Silva, E., Galmés, J. (2017): Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. *Frontiers in plant science*, (8), 490.
- Petrović, M., Štrbac, D. (1996). Fiziologija biljaka – praktikum. *Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjaluci*.
- Petrović, R., Čegar, N., Penavić-Škundrić, J., Lazić, D. (2011): Adsorpcija vodene pare na ZSM-5 zeolitu. *Glasnik hemičara, ekologičara i tehnologa Republike Srpske* 6, 11-16.
- Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja. *Profil, Zagreb*.
- Pisarović, A., Filipan, T., Tišma, S. (2003): Application of zeolite based special substrates in agriculture: ecological and economical justification. *Periodicum Biologorum* 105, 287-293.
- Pirzad, A., Mohammadzadeh, S. (2014). The effects of drought stress and zeolites on the protein and mineral nutrients of *Lathyrus sativus*. *International Journal of Biosciences* 4 (7), 241-248.
- Porkashefi, E.H., Gharineh, M.H., Shafeinia, A R., Roozrokh, M. (2016): The Effect of zeolite levels on chlorophyll fluorescence of red bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under drought tension conditions. *Crop Physiology Journal* 28, 32-39.
- Popović, V., Takač, A., Glogovac, S., Medić Pap, S., Červenski, J. (2015): Prinos semena i plodova kod indeterminantnih genotipova paradajza gajenih na četiri etaže. *Selekcija i Semenarstvo XXI (1)*, 43-56.

- Prins, A., van Heerden, P.D., Olmos, E., Kunert, K.J., Foyer, C.H. (2008): Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* 59 (7), 1935-1950.
- Prokić, Lj., Jovanović, Z., McAinsh, R.M., Vučinić Z., Stikić R. (2006): Species-dependent changes in stomatal sensitivity to abscisic acid mediated by external pH. *Journal of Experimental Botany* 57, 675-683.
- Queval, G., Jaillard, D., Zechmann, B. and Noctor, G., (2011): Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant, Cell & Environment*, 34 (1), 21-32.
- Ralph, J., Bunzel M., Marita, M.J., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabbe, J.H., Steinhart, H. (2004): Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews* 3, 79-96.
- Rauniyar, N., Stevens, S. M., Prokai, L. (2007): Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of covalent adducts of proteins and 4-hydroxy-2-nonenal, a reactive end-product of lipid peroxidation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (5), 1421-1428.
- Reddy, A.R., Chiatanya, K. V., Vivekanandan, M. (2004): Draught induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161, 1189-1202.
- Rhodes J. C. (2007): Zeolites: Physical Aspects and Environmental Applications. *Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section C: Physical Chemistry* 103, 287-325.
- 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, 933-956.
- Rivielli, A. R., Trotta, V., Toma, I., Fanti. P., Battaglia, D. (2013): Relation between plant water status and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera:Aphididae) population dynamics on three cultivars of tomato. *European Journal of Entomology* 110, 617-625.
- Robards, K., Prenzer, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry* 66, 401-436.

- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., Dure, L. (1993): Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5, 769-780.
- Robredo, A., Perez-Lopez, U., Miranda-Apodaca, J., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Munoz-Rueda, A. (2011): Elevated CO<sub>2</sub> reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* 71, 399-408.
- Ros Barceló, A., Gómez Ros, L.V., Esteban Carrasco, A. (2007): Looking for syringyl peroxidases. *Trends in Plant Science* 12, 486-491.
- Saarenketo, T. (1998): Electrical properties of water in clay and silty soils. *Journal of Applied Geophysics* 40 (1-3), 73-88.
- Sainju, U. M., Dris, R., Singh, B. (2003): Mineral nutrition of tomato. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1, 176-183.
- Sakata Y., Komatsu K., Takezawa D. (2014): ABA as a Universal Plant Hormone. In: Lüttge, U.: *Progress in Botany, Springer* 75, 57-96.
- Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi Shinozaki, K. (2006): Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292-1309.
- Sam, O., Jerez, E., Dell'Amico, J., Ruiz-Sanchez, M.C. (2000): Water stress induced changes in anatomy of tomato leaf epidermes. *Biologia Plantarum* 43, 275-277.
- Samaras, Y., Bressan, R. A., Csonka, L. N., Garcia-Rios, M., Paino D'Urzo, M., Rhodes, D. (1995): Proline accumulation during water deficit. In: Smirnoff, N. Environment and plant metabolism. *Flexibility and acclimation, Oxford: Bios Scientific Publishers.*
- Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Rosales, M.A., Ruiz, J.M. (2010): Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science* 178, 30-40.
- Sanders, G.J., Arndt, S.K. (2012): Osmotic Adjustment Under Drought Conditions. In: Aroca R. (eds) *Plant Responses to Drought Stress. Springer, Berlin, Heidelberg.*

- Santelia, D., Lawson, T. (2016): Rethinking Guard Cell Metabolism. *Plant Physiology* 172 (3), 1371-1392.
- Sass, J.E. (1940). Elements of botanical microtechnique. *McGraw Hill Book Co., New York*.
- Sauvage, C., Segura, V., Bauchet, G., Stevens, R., Thi Do, P., Nikoloski, Z., Fernie, A.R., Causse, M. (2014): Genome wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. *Plant Physiology* 165 (3), 1120-1132.
- Scandalios, J.G., Guan, L., Polidoros, A.N. (1997): Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Scandalios, J.: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA*, 343–406.
- Scheer H. (2003): The Pigments In: Light Harvesting Antennas in Photosynthesis, (Eds. B. R. Green W. Parson), *Kluwer Academic Publishers*, 29-81.
- Schnabl, H., Elbert, C., Krämer, G. (1982): The regulation of the starch-malate balances during volume changes of guard cell protoplasts. *Journal of Experimental Botany* 33, 996-1003.
- Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F., Bartels, D. (1993): Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189,120–131.
- Schwartz, A., Wu, W. H., Tucker, E. B., Assmann, S. M. (1994): Inhibition of inward K<sup>+</sup> channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 91, 4019-4023.
- Sevanto, S. (2014): Phloem transport and drought. *Journal of Experimental Botany* 65, 1751-1759.
- Shahsavari, N. (2019): Effects of Zeolite and Zinc on Quality of Canola (*Brassica napus* L.) Under Late Season Drought Stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 50, 1117-1122.
- Shamili, M., Dehghanpour, S., Atrash, S. (2020): Zeolite alleviates defense responses in drought stressed carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Plant Process and Function* 9, 27-36.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012, 1-26.

- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. & Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1305-1319.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6 (5), 410-417.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Skovsen, E., Snyder, J.W., Lambert, J.D., Ogilby, P.R. (2005): Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *Journal of Physical Chemistry B* 109, 8570–8573.
- Skriver, K., Mundy, J. (1990): Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant cell* 2(6), 503-512.
- Smeekens, S. (2000): Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 51, 49-81.
- Smirnoff, N. (1996): Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78(6), 661-669.
- Smirnoff, N. (2005): Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff, N., ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford:Blackwell Publishing, 53–86.
- Smirnoff, N. (2018): Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine* 122, 116-129.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A. (2015): Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 13561-13578.
- Spreitzer, R. J. (2003): Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 144 (2), 141-149.
- Stahl, W., Sies, H. (2003): Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24, 345-351.
- Stanković, Ž. (2010): Fiziologija biljaka. *Državni Univerzitet u Novom Pazaru, Novi Pazar, Srbija*.

Stanković, Ž., Petrović, M., Krstić, B., Erić, Ž. (2006): Fiziologija biljaka. *Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija.*

Statistički godišnjak Republike Srbije 2012. *Republički Zavod za statistiku Beograd, Republika Srbija.*

Statistički godišnjak Republike Srbije 2018. *Republički Zavod za statistiku Beograd, Republika Srbija.*

Shao, H.B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Abdul Jaleel, C., Hong-Mei, M. (2008): Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptus Rendus Biologie 331*, 433-441.

Subba, P., Mukhopadhyay, M., Mahato, S. K., Bhutia, K. D., Mondal, T. K., & Ghosh, S. K. (2014): Zinc stress induces physiological, ultra-structural and biochemical changes in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) seedlings. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 20, 461–473.

Sui, N., Li, M., Liu, X. Y., Wang, N., Fang, W., Meng, Q.W. (2007): Response of xanthophyll cycle and chloroplastic antioxidant enzymes to chilling stress in tomato over-expressing glycerol-3-phosphate acyltransferase gene. *Photosynthetica 45* (3), 447–54.

Sullivan, J., Shirasu, K., Deng, X. (2003): The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews Genetics 4*, 948-958.

Sun, L. H., Shen, L. T., Ye, S. (2007): Simultaneous overexpression of both Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology 164*, 1626-1638.

Sun, L., Yuan, B., Zhang, M., Wang, L., Cui, M., Wang, Q., Leng, P. (2012): Fruitspecific RNAi-mediated suppression of SINCED1 increases both lycopene and beta-carotene contents in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany 63*, 3097-3108.

Sun, X., Rikkerink, E.H.A., Jones, W.T., Uversky, V.N. (2013): Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *Plant Cell 25*, 38-55.

Škvorc, Ž., Sever, K., Franjić, J. (2013): Fiziologija šumskog drveća, interna skripta. *Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.*

- Tahervand, S., Jalali, M. (2017): Sorption and desorption of potentially toxic metals (Cd, Cu, Ni and Zn) by soil amended with bentonite, calcite and zeolite as a function of pH. *Journal of Geochemical Exploration* 181, 148-159.
- Takač, A., Gvozdrenović, Đ., Bugarski, D., Červenski, J. (2007): Savremena proizvodnja paradajza. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 43, 269-281.
- Takahama, U. (1989): A role of hydrogen peroxide in the metabolism of phenolics in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiology* 30, 295-301.
- Takahama, U., Oniki, T. (2006): A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101, 845-885.
- Takahama, U., (2004): Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3, 207-219.
- Takahashi, S., Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* 13 (4), 178-182.
- Takkar, P.N., Mann, M.S. (1978): Toxic levels of soil and plant zinc for maize and wheat. *Plant Soil* 49, 667-669 .
- Tapia, G., Méndez, J., Inostroza, L. (2016): Different combinations of morpho-physiological traits are responsible for tolerance to drought in wild tomatoes *Solanum chilense* and *Solanum peruvianum*. *Plant Biology* 18, 406-416.
- Tate, E.L., Gustard, A. (2000): Drought Definition: A Hydrological Perspective. In: Vogt, J.V., Somma, F. (eds) *Drought and Drought Mitigation in Europe. Advances in Natural and Technological Hazards Research, vol 14. Springer, Dordrecht.*
- Tausz, M., Bytnerowicz, A., Arbaugh, M.J., Wonisch, A., Grill, D. (2001): Multivariate patterns of biochemical responses of *Pinus ponderosa* trees at field plots in the San Bernardino Mountains, southern California. *Tree Physiology* 21, 329-336.
- Teisseire, H., Guy, V. (2000). Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science* 153 (1), 65-72.
- Terzi, R., Güler, N. S., Çalışkan, N., Kadioğlu, A. (2013): Lignification response for rolled leaves of *Ctenanthe setosa* under long-term drought stress. *Turkish Journal of Biology* 37, 614-619.

- Tombesi, S., Nardini, A., Farinelli, D., Palliotti, A. (2014): Relationships between stomatal behavior, xylem vulnerability to cavitation and leaf water relations in two cultivars of *Vitis vinifera*. *Physiologia Plantarum* 152, 453-464.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., Koca, H. (2005): Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168, 223-231.
- Tuteja N. (2007): Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling and Behavior* 2, 135-138.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K. (1999): A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant cell*, 11(9), 1743-1754.
- Ünyayar, S., Keleş, Y., Çekiç, F.Ö. (2005): The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Plant, Soil and Environment* 51, 57-64.
- Xiong L. (2007): Abscisic acid in plant response and adaptation to drought and salt stress. In: Jenks, M. A.: *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer 193-221.
- Xiubin H., Zhanbin H. (2001): Zeolite application for enhancing water infiltration and retention in loess soil. *Resources, Conservation and Recycling* 34, 45-52.
- Xu J., Zhang Y. X., Wei W., Han L., Guan Z. Q., Wang Z., Chai, T.Y. (2008): BJDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. *Molecular Biotechnology* 38, 91-98.
- Xu, F., Guo, W., Xu, W., Wei, Y., Wang, R. (2009): Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? *Progress in Natural Science* 19 (12), 1789-1798.
- Xu D. H., Wang X. W., Wang G. (2012): Ecophysiological responses of *Caragana korshinskii* Kom. under extreme drought stress: Leaf abscission and stem survives. *Photosynthetica* 50, 541-548.



- Xu, Z. Z., Zhou, G. S. (2005): Effects of water stress on photosynthesis and nitrogen metabolism in vegetative and reproductive shoots of *Leymus chinensis*. *Photosynthetica* 43, 29-35.
- Xun-Liang, L., Hai-Dong, Y., Yuan, G., Ji-Kai, L., Fang-Qing, G. (2012): Carbonylation and Loss-of-Function Analyses of SBPase Reveal Its Metabolic Interface Role in Oxidative Stress, Carbon Assimilation, and Multiple Aspects of Growth and Development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 5 (5), 1082-1099.
- 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.
- Yamuna Devi S., Surendran A., Thatheyus A. J. (2020): Bioremoval of Zinc Using the Tomato Plant, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Public Health International* 3, 7-19.
- Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B., Wang, J. (2008): Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 433-440.
- Yao, X., Chu, J., Liang, L., Geng, W., Li, J., Hou, G. (2012): Selenium improves recovery of wheat seedlings at rewatering after drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 59, 701-707.
- Yazdi, M.T., Khaleghparast, S., Monsef, H.R. (2002): Purification and some partial characterization of peroxidase isoenzyme from *Brassica oleracea capitata* L. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 13, 107-112.
- Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C., Akashi, K. (2002): Citrulline and DRIP-1 Protein (ArgE Homologue) in Drought Tolerance of Wild Watermelon. *Annals of Botany* 89, 825–832.
- Yoshida, T., Mogami, J. and Yamaguchi-Shinozaki, K., (2014): ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current opinion in plant biology* 21, 133-139.
- Young, A.J., Lowe, G.M. (2001): Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385, 20-27.

- Yuan, Y., Qi, L., Yang, J., Wu, C., Liu, Y., Huang, L. (2015): A *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB gene, SbMYB8, regulates flavonoid biosynthesis and improves drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures* 120, 961-972.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1997): Alternative oxidase: from gene to function. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 703-734.
- Veljović-Jovanović, S., (1998): Active oxygen species and photosynthesis: Mehler and ascorbate peroxidase reactions. *Iugoslavica Physiologica et Pharmacologica Acta* 34, 503-522.
- Veljović Jovanović, S. (2015): Carbon allocation from source to sink leaf tissue in relation to flavonoid biosynthesis in variegated *Pelargonium zonale* under UV-B radiation and high PAR intensity. *Plant Physiology and Biochemistry* 93, 44-55.
- Veljović-Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer, Cham, 269-300.
- Vidović, M., Morina, F., Milić, S., Albert, A., Zechmann, B., Tosti, T., Barbro Winkler, J., Vilagrosa, A., Chirino, E., Peguero-Pina, J.J., Barigah, T.S., Cochard, H., Gil-Pelegrin, E. (2012): Xylem cavitation and embolism in plants living in water-limited ecosystems. In: Aroca, R. (ed) *Plant responses to drought stress*, Springer, Berlin, Heidelberg, 63-109.
- Voelker, S.L., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C., Kitin, P., Strauss, S.H. (2011): Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant, Cell & Environment* 34, 655-668.
- Von Wettstein, D. (1957). Genetics and the submicroscopic cytology of plastids. *Hereditas* 43, 303-317.
- Vukadinović, V. (1999): Ekofiziologija. *Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni Fakultet*.
- Wahb-Allah, M.A., Alsadon, A.A., Ibrahim, A.A (2011): Drought tolerance of several tomato genotypes under greenhouse conditions. *World Applied Sciences Journal* 15, 933-940.

- Wu, W., Pang, Y., Shen, G.A., Lin, J., Wang, J., Sun, X., Tanq, K. (2006): Molecular cloning, characterization and expression of a novel trehalose-6-phosphate synthase homologue from *Ginkgo biloba*. *Journal of Biochemistry and molecular biology* 39, 158-166.
- Wu, Q., Chi, D., Xia, G., Chen, T. (2019). Effects of Zeolite on Drought Resistance and Water–Nitrogen Use Efficiency in Paddy Rice. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering* 145 (11), 1-10.
- Wang, X., Zhang, M. M., Wang, Y. J., Gao, Y. T., Li, R., Wang, G. F., Li, W. Q., Liu, W. T., Chen, K. M. (2016): The plasma membrane NADPH oxidase OsRbohA plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice. *Physiologia Plantarum* 156 (4), 421-43.
- Wang, Y., Sperry, J.S., Venturas, M.D., Trugman, A.T., Love, D.M., Anderegg, W.R. (2019): The stomatal response to rising CO<sub>2</sub> concentration and drought is predicted by a hydraulic trait-based optimization model. *Tree Physiology* 39, 1416-1427.
- Weisz, P.R., Randall, H.C., Sinclair, T.R. (1989): Water relations of turgor recovery and restiffening of wilted cabbage leaves in the absence of water uptake. *Plant Physiology* 91(1):433-439.
- Winter, K., Smith, J.A.C. (1996): An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. In: Winter, K., Smith, J.A.C: Biochemistry, ecophysiology and evolution. *Springer-Verlag, Berlin*, 1-13.
- Wise, M. J., Tunncliffe, A. (2004): POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9, 13-17.
- Woith, E., Stintzing, F., Melzig, M.F. (2017): SOD activity and extremophilicity: a screening of various plant species. *Pharmazie* 72(8), 490-496.
- Woodward, R.B., Ayer, W.A., Beaton, J.M., Bickelhaupt, F., Bonnett, R., Bauchschacher, P., Closs, G. L., Dutler, H., Hannah, J., Hauck, F. P., Itô, S., Lngemann, A., Le, Goff, E., Leimgruber, W., Lwowski, W., Sauer, J., Valenta, Z., Voiz, H. (1960): The total synthesis of chlorophyll. *Journal of the American Chemical Society*, 82, 3800-3802.

Wu, T.Y., Urano, D. (2018): Genetic and Systematic Approaches Toward G Protein-Coupled Abiotic Stress Signaling in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1378. Published 2018 Sep 20. doi:10.3389/fpls.2018.01378

Zarebanadkouki, M., Trtik, P., Hayat, F., Carminati, A., Kaestner, A. (2019): Root water uptake and its pathways across the root: quantification at the cellular scale. *Scientific Reports* 9, 12979.

Zhu J.K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.

Zelitch, I. (1967): Control of leaf stomata- their role in transpiration and photosynthesis. *American Scientist* 55 (4), 472-486.

Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., Gaxiola, R., Covarrubias, A. A., Nieto-Sotelo, J., Thevelin, J. M., Ituriaga, G. (1999): A *Selaginella lepidophylla* Trehalose 6-Phosphate Synthase Complements Growth on Stress-Tolerance Defects in a Yeast *tps-1* Mutant. *Plant Physiology* 119 (4), 1473- 1482.

Zdunek E., Lips H. (2001): Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *Journal of Experimental Botany* 52, 1269-1276.

Zgallai, H., Steppe, K., Lemeur, R. (2006): Effects of different levels of water stress on leaf water potential, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain anti-oxidative enzymes in tomato plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 48, 679-685.

Zhang, W., Tian, Z., Pan, X., Zhao, X., Wang, F. (2013): Oxidative stress and non-enzymatic antioxidants in leaves of three edible canna cultivars under drought stress. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 54, 1–8.

Zwingmann, N., Singh, B., Mackinnon, I. D. R., Gilkes, R. J. (2009); Zeolite from alkali modified kaolin increases NH<sub>4</sub><sup>+</sup> retention by sandy soil: Column experiments. *Applied Clay Science* 46, 7-12.

Živanović, B., Milić Komić, S., Tosti, T., Vidović, M., Prokić, L., Veljović Jovanović, S. (2020): Leaf Soluble Sugars and Free Amino Acids as Important Components of Abscisic Acid-Mediated Drought Response in Tomato. *Plants* 9, 1147.

[https://solgenomics.net/about/solanum\\_nomenclature.pl](https://solgenomics.net/about/solanum_nomenclature.pl)

## BIOGRAFIJA AUTORA



Dino (Ilijas) Hasanagić, rođen je 28.09.1981. godine u Prijedoru (Bosna i Hercegovina). Srednju medicinsku školu u Prijedoru završio je 2000. godine, a studije biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Banjoj Luci upisao je 2006. godine te ih završio 2010. godine sa prosječnom ocjenom 9 i time stekao zvanje Diplomirani biolog. Master studije biologije završio je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Sarajevu 2014. godine sa prosječnom ocjenom 9,6 i time stekao akademsko zvanje Magistar biologije-usmjerenje biohemija i fiziologija. Doktorske studije biologije upisao je na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu 2015. godine. Od 2011. godine zaposlen je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci u svojstvu asistenta, gdje je do danas bio angažovan u realizaciji praktične nastave na predmetima iz uže naučne oblasti biohemija i molekularna biologija. Više puta je odlazio na stručna usavršavanja iz oblasti svog naučnog polja na nekoliko prestižnih univerziteta kao što su Fakultet za nauku i tehnologiju u Krakovu (AGH University of Science and Technology), Fakultet za poljoprivredu, prehrambenu tehnologiju i ekologiju u Jerusalimu (The Hebrew University, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment), Centar za doktorske i postdoktorske studije Univerziteta Balearskih ostrva na Palma de Majorci (UIB University of Balearic Islands). Tokom rada publikovao je veći broj radova u međunarodnim i nacionalnim naučnim časopisima, a svoje polje istraživanja fokusirao je na biohemijsko-fiziološke procese kod biljaka u uslovima stresa. Učestvovao je kao saradnik u velikom broju međunarodnih i nacionalnih istraživačkih projekata i ostvario značajnu naučnu saradnju iz svog istraživačkog polja, kako u zemljama regiona tako i u inostranstvu. Tokom rada više puta je nagrađivan od strane Ministarstva za naučno tehnološki razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske, kao i od strane Univerziteta u Banjoj Luci za ostvarena naučna dostignuća i publikaciju radova u međunarodnim časopisima. Tokom studija na svim nivoima (osnovne, master i doktorske) bio je stipendista Vlade Republike Srpske. Aktivno je posvećen razvoju laboratorijskih eksperimenata u oblasti biohemije biljaka kombinujući znanja sa kolegama iz sličnih naučnih disciplina.

---

*Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.*

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
Ефекат зеолита на параметре антиоксидативног статуса код парадајза ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) и кукуруза ( <i>Zea mays</i> L.) у условима суше
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет б) Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Новом Саду.  Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом су део пројекта под називом: „Испитивање улоге зеолита у умањенју оксидативних оштећења биљака парадајза и пасуља насталих под утицајем различитих абиотичких фактора“ (број 9/06-020/961-23/15) финансираног од стране Министарства за научнотехнолошки развој, високо образовање и информационе системе Републике Српске.
<b>1. Опис података</b>
1.1 Врста студије  <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i>  <u>Докторска дисертација</u>
1.2 Врсте података  <input checked="" type="radio"/> а) квантитативни <input type="radio"/> б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података  а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту \_\_\_\_\_

г) административни подаци: навести врсту \_\_\_\_\_

д) узорци ткива: навести врсту \_\_\_\_\_

ђ) снимци, фотографије: навести врсту \_\_\_\_\_

е) текст, навести врсту преглед литературе \_\_\_\_\_

ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_

з) остало: описати лабораторијски експерименти и мерења \_\_\_\_\_

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека \_\_\_\_\_

б) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_

в) PDF фајл, датотека pdf \_\_\_\_\_

г) Текст фајл, датотека word.doc \_\_\_\_\_

д) JPG фајл, датотека jpg, tiff \_\_\_\_\_

е) Остало, датотека \_\_\_\_\_

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 120 \_\_\_\_\_

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број \_\_\_\_\_

#### 1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је дефинисан примењеном методом
- б) варијабле које се више пута мере односе се на испитиване карактеристике анализираних система
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

а) *Да*

б) *Не*

*Ако је одговор не, образложити* \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип анализа биохемијских и физиолошких карактеристика система
- б) корелационо истраживање, навести тип корелациони коефицијенти
- ц) анализа текста, навести тип прикупљање података из литературних извора
- д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

UV-Vis спектрофотометар, сет за вертикалну полиакриламидну електрофорезу протеина, LC-MS-MS течни хроматограф, Shimadzu 7000 AA атомски апсорпциони спектрофотометар, Апарат за мјерење протока гасова кроз стоме (portable photosynthesis system, LCi-SD), Свејтлосни микроскоп повезан са дигиталном камером Leica EC3 i софтвером за обраду података (Leica Acquire software).



## 2.2 Квалитет података и стандарди

### 2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да  Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

\_\_\_\_\_

### 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Статистичком проценом добијених резултата и поређењем експерименталних и теоријских података \_\_\_\_\_

### 2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Статистичком контролом изведеног резултата \_\_\_\_\_

## 3. Третман података и пратећа документација

### 3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду \_\_\_\_\_.

3.1.2. *URL адреса* \_\_\_\_\_

3.1.3. *DOI* \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

a) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром?  Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача?  Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити

---

## 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

#### 4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

#### 4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
  - б) Подаци су анонимизирани
  - ц) Остало, навести шта
- 

## 5. Доступност података

### 5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:*

Уз претходну комуникацију и писмено одобрење власника података

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:* Добијањем шифре власника података за приступ подацима који су похрањени у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду

*5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.*

Ауторство – некомерцијално – без прераде

## 6. Улоге и одговорност

*6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података*

Дино Хасанагић, е-mail: dino.hasanagic@pmf.unibl.org

*6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима*

Дино Хасанагић, е-mail: dino.hasanagic@pmf.unibl.org

*6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима*

Дино Хасанагић, е-mail: dino.hasanagic@pmf.unibl.org