



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



**EFEKTI VODNOG DEFICITA I
SUFICITA NA ANTIOKSIDATIVNI
SISTEM ZAŠTITE KOD DVA
HIBRIDA KUKURUZA (*Zea mays* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:
Prof. dr Danijela Kojić
Prof. dr Biljana Kukavica

Kandidat:
Nataša Lukić

Novi Sad, 2021. godine



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY AND ECOLOGY



**EFFECTS OF DROUGHT AND
FLOODING STRESS ON
ANTIOXIDATIVE DEFENCE SYSTEM
IN TWO MAIZE (*Zea mays* L.) HYBRIDS**

PhD THESIS

Supervisors:
Prof. dr. Danijela Kojić
Prof. dr. Biljana Kukavica

Student:
Nataša Lukić

Novi Sad, 2021

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Наташа Лукић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Данијела Којић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду Др Биљана Кукавица, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Бањој Луци
Наслов рада:	Ефекти водног дефицита и суфицита на антиоксидативни систем заштите код два хибрида кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница <u>233</u> Поглавља <u>8</u> Референци <u>496</u> Табела <u>26</u> Слика <u>51</u> Прилога <u>3</u>
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Биохемија
Кључне речи / предметна одредница:	Оксидативни стрес, Антиоксидативни механизми заштите, кукуруз, водни дефицит, водни суфицит
Резиме на језику рада:	Евидентне климатске промене доводе до измена не само у смислу запремине већ и расподеле падавина, па су последично све чешће смене периода екстремних водних дефицита и суфицита. Водни дефицит и суфицит утичу на раст и развој биљака тако што доводе до инхибиције фотосинтезе, оксидативних оштећења хелијских компоненти те промена у респирацији. Циљ ове дисертације је био да се утврде ефекти водног суфицита и дефицита на физиолошке, оксидативне и антиоксидативне параметре код два хибрида кукуруза (ЗП 555 и ЗП 606). Водном суфициту су подвргнуте биљке у трајању од 6, 24, 72 и 144 сати, а водном дефициту у трајању од 8 и 15 дана, са одговарајућим контролним биљкама. Листови контролних и третираних биљака су кориштени за одређивање следећих параметара: физиолошких (релативног садржаја воде (RWC), концентрације фотосинтетичких пигмената, солубилних

¹ 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.

	<p>протеина, слободног пролина), оксидативних (концентрације малондиалдехида – MDA и H₂O₂) и антиоксидативних (неензимских - концентрација полифенола, и ензимских компоненти - активности антиоксидативних ензима: супероксид дисмутасе (SOD, EC 1.15.1.1), каталазе (CAT, EC 1.11.1.6), аскорбат пероксидазе (APX, EC 1.11.1.11) и пероксидаза Класе III (POX, EC 1.11.1.7)). Резултати добијени излагањем биљака водном суфициту и дефициту су показали различит одговор хибрида на поплаву и сушу и значајне интерхибридне разлике када је у одговор на поплаву или сушу.</p> <p>Промене у процесу фотосинтезе су детектоване кроз промене концентрације фотосинтетичких пигмената. При условима водног суфицита измерен је пораст концентрације хлорофила <i>a</i> и <i>b</i>, те каротеноида код хибрида ЗП 555. Са друге стране, смањена концентрација хлорофила <i>b</i> и каротеноида измерена је код хибрида ЗП 606 након 24 сата водног суфицита. Хибрид су имали истоветан одговор на водни дефицит, где је детектовано смањење концентрације хлорофила <i>a</i> и каротеноида те повећање концентрације хлорофила <i>b</i>. Као последица водног суфицита детектована је и повећана концентрација солубилних протеина код оба испитивана хибрида. Виши нивои оксидативног стреса при условима водног суфицита су видљиви кроз повећану производњу водоник пероксида код хибрида ЗП 555. Водни суфицит је за последицу имао већу активност SOD и POX, те повећану концентрацију укупних полифенола код оба испитивана хибрида. Систем полифеноли/POX код хибрида ЗП 606, при условима водног суфицита, омогућио је овом хибриду да брзо и ефикасно уклони повећане концентрације водоник пероксида. Са друге стране, при условима водног дефицита детектовано је смањење концентрације солубилних протеина и пролина. Смањење концентрације пролина, при водном дефициту има за последицу дисбаланс у осмотском потенцијалу биљне ћелије. Осетљивост тестираних хибрида на водни дефицит је уочљива при пролонгираном излагању овом стресу, који је за последицу имало повећање концентрације водоник пероксида (код хибрида ЗП 555) и степена липидне пероксидације (код оба хибрида). Са друге стране, повећане активности SOD, CAT и POX су измерени код хибрида ЗП 555 при излагању водном дефициту. Антиоксидативни одговор хибрида ЗП 606 на стрес изазван водним дефицитом је био у смислу повећања активности SOD. Смањена концентрација полифенола измерен је код оба испитивана хибрида при условима водног дефицита. Смањење концентрације MDA и H₂O₂, повећање активности антиоксидативних ензима заједно са повећањем концентрације неензимских компоненти, те акумулација осмопротектаната се може узети као маркер за одређивање толерантних генотипова биљака. Тако, већа антиоксидативна активност, заједно са смањеном концентрацијом H₂O₂ може представљати бољу адаптираност и толерантност хибрида ЗП 606 на водни суфицит у односу на хибрид ЗП 555. Са друге стране, повећана концентрација MDA, смањена синтеза протеина, те слободног пролина, као и смањена концентрација полифенола води ка закључку да су оба испитивана хибрида кукуруза подједнако</p>
--	--

	неотпорна на стрес изазван водним дефицитом у условима трајања суше од 15 дана код биљака старости 30 дана.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	12. 05. 2020.
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 Едвард Петри, ванредни професор Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Данијела Мишић, научни саветник Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"- Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду</p> <p>Члан: др Данијела Којић, редовни професор Природно-математички факултет Универзитет у Новом Саду, ментор</p> <p>Члан: др Биљана Кукавица, редовни професор Природно-математички факултет Универзитет у Бањој Луци, ментор</p>
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Nataša Lukić
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:	Effects of drought and flooding stress to antioxidative defence system in two maize (<i>Zea mays</i> L.) hybrids
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages <u>233</u> Chapters <u>8</u> References <u>496</u> Tables <u>26</u> Illustrations <u>51</u> Appendices <u>3</u>
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Biochemistry
Subject, Key words:	Oxidative stress, Antioxidants, flooding stress, drought stress, maize.
Abstract in English language:	Plants are continuously challenged by the rising incidence of drought and flooding as a consequence of global warming. These stresses may cause severe depression in the plant's growth by inhibiting photosynthesis, inducing oxidative cell damage, and cell respiration changes. The present work aimed to study the effect of flooding and drought stress on physiological, oxidative, and antioxidative parameters in leaves of two maize hybrids (ZP 555 and ZP 606). Maize plants` leaves at the stage of three fully developed leaves were harvested after 6, 24, 72, and 144 hours of applied flooding stress and after 8 and 15 days after applied drought stress. Leaves from experimental plants and control plants were used for the determination of physiological (relative water content (RWC), the content of photosynthetic pigments and

² 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 he faculty and are not included into the printed thesis.

soluble proteins, proline), oxidative stress parameters (the content of malondialdehyde (MDA) and H₂O₂), as well as antioxidants (the total polyphenols content (Phe), and activity of antioxidative enzymes [catalase (CAT, EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbate peroxidases (APX, EC 1.11.1.11), and Class III peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)]). Results indicated that drought and flooding stress-induced time-dependent changes of measured parameters and those hybrids differ in stress response. Changes in photosynthesis can be seen through modifications in photosynthetic pigments concentration. An increase in the concentration of chlorophylls and carotenoids have been noted during flooding in ZP 555 hybrids. On the other hand, flooding stress decreased the chlorophyll *b* and carotenoid concentrations in ZP 606 hybrids. A decrease in the concentration of chlorophyll *a* and carotenoids and an increase in chlorophyll *b* concentration were a response of both examined hybrids on drought stress. Also, intensive protein synthesis was noted in both hybrids during flooding. More intensive oxidative stress levels were correlated with an increase in H₂O₂ in hybrid ZP 555. Induced SOD and POX activities and concentration of polyphenols were detected in both hybrids during flooding stress. Polyphenols/POX system provided faster hydrogen peroxide displacement cells of ZP 606 hybrids. On the other hand, a decline in the concentration of soluble proteins and proline was drought-stress induced. The drought-induced decrease in proline concentration caused a disbalance in cell osmotic potential. The sensitivity of the tested hybrids to water deficit was noted during the prolongation of this stress, which caused an increase in the hydrogen peroxide concentration (in hybrids ZP 555) and lipid peroxidation (in both hybrids). Moreover, a drought-induced increase in the activity of antioxidative enzymes, SOD (both hybrids), CAT and POX (only ZP 555) was noted. A decline in the concentration of polyphenols caused by drought stress makes both hybrids drought sensitive. The decrease in the concentration of MDA and H₂O₂, followed by an increase in activity in antioxidative enzymes and concentration of nonenzymic, together with an increase in osmoprotectants accumulation, presents valuable tools for the selection of flooding/drought-tolerant plants. The present study results suggest that a more robust antioxidative metabolism is essential under flooding stress and could be a protective strategy against

	oxidative damage induced by flooding in ZP 606 maize plants compared to ZP 555 plants. On the other hand, enlarge in the concentration of MDA, followed by a decrease in protein, proline and polyphenols concentration, suggests that both tested 30 days old hybrids are defenceless against oxidative damage induced by 15-days drought stress.
Accepted on Scientific Board on:	12. 05. 2020.
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. Edvard Petri, associate professor Faculty of Sciences University of Novi Sad</p> <p>Member: dr. Danijela Mišić, principal research fellow Institute for Biological Research “Siniša Stanković”– National Institute of Republic of Serbia University of Belgrade</p> <p>Member: dr. Danijela Kojić, full professor Faculty of Sciences University of Novi Sad, mentor</p> <p>Member: dr. Biljana Kukavica, full professor Faculty of Natural Sciencis and Mathematics University of Banja Luka, mentor</p>
Note:	

Zahvalnica

Približavanjem kraju ovog značajnog stepena studija i obrazovanja, uz neopisivo zadovoljstvo, sreću i osećaj lične ispunjenosti, želela bih da se duboko i iskreno zahvalim izuzetnim ljudima koji su mi na bilo koji način na ovom putu pomogli.

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji za biohemiju i molekularnu biologiju, na Odseka za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Disertacija je urađena u okviru istraživanja na projektu pod nazivom: „Istraživanja biohemijskih mehanizama odgovora biljaka na hipoksiju i povećanu koncentraciju reaktivnih vrsta kiseonika pod uticajem poplave i suše“ (br. projekta 19/6-020/961-118/18), koji je finansiran od strane Ministarstva za naučnotehnološki razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske.

Pre svega, najveću zahvalnost želim da izrazim mojim dragim mentorkama dr Danijeli Kojić, redovnom profesoru na Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i dr Biljani Kukavici, redovnom profesoru na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Banjoj Luci, koje su mi pružile dragocenu i nesebučnu stručnu pomoć, ne samo u pisanju disertacije, već i tokom celokupnih doktorskih studija. Posebno im se zahvaljujem na strpljenju pri izradi samih eksperimenata i beskonačnim konsultacijama. Prof. dr Biljani Kukavici dugujem dodatnu zahvalnost što me je prihvatila u svoju laboratoriju i omogućila mi da učestvujem u naučnoistraživačkim projektima, a time me uvela u neverovatan i zanimljiv svet nauke.

Veliku zahvalnost uputila bih i uvaženim članovima Komisije dr Jeleni Purać, redovnom profesoru na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, dr Edvardu Petriju, vanrednom profesoru na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, te dr Danijeli Mišić, naučnom savetniku na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na posvećenosti i izdvojenom vremenu i korisnim sugestijama koje su znatno uticale na kvalitet ove doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem dr Danijeli Mišić i dr Urošu Gašiću, višem naučnom saradniku na Institutu za Multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na pomoći pri detekciji, razdvajanju i kvantifikaciji polifenola UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS metodom.

Ovim putam bih želela da se zahvalim i Danijeli Kondić sa Univerziteta u Banjoj Luci na obezbeđenim semenima kukuruza bez kojih ne bi bilo ni ove disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem dr Mirjani Žabić, redovnom profesoru na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Banjoj Luci, sa kojom sam imala zadovoljstvo sarađivati prilikom HPLC merenja i snimanja spektara.

Veliku zahvalnost upućujem i dragoj Tanji Trifković na nesebičnoj pomoći pri postavljanju eksperimenta i pri izradi praktičnog dela doktorske disertacije. Tanja, veliko Ti hvala na izdvojenom vremenu, posvećenosti i nezaboravnim trenucima u laboratoriji.

Imam zadovoljstvo da ovom prilikom spomenem imena članova Laboratorije za biohemiju i molekularnu biologiju Odseka za biologiju Univerziteta u Banjoj Luci koji su me od prvog dana srdačno prihvatili i učinili da se osećam kao potpuno ravnopravni član njihovog tima. Kolegi MSc Dinu Hasanagiću i prof. dr Biljani Davidović-Plavšić, sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci na pomoći pri postavljanju eksperimenta i pri izradi praktičnog dela doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i Ministarstvu prosvjete i kulture, Ministarstvu za naučnotehnološki razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske, te Fondu „dr Milan Jelić“ za finansijsku pomoć tokom mojih studija i izrade ove doktorske disertacije.

Dragoj prijateljici MSc Neveni Šuškalović iskazujem posebnu zahvalnost na dragocenoj pomoći pri izradi praktičnog dela disertacije i ogromnoj i nesebičnoj podršci tokom svih godina zajedničkog rada i druženja.

Želela bih izraziti zahvalnost dragoj Mariji Mirić i njenoj porodici na logističkoj, tehničkoj, moralnoj, emotivnoj i svakoj drugoj podršci. Draga Marija, nemam dovoljno reči kojima bih dovoljno opisala moju zahvalnost.

Veliko hvala svim ostalim mojim dragim prijateljima koji su bili uz mene sve ove godine bez kojih dragoceni trenuci mog slobodnog vremena ne bi bili tako ulepšani i ispunjeni.

Ovu doktorsku disertaciju od srca posvećujem onima koji imaju najveću zaslugu za to što sam danas, mojoj porodici – mami Ranki i bratu Dragiši. Hvala im na bezrezervnoj veri, podršci i požrtvovanosti. Hvala vam za beskrajnu podršku i oslonac koji su kroz život značajno doprineli mojim uspesima. I na kraju, veliko hvala mom dragom Danilu za pruženu ljubav, podršku, razumevanje i strpljenje tokom proteklih godina sa kojima je sve bilo lepše i lakše.

Novi Sad, 2021. godine

Nataša Lukčić

Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less...

Marie Curie

Lista skraćenice

AA	askorbinska kiselina
ABA	abscicinska kiselina,
ACC	1-amino cikopropan 3-fosfat dehidrogenaza
ADH	alkohol dehidrogenaza
ADH	alkohol dehidrogenaza,
AOS	antioksidativni sistem zaštite
APS	amonijum persulfat
APX	askorbat peroksidaze
BADH	betain aldehid dehidrogenaza
CAT	katalaze
Car	karotenoidi
Chl <i>a</i>	hlorofil <i>a</i>
Chl <i>b</i>	hlorofil <i>b</i>
CK	citokinin
DAD	diodni detektor
DHA	dehidroaskorbinska kiselina
EDTA	etilendiamintertra sirćetna ksileina
ENO	enolaza
EPO	eozinofil peroksidaza
ETC	elektrontransportni lanac
FAO	Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija
FS I	fotosistem I
FS II	fotosistem II
GABA	gama aminobuterna kiselina,
GAD	glutamat dehidrogenaza,
GA	giberelinska kiselina,
GAPD	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze
GSH	glutation
GSSG	oksidovani glutation
HGH	homogentizinska kiselina
HNE	4-hidroksinonenal
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi

HSP	proteini termalnog stresa
IAA	indol-3-sirćetne kiseline
IPT	izopentenil-transferaze
JA	jasmonska kiselina
LDH	laktat dehidrogenaza,
LEA	engl. <i>late embryogenesis abundant</i> („proteini sazrevanja“)
LPO	leuko peroksidaza
MDA	malondialdehid
MPO	mijeloperoksidaza
Na Pi	natrijum-fosfatni pufer
NBT	nitro blue tetrazolijum
NCED3	9-cis epoksikarotenoid deoksigenaze
OAT	ornitin TM-aminotransferaza
P5CR	pirolin-5-karboksil reduktaza
PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
PAL	fenilalanin aminotransferaza
PDC	piruvat dekarboksilaza
PDP	fitil difosfat
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorid
POX	peroksidaze
PUFA	polinezasićene masne kiseline
PVP	polivinilpirolidon
ROS	reaktivne vrste kiseonika
Rubisco	ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
RuBP	ribulozo-1,5-bisfosfata
RWC	relativni sadržaj vode
SA	salicilna kiselina
SDS	natrijum dodecilsulfat
SOD	superoksid dismutaza
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trihlorsirćetna kiselina
TEMED	tetrametiletildiamid
TPO	tireoidna peroksidaza
Tween	polioksietilen sorbitol estar

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Abiotički ekološki faktori	5
2.2. Voda kao stresni faktor	6
2.2.1. Vodni suficit	6
2.2.2. Vodni deficit	16
2.3. Reaktivne vrste kiseonika	27
2.4. Oksidativni stres	31
2.4.1. Lipidna peroksidacija.....	33
2.5. Antioksidativni metabolizam	36
2.5.1. Enzimski antioksidanti.....	39
2.5.2. Neenzimski antioksidanti.....	48
2.5.3. Oksidativni stres i antioksidativni metabolizam u uslovima vodnog suficita i deficita	53
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	59
4. MATERIJAL I METODE	61
4.1. Biljke korištene u eksperimentu	62
4.2. Postavka eksperimenta i priprema uzoraka	66
4.3. Određivanje fizioloških parametara	71
4.3.1. Određivanje relativnog sadržaja vode (RWC)	71
4.3.2. Određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata	72
4.3.3. Određivanje koncentracije proteina	73
4.3.4. Određivanje koncentracije prolina.....	74
4.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa	75
4.4.1. Određivanje koncentracije MDA.....	75
4.4.2. Određivanje koncentracije H ₂ O ₂	77
4.5. Određivanje parametara antioksidativnog sistema	78
4.5.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	78
4.5.2. Određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza Klase III (POX)	79
4.5.3. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)	80
4.5.4. Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (PAGE).....	81
4.5.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD).....	84
4.5.6. Specifično bojenje POX.....	85
4.5.7. Određivanje koncentracije polifenola	86

4.6. Statistička obrada podataka	91
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	92
5.1. Ispitivanje efekata vodnog suficita na dva hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606	93
5.1.1. Fizičko-hemijski parametri vode u kojoj su biljke bile potopljene tokom tretmana	93
5.1.2. Fiziološki parametri	95
5.1.3. Parametri oksidativnog stresa.....	102
5.1.4. Antioksidativni sistem zaštite.....	108
5.2. Ispitivanje efekata vodnog deficita na dva hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606 ...	127
5.2.1. Fiziološki parametri	128
5.2.2. Parametri oksidativnog stresa.....	138
5.2.3. Antioksidativni sistem zaštite.....	142
5.3. Razlike u metaboličkom odgovoru između hibrida kukuruza pri vodnom suficitu i deficitu	165
6. ZAKLJUČCI	169
7. LITERATURA	173
8. PRILOZI.....	224

1. Uvod

Biljke kao sesilni organizmi su vrlo često izložene različitim abiotičkim i biotičkim faktorima iz okoline. Sa druge strane, globalno zagrevanje povlači za sobom i promene u padavinama, ne samo u smislu zapremine već i njihove raspodele, pa su posledično sve češće smene perioda ekstremnih vodnih deficita i suficita. Upravo zbog toga, vodni deficit i suficitu su najvažniji abiotički stresori koji negativno utiču na rast i razvoj biljaka. Vodni deficit i suficit su posledica promene klime u skoro svim područjima na svetu, posebno veliki problem izaziva vodni deficit u aridnim ili poluaridnim biotopima.

Danas vrlo evidentni faktori kao što su, promene količine padavina, porast koncentracije CO₂, visoke temperature, povećan intenzitet svetlosti, suvi vetar koji povećava evaporaciju vode sa podloge, rezultuju gubitak vode iz biljnog tkiva te postepeno vode ka vodnom stresu. U nekim slučajevima, kada je voda u podlozi prisutna ali zbog visokog saliniteta, niske temperature zemljišta, vodnog suficita, koren biljaka nije u mogućnosti da istu usvoji što opet vodi ka stvaranju stresnih uslova za biljku. Ovaj tip stresa se naziva fiziološki stres, gde atmosferski faktori nisu limitirajući faktori (Arbona i sar., 2009). Oba stresna faktora nesumnjivo dovode do poremećaja u metabolizmu biljaka prvenstveno zbog narušavanja homeostaze u respiratornim procesima i metabolizmu kiseonika (Rubio i sar., 2002; Sharma i sar., 2012; Anee i sar., 2019). Osim toga, gubici prinosa nastali usled vodnog suficita i deficita premašuju gubitke nastale kao posledica uticaja drugih vrsta abiotičkog stresa zajedno (Flood, 2007).

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jedna od tri najčešće korištene žitarice u ishrani ljudi i životinja. Takođe, kukuruz se koristi i u različitim granama industrije, kao što su proizvodnja etanola, koji ima značajnu ulogu jer se koristi kao biogorivo (Radosavljević i sar., 2009). Prema podacima FAO u 2014. godini kukuruz se sejao na 184,66 miliona ha, a po ukupnoj svetskoj proizvodnji 2014. godine bio je na drugom mestu od ukupne proizvodnje žitarica (www.fao.org). Hibridi korišteni u ovom radu (ZP 555 i ZP 606) su predloženi od strane naučnika sa Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ kao jedni od najboljih za uzgoj zahvaljujući visokom prinosu u sve češćim sušnim periodima u jugoistočnoj Evropi te mogućnost rasta na plodnom tlu od 400 metara (ZP 606) i 500 metara (ZP 555) nadmorske visine. Upravo različita genetska osnova ovih hibrida ukazuje na važnost ispitivanja otpornosti i interhibridne razlike na predstojeće sušne i plavne periode u području gde se pomenuti hibridi uzgajaju. Promene u količini padavina, u njihovoj frekvenciji ili potpuno odsustvo istih, uz globalni porast temperature neosporivo vode ka smanjenju prinosa i kvaliteta ove žitarice.

Kao posledica izloženosti biljaka vodnom suficitu i deficitu nastaju reaktivne vrste kisonika (ROS) koje pokreću biohemijsko-fiziološke kaskadne reakcija kao odgovor biljaka na

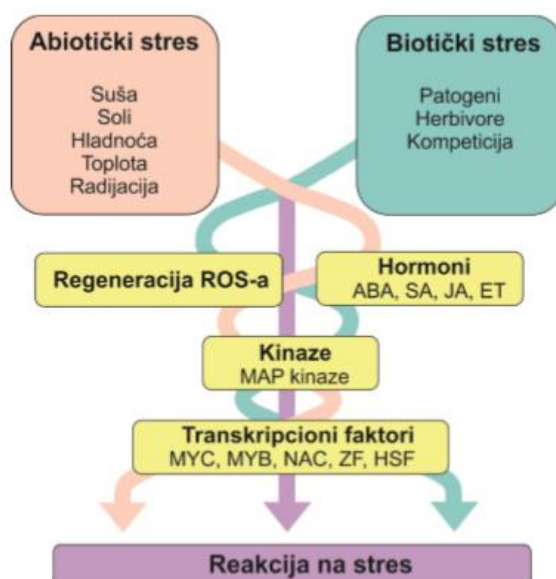
stres. Usled disbalansa između produkcije ROS i nemogućnosti ćelije da ih ukloni, nastaje sekundarni - oksidativni stres. Oksidativni stres se definiše kao pomeranje ravnoteže u ćelijskim oksido-redukcionim procesima u smeru oksidacije što je praćeno povećanjem koncentracije ROS (Arora i sar., 2002; Florez-Sarasa i sar., 2020). Kao posledica toga, u biljci dolazi do povećanja ekspresije gena koji su uključeni u sintezu antioksidativnih enzima, proteina stresa (HSP - *Heat Shock Proteins*), LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), Rab protina (*Responsive to ABA*), te akumulacije osmolita (prolina, šećera i dr.) (Faghani i sar., 2014; Hao i sar., 2015; Wang i sar., 2016).

Osim toga, stres izazvan vodnim suficitom i deficitom dovodi do promena u antioksidativnom sistemu zaštite, enzimskom i neenzimskom. U zavisnosti od aktivnosti antioksidativnih enzima i promene koncentracije neenzimskih antioksidanata, genotipovi kukuruza mogu efikasnije ukoniti ROS i posledice nastale kao rezultat oksidativnog stresa. Antioksidativni odbrambeni sistem zavisi od genetske strukture hibrida. Praćenjem ovih parametara (oksidativnih i antioksidativnih) možemo govoriti o intenzitetu stresa, razlikama između hibrida te odabiru otpornijih hibrida.

2. Pregled literature

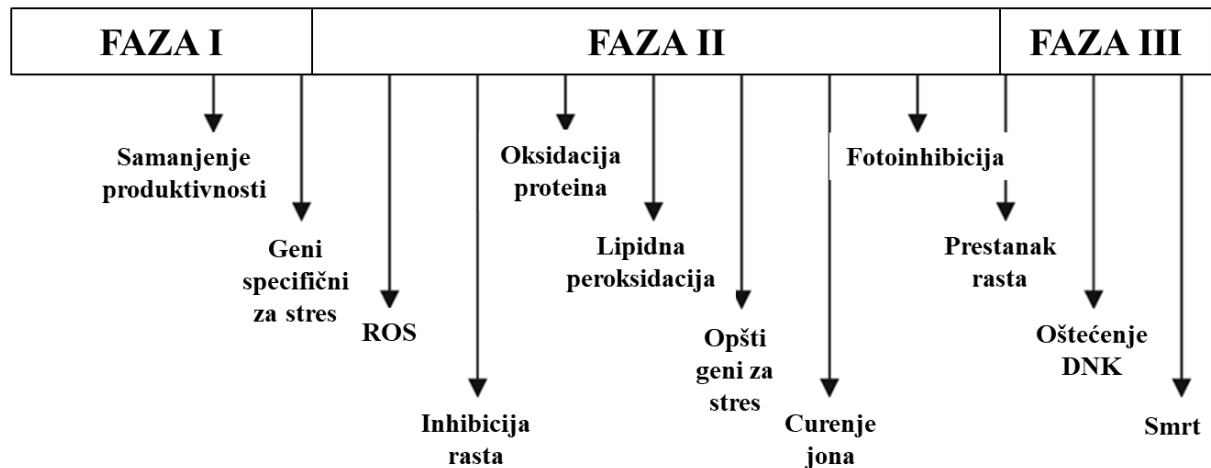
2.1. Abiotički ekološki faktori

Abiotički stresni faktori, kao što su salinitet, teški metali, UV-B zračenje i slični stresori (Slika 2.1), utiču na rast i razvoj biljaka. Stresni faktori mogu imati pozitivno ili negativno dejstvo (smanjenje intenziteta fotosinteze, inhibicija rasta, ubrzano starenje i oštećenje biljnih organa) (Mittler, 2006; Maksymiec, 2007).



Slika 2.1. Shema komunikacije (engl. cross-talk) između abiotičkih i biotičkih signalnih puteva. ABA- abscicinska kiselina (engl. abscisic acid), SA – salicilna kiselina (engl. salicylic acid), JA – jasaminska kiselina (engl. jasmonic acid), ET – etilen, MAP kinaze – mitogen-aktivirane proteinske kinaze, MYC – mijelocitomatoze (engl. myelocytomatosis), MYB – mijeloblastoze (engl. myeloblastosis) transkripcioni faktor, NAC – N-acetil cistein transkripcioni faktor, ZF – cink transkripcioni faktor (engl. zink fingers), HSF – transkripcioni faktor za visoke temperature (engl. heat shock factor) (Fujita i sar., 2006; modificovano).

Biljke, kao i drugi organizmi, sintetišu veliki broj hemijskih komponenti te pronalaze različite strategije kako bi kontrolisale hiperprodukciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) pri stresnim situacijama (Slika 2.2), kao što su hipooksija, vodni deficit, vodni suficit, UV-B zračenje, kontaminacija teškim metalima i pesticidima (Yousuf i sar., 2012).



Slika 2.2. Regulatorni mehanizmi, metaboličke promene i oštećenja kroz tri faze koje se u ćeliji pokreću tokom abiotičkog stresa (Dietz, 2010; modifikovano).

2.2. Voda kao stresni faktor

Snabdevenost biljaka vodom je jedan od najvažnijih faktora neophodnih za normalna rast i razvoj svih biljaka. Voda je najvažnija strukturna komponenta građe svih ćelija i ima veoma značajnu ulogu u brojnim procesima, kao što su metabolički procesi, transport materija, regulacija temperature i slično. Promena sadržaja vode u biljci označava se kao vodni režim i podrazumeva: (1) usvajanje, uglavnom pomoću korenovog sistema, (2) provođenje, provodnim snopićima, (3) odavanje vode, nadzemnim organima (procesom transpiracije).

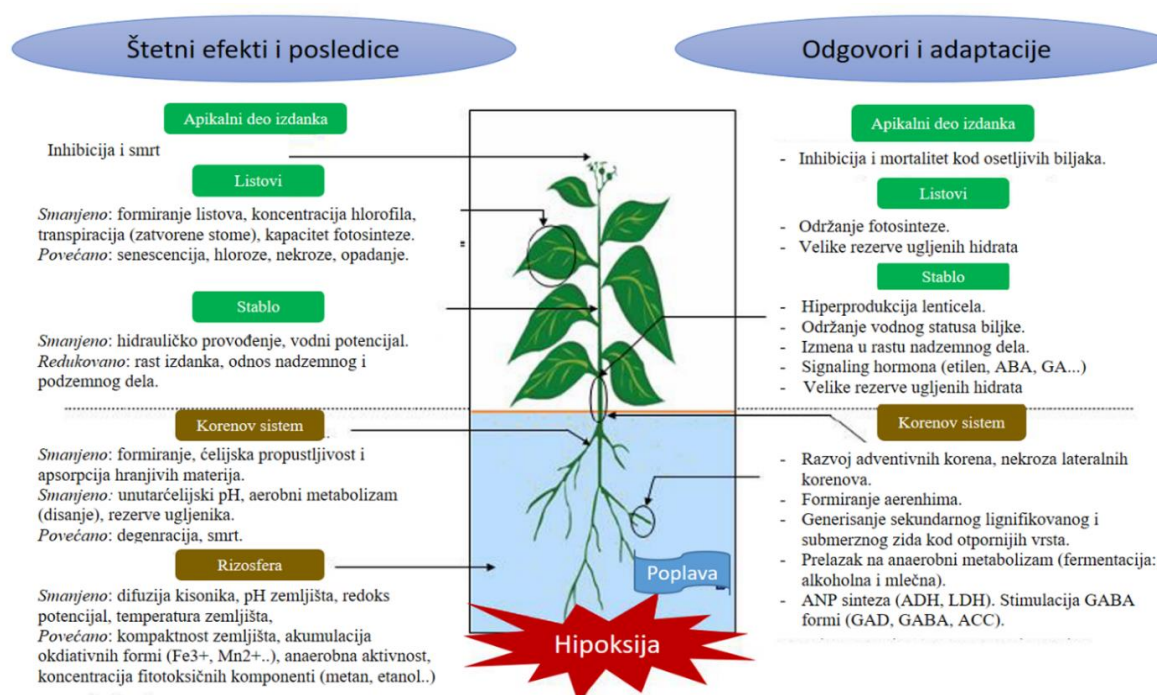
Ukoliko je količina transpirisane vode veća od količine primljene vode, dolazi do **vodnog deficita**. **Vodni suficit** nastaje kada je količina usvojene vode veća od mogućnosti biljke za njeno odavanja (Stikić i Jovanović, 2012).

2.2.1. Vodni suficit

Usled globalnih klimatskih promena dolazi do promena u prirodnim ekosistemima. Suficit ili deficit vode u podlozi predstavlja globalni problem za celi biljni svet. Distribucija biljnog sveta zavisi od ovih uslova i neophodno je da se prilagodi na iste. Kao i svako drugo živo biće i biljkama je neophodan kiseonik kako bi se normalano odvijali metabolički procesi. Međutim, suficit vode u podlozi za vrlo kratko vreme dovodi do hipoksije u zemljištu. Kao rezultat toga koren biljaka ne dobija kiseonik, te se nalazi u fazi anoksije, potpunog odsustva

kiseonika (Gambrell i Patrick; 1978; Capon i sar., 2009). Kako bi preživele ovakve uslove, biljke pribegavaju određenim adaptacijama: formiraju parenhim ispunjen vazduhom – aerenhim, obezbeđujući na taj način rezervoar vazduha, zatim generišu adventivne korene, što je u korelaciji sa biljnim hormonima, auksinom i etilenom (Slika 2.3) (McNamara i Mitchell, 1989).

Međutim, biljke koje se nalaze u vodnom suficitu pokušavaju da prežive te uslove kroz biohemijske, fiziološke, anatomske i morfološke adaptacije. Proizvodnja etilena i formiranje adventivnih korena je najčešći adaptivni odgovor biljaka na vodni suficit (Pezeshki, 2001).



Slika 2.3. Shematski prikaz posledica, odgovora i adaptivnih mehanizama biljaka na hipoksiju/anoksiju. ABA – abscicinska kiselina, GA-giberelinska kiselina, ANP – anaerobni polipeptidi, ADH – alkohol dehidrogenaza, LDH – laktat dehidrogenaza, GABA – gama aminobuterna kiselina, GAD – glutamat dehidrogenaza, ACC – 1-amino ciklopropan 3-fosfat dehidrogenaza (Dat i sar., 2006; modifikovano).

2.2.1.1 Anatomske i morfološke adaptacije

Hloroze, nekroze, oštećenje listova, smanjena fiksacija azota, smanjenje prinosa i smrt biljaka su promene koje su uzrokovane vodnim suficitom i mogu se desiti i u vegetativnoj i reproduktivnoj fazi biljke (Hasanuzzaman i sar., 2016). Vodni suficit dramatično smanjuje rast i razvoj biljaka i njihovo preživljavanje (Parent i sar., 2008). Kod kukuruza, koji je bio 2 cm u vodi, visina, prečnik lista, broj listova i totalni rast biljke su inhibirani kao posledica vodnog suficita (Ali i sar., 1999).

a) *Lenticеле*

Pri vodnom suficitu biljke formiraju adventivne korene, hipertrofirane lenticеле i/ili aerenhim (Ashraf, 2012). Tačna fiziološka funkcija lenticela još uvek nije dobro poznata, ali je definitivno povezana sa vodnim suficitom (Parelle i sar., 2006). Smatra se da lenticеле imaju ulogu u difuziji kiseonika i drugih gasova koji su uključeni u anaerobni metabolizam, kao što su C_2H_2 , CO_2 i CH_4 . Uočeno je da dolazi i do širenja provodnih snopića – floema u korenu biljke, kada se broj traheja i traheida ksilema smanjuje.

b) *Aerenhim*

Veoma važnu ulogu u transportu kiseonika pri hipoksiji i anoksiji ima parenhimsko tkivo – aerenhim. Aerenhim je biljno tkivo sa velikim intercelularima koji omogućavaju stvaranje rezervnog puta za razmenu gasova između anaerobnog korena i aerobnog izdanka (Jackson i Armstrong, 1999). Formiranje aerenhima je zabeleženo kod velikog broja biljaka kao što su: *Trifolium subterraneum* (Aschi-Smiti i sar., 2004), soja (Bacanamwo i Purcell, 1999), pšenica (Watkin i sar., 1998), riža (Justin i Armstrong, 1991), kukuruz (Gunawardena i sar., 2001) i *Carex sp.* (Visser i sar., 2000). Transportom kiseonika aerenhimom iz izdanka u koren dolazi do „curenja“ kiseonika kroz pore korena, te se zemlja oko korena oksigenizuje. Stvaranje aerobnog tla u maloj zoni oko individualnih korena može dovesti do nagomilavanja aerobnih mikroorganizama što je prevencija od toksičnih komponenata tla kao što su nitriti, sulfidi, Fe, Cu i Mn (Armstrong i Armstrong, 1988).

Aerenhim biva generisan zahvaljujući etilenu koji se akumulira pri apoptozi (Shiono i sar., 2008). Sinteza etilena je veoma ubrzana tokom hipoksije i podstiče formiranje aerenhima što je pokazano kod kukuruza (Visser i sar., 1997). Dokazano je da je formiranje aerenhima u korenu kukuruza uz aplikaciju egzogenog etilena, ali je bilo inhibirano u prisustvu Ag^+ jona (Drew i sar., 1981). U prisustvu inhibitora sinteze etilena ne dolazi do formiranja aerenhima (Konings, 1982). Vrh korena takođe mora biti prisutan kako bi se mogao formirati ovaj tip

tkiva. Vrh korena prvenstveno služi za sintezu 1-amino ciklopropan 1-karboksilne kiseline (ACC), kao prekursora za sintezu etilena. Njegovim transportom se generiše zrelije i bolje aerisano tkivo (Konings, 1982).

c) *Adventivni koreni*

Adventivni koreni su koreni koji rastu horizontalno (diageotropizam) i uočljivi su kod biljaka pri vodnom suficitu kao adaptaciju na stresne uslove sredine. Novoformirani koreni mogu preuzeti funkciju glavnog korenovog sistema (Jackson i Drew, 1984). Ovi koreni su bliži površini zemlje i nalaze se u neposrednoj blizini aerenhima, što im omogućava veću dostupnost kiseonika u poređenju sa glavnim korenovim sistemom. Biljke koje su tolerantne na vodni suficit kao *Rumex crispus* i *Rumex palustris* razvijaju nove na vodni suficit otporne korene na 10 cm od zemlje koja je poplavljena, dok kod biljaka koje su netolerantne na vodni suficit, kao što je *Rumex acetosa* ne dolazi do promene u vertikalnom korenovom sistemu (Voeselek i sar., 1989). Akumulacija etilena takođe omogućava formiranje adventivnih korena u odgovoru na hipoksiju. Naime, etilen omogućava formiranje adventivnih korena koji sadrže mnogo veće intercelulare i omogućavaju neometanu razmenu gasova između izdanka i korena (Visser i sar., 1996). Aplikacijom etilena u biljke koje su netolerantne na vodni suficit (neke od vrsta roda *Rumex*) rezultovalo je pojavu adventivnih korena kod ispitivanih biljaka. Suprotno tome, inhibicijom sinteze etilena kod *R. palustris* dolazi do redukcije broja adventivnih korena izazvanih vodnim suficitom na osnovu čega se došlo do zaključka da je veća koncentracija etilena glavni uslov za formiranje adventivnih korena kod vrsta roda *Rumex* (Sairam i sar., 2008). Bragina i sar. (2003) su pokazali da povećanje koncentracije etilena pri hipoksiji kod klijanaca kukuruza „uništava“ ćelijske zidove adventivnih korena biljaka menjajući tako celi korenov sistem.

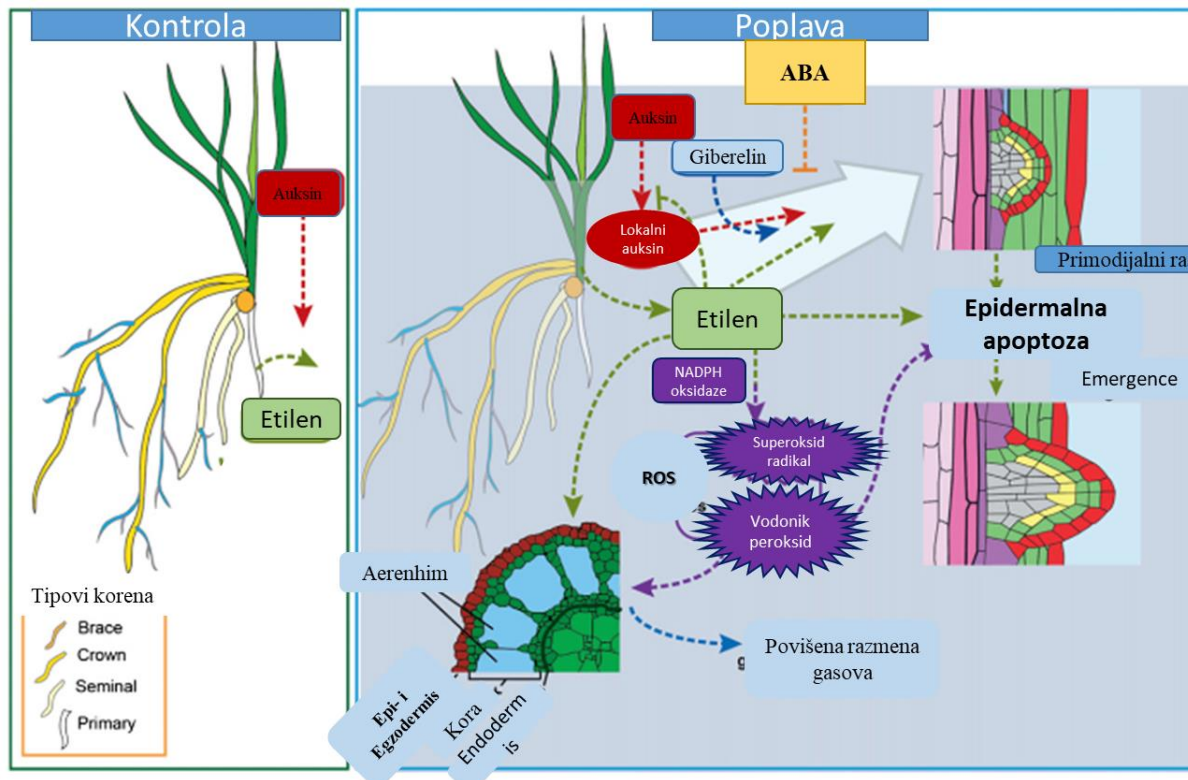
2.2.1.2 Fiziološke i biohemijske promene i adaptacije kod biljaka u uslovima vodnog suficita

a) *Hormoni*

Hormonska regulacija je jedna od važnih adaptivnih odgovora biljaka u uslovima vodnog suficita. Morfološke i anatomske promene su u direktnoj vezi sa hormonskim promenama. Kod biljaka osetljivih na vodni deficit kao što je *Solanum lycopersicum* uočen je razvoj adaptivnih korena koji je u asocijaciji sa sintezom etilena (Vidoz i sar., 2010). Osim direktnog efekta, etilen takođe koordiniše radom drugih fitohormona, kao što su giberelinska kiselina (GA) i abscicinska kiselina (ABA) koje imaju važnu ulogu pri izduživanju korena i formiranju adventivnih korena (Fukao i Bailey-Serres, 2008) (Slika 2.4).

Osim toga, akumulacija etilena, ugljendioksida i metana tokom vodnog suficita i anaerobnog metabolizma (Vartapetian, 2006) oštećuje akvaporine na membranama u listovima biljaka usled transporta ovih gasova. Povećana koncentracija etilena omogućava nastanak adventivnih korena, ali sa druge strane povećava fosforilaciju akvaporina na membranama (Kamaluddin i Zwiazek, 2002).

Salicilna kiselina (SA), kao jedna od signalnih molekula, je takođe odgovorna za adaptacije na hipoksiju. Uloga salicilne kiseline tokom abiotičkog i biotičkog stresa je veoma značajna (Dat i sar., 1998; Scott i sar., 1999). Naime, egzogenom aplikacijom različitih koncentracija SA u listovima biljaka je uočeno da dolazi do povećanja produkcije glicin betaina, povećanja neto fotosinteze, povećanja biomase biljaka, zatim je uočeno povećanje koncentracije hlorofila, prolina, koncentracije i aktivnosti ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco), te aktivnosti SOD i koncentracije askorbata (AA) (Ardebili i sar., 2014; Khan i sar., 2014a; Li i sar., 2014; Lee i sar., 2014). Osim toga, veća koncentracija SA u uslovima različitih vrsta abiotičkog stresa dovodi do smanjenja koncentracije malondialdehida (MDA) te takođe aktivnost Na^+/K^+ ATPaze (Fayer i Bazaid, 2014). Takođe, SA zajedno sa ABA reguliše otvaranje i zatvaranje stoma pri vodnom deficitu (Larqué-Saavedra, 1978), jer stimuliše rast korena i formiranje adventivnih korena pri stresnim uslovima (Singh, 1993; Gutierrez-Coronado i sar., 1998).



Slika 2.4. Hormonska signalizacije u uslovima vodnog suficita. Pri aerobnim uslovima, etilen se može normalno osloboditi iz ćelije, dok pri vodnom suficitu, voda predstavlja barijeru za oslobađanje istog, te se on nakuplja u unutrašnjosti ćelije. Giberelinska kiselina (GA) ubrzava nastanak adventivnih korena koje sam etilen inicira, dok abscisinska kiselina (ABA) inhibira taj efekt. Etilen izaziva nastanak ROS, te izaziva apoptozu i formiranje lizogenog aerenhima. Žuti koreni predstavljaju adventivne korene, dok plavi i pink predstavljaju lateralne korene (Steffens i Rasmussen, 2016; modifikovano).

b) Uloga ugljenih hidrata u uslovima vodnog suficita

Važnu ulogu u procesima adaptacije biljaka na uslove vodnog suficita imaju ugljeni hidrati. U uslovima vodnog suficita, literaturni podaci ukazuju da se povećava ukupna koncentracija ugljenih hidrata u korenu za 24% posle 21 dan vodnog suficita, i 15% i 17% u listovima i stabljici biljke *Corchorus capsularis* (Parvin i Karmoker, 2013).

Ugljeni hidrati su povezani sa tolerancijom biljaka na hipoksiju, jer obezbeđuju neophodnu energiju (Ram i sar., 2002). Povećana upotreba ugljenih hidrata u glikolitičkom putu omogućava biljci riže da preživi duže u uslovima anoksije (Ito i sar., 1999). Takođe je pokazano da su stariji listovi, koji sadrže više ugljenih hidrata, otporniji na vodni suficit. Osim toga, dodatak ugljenih hidrata biljkama u uslovima anoksije ima važan efekat pri toleranciji na ovaj stres (Vartapetian i Jackson, 1997).

c) Uloga stoma u uslovima vodnog suficita

Jedan od prvih odgovora na vodni suficit kod biljaka je smanjenje stomatalne provodljivosti (Folzer i sar., 2006). Biljke izložene vodnom suficitu su otporne na usvajanje dodatne vode, što dovodi do unutrašnjeg vodnog deficita (Parent i sar., 2008), slično kao kod biljaka pri vodnom deficitu. Osim toga, nizak nivo kiseonika može smanjiti hidrauličko provođenje kroz provodne sudove usled smanjene permeabilnosti korena (Else i sar., 2001). Vodni suficit dovodi do zatvaranja stoma većinom kod C3 biljaka (Akhtar i Nazir, 2013) što značajno utiče na proces fotosinteze. Smanjena koncentracija kiseonika generalno vodi ka postepenom smanjenju intenziteta fotosinteze (Ashraf i sar., 2011). Smanjenje intenziteta fotosinteze i transpiracije se dešava zahvaljujući zatvorenim stomama (Ashraf i Arfan, 2005). Međutim, drugi faktori, kao što su smanjena koncentracija hlorofila, senescencija lista i smanjenje lisne površine takođe rezultuju smanjenju intenziteta fotosinteze (Malik i sar., 2001). Brzo zatvaranje stoma pri vodnom suficitu je uočeno od strane Yordanova i sar. (2005), što su prethodno pokazali i Zang i Zang (1994) posmatrajući biljku pasulja u uslovima vodnog suficita. Zatvaranje stoma se dešava zahvaljujući ABA. Naime, tokom vodnog suficita ABA se transportuje iz starijih u mlađe listove ili dolazi do *de novo* sinteze ovog hormona.

d) Promene u fotosintezi u uslovima vodnog suficita

Produženo izlaganje biljaka vodnom suficitu rezultuje povredama korena, smanjujući na taj način dodatno kapacitet fotosinteze i utičući na promene u biohemijskim reakcijama ovog procesa. Promene se ogledaju u smanjenoj aktivnosti Rubisco (Pezeshki, 1994; 2001; Drew, 1997) i smanjenoj aktivnosti fosfoglikolat i glikolat oksidaze (Yordanova i Popova, 2001), oštećenju membrana hloroplasta što za posledicu ima inhibiciju elektrontransportnog lanaca i fotosistema II (FSII) (Titarenko, 2000). Smanjenje koncentracije hlorofila direktno ili indirektno utiče na ukupni kapacitet fotosinteze kod biljaka koje se nalaze u uslovima vodnog suficita (Ashraf i sar., 2011).

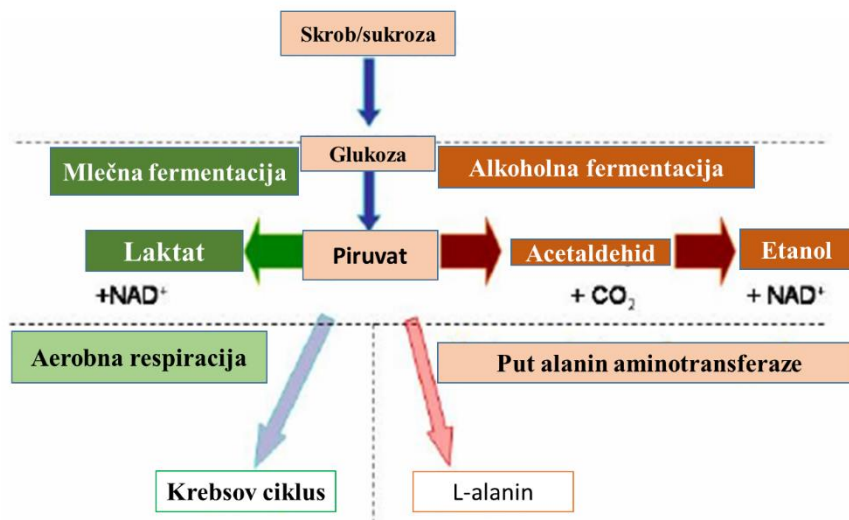
Kumar i sar. (2013) su dokazali da vodni suficit dovodi do smanjenja relativnog sadržaja vode, RWC (engl. *Relative Water Content*) i stabilnosti membrana.

Promene u provodnosti korena, provodnosti kroz stoma, asimilacija CO₂, drastično smanjenje intenziteta fotosinteze, promene u procesu disanja, generisanje sekundarnih metabolita su procesi odgovorni za redukciju rasta i prinosa biljaka u uslovima vodnog suficita (Ashraf, 2012).

e) Promene u energetskom metabolizmu u uslovima vodnog suficita

Vodni suficit dovodi do smanjenja koncentracije kiseonika u biljkama što vodi ka hipooksiji ili anoksiji. Bez kiseonika, kao elektron akceptora, izostaje i aerobna respiracija, odnosno dolazi do zaustavljanja Krebsovog ciklusa i elektrontransportnog lanca (Ashraf, 2012). Biljke koje su otporne na vodni suficit imaju nekoliko zajedničkih karakteristika: 1) mogućnost održanja alkoholne fermentacije, 2) oslobađanje etanola i drugih ko-proizvoda anaerobnog metabolizma van organizma, 3) zahvaljujući ugljenim hidratima omogućavaju odvijanje glikolize, 4) mogu sintetisati ATP kroz izmenjeni Krebsov ciklus, jer se alkoholnim i mlečnim vrenjem pri ograničenoj koncentraciji kiseonika ne dobija dovoljna količina ATP i nije dovoljna pri dugom izlaganju vodnom suficitu (Laan i sar., 1991).

Pri niskim koncentracijama kiseonika metabolizam ćelije zavisi od alternativnih puteva, anaerobnog metabolizma (Slika 2.5). Pri optimalnim koncentracijama kiseonika ATP se dobija iz glikolize, dajući kao proizvod dva ATP i dva molekula piruvata po jednoj heksozi uz redukciju NAD^+ do NADH (Rocha i sar., 2010). Kako bi se proces glikolize održao pri anoksiji dolazi do konstantnog regenerisanja NADH iz NAD^+ pri procesu fermentacije (Tadege i sar., 1999). Koristeći piruvat kao supstrat, pri anoksiji i hipooksiji ključnu ulogu imaju alkoholna i mlečna fermentacija. Pri alkoholnoj fermentaciji ključnu ulogu ima alkohol dehidrogenaza (ADH) koja katalizuje prevođenje acetaldehida u etanol pri čemu se oksiduje NADH u NAD^+ (Vartapetian i Jackson 1997; Kingston-Smith i Theodorou 2000; Nakazono i sar., 2000). Iako se ovim procesom ne može proizvesti značajna količina energije u obliku ATP-a, ovo je jedan od adaptivnih mehanizama tokom vodnog suficita. Anaerobnom fermentacijom biljke dobijaju samo dva molekula ATP iz jednog molekula glukoze, što je mnogo manje u odnosu na aerobni metabolizam gde se generiše 38 molekula ATP iz jednog molekula glukoze ali se omogućuje obnavljanje NAD^+ koji je neophodan za proces glikolize. Povećanje aktivnosti ADH pri vodnom suficitu je uočeno kod mnogih biljaka (Christine i Musgrave 1994; Zaidi i sar., 2004; Srivastava i sar., 2007; Sairam i sar., 2008). Takođe, kod biljaka koje su tolerantnije na vodni suficit zabeležena je veća aktivnost ADH u odnosu na biljke koje su osetljive na ovaj tip abiotičkog stresa.



Slika 2.5. Shematski prikaz tri glavna metabolička puta biljaka u uslovima vodnog suficita (Dat i sar., 2006; modifikovano).

Tokom anaerobne fermentacije veoma je važno održanje konstante pH vrednosti citoplazme, tj. održanje neutralnog pH. Međutim, acidifikacije se dešava upravo pri vodnom suficitu i smatra se jednim od ključnih faktora smrti ćelije (Roberts i sar., 1984). Nekoliko faktora može uticati na acidifikaciju: porast koncentracije H⁺, hidroliza jona Mg²⁺, akumulacija nus-proizvoda glikolize koji nisu izbačeni iz ćelije i sinteza laktata. Naime, pri anaerobnoj mlečnoj fermentaciji dolazi do oslobađanja laktata. Oslobađanjem laktata smanjuje se pH citoplazme što aktivira alkohol dehidrogenazu i inhibira laktat dehidrogenazu (Chang i sar., 2000), te omogućava biljkama prelazak sa mlečnog na alkoholno vrenje. Akumulacija laktata je povezana sa inhibicijom protonske pumpe tonoplasta, usled smanjenja sinteze ATP, što rezultuje brzo smanjenje pH vrednosti (Drew, 1997). Naime, smanjenje pH vrednosti ispod 7 rezultuje inaktivacijom laktat dehidrogenaze, te piruvat dekarboksilaza (PDC) omogućava prelazak piruvata u acetaldehid koji pomoću ADH (Kingston-Smith i Theodorou, 2000) prelazi u etanol.

Međutim, ova dva puta imaju i negativnih posledica na biljnu ćeliju: laktat je toksičan za ćeliju, a etanol ima sposobnost brzog difuzovanja iz ćelije, što vodi ka gubljenju ugljenika tokom hipooksije. Osim mlečne i alkoholne fermentacije, mnoge biljne vrste akumuliraju i alanina (Ala) pri anoksičnim uslovima (de Sousa i Sodek, 2003; Miyashita i sar., 2007). Akumulacija veće koncentracije Ala u biljnoj ćeliji ne dovodi do oštećenja ćelije, kao što je slučaj sa etanolom i laktatom. Smatra se da Ala omogućava regulaciju pH vrednosti pri

hipooksiji i anoksiji (Reggiani i sar., 1988; Rocha i sar., 2010). Mehanizam i uloga akumulacije Ala još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Jedan od metaboličkih modela ukazuje da se uloga akumulacije Ala tokom vodnog suficita može objasniti preko njegove uloge u reorganizovanom TCA ciklusu, pri čemu je njegova uloga u prevenciji nakupljanja piruvata, što omogućava kontinuiranu glikolizu pri uslovima vodnog suficita (Rocha i sar., 2010).

Bajpai i Chandra (2015) su ukazali na važnost prolina da može biti jedna od važnih biohemijskih adaptacija na vodni suficit. Autori su eksperimentalno pokazali da se koncentracija prolina povećava kod biljaka nakon 96 h vodnog suficita u poređenju sa kontrolom. Kao i kod aktivnost ADH, tolerantniji genotipovi imaju veće koncentracije prolina u odnosu na osetljive genotipove biljaka.

f) Promene u sintezi proteina u uslovima vodnog suficita

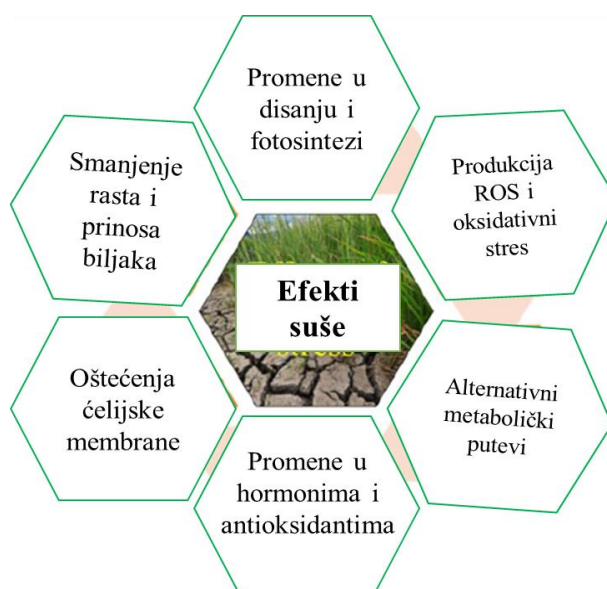
Rai i sar. (2004) su pokazali da dolazi do promena u koncentraciji proteina. Autori su zabeležili povećanje koncentracije solubilnih proteina kod biljakea kukuruza. Usled smanjenja koncentracije kiseonika, sinteza ukupnih proteina je u potpunosti izmenjena, gde se uočava selektivna sinteza oko 20 proteina (anaerobnih proteina) (Sachs i sar., 1980; Chang i sar., 2000).

Većina identifikovanih gena i proteina u korenu kukuruza su solubilni metabolički enzimi koji učestvuju u glikolizi, fermentaciji i metabolizmu ugljenih hidrata (Chang i sar., 2000). Takođe, identifikovana je i alkohol dehidrogenaza 1 (ADH1; Sachs i sar., 1980), enolaze 1 (ENO; Lal i sar., 1991), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPD; Russell i Sachs, 1991) i PDC (Kelley i sar., 1991).

Promene se uočavaju i u ekspresiji gena, a posebno su izmenjeni transkripcioni faktori, signalne transdukcione komponente, kao i geni uključeni u biosintezu etilena, metabolizam azota (Nie i Hill, 1997; Klok i sar., 2002; Dordas i sar., 2003; 2004; Paul i sar., 2004; Liu i sar., 2005).

2.2.2. Vodni deficit

Vodni deficit je jedan od najzastupljenijih abiotičkih stresnih faktora čiji efekti negativno utiču na produktivnost biljaka. U poslednje vreme, usled različitih vremenskih promena, prisustvo i količina vode za biljke nije marginalno pitanje. Sve su izvesnija predviđanja da će zbog klimatskih promena i efekta staklene bašte doći do smanjenja količine padavina i porasta temperature (IPCC, 2014). Vodni deficit najčešće nastaje kao nedostatak vode u zemljištu i označen je kao **zemljišna suša**. Međutim, vodni deficit može nastati i pri poremećaju primanja vode od strane biljaka iako je voda prisutna u zemljištu, što je označeno kao **fiziološka suša**. Aklimatizacija i aklimacija na vodni deficit postaje veliki izazov za netolerantne biljke. Vodni deficit izaziva smanjene rasta biljaka i prinosa za 30-50%. Vodni deficit uzrokuje veliki broj fizioloških promena kod biljaka, kao što su nemogućnost fiksacije CO₂ usled zatvaranja stoma, što ima za posledicu smanjenje intenziteta fotosinteze te morfološke promene na biljci (Slika 2.6), povećanje respiracije, i enzimske aktivnosti biljaka (Alexieva i sar., 2001). Pri vodnom deficitu u svetloj fazi fotosinteze na membrani tilakoida dolazi do produkcije velike količine kiseoničnih slobodnih radikala koji uzrokuju oštećenja makromolekula i smrt biljke, zahvaljujući reakcijama oksidacije. Pri ovom abiotičkom stresu dolazi do akumulacije soli i joni u gornjim slojevima zemlje i oko korenovog sistema biljaka, što uzrokuje osmotski stres i toksikaciju jonima).



Slika 2.6. Efekat vodnog deficita na biljke (Khan i Khan, 2017; modifikovano)

Biljke su razvile nekoliko mehanizama kako bi preživele vodni deficit: formiranje dužeg korena, transport soli u vakuolu i van ćelije, formiranje malih sukulentnih listova i sve u cilju zadržavanja vode u biljci (Dai, 2013). Osmoliti, kao što su polioli, organske kiseline, prolin zajedno sa velikim brojem aminokiselina imaju veoma važnu ulogu tokom vodnog deficita kako bi obezbedili normalno funkcionisanje ćelije (Khan i Khan 2017).

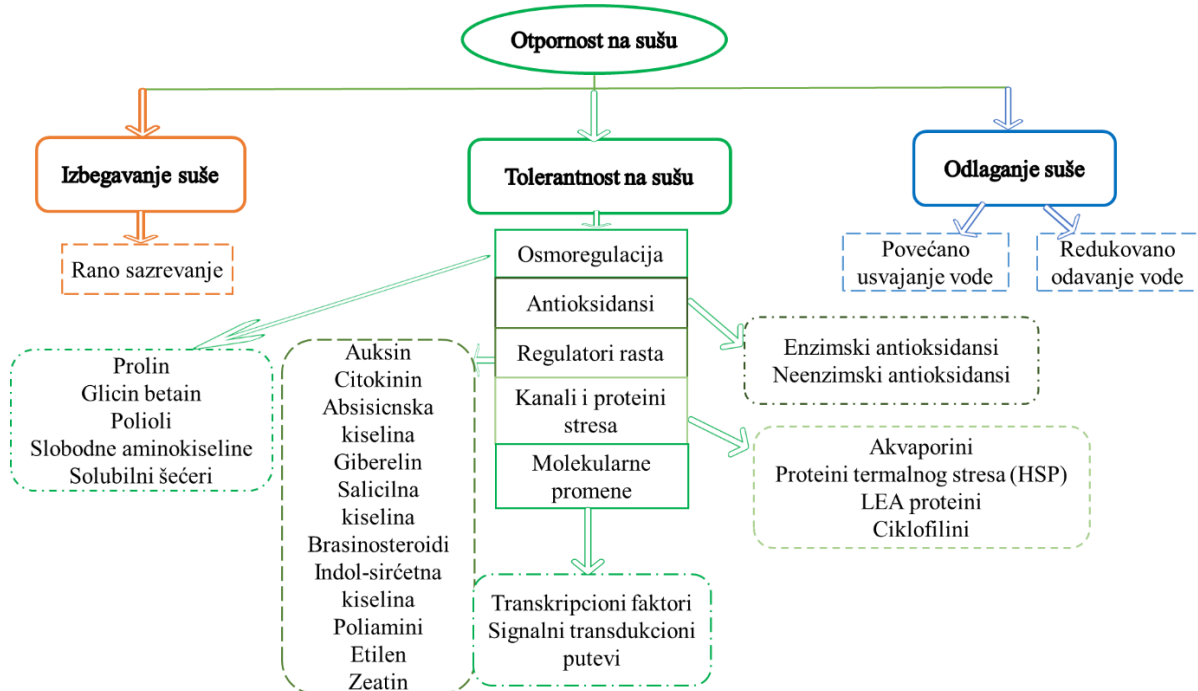
Naučnici su primenili nekoliko načina kako bi razvili rezistentnost biljaka na vodni deficit: egzogena aplikacija fitohormona, tretiranje semena osmoprotektantima, kao bi semena bolje klijala i biljke rastle, kao i genetički inženjering i metode kojima se „biraju markeri stresa“ (Jones i sar., 1991).

Odgovor biljaka na stres izazvan nedostatkom vode se može uočiti na morfološkom, fiziološkom te metaboličkom nivou.

Biljke koje su otporne na vodni deficit (engl. *drought resistance*) preživljavaju ovakve uslove tako što izbegavaju, odlažu ili tolerišu nedostatak vode (Slika 2.7) (Levitt, 1980).

1. Biljke koje *izbegavaju vodni deficit* (engl. *drought escape*) imaju sposobnost da završe svoj životni ciklus pre vodnog deficita. Na taj način biljke ne doživljavaju stres izazvan vodnim deficitom, jer su sposobne da modifikuju svoj vegetativni i reproduktivni rast u zavisnosti od prisustva vode. U osnovi ovoga tipa adaptacije se nalaze dva različita mehanizma: brzi fenološki razvoj i razvoj evolucione plastičnosti (Jones i sar., 1991). Brz fenološki razvoj podrazumeva brz rast biljaka, sa produkcijom minimalne količine semena, bez morfoloških, fizioloških adaptacija. Biljke koje imaju sposobnost razvijanja plastičnosti rastu vrlo ograničeno tokom perioda vodnog deficita, produkujući veoma malo cvetova i semena, ali tokom vlažnog perioda rastu veoma brzo i produkuju veliki broj semena.
2. Biljke koje *odlažu isušivanje* (engl. *drought avoidance*) imaju sposobnost da zadrže relativno visok procenat vode u tkivu uprkos vodnom deficitu u podlozi. Ovo se postiže nizom adaptacija koje uključuju smanjenje gubitka vode (štednja vode) i optimizacija potrošnje vode (potrošači vode). Optimizaciju potrošnje vode postižu kroz povećano ukorenjavanje, dok biljke koje su razvile mehanizam štednje vode to postižu kroz smanjenje transpiracije, transpiracione površine, apsorpciju zračenja i slično (Morgan, 1984).
3. Biljke koje *tolerišu vodni deficit* (engl. *drought tolerance*) imaju sposobnost preživljavanja niskog sadržaja vode u tkivu zahvaljujući adaptivnim osobinama. Adaptivne osobine uključuju održavanje turgora ćelija zahvaljujući osmotskom

pritisku i elastičnosti ćelija i povećanje protoplazmatske otpornosti prema gubitku vode (Morgan, 1984).



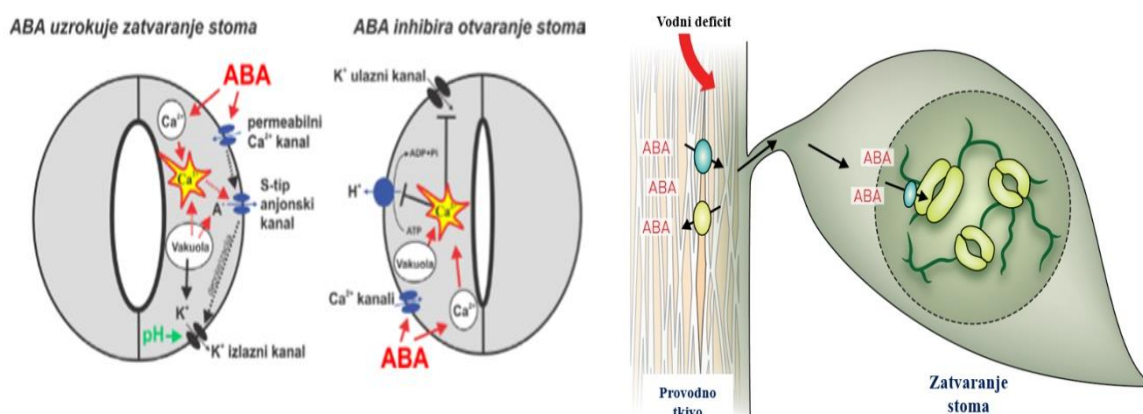
Slika 2.7. Morfološki, fiziološki i molekularni odgovor biljaka kukuruza na stres izazvan vodnim deficitom (Aslam i sar., 2015; modifikovano).

2.2.2.1 Fiziološki odgovori biljaka na vodni deficit

a) Hormonska regulacija

Rast korena biljaka nije inhibiran pri vodnom deficitu kod većeg broja biljaka (Jaleel i sar., 2008) uključujući i kukuruz (Sacks i sar., 1997). Generalno, odnos izdanka i korenovog sistema kod biljaka raslih u uslovima vodnog deficita je veći u korist korenovog sistema, koji je manje osetljiv od nadzemnog dela biljke (Wu i Cosgrove, 2000). ABA, citokinini (CK), etilen, malat i drugi faktori koji još nisu identifikovani su uključeni u signalizaciju rasta korena. Koren biljaka šalje signal ostatku biljke da se nalazi u vodnom deficitu, pre nego što se stome zatvore. Zahvaljujući tom signalu dolazi do sinteze ABA hormona (Pour Najaf, 2005), koji ima najvažniju ulogu u životnom ciklusu biljke jer učestvuje u mnogim bitnim fiziološkim procesima, te morfološkim i fiziološkim adaptacijama na uslove u životnoj sredini (Fathi i Tari, 2016). Takođe, druge signalne molekule kao što su CK mogu biti vrlo važan signal koji putuje od korena do izdanka.

Fitohormoni kao što su ABA, CK, GA, auksini i etilen, regulišu procese koji omogućavaju biljci adaptacije na vodni deficit. ABA predstavlja univerzalni „stres hormon“ čija akumulacija omogućava bolju adaptaciju biljaka na stresne faktore iz životne sredine (Nakashima i Yamaguchi-Shinozaki, 2013). Pri izlaganju vodnom deficitu, ABA je hormon koji se najviše sintetiše u korenu i transportuje se do listova inicirajući zatvaranje stoma i smanjenje rasta biljaka kao odgovor na stres (Slika 2.8). Vodni deficit stimuliše sintezu ABA kroz regulaciju ključnog enzima 9-cis epoksikarotenoid deoksigenaze (NCED3). Značajno povećanje aktivnosti ovog enzima je zabeleženo već nakon 15 do 30 minuta vodnog deficita (Qin i Zeevaart, 1999; Thompson i sar., 2000). Najvažnija uloga ABA u adaptaciji na vodni deficit jeste što podstiče zatvaranje stoma i smanjuje transpiraciju i na taj način smanjuje gubitke vode iz ćelije. Pri akumulaciji ABA u ćelijama pomoćnicama dolazi do smanjenja turgorovog pritiska i modulacije jonskih kanala, naročito kanala za kalijum i kalcijum, usled čega dolazi do zatvaranja stoma (Guerrero i Mullet, 1986). Usled toga dolazi do redukcije koncentracije CO₂ u ćelijama, što dalje vodi ka smanjenju intenziteta fotosinteze i povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika usled preusmeravanja elektrona na kiseonik. Smanjenjem intenziteta fotosinteze smanjuje se i koncentracija Rubisco-a (Fathi i Tari, 2016).



Slika 2.8. Efekti ABA na zatvaranje stoma (levo) i inhibicija otvaranja stoma (desno) (Stakić i Jovanović, 2012; Osakabe i sar., 2014, modifikovano).

Citokinini su biljni hormoni koji imaju ulogu u odgađanju starenja i smrti biljaka, što povećava adaptivne sposobnosti biljaka povećanjem prinosa. Povećavanjem koncentracije endogenog CK kroz ekspresiju izopentenil-transferaze (IPT), enzima odgovornog za biosintetski put CK, dolazi do adaptacije biljke na stresne situacije odgađanjem starenja uzrokovanog vodnim deficitom (Daszkowska-Golec i Szarejko, 2013).

Auksini su biljni hormoni čija je uloga u apikalnoj dominaciji, elongaciji izdanka i inhibiciji korena (Berleth i Sachs, 2001). Za auksin je pokazano da negativno reguliše adaptaciju biljaka na vodni deficit. Naime, auksin pozitivno utiče na otvaranje stoma, međutim njegova veća koncentracija ima obrnuti efekat (Lohse i Hedrich, 1992). Takođe, smanjenje sadržaja indol-3-sirćetne kiseline (IAA) je povezano sa regulacijom gena koji kodiraju proteine u kasnoj embriogenezi (LEA, engl. *late embryogenesis abundant*), što je adaptivna sposobnost biljke (Stakić i Jovanović, 2012).

Giberelini imaju pozitivno regulatorno dejstvo na biljke u uslovima vodnog deficita. Brzo povećanje koncentracije endogenog GA rezultira inhibicijom rasta. Etilen negativno reguliše vodni deficit. Ubrzavajući starenje biljke, inhibirajući rast i razvoj korena, rast listova i fotosintezu. Etilen ima značajnu ulogu i u ABA signalizaciji (engl. *cross-talk*) (Daszkowska-Golec i Szarejko, 2013).

Takođe, osim pomenutih velikih grupa fitohormona, značajnu ulogu u rastu i razvoju imaju i drugi hormoni kao što su brasinosteroidi, jasmonska kiselina (JA), SA i strigolaktoni. Međutim, njihova uloga pri vodnom deficitu je manje okarakterisana. Studije su takođe

pokazale da sinergističko dejstvo više hormona ima veće adaptivno dejstvo na vodni deficit od dejstva individualnih hormona (Basu i sar., 2016).

b) Osmoregulacija

Promena osmotskog pritiska je jedan od mehanizama odbrane i povećanja tolerantnosti biljaka pri vodnom deficitu (Slika 2.9). Pri deficitu vode dolazi do akumulacije rastvorenih supstanci unutar ćelije koje se podjednako deli kćerkama ćelijama u mitozu kako bi se održao turgorov pritisak u ćelijama (Chaves i Oliveir, 2004). Rast i izduživanje ćelija u biljci u mnogome zavisi od prisustva vode i pomaže održavanju turgora. U mladim tkivima biljke, posebno u listu i stablu, turgorov pritisak je nepromenjen, ali zahvaljujući osmoregulaciji pri vodnom deficitu inhibira se elongacija ćelija (Chaves i Oliveira, 2004). Pri smanjenom prisustvu vode u biljci, osmoregulacijom se mora obezbediti rad stoma, fotosinteza, prisutnost vode u listovima biljke kao i normalno funkcionisanje biljke (Chaves i Oliveira, 2004).

Smanjenje sadržaja vode u ćeliji je obrnuto proporcionalno povećanju koncentracije soli (Ashraf i Foolad, 2007). Neorganski katjoni, organske kiseline, ugljeni hidrati i slobodne aminokiseline su supstance koje se nalaze u najvećoj koncentraciji u ćeliji pri vodnom deficitu.

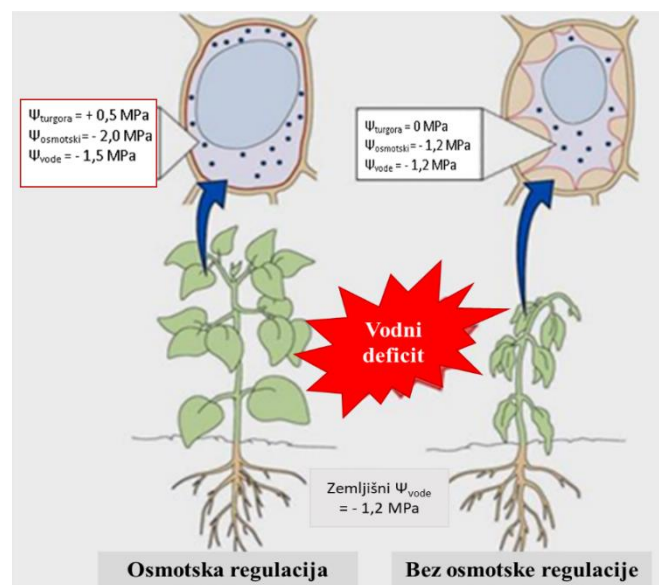
Takođe, akumulacija prolina i glicin betina je veoma važna u uslovima vodnog deficita, ne samo zbog osmoregulacije nego i zbog detoksifikacije ROS jer na taj način štite integritet membrana i strukturu enzima i proteina (Ashraf i Foolad, 2007). Pokazano je da enzimi kao što su betain aldehid dehidrogenaza (BADH), pirolin-5-karboksil reduktaza (P5CR) i ornitin TM-aminotransferaza (OAT) imaju veoma značajnu ulogu pri osmotskoj regulaciji (Basu i sar., 2016).

Osim toga, kod nekih vrsta biljaka šećeri, kao što su trehaloza, glukoza, saharoza i fruktoza, imaju veoma važnu ulogu u osmoregulaciji (Basu i sar., 2016).

Prolin je osmolit koji se najviše akumulira u biljci pri stresnim uslovima, te kao prvi odgovor biljke na vodni deficit onemogućava oštećenje ćelija. Trajanje vodnog deficita je u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem koncentracije prolina kod kukuruza (Anjum i sar., 2011). Akumulacija prolina u biljkama nakon stresa je povezana sa tolerancijom na stresne uslove i generalno je veća koncentracije prolina kod biljaka koje su otporne na vodni deficit, u odnosu na one koje su neotporne (Zadebagheri i sar., 2014). Akumulacija prolina se prvenstveno vrši u hloroplastima i citoplazmi dok se njegova degradacija (oksidacija do glutamata) odvija u mitohondrijama biljne ćelije (Krasensky i Jonak, 2012). Prolin ima brojne funkcije u uslovima vodnog deficita: stabilizacija subćelijskih struktura i membrana, stabilizacija proteina te

održavanje funkcionisanja ćelije, kao i značajnu ulogu u eliminaciji ROS (Khedr i sar., 2003; Okuma i sar., 2004; Ashraf i Foolad, 2007; Hoque i sar., 2008; Banu i sar., 2009). Pored toga, prolin ima ulogu u zaštiti fotosintetskih komponenti, te elektron-transportnog kompleksa II mitohondrija (Hamilton and Heckathorn, 2001). Mnoga istraživanja su pokazala da je prolin efikasan i u eliminaciji singlet kiseonika (Alia i Maysik, 2001) i hidroksil radikala (Smirnoff i Cumbes, 1989) što pokazuje da prolin može biti i neenzimski antioksidant u biljnoj ćeliji u uslovima abiotičkog stresa.

Prolin takođe može biti i signalna molekula jer utiče na proliferaciju ili ćelijsku smrt ili specifičnu ekspresiju gena, što je od ključnog značaja pri oporavku biljke od stresa (Szabados i Savoure, 2010). Ovaj osmolit održava stabilnu kvarternu strukturu proteina, stabilnost membrane pri dehidraciji, te smanjuje oksidativna oštećenja membranskih lipida (Demiral i Turkan, 2004).



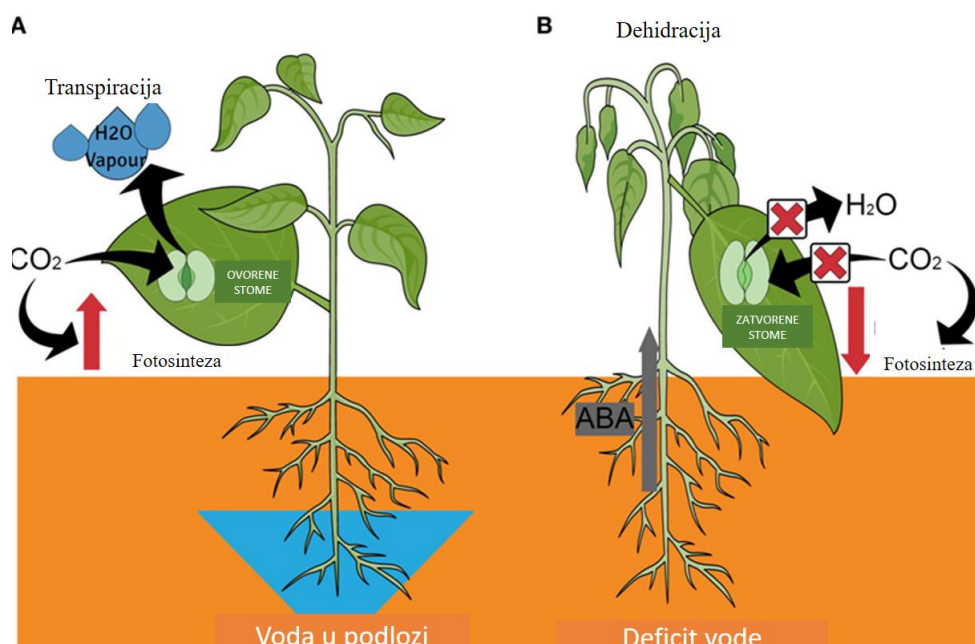
Slika 2.9. Osmoregulacija pri vodnom deficitu. Osmotska regulacija je aktivan proces pri kome se povećava količina rastvorljivih čestica u biljnim ćelijama, što dovodi do redukcije vodnog i osmotskog potencijala i omogućava apsorpciju vode.

(<https://slideplayer.com/slide/14948246/>)

c) Fotosinteza i metabolizam

Vodni deficit značajno utiče na promene u strukturi i funkciji glavnih komponenti fotosintetičkog aparata. Naime, ovaj tip stresa utiče na tilakoidni transport elektrona, asimilaciju CO₂ (zbog prethodno zatvorenih stoma), biosintezu fotosintetičkih pigmenata, akumulaciju ugljenih hidrata, razgradnju lipida, te vodni balansa (Allen i Ort, 2001; Sharma i sar., 2019). Stres izazvan vodnim deficitom otežava razmenu gasova usled smanjenja lisne površine, preranu senescenciju i abscisiju listova, oksidaciju lipida u hloroplastima i promene u strukturi pigmenata i proteina (Menconi i sar., 1995). Anjum i sar. (2011) ukazuju da je ovaj tip stresa kod kukuruza doveo do značajnog smanjenja neto fotosinteze (33,22%), brzine transpiracije (37,84%), efikasnosti korišćenja vode (50,87%), koncentracije intercelularnog CO₂ (5,86%) u poređenju sa kontrolom.

Kao jedna od komponenti fotosintetičkog aparata, stome imaju veoma značajnu ulogu pri vodnom deficitu. One predstavljaju mesta ulaska CO₂ neophodnog za proces fotosinteze o istovremeno izlaska H₂O u procesu transpiracije (Slika 2.10). S toga, tokom izlaganja biljaka vodnom deficitu stome moraju regulisati i obezbediti maksimalni nivo fotosinteze uz minimalnu transpiraciju. Tako, stomine ćelije u uslovima kratkotrajne vodnog deficita reaguju delimičnim zatvaranjem, čime se stamanjuje transpiracija, ali održava fotosinteza. Međutim, pri dugotrajnom vodnom deficitu stomine ćelije se u potpunosti zatvaraju, sprečavajući time „jaku“ dehidrataciju tkiva i održavajući biljku u životu. Reakcije stominih ćelija predstavljaju „primarnu i sekundarnu liniju odbrane od vodnog deficita“ (Stikić i Jovanović, 2012).



Slika 2.10. Promene u biljci nastale usled vodnog deficita. Promene u koncentraciji ABA hormona vodi ka zatvaranju stoma, što za posledicu ima izostanak fiksacije CO₂ i transpiracije (<https://frontiersin.org>)

Usled produžene svetle faze fotosinteze tokom vodnog deficita i pri smanjenoj koncentraciji intercelularnog CO₂ dolazi do nakupljanja redukovanih jedinjenja u elektron transportnom lancu, što rezultuje produkcijom ROS. ROS mogu izazvati mnoga oštećenja na fotosintetičkom aparatu (Lawlor i Cornic, 2002). Efikasnost i intenzitet fotosinteze pri vodnom deficitu je uslovljen regeneracijom ribulozo-1,5-bisfosfata (RuBP) i aktivnošću Rubisco (Medrano i sar., 1997; Lawlor, 2002). Smanjenje ukupnog intenziteta fotosinteze tokom vodnog deficita dovodi do: smanjenja koncentracije intercelularnog CO₂ (što značajno utiče na aktivnost Rubisco-a) (Cornic i Massacci, 1996), direktne inhibicije Rubisco-a (Haupt-Herting i Fock, 2000) ili ATP sintetaze (Ashraf, 2012).

Uprkos činjenici da je FS II veoma otporan na vodni deficit (Yordanov i sar., 2003) pri vodnom deficitu ipak dolazi do inhibicije elektron transportnog lanca u FSII (Chen i Hsu, 1995; Chakir i Jenson, 1999). Nekoliko *in vivo* studija je pokazalo da vodni deficit rezultuje oštećenjima u reakcionom centru FSII što je povezano sa denaturacijom proteina D1 (He i sar., 1995). Mehanizam kojim vodni deficit inhibira transport elektrona još uvek nije do kraja razjašnjen.

Lawlor i Cornic (2002) smatraju da je smanjenje ukupne fotosinteze pri veoma niskom RWC izazvano smanjenim metabolizmom (skladištenje ATP, ograničena sinteza RuBP bez ili sa inhibiranim Rubisco-om). Intenzitet fotosinteze bi takođe moga biti smanjena upravo zbog balansa između kapaciteta karboksilacije katalizovane Rubisco-om i regeneracije i korištenja RuBP. Ovo dalje sugerise da dolazi do inhibicije nekih reakcije u Kalvinovom ciklusu koje su deo puta regeneracije RuBP. Regeneracije RuBP može biti ograničena i gubitkom ili inhibicijom nekih drugih enzima osim Rubisco-a (Ashraf, 2012).

Smatra se da C4 ciklus ugljenika predstavlja adaptaciju C3 ciklusa ugljenika na deficit vode, smanjenje intenziteta fotosinteze i poboljšanja fotosintetičke efikasnosti (Edwards i Walker, 1983).

d) Proteini vodnog deficita

Pri vodonom deficitu dolazi do ekspresije gena te sinteze proteina koji omogućavaju biljkama preživljavanje u uslovima vodnog deficita.

Prvi u nizu proteina koji se sintetišu pri vodonom deficitu su **LEA** ili „proteini sazrevanja“ koji se sintetišu u uslovima vodnog deficita. Proteini ove velike grupe su podeljeni u 18 familija. Jedna od familija LEA proteina jesu **dehidrini**, koji su posebno važni u uslovima vodnog deficita. Naime u uslovima dugotrajnog vodnog deficita, stresa izazvanog povećanim koncentracijama soli ili niskim temperaturama dolazi do akumulacije ovih proteina (Stikić i Jovanović, 2012). Dehidrini mogu interagovati sa hidrofobnim delovima delimično denaturisanih proteina i membranskih struktura i na taj način sprečavajući i stabilizirajući agregaciju proteina u uslovima vodnog deficita.

G proteini su uključeni u neke od najvažnijih signalnih kaskada u ćeliji. Istraživanjima u proteomici je pokazano da koncentracija dve subjedinice G proteina (alfa i beta), nekoliko malih G proteina (npr. Ras-vezani proteini Rab7 i Ras-vezani protein Ran), te Ran-vezani protein 1 se povećava kod listova izloženih vodonom deficitu (Wang i sar., 2016). Njihova uloga pri vodonom deficitu je prethodno pokazana u mnogim istraživanjima. Alfa subjedinice G proteina imaju pozitivnu ulogu u regulaciji vodnog deficita (Gao i sar., 2010; Wang i sar., 2016), dok beta subjedinca G proteina negativno reguliše vodni deficit, kako je prethodno zabeleženo pri istraživanju biljke *Arabidopsis* (Zhang i sar., 2008; Xu i sar., 2015). Osim toga, **Rab** proteini (engl. *Responsive to ABA*) koji pripadaju familiji malih G proteina su zaduženi za unutarćelijsku signalizaciju, mnoge bitne fiziološke procese i hormonski signalni put, te kao

repressor stresa (Ma, 2007). Pokazano je da je jedan od Rab proteina, Rab7, značajan pri toleranciji biljaka prema vodnom deficitu (Wang i sar., 2016).

Proteini toplotnog stresa ili **HSP** (engl. *Heat Shock Proteins*) imaju ulogu u održanju pravilne strukture proteina, sprečavaju denaturacije proteina, te otklanjanju nefunkcionalnih i oštećenih proteina. Njihova primarna uloga se ogleda u omogućavanju uvijanja polipeptidnog lanca u pravilnu trodimenzionalnu strukturu koja je osnov funkcije proteina. Šaperoni (često nazivani i molekuli pratioci) su proteinski molekuli koji pomažu u savijanju i uvijanju poplipeptidnog lanca, a time učestvuju u kreiranju trodimenzionalne strukture proteina. Upravo zbog ovog svojstva mnogo šaperoni pripadaju grupi HSP proteina (Stikić i Jovanović, 2012).

Proteini **ubikvitini** imaju takođe značajnu ulogu u uslovima izloženosti biljaka vodnom deficitu i visokim temperaturama. Oni su komponenta ubikvitin-proteaznog sistema koji ima ulogu u vezivanju i uklanjanju oštećenih proteina ili proteina koji se trebaju ukloniti iz ćelije jer im je istekao „životni vek“ (Stikić i Jovanović, 2012).

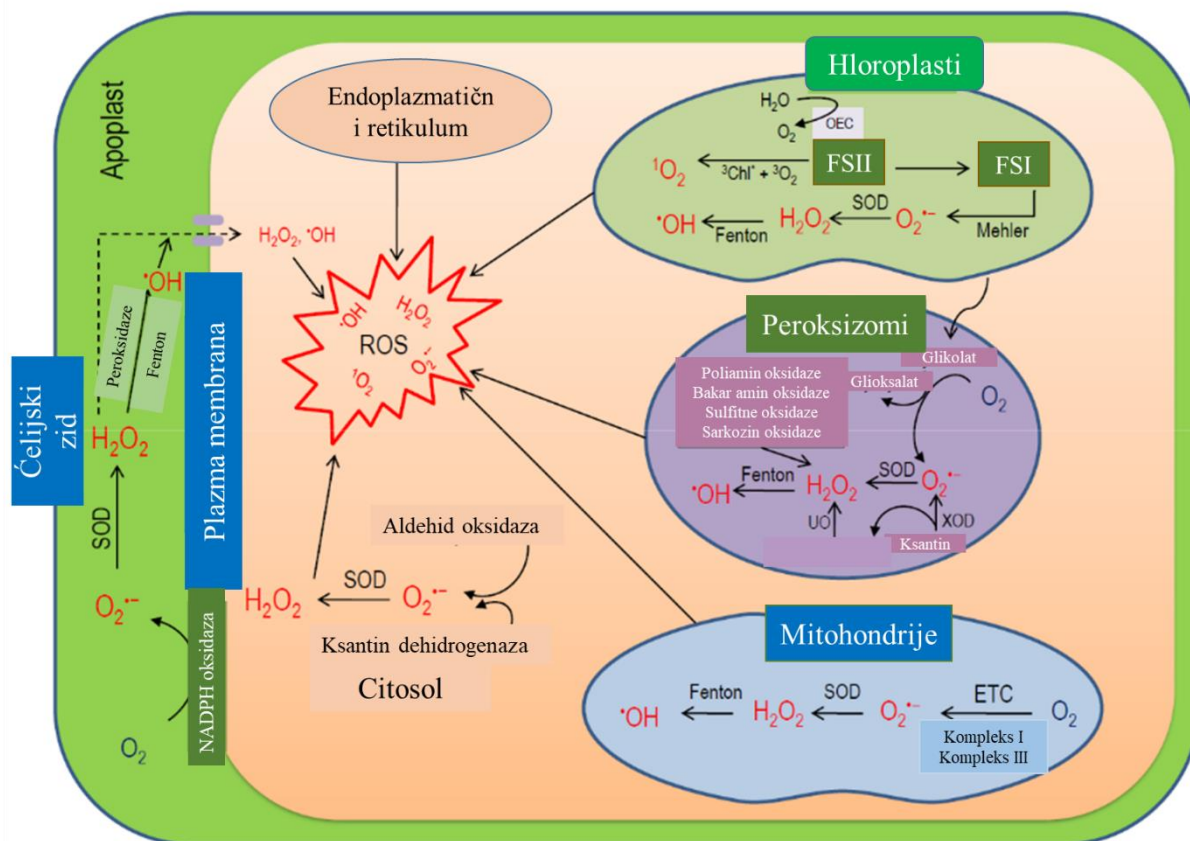
Akvaporini (vodeni proteinski kanali) olakšavaju transport vode i jona između citoplazme i vakuole. Akvaporini imaju tetramernu strukturu što im omogućava selektivnu propustljivost molekula vode, jer elektrostatički potencijal unutrašnjosti akvaporina omogućava selektivno zadržavanje svih naelektrisanih molekula, kao što su joni i protoni (Stojiljković i sar., 2007). Osim toga, neke izoforme imaju mogućnost propuštanja i nekih drugih molekula. Na njihovu aktivnost utiče više faktora, na prvom mestu količina vode, zatim pH zemljišta, pristupačnost azota biljkama i mnogi drugi faktori koji dolaze i biljke ili zemljišta (Stikić i Jovanović, 2012).

2.3. Reaktivne vrste kiseonika

Svi aerobni organizmi koriste O_2 kao krajnji akceptor elektrona u procesima koji se odvijaju u respiratornom lancu mitohondrija, pri čemu nastaje osnovni energetska molekula ATP, u kom je vezana hemijska energija neophodna za odvijanje svih životnih funkcija. Tokom respiracije O_2 se kompletno redukuje do molekula vode prenosom četiri elektrona, što se odigrava postupno uz formiranje delimično redukovanih intermedijera. Više od 95% O_2 unetog u ćeliju prolazi kroz kompletnu redukciju do H_2O , dok parcijalnoj redukciji podleže samo od 1- 5% O_2 pri čemu se generišu ROS (Scandalios, 2005). Jednoelektronskom redukcijom O_2 nastaje superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), dvoelektronskom vodonik peroksid (H_2O_2), a prenosom tri elektrona nastaje hidroksil radikal ($OH\cdot$). Dva elektrona u molekulu kiseonika imaju paralelni spin i to je najstabilnije stanje ili osnovno (triplet) stanje O_2 (oblik kiseonika prisutan u vazduhu). Elektroni paralelnih spinova čine da kiseonik preferira prihvatanje jednog po jednog elektrona (jednovalentna redukcija) što objašnjava njegovo sporo reagovanje sa većinom neradikala. Primanje elektrona je osnovni uslov za obrazovanje i aktivaciju ROS (Stikić i Jovanović, 2012).

ROS su potencijalno rizične jer lako mogu da izazovu oksidativna oštećenja biomolekula što na kraju dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. Tako različiti abiotički strasori mogu pospešiti generisanje različitih vrsta ROS (Anjum i sar., 2016; Soares i sar., 2016; Anjum i sar., 2017; Guo i sar., 2017; Kaur i sar., 2019; Sharma i sar., 2019). Međutim, tokom evolucije aerobni organizmi su razvili adaptivne mehanizme kontrole koncentracije ROS-a i ostalih reaktivnih intermedijarnih jedinjenja – redoks homeostazu. ROS nastaju kao sporedni proizvodi u normalnim aerobnom metabolizmu i imaju važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji i homeostazi.

Glavna mesta nastanka ROS u biljnim ćelijama su (Slika 2.11): hloroplasti (elektrontransportni lanac FS I i FS II), mitohondrije (Kompleksi I i III), peroksizomi, apoplast, plazma membrana te edoplazmatični retikulum (Hasanuzzaman i sar., 2020).



Slika 2.11. Mesta i način nastanka ROS u biljnoj ćeliji. Skraćenice: ROS-reaktivne vrste kiseonika, H_2O_2 – hidrogen peroksid, $O_2^{\cdot-}$ – superoksid anjon radikal, 1O_2 – singlet kiseonik, $^{\cdot}OH$ – hidroksil radikal, SOD – superoksid dismutaza, UO – urat oksidaza, XOD – ksantin oksidaza, ETC – elektrontransportni lanac, FSI – Fotosistem I, FSII – Fotosistem II, NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, OEC – kompleks koji katalizuje prevođenje vode do kiseonika (engl. oxygen-evolving complex, $CaMn_4O_5$) (Hasanuzzaman i sar., 2020, modifikovano).

Tabela 2.1. Reaktivne vrste kiseonika: vreme poluživota, dužina migracije u ćeliji, mesta nastanka u ćeliji, reakcije sa makromolekulima, antioksidansi koji ih uklanjaju (preuzeto i modifikovano od Mittler, 2017).

ROS	$T_{1/2}$	Distanca migracije	Mesto nastanka	Način delovanja	Reakcije sa DNK	Reakcije sa proteinima	Reakcije sa lipidima	Sistem neutralisanja
Superoksid anjon radikal (O_2^-)	1-4 μ s	30 nm	Membrane, Hloroplasti, Mitohondrije	Reaguje sa dvostrukim vezama	Ne	Preko Fe centra	Ekstremno niska	SOD
Hidroksil radikal (OH^\cdot)	1 μ s	1 nm	Membrane, Hloroplasti, Mitohondrije,	Ekstremno reaktivan sa svim biomolekulima	Brzo reaguje	Brzo reaguje	Brzo reaguje	Flavonoidi i prolin
Vodnik peroksid (H_2O_2)	1 ms	1 μ m	Membrane, Hloroplasti, Mitohondrije, Peroksizomi	Oksidacija proteina i nastanak OH^\cdot preko Fe i O_2^-	Ne	Reakcija preko Cys ostatke	Ekstremno nisko	CAT, POD_x i flavonoidi
Singlet kisonik (1O_2)	1-4 μ s	30 nm	Membrane, Hloroplasti, Mitohondrije	Oksidacija proteina, PUFA i DNK	Reaguje sa G ostacima	Reakcija Trp, His, Tyr, Met i Cys ostatke	PUFA	Karotenoidi i α -tokoferol

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

Superoksid anjon radikal nastaje tako što O_2 primi jedan elektron. Sa samo jednim nesparenim elektronom manje je reaktivan u odnosu na $\cdot OH$ (Fridovich, 1995). Međutim, nastanak $O_2^{\cdot-}$ može uticati na formiranje reaktivnijih ROS kao što su hidrosil radikal, koji nastaje Heber-Weiss reakcijom (Sairam i sar., 1998), te češće singlet kiseonik (Halliwell, 2006). Superoksidni anjon radikal u najvećoj meri nastaje u mitohondrijama. Ovaj radikal ima veoma štetno dejstvo jer indukuje lipidnu peroksidaciju i oštećuje ćelijske membrane. Pri vodnom deficitu dolazi do zatvaranje stoma, smanjenja intenziteta fotosinteze i rasta. Zatvaranjem stoma, smanjuje se količina CO_2 u mezofilu lista, što rezultuje akumulacijom NADPH.

b) Hidrosil radikal (OH^{\cdot})

Hidrosil radikal je najreaktivniji intermedijerni proizvod delimične redukcije kiseonika. Hidrosil radikal nastaje pri neutralnoj pH u Haber-Wajsovoj reakciji između H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$.



U Fentonovoj reakciji vodonik peroksid može da reaguje sa Fe (Fe^{2+} , Fe^{3+}) i Cu jonima formirajući na taj način hidrosil radikal. Hidrosil radikal oštećuje membranu mitohondrija, DNA, oštećuje membranu ćelije i izaziva lipidnu peroksidaciju (LPO). Sve ovo je dovoljno da dođe do ireverzibilnog oštećenja ćelije (Halliwell, 2006; Kaushik Das i Roychoudhury, 2014).

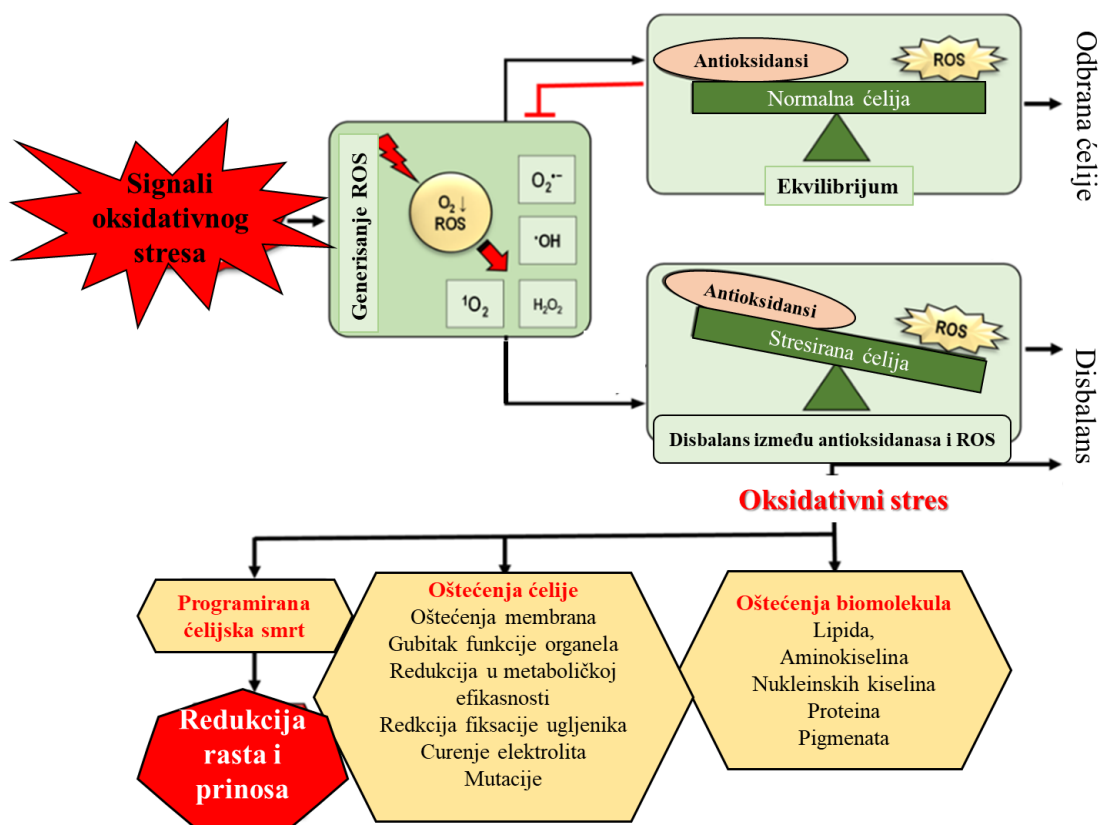
c) Vodonik peroksid (H_2O_2)

Vodonik peroksid u ćelijama nastaje redukcijom molekula kiseonika sa dva elektrona pri čemu je reakcija katalizovana brojnim oksidazama. Iako se ne može definisati kao slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona i mada predstavlja najstabilniji intermedijerni proizvod redukcije kiseonika, vodonik peroksid takođe iskazuje brojne toksične efekte (Zorov i sar., 2014). Ovaj molekul može difundovati kroz membrane što ga čini reaktivnim i van mesta nastanka.

Kao što je prethodno navedeni, vodonik peroksid u Fentonovoj reakciji reaguje sa prelaznim metalima kao što su Fe (Fe^{2+} , Fe^{3+}) i Cu.

2.4. Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje povećane koncentracije ROS u ćeliji koji nastaje zbog poremećaja unutarćelijskog balansa između prooksidanata i antioksidanata u korist prooksidanata (Slika 2.12). Drugim rečima, oksidativni stres je stanje u kome koncentracije ROS premašuju postojeći kapacitet biološkog sistema da neutrališe reaktivne intermedijare ili da popravi već nastala oštećenja (Aseervatham i sar., 2013).

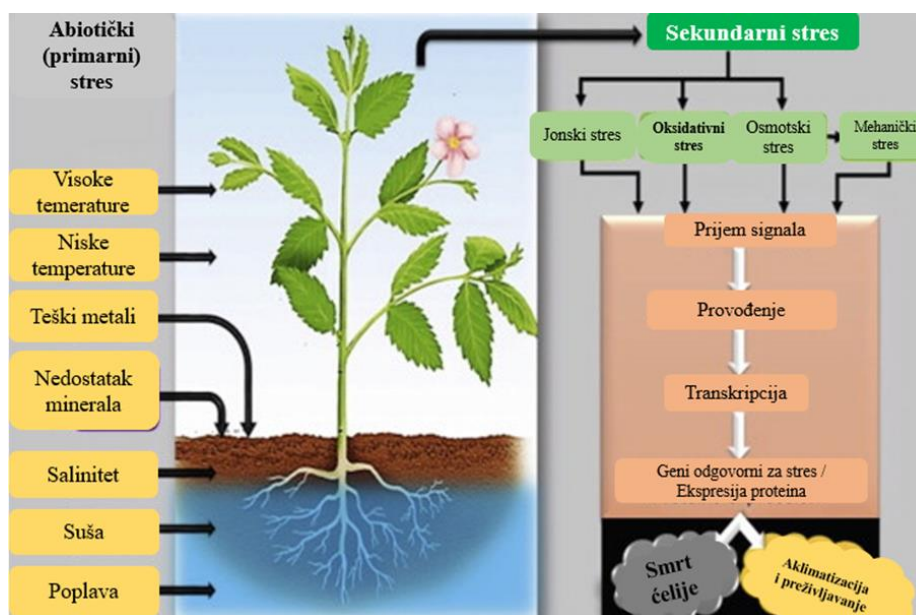


Slika 2.12. Oksidativni stres u biljnoj ćeliji i njegove posledice (Hasanuzzaman i sar., 2020; modifikovano).

Bilo koja promena u životnoj sredini koja narušava redoks homeostazu može dovesti do oksidativnog stresa. Narušavanje redoks homeostaze i akumuliranje ROS u ćeliji vodi ka oštećenjima DNK molekula, proteina, lipida, fotosintetičkih pigmenata (Slika 2.12) (Dat i sar., 2000; Jaleel i sar., 2009). Osim toga, proizvodnja ROS tokom stresa usled promena u životnoj sredini je jedan od glavnih uzroka smanjenja produktivnosti, oštećenja i smrti ćelije (Slika 2.12).

Oksidativni stres mogu izazvati brojni primarni stresori, abiotički i biotički faktori, kao što su promena temperature, vodnog režima, visok intenzitet svetlosti, soli u zemljištu, izloženost ozonu, patogeni. S toga se oksidativni stres vrlo često označava kao sekundarni stres, jer nastaje kao rezultat dejstva više različitih primarnih stresora. Upravo, povećana proizvodnja ROS se označava kao oksidativni stres ili sekundarni stres (Slika 2.13).

Reaktivne vrste kiseonika se ne generišu samo u stresnim uslovima, već se u malim količinama sintetišu i u fiziološkim uslovima i deluju kao signalne molekule (primer je lignifikacija ćelijskog zida kod biljaka) (Mittler, 2002; Maksymiec, 2007; Gill i Tuteja, 2010).

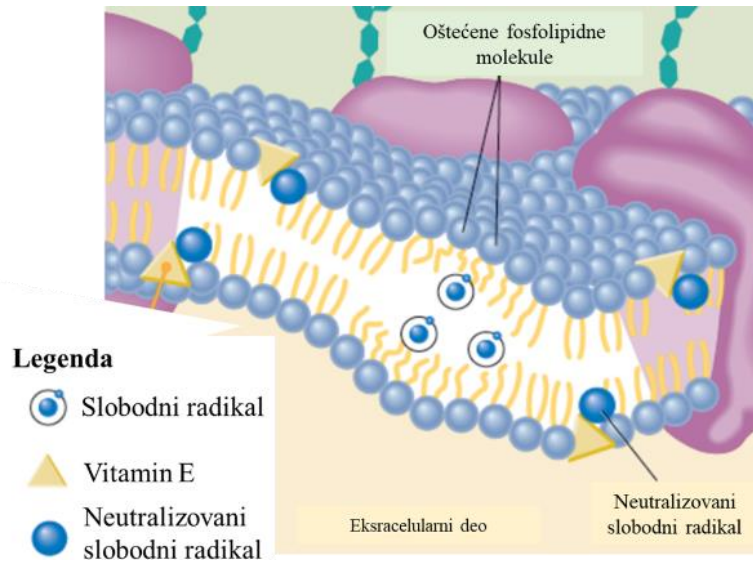


Slika 2.13. Efekat primarnih abiotičkih stresora na biljke. Svi primarni abiotički stresori (visoke i niske temperature, teški metali, salinitet, vodni deficit, vodni suficit i dr.) vode ka nastajanju sekundarnih abiotičkih stresova (jonski, oksidativni i osmotski stres), a koji dalje vode signalnim putevima ka promeni u ekspresiji gena. Promene u ekspresiji gena ili proteina dovode ili do aklimatizacij ili do smrti ćelije (Khan i sar., 2014b; modifikovano).

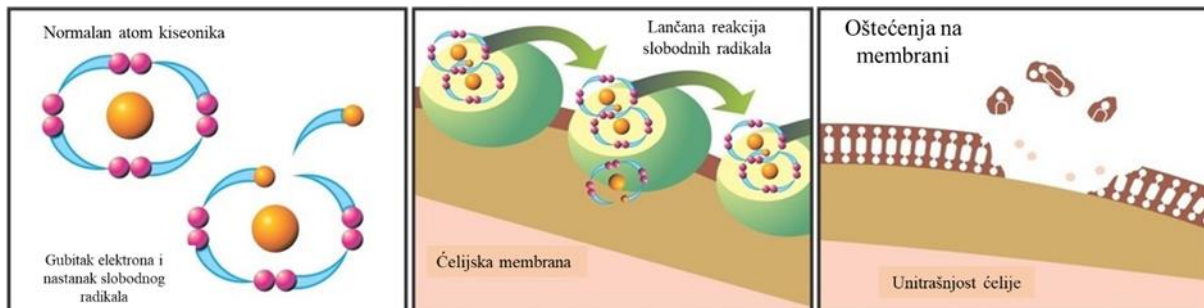
2.4.1. Lipidna peroksidacija

Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu su mnogo otpornije na delovanje ROS u odnosu na polinezasićene masne kiseline (PUFA – *engl. polyunsaturated fatty acids*). Naime, PUFA, koji su značajni konstituenti ćelijske membranama, su glavna meta lipofilnih RNS i ROS (Slika 2.14A, B).

A)



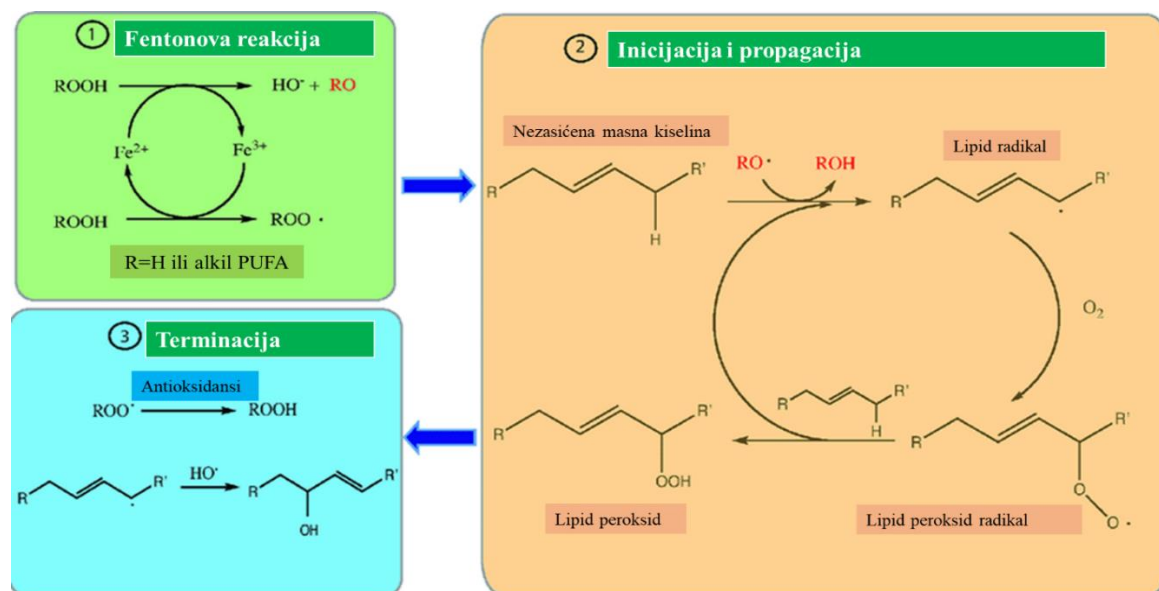
B)



Slika 2.14. Mehanizam delovanja slobodnih radikala na ćelijsku membranu i dejstvo antioksidanata (A) te nastanak superoksid anjona (B)

(<http://sciencedoing.blogspot.ba/2012/09/free-radicals-cause-and-concern.html>,
modifikovano

Mehanizam delovanja slobodnih radikala na ćelijsku membranu i dejstvo antioksidanata je prikazano na Slici 2. 14. Slobodni radikali koji mogu izazvati oksidaciju viših masnih kiselina su $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , $\text{RO}\cdot$ i $\text{RO}_2\cdot$ dok je $\text{O}_2^{\cdot-}$ nedovoljno reaktivan (Feng i Stockwell, 2018). Jednom pokrenuta reakcija peroksidacije nastavlja se autokatalitički, a kao krajnji rezultat su strukturno-funkcionalne promene masnih kiselina (Feng i Stockwell, 2018). Lipidna peroksidacija ima 3 faze (Slika 2.15): inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Reakcija molekuskog kiseonika i PUFA je nemoguća, s toga lipidna peroksidacija započinje slobodno radikalskim mehanizmom koji se ogleda u tome da slobodni radikal izdvoji atom vodonika iz metil grupe ($-\text{CH}_2$). Prisustvo dvostrukih veza u masnim kiselinama slabi C-H vezu na ugljenikovom atomu u blizini dvostruke veze, te olakšava premeštanje vodonika. Tada se ugljenikovi atomi nastoje stabilizovati formirajući konjugovane diene. Na taj način nastaje jedinjenje koje može reagovati sa molekulkim kiseonikom, te reakcijom kiseonika i diena nastaje peroksilni radikal ($\text{LOO}\cdot$). Nastali peroksilni radikali su izrazito reaktivni pa dalje reaguju sa masnom kiselinom oduzimajući joj vodonikov atom pri čemu započinje reakcija propagacije uz nastajanje lipidnog hidroperoksida (LOOH). Lipidni hidroperoksid dalje disosuje do aldehida (najčešće MDA) i isparljivih ugljovodonika (etana i pentana) (Feng i Stockwell, 2018).



Slika 2.15. Shema - inicijacija i propagacija procesa lipidne peroksidacije; (Feng i Stockwell, 2018; modifikovano).

Funkcionalni integritet membrana, procenat nezasićenih masnih kiselina, te stvaranje slobodnih masnih kiselina je usko vezano sa metabolizmom ROS. Održanje integriteta membrana, a posebno njenog lipidnog dela, je jedan od najvažnijih faktora za preživljavanje biljaka pri hipoksiji. Biljke tolerantne na anoksiju (npr. riža ili *Echinochloa phyllopogon*) su sposobne da sintetišu lipide i pri potpunoj anoksiji. Kod ovih biljaka je detektovana sinteza fosfolipida, glikolipida i neutralnih lipida, kao i zasićenih masnih kiselina (Generosova i Vartapetian, 2005). Autori su pokazali da pri anoksiji i hipoksiji dolazi do porasta koncentracije zasićenih masnih kiselina.

Proizvodi lipidne peroksidacije

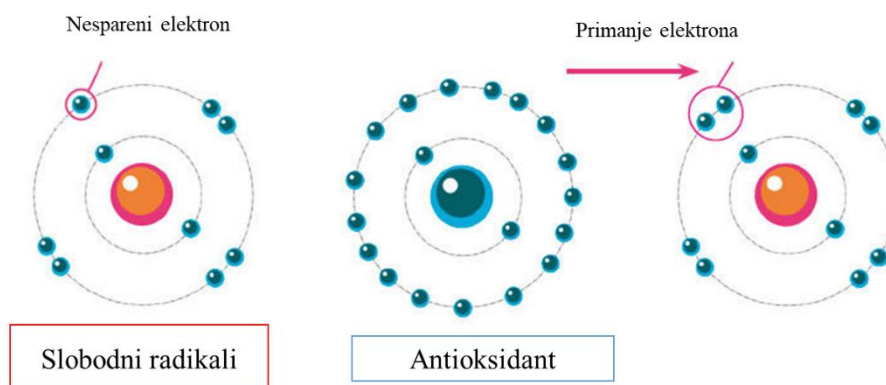
Pod dejstvom jona gvožđa ili bakra, lipidni peroksidi generišu mnogobrojne proizvode kao što su: aldehidi, ketoni, ugljovodonici (etani, eteni, pentani), epoksidi te aktivni radikali. MDA kao proizvod lipidne peroksidacije je upravo pokazatelj da je došlo do narušavanja strukture membrana. MDA molekuli reaguju sa proteinima, sa veoma značajnim afinitetom prema ostacima lizina, kao i molekulima DNK (gde je guanin ciljno mesto što dovodi do mutacija). Razgradnjom MDA u organizmu nastaju malonatne kiseline koje su inhibitori mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze (Yamauchi i sar., 2008). Biljne biomembrane, posebno membrane hloroplasta, sadrže veliki procenat tro-nezasićene masne kiseline sa C18 i C16 kojih ima od 50% do 90% u membrani biljaka, dok di- i mono-nezasićenih ima do 25% (Allen i sar., 1966; Douce i Holtz, 1973; Yamauchi i sar., 2008). Visoke koncentracija ovih masnih kiselina u tilakoidnoj membrani hloroplasta obezbeđuje veću fluidnost i omogućava veću efikasnost pri sakupljanju svetlosne energije. Međutim, to ih čini jako podložnim peroksidaciji i nastanku proizvoda oksidacije koji imaju toksičan efekat. Upravo je MDA proizvod lipidne peroksidacije koji najviše nastaje u stresnim uslovima u biljnim ćelijama i smatra se glavnim oksidativnim markerom stresa (Yamauchi i sar., 2008) kod svih oblika abiotičkog stresa, uključujući i stres izazvan vodnim suficitom ili deficitom.

Osim MDA, proizvodi lipidne peroksidacije su i hidroksialkenal 4-hidroksinonenal (HNE), koji je u većim količinama veoma toksično jedinjenje koje inhibira rast ćelija, modifikuje lipoproteine, fosfolipide, DNK i slično (Yamauchi i sar., 2008).

2.5. Antioksidativni metabolizam

Antioksidativni sistem zaštite (engl. *antioxidant defence system*, AOS) nastao je tokom evolucije kod svih aerobnih organizama, kako bi se sprečila, ograničila ili „popravila“ oštećenja nastala delovanjem reaktivnih ROS.

Antioksidansi su molekuli sposobni da uspore ili spreče oksidaciju drugih molekula tako da sami bivaju oksidovani (Slika 2.16) (Sies, 1997).



Slika 2.16. Antioksidansi kao donori elektrona, (<http://normsfarms.com/what-are-antioxidants/>)

Antioksidansi deluju na sledeći način:

- uklanjanje ROS: superoksid anjon radikal, vodonik peroksid i dr.
- inhibicija nastanka ROS delujući na sam izvor nastanka, kao što je npr. kroz inhibiciju NAD(P)H oksidaze smanjući na taj način brzinu nastajanja peroksid anjoj radikala (Steffen i sar., 2008)
- popravljaju oštećenja biomolekula nastalih pod uticajem ROS-a.

Dele se na enzimске i neenzimске antioksidante, odnosno sistem antioksidativne zaštite (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Enzimski i neenzimski antioksidansi (Hasanuzzaman i sar., 2020; modifikovano)

Antioksidansi	Reakcije koje katalizuju	Mesto odvijanja reakcija
Enzimski antioksidansi		
Superoksid dismutaze (SOD) EC 1.15.1.1	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Hloroplasti, peroksizomi, citosol, mitohondrije, apoplasti
Katalaze (CAT) EC 1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Peroksizomi
Peroksidaze (POX) EC 1.11.1.7	$2PhOH + H_2O_2 \rightarrow 2PhO^{\cdot} + 2H_2O$ $PhO^{\cdot} + Asc \rightarrow PhOH + MDHA$ $PhO^{\cdot} + MDHA \rightarrow PhOH + DHA$	Ćelijski zid, apoplasti, vakuole
Polifenol oksidaze (PPO) EC 1.14.18.1	$PhOH + O_2 \rightarrow$ Kateholi $Kateholi + O_2 \rightarrow Q + H_2O$	Tilakoidi membrane hloroplasta, citosol, vakuole
Askorbat peroksidaze (APX) EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + MDHA$	Hloroplasti, peroksizomi, citosol, mitohondrije, apoplasti
Monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR) EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$	Hloroplasti, citosol, mitohondrije
Dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) EC 1.8.5.1	$2GSH + DHA \rightarrow GSSG + AA$	Hloroplasti, citosol, mitohondrije
Glutation reduktaze (GR) EC 1.6.4.2	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow GSH + NADP^+$	Hloroplasti, citosol, mitohondrije

Glutation peroksidaze (GPX) EC 1.11.1.9	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$	Citosol, mitohondrije
Glutation S-transferaze (GSH) EC 2.5.1.18	$R - X + GSH \rightarrow GS - R + H - R$	Hloroplasti, citosol, mitohondrije
Peroksiredoksini (PRX) EC 1.11.1.15	$H_2O_2 + PRX - S^- \rightarrow OH^- + PRX - SOH$ $PRX - SOH + GSH \rightarrow PRX - SSG + H_2O$ $PRX - SSG + GSH \rightarrow PRX - S^- + GSSG$	Hloroplasti, citosol, mitohondrije, jedro, vanćelijski prostor
Tioredoksin (TRX) EC 1.8.1.9	$TRX - RS_2 + NADPH + H^+ \rightarrow TRX - R(SH)_2 + NADP^+$	Hloroplasti, citosol, mitohondrije
Neenzimski antioksidansi		
Aksorbinska kiselina (AA)	Uklanja $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 i 1O_2	Hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi, apoplast, citosol
Glutation (GSH)	Uklanja OH^{\cdot} , H_2O_2 i 1O_2	Hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi, apoplast, citosol
Tokoferol	Uklanja OH^{\cdot} , ROO^{\cdot} , $ROOH$ i 1O_2	Tilakoidna membrana hloroplasta
Karotenoidi (Car)	Uklanjaju 1O_2	Hloroplasti
Flavonoidi	Uklanjaju $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i 1O_2	Hloroplasti i vakuole
Polifenoli (Phe)	Uklanjaju $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 , ROO^{\cdot} i $ONOO^-$	Ćelijski zid, vakuola
Alkaloidi	Uklanjaju $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 i 1O_2	Vakuole
Neproteinske aminokseline	Uklanjaju $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i 1O_2	Citosol, mitohondrije, ćelijski zid

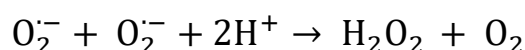
2.5.1. Enzimski antioksidanti

2.5.1.1 Superoksid dismutaze

Superoksid dismutaze (superoksid oksidoreduktaza) su metalo-enzimi koji igraju ključnu ulogu u neutralizaciji O_2^- , jer sprečavaju inicijaciju lančane reakcije oksidacije, koju ovaj anjon pokreće, a koja za krajnji ishod ima značajna oštećenja biomolekula (Voet i Voet, 1995; Miller, 2004).

Superoksid dismutaze su enzimi koji katalizuje razgradnju superoksid anjon radikala do kiseonika i vodonik peroksida. SOD su veoma važan deo antioksidativnog metabolizma u gotovo svim ćelijama izloženim kiseoniku. Dejstvo SOD zasniva se na dismutaciji dve molekule superoksid anjon radikala pri čemu nastaju kiseonik i H_2O_2 što je prva faza u uklanjanju reaktivnih vrsta kiseonika. Unutar ćelije SOD čini prvu liniju odbrane protiv ROS.

Dismutacija se zasniva na činjenici da O_2^- , može biti i oksidant i reduktant, pa SOD koriste jedan molekul superoksid anjon radikala da bi oksidovali drugi O_2^- molekul prema reakciji:



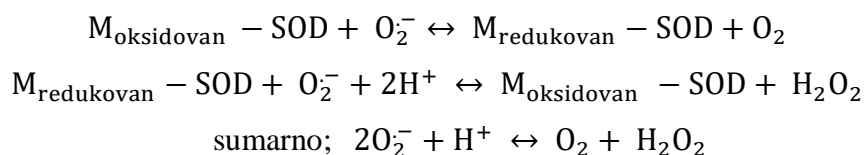
Mehanizam delovanja SOD omogućen je redukcijom i reoksidacijom metala u aktivnom centru enzima.

Izoforme SOD

Tokom evolucije razvilo se nekoliko izoformi SOD sa različitim metalnim jonima kao kofaktorima: CuZn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD i Ni-SOD (DiDonato i sar., 2003; Wang i sar., 2008).

Sve izoforme SOD se međusobno razlikuju po molekulskoj masi, vrsti prelaznog metala u aktivnom mestu, lokalizaciji u ćeliji, mehanizmima regulacije i ulozi koju imaju u specifičnim fiziološkim i patološkim procesima. Zajednički za sve izoforme je princip reakcionog mehanizma u kome prelazni metal (M) u aktivnom centru enzima svojom redoks aktivnošću obezbeđuje katalitičku razlaganju superoksid anjon radikala.

Reakcija se odvija po sledećoj shemi:



Fe-SOD i Mn-SOD su po strukturi slični metaloenzimima i pojavljuju se kao homodimeri, retko kao homotetrameri, dok su CuZn-SOD homodimeri čiju osnovnu strukturu čine β -zavojnice (Tainer i sar., 1982) i Ni-SOD su opisane kao homoheksameri (Barondeau i sar., 2004; Wuerges i sar., 2004).

Bakar-cink superoksid dismutaze (CuZn-SOD). Bakar-cink superoksid dismutaza se eksprimira u svim eukariotskim ćelijama, a identifikovana je i u nekoliko bakterijskih vrsta. Ipak, prisustvo ovog enzima kod prokariota se pre smatra izuzetkom nego pravilom. Imunohemijskim metodama prisustvo CuZn-SOD, kod biljaka, je detektovano u citoplazmi, hloroplastima, apoplastu i ćelijskoj membrani (Zelko i sar., 2002).

Mangan superoksid dismutaza (Mn-SOD). Mangan superoksid dismutaza se eksprimira u skoro svim aerobnim organizmima, od bakterije do čoveka, a njeno prisustvo je zabeleženo čak i kod nekih anaeroba (Ravindranath i Fridovich, 1975). Kod prokariota Mn-SOD je lokalizovana u citoplazmi (Steinman i sar., 1994), a u eukariotskim ćelijama distribucija ovog enzima je isključivo mitohondrijalna (Weisiger i Fridovich, 1973; Shimoda-Matsubayashi i sar., 1996), izuzev nekoliko organizama gde je pronađena u citoplazmi, kao i u hloroplastima biljaka.

Gvožđe superoksid dismutaza (Fe-SOD). Prvi eukariotski organizmi kod kojih je identifikovana Fe-SOD bili su protisti (Opperdoes i sar., 1977; Dufernez i sar., 2006), ali vrlo brzo je pronađena i kod biljaka (Salin i Bridges, 1980). Po strukturi je vrlo slična Mn-SOD, ali značajno različita od CuZn-SOD. Vodonik peroksid inhibira Fe-SOD, dok je ova izoforma otporna na inhibiciju sa KCN-om. U svim do sada ispitanim biljnim vrstama lokalizovane su u hloroplastimama.

Utvrđeno je da se aktivnost SOD povećava kod biljaka koje su izložene hipoksiji (Yan i sar., 1996). Naime, aktivnost SOD se povećava pri vodnom suficitu kod tolerantnih genotipova, dok je zabeleženo smanjenje aktivnosti kod biljaka koje su netolerantne na uslove vodnog suficita. Porast aktivnosti SOD pri vodnom suficitu je zabeležen kod mnogih vrsta, kao što su: kukuruz (Jamei i sar., 2009; Tang i sar., 2010; Chugh i sar., 2016), citrusi (Hossain i sar., 2009), zlatni pasulj (Sairam i sar., 2011) i sl. (Tabela 2.5).

2.5.1.2 Katalaze

Katalaze (CAT) su jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu, a po strukturi su homotetrameri koji u aktivnom mestu sadrže gvožđe Fe^{3+} (Halliwell i Gutteridge, 2015). Katalizuju dva tipa reakcije:

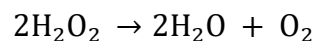
- katalazna reakcija** se odvija pri visokim koncentracijama supstrata ($>1 \mu\text{M}$), a tokom ove reakcije H_2O_2 se direktno prevodi u vodu i molekularni kiseonik.
- peroksidazna reakcija** se odvija pri niskim koncentracijama H_2O_2 uz pomoć različitih donora vodonika (alkoholi, AA).

CAT je prisutna u aerobnim eukariotskim ćelijama. Prisutna je u citoplazmi i mitohondrijama, te peroksizomima (El-Beltagi i Mohamed, 2013). Peroksizomi su mesto gde se generiše najveća količina vodonik peroksida zahvaljujući β -okidaciji masnih kiselina, fotorespiratornoj oksidaciji te metabolizmu purina (Mitter, 2002).

Katalaze su podeljene u tri grupe (Wiseman, 2010):

1. Monofunkcionalne HEM katalaze
2. Katalaze-Peroksidaze
3. Katalaze bez HEM grupe

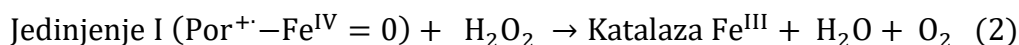
Sve tri grupe katalaza katalizuju isti tip reakcije degradiranja dve molekule H_2O_2 u vodu i kiseonik.



a) *Monofunkcionalne hem katalaze*

Monofunkcionalne katalaze su pronađene i kod prokariota i eukariota (Chelikani i sar., 2004). One mogu biti tetrameri, heksameri ili u nekim slučajevima i trimeri (Dos Santos i sar., 2000). Jednom nekovalentnom vezom su povezani sa hem grupom. Pri reakciji razgradnje vodonik peroksida do vode i kiseonika, postoje dva koraka:

- U prvom koraku jedan molekul vodonik peroksida reaguje sa hem grupom i generiše feri porfirin katjon radikal ($\text{Por}^{+\cdot} - \text{Fe}^{\text{IV}} = 0$), još nazvano i jedinjenje I (reakcija 1).
- U drugom koraku, drugi molekul vodonik peroksida reaguje sa feri porfirin katjon radikalom ($\text{Por}^{+\cdot} - \text{Fe}^{\text{IV}} = 0$) i prevodi vodonik peroksid do vode i kiseonika (reakcija 2) (Kato i sar., 2004).



b) Katalaze-peroksidaze

Hem katalaze-peroksidaze su prisutne u svim carstvima života i podeljene su u dve superfamilije:

- **Biljna superfamilija** (arhebakterije, gljive i biljke) – obuhvata askorbat peroksidazu (APX), citohrom c peroksidazu (CcP), magnezijum peroksidazu (Passardi i sar., 2007).
- **Animalna superfamilija** (peroksidaza-cikloksigenaza, peroksidaza sisara) – obuhvata mijelo peroksidaza (MPO), eozinofil peroksidaza (EPO), leuko peroksidaza (LPO) i tireoidna peroksidaza (TPO) (Zamocky i sar., 2008).

Obe grupe katalaza-peroksidaza imaju tetramernu strukturu u čijem se centru nalazi hem grupa.

c) Katalaze bez hem grupe

Organizmi koji ne mogu da sintetišu hem grupu sintetišu ovu vrstu katalaze. Ova klasa katalaza je karakteristična za eubakterije i neke anaerobne bakterije, kao što su laktobacili (Klotz i Loewen, 2003).

Katalaze imaju veoma značajnu ulogu u uklanjanju ROS nastalih tokom izlaganja biljaka vodnom suficitu i deficitu. Naime, kao odgovor na vodni stres i uklanjanje ROS zabeležena je povećana aktivnost CAT kod velikog broja biljaka kao što su: kukuruz (Bin i sar., 2010; Chugh i sar., 2016), *Cajanus cajan* (Kumuth i sar., 2009; Duhan i sar., 2017), pšenica (Tan i sar., 2008; Mubeen i sar., 2017), soja (Ershova i sar., 2011) i sl. (Tabela 2.5). Aktivnost katalaze je veća kod biljaka tolerantnih na vodni suficit i deficit, dok je zabeležena smanjena aktivnost ovog enzima kod biljaka koje su netolerantne na ovaj vid stresa. Pored toga, veća aktivnost CAT je izmerena u korenu u poređenju sa listom biljaka kukuruza (Chugh i sar., 2016).

2.5.1.3 Peroksidaze Klase III

Biljne peroksidaze Klase III (POX) su oksidoreduktaze koje katalizuju oksidaciju širokog spektra supstrata koristeći H_2O_2 kao ko-supstrat (Haschke i Freidhoff, 1978; Dawson, 1988; Lucena i sar., 2003). Peroksidaze Klase III su građene iz jednog polipeptidnog lanca sa hem grupom u aktivnom mestu. Za aktivnost peroksidaza neophodni su joni kalcijuma (Penel i sar., 1999) i imaju četiri visoko konzervisana disulfidna mosta.

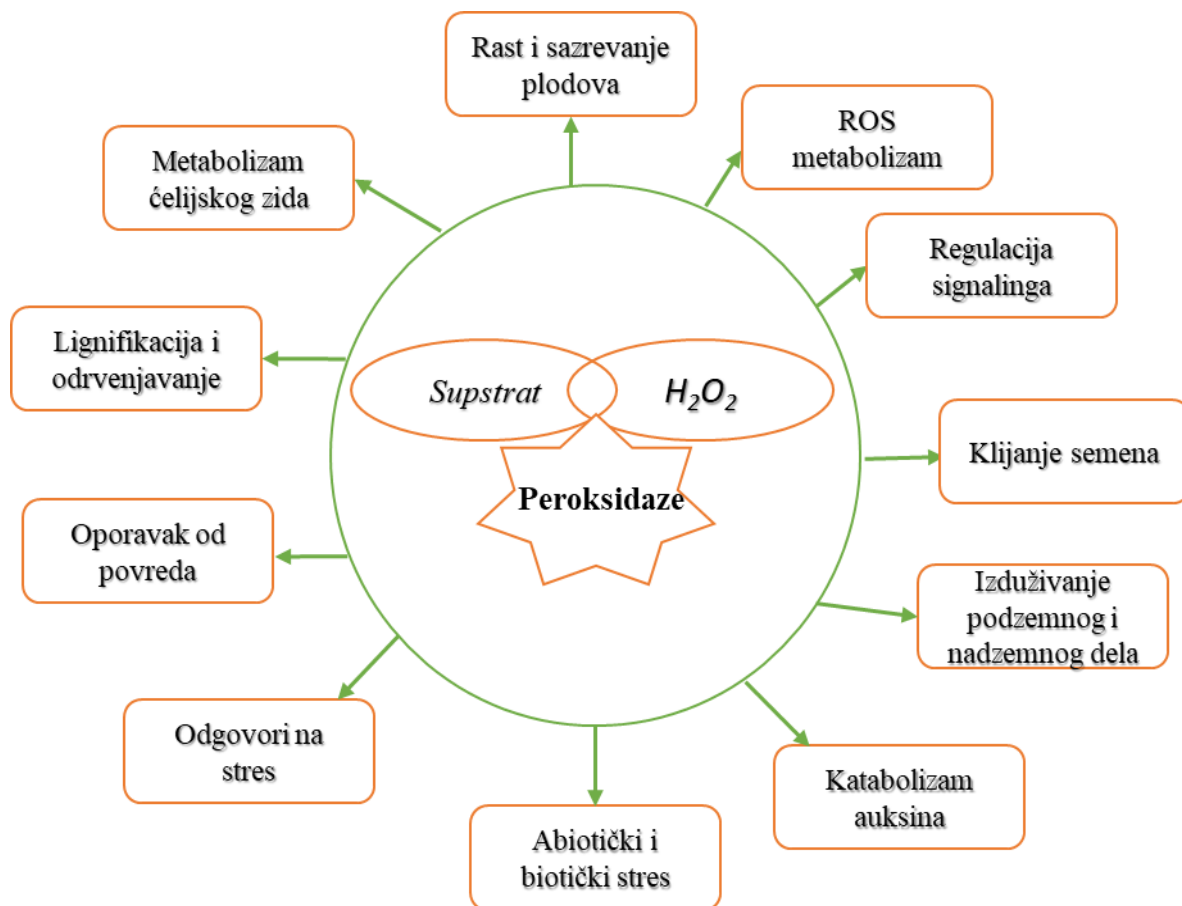
Peroksidaze su podeljene u tri subfamilije (Tabela 2.3);

1. Biljne peroksidaze,
2. Životinjske peroksidaze,
3. Katalaze.

Tabela 2.3. Klasifikacija biljnih peroksidaza (Hiraga i sar., 2001)

Subfamilija	Klasa	EC broj	Poreklo	Molekulska masa (kDa)
Biljne peroksidaze	I	Citohrom c peroksidaze (EC 1.11.1.5.)	Kvasci i biljke	32-62
		Katalaza – peroksidaza (EC 1.11.1.6.)	Bakterije i gljive	150-240
		Askorbat peroksidaza (EC 1.11.1.11.)	Biljke	30-58
	II	Mangan peroksidaza (EC 1.11.1.13.)	Gljive	43-49
		Lignin peroksidaza (EC 1.11.1.14.)	Gljive	40-43
	III	Peroksidaze (EC 1.11.1.7)	Biljke	28-60

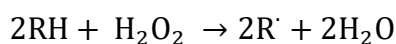
Peroksidaze učestvuju u različitim metaboličkim procesima (Slika 2.17) kao što su metabolizam auksina (Gazarian i sar., 1999), oksidaciji polifenola (Lagrimini, 1991), povezivanje strukturnih proteina i polisaharida (Fry, 1986) i sinteza lignina (Sancho i sar., 1996). Kao rezultat višestruke funkcije one učestvuju u ćelijskom rastu i razvoju (Wallace i Fry, 1999), ćelijskoj diferencijaciji, kao i odgovoru na abiotičke i biotičke stresore (Medina i sar., 1997; Veljović-Jovanović i sar., 2006; Morina i sar., 2008, 2015; Kukavica i sar., 2013; Meisrimler i sar., 2014) (Slika 2.17). Ove peroksidaze se najčešće nalaze u ćelijskom zidu, vakuolama, transportnim organelama, te u endoplazmatičnom retikulumu (Lucena i sar., 2003).



Slika 2.17. Shematski prikaz uloga biljnih peroksidaza (Pandey i sar., 2017; modificovano).

Sinteza POX, kao glikoproteina, odvija se u endoplazmatičnom retikulumu, a pomoću Goldžijevog aparata se transportuje u ekstracelularni prostor ili vakuolu (Lucena i sar., 2003; Veljović Jovanović i sar., 2018). Ovi enzimi se nalaze u ćelijskom zidu, apoplastu ili vakuoli kao solubilne, u intracelularnim ili ekstracelularnim komponentama te kao jonski ili kovalentno vezane za ćelijski zid (Kukavica i sar., 2017).

Peroksidaze su jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima kod biljaka. Njihova uloga se ogleda u uklanjanju vodonik peroksida, a mehanizam reakcije se može predstaviti na sledeći način (RH – supstrat za peroksidaze, - slobodni radikal (proizvod), Komponenta I – oksiferil porfirin π kation radikal ($Fe^{4+} = O, Por^+$), Komponenta II – oksiferil hem intermedijer ($Fe^{4+} = O - H$)) (Pandey i sar., 2017):

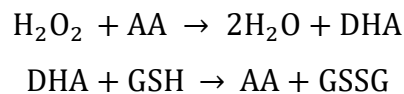


Peroksidaze imaju veoma važnu ulogu pri uklanjanju ROS molekula nastalih pri vodnom stresu. Povećanje aktivnosti POX je zabeleženo kod velikog broja vrsta, kao što su: kukuruz (Purabdal i sar., 2008; Bin i sar., 2010; Chugh i sar., 2016), *Cajanus cajan* (Duhan i sar., 2017), pšenica (Tan i sar., 2008; Mubeen i sar., 2017), soja (Ershova i sar., 2011) i dr. (Tabela 2.5). Osim toga, veliki broj izoformi peroksidaza zabeležen je kod različitih biljnih vrsta, koje su kodirane genima zaduženim za ogroman broj metaboličkih procesa važnih za rast i razvoj biljaka (Veljović Jovanović i sar., 2018).

Takođe, veća aktivnost POX je zabeležena kod biljaka otpornih na vodni deficit u odnosu na biljke koje su senzitivne na ovaj vid stresa (Lal i sar., 2019).

2.5.1.4 Askorbat peroksidaza

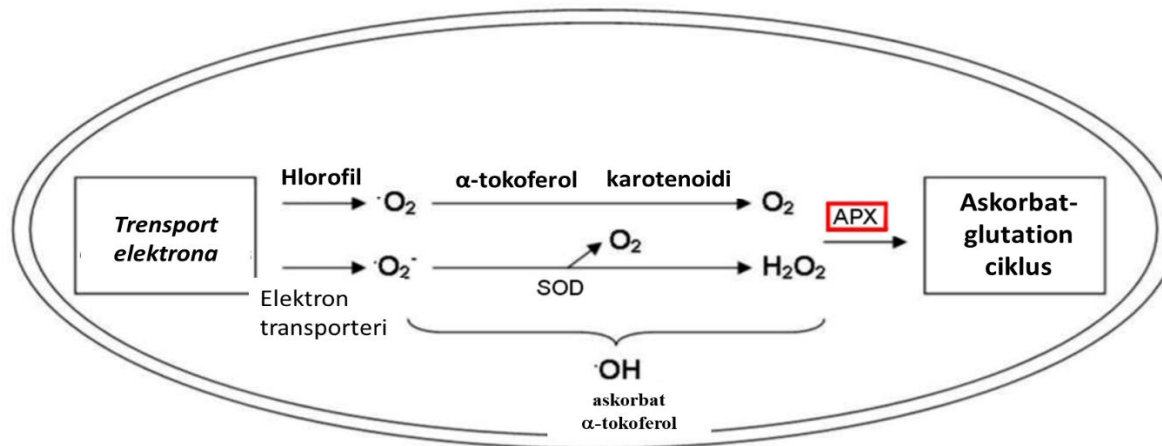
Katalaza uklanja H_2O_2 generisan u peroksizomima, dok glavnu ulogu u njegovom uklanjanju u hloroplastima i citoplazmi biljne ćelije ima askorbat peroksidaza (APX). Najveći deo vodonik peroksida sintetisanog tokom abiotičkog stresa biva eliminisano kroz ciklus askorbat-glutation, gde APX ima ključnu ulogu u konverziji H_2O_2 do H_2O koristeći askorbat kao elektron donor (Asada, 2000; Correa-Aragunde i sar., 2013; Gill i sar., 2013), kao i u “voda-voda” ciklusu (Gill i Tuteja, 2010). APX katalizuje oksidaciju AA do dehidroaskorbata (DHA) u prisustvu vodonik peroksida:



APX ima znatno veći afinitet prema H_2O_2 od katalaze i glutacion peroksidaze i njena uloga je presudna tokom stresa (Slika 2.18) (Asada, 2006; Mohan Murali Achary i sar., 2008).

Ukoliko sinteza APX vrši u organelama, onda ima ulogu u eliminaciji H_2O_2 generisanog u organelama, sa druge strane, ukoliko je sinteza odvija u citoplazmi omogućava eliminaciju H_2O_2 u citoplazmi. Postoji najmanje pet izoformi APX uključujući tilakoidnu (tAPX), izoformu lokalizovanu u membrani glikozoma (gmAPX), rastvorljivu izoformu lokalizovanu u stromi hloroplasta (sAPX) i citoplazmatičnu izoformu (cAPX) (Gill i Tuteja, 2010).

Prema Sharma i Dubey (2004), APX štiti ćelije od H_2O_2 u normalnim i stresnim uslovima. Autori ističu da je povećanje aktivnosti APX pokazano u reakciji na abiotički stres poput vodnog deficita, vodnog suficita, saliniteta, povećanu UV, visoke i niske temperature, toksičnosti metala kod različitih vrsta biljaka (Tabela 2.5) (Boo i Jung, 1999; Sharma i Dubey, 2005a; Sharma i Dubey, 2007; Han i sar., 2009; Sayfzadeh i Rashid, 2011). Istraživanja drugih autora su ukazala na značajne razlike između tolerantnih i osetljivih genotipova biljka u aktivnosti APX, a kao odgovor na vodni deficit.



Slika 2.18. Produkcija i eliminacija ROS u hloroplastima biljne ćelije pri abiotičkom stresu sa ključnom ulogom APX u ROS eliminaciji (Sofa i sar., 2015; modifikovano).

2.5.2. Neenzimski antioksidanti

a) Askorbat

Askorbat je jedna od najproučavanijih antioksidanasa (Carocho i Ferreira, 2013). U normalnim fiziološkim uslovima, askorbat se u biljci nalazi u redukovanoj formi kao AA, ali takođe postoji i u oksidovanoj formi, DHA u listovima i hloroplastima (Blokina i Fagerstedt, 2010). Askorbat direktno uklanja superoksid anjon radikal, hidroksil radikal i singlet kisonik prevodeći ih u vodonik peroksid. U reakciji koju katalizuje APX uklanja se vodonik peroksid (Blokina i Fagerstedt, 2010). AA predstavlja prvu liniju odbrane od ROS (Barnes i sar., 2002). Takođe može da regeneriše tokoferol iz tokoferol radikala na taj način štiti ćelijsku membranu (Sharma i sar., 2012).

Osim uloge antioksidanta, AA ima i neantioksidativne uloge u ćeliji. Utvrđeno je da učestvuje u regulaciji ćelijske deobe, ćelijskog ciklusa od G1 do S faze i ćelijskoj elongaciji (Sharma i sar., 2012).

Utvrđeno je takođe da se DHA ponaša kao signalna molekula za regulaciju zatvaranja stoma (Blokina i Fagerstedt, 2010). U procesu fotosinteze, AA ima važnu ulogu u odbrani ili smanjenju oksidativnog stresa nastalog usled delovanja različitih stresora.

Vodni suficit dovodi do povećanja koncentracije AA kod tolerantnih genotipova *Zea mays* (Jamei i sar., 2009; Chugh i sar., 2011), *Cajanus cajan* (Kumutha i sar., 2009; Duhan i sar., 2017) i paradajza (Lin i sar., 2004) u odnosu na senzitivne genotipove gde je zabeleženo smanjenje koncentracije AA (Tabela 2.5).

b) Polifenolna jedinjenja

Biljke proizvode veliki broj različitih organskih supstanci, od kojih većina nije direktno povezana sa rastom i razvićem biljaka. Ovaj tip komponenti se označen kao „sekundarni metaboliti“, još uvek im nije u potpunosti poznata uloga, ali se zna da imaju veoma značajnu ulogu u interakciji biljaka i okoline, štiteći biljke od različitih vrsta stresora. Mnogi sekundarni metaboliti su zaštitni agensi protiv patogena i herbivora, te omogućavaju privlačenje polinatora i rasejavanje semena (Das i Singh, 2016). Sekundarni metaboliti su klasifikovani u tri velike grupe, bazirane na biosintetskom poreklu jedinjenja: terpeni, alkaloidi i polifenoli.

Polifenolnim jedinjenjima koja imaju antioksidativno dejstvo, kao delu sekundarnog metabolizma, pripadaju flavonoidi, tanini, lignin i fenolne kiseline (hidroksicimetična i hidroksibenzoeva) (Bartwal i sar., 2013; Slika 2.19). Flavonoidi su najveća grupa fenolnih komponenti i prema heterocikličnom C prstenu se deli na: flavone, flavonole, flavanone, flavanole, antocijane i izoflavone (Zhang i sar., 2020). Polifenolna jedinjenja imaju aromatične

prstene sa –OH i –OCH₃ grupama. Klasifikacija polifenola prema broju C atoma u lancu je prikazana u Tabeli 2.5.

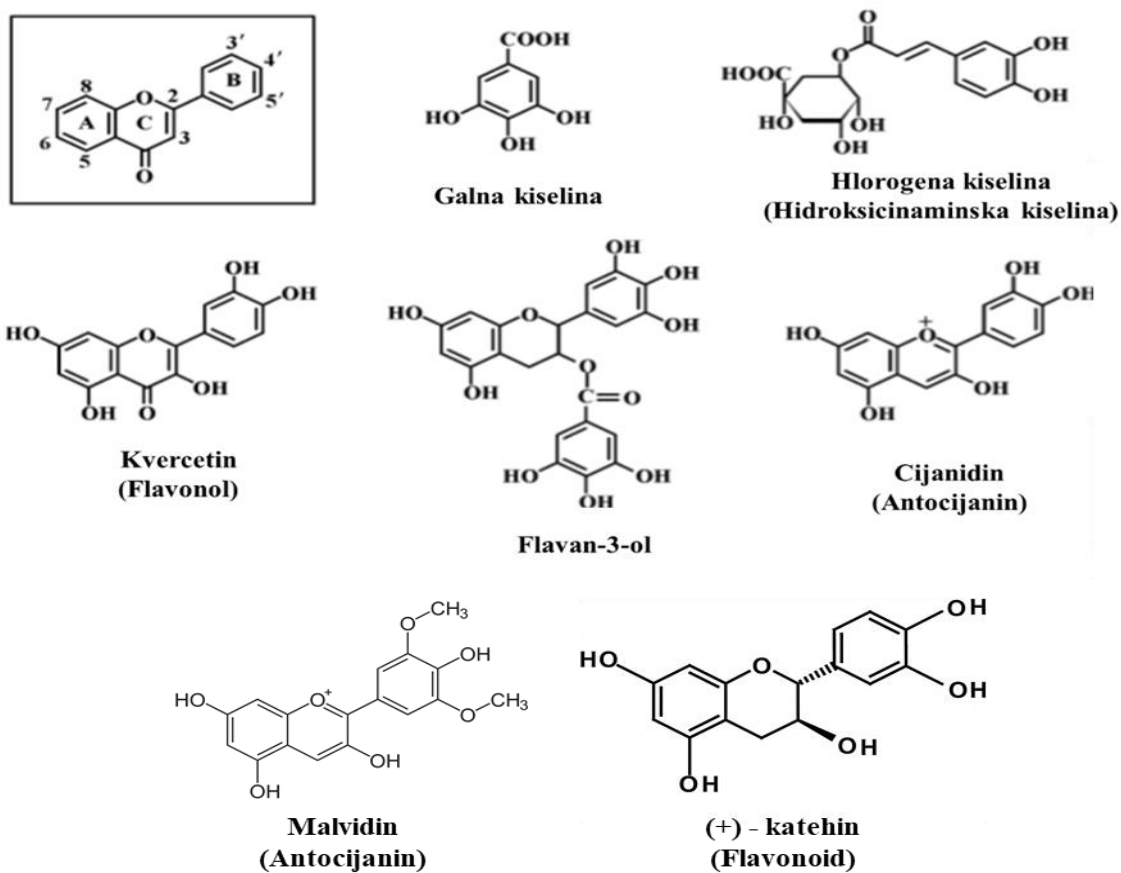
Tabela 2.4. Klasifikacija polifenola prema broju C atoma u lancu (Robards i sar., 1999; Durović, 2019).

Osnovni skelet	Klasa	Primer
C6	Jednostavni fenoli Benzohinoni	Katehol, hidrohion rezorcinol
C6 – C1	Fenolne kiseline	p-Hidroksibenzoeva, salicilna kiselina
C6 – C2	Fenilsirćetne kiseline	p-Hidroksifenilsirćetna kiselina
C6 – C3	Fenilpropeni Kumarini Hormoni	Eugenol, mirsticin Umbeliferon, eskuletin, skopolin Eugenin
C6 – C4	Naftohinoni	Juglon
C6 – C1 – C6	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C6 – C2 – C6	Stilbeni Antrahinoni	Emodin, hrizofenol, rein Sinensetin, nobiletin
C6 – C3 – C6	Flavonoidi Flavoni Flavonoli Flavonol glikozidi Flavanoli Flavanoni Flavanon glikozidi Antocijanini Flavanoli (katehini) Halkoni	Sinensetin, nobiletin izosinesetin, tangeretin, diosmin Kvercetin, kempferol Rutin Dihidroksikvercetin Hesperidin, naringenin Neohesperidin, narirutin, naringin Glikozidi peonidina, delfinidina, cijanida (+)-Katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin Filoridžin, arbutin, halkonaringenin
(C6 – C3) ₂	Lignini	Pineorezinol
(C6 – C3 – C6) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon

Antioksidativna aktivnost pojedinih polifenolnih jedinjenja je izraženija od antioksidativne aktivnosti važnih antoksidanata kao što su AA i α -tokoferol, jer mogu donirati elektrone ili atome vodonika (Ali i sar., 2006). Polifenoli mogu direktno ukloniti slobodne kiseonične radikale, te sprečiti lipidnu peroksidaciju uklanjajući lipidne radikale. Takođe, mogu uticati na smanjenje fluidnost ćelijske membrane (Ali i sar., 2006) što onemogućava prolaz ROS i sprečava peroksidaciju same membrane. Osim toga, utvrđeno je da se flavonoidi i fenilpropanoidi oksiduju u reakciji koju katalizuju POX uklanjajući H₂O₂ kroz fenoli/AA/POX sistem (Takahama i Oniki, 2000).

Antioksidativno dejstvo polifenola se ispoljava na nekoliko načina (Lobo i sar., 2010):

- direktno vezivanje ROS ili RNS, predajom H-atoma;
- heliranjem metalnih jona (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+});
- aktivacija antioksidativnih enzima;
- inhibicijom prooksidativnih enzima (enzimi citohroma P-450, lipoksigenaza, ksantin-oksida, NAD(P)H oksidaza).



Slika 2.19. Primeri biljnih fenolnih jedinjenja sa dokazanom antioksidativnom aktivnošću (Smirnof, 2005; modifikovano).

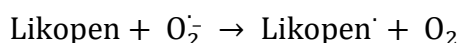
Uloga polifenolnih jedinjenja pri vodnom suficitu i deficitu je evidentna. Mnogi autori su pokazali promene u koncentraciji polifenola izloživši biljke vodnom deficitu i suficitu (Dixon i Paiva, 1995; Janas i sar., 2002; Wrobel i sar., 2005; Weidner i sar., 2009a). Smanjena sinteza polifenolnih jedinjenja je izmerena kod tri sorte grožđa pri vodnom deficitu (Król i sar., 2014). Međutim, sa druge strane Chung i sar. (2006) su uočili povećanje koncentracije polifenolnih jedinjenja pri vodnom deficitu kod vrste *Rehmannia glutinosa*. Osim toga, povećanje koncentracije različitih polifenolnih jedinjenja pri vodnom suficitu je uočeno kod graška (Selmar i Kleinwacher, 2013), *Silybum marianum* (Zahir i sar., 2014), *Hypericum brassiliense* (De Abreu i Mazzafera, 2005) te kod tri različite vrste roda *Achillea* (Gharibi i sar., 2016). Naime, uočeni su različiti odgovori biljaka na vodni deficit i suficit kada su u pitanju koncentracije polifenolnih jedinjenja i oni zavise od tipa stresa, njegovog intenziteta, trajanja, kao i stepena razvoja biljke, te od samog biljnog tkiva koje je ispitivano (Weidner i sar., 2009b)

c) *Karotenoidi*

Karotenoidi (Car) su lipoofilne organske molekule koje osim uloge pomoćnih pigmenata u procesu fotosinteze imaju veoma važnu ulogu i u detoksikaciji ROS. Podeljeni su na dve velike grupe: karotene i ksantofile. Ksantofili su smeštni u fotosintetičkom kompleksu za sakupljanje svetlosti koji je povezan sa reakcionim centrom FSII (Robert i sar., 2004). Karotenoidi imaju veoma značajnu ulogu i pri foto-zaštiti uklanjajući triplet hlorofil i singlet kiseonik (Havaux i Niyogi, 1999).

Inhibicijom sinteze karotenoida dolazi do fotooksidacije hloroplasta (Barry i sar., 1990). U stvari Car uklanja $^1\text{O}_2$ i rasipaju energiju u obliku toplote preko ksantofil ciklusa. Najpoznatiji među Car je β -karoten čija je uloga vezana za reakcije sa $^3\text{Chl}^*$ (triplet Chl^* ekscitovani hlorofil), što sprečava stvaranje $^1\text{O}_2$ i oksidativno oštećenje membrane (Stikić i Jovanović, 2012).

Karotenoidi direktno mogu uklanjati superoksid anjon radikala i druge slobodne radikale (Young i Lowe, 2001).



Povećana koncentracija karotenoida nakon vodnog deficita je izmerena u listovima suncokreta (Nazarli i sar., 2010) i u listovima zimske pšenice (Wang i sar., 2001) (Tabela 2.5). Talebi i sar. (2013) ukazuju da su veće koncentracije karotenoida kod vrsta koje su tolerantnije na vodni deficit i suficit u odnosu na osetljive genotipove.

Osim pri vodnom deficitu biljke su pokazale promene u koncentraciji karotenoida i pri izlaganju vodnom suficitu. Naime, studije su pokazale smanjenje koncentracije karotenoida u listovima *Vigna radiata* (Kumar i sar., 2013), *Triticum aestivum* (Collaku i Harrison, 2002) i *Allium fistulosum* (Yiu i sar., 2008) pri izlaganju vodnom suficitu. Međutim, povećana koncentracija karotenoida je zabeležena kod *Cucumis sativus* pri izlaganju vodnom suficitu u trajanju od 10 dana (Barickman i sar., 2019).

d) Tokoferol

Tokoferoli (α , β , γ i δ) pripadaju grupi lipofilnih antioksidanata koji uklanjaju slobodne kiseonične radikale i lipid peroksid radikale (Ouchi i sar., 2014). Antioksidativna aktivnost izomera tokoferola *in vivo* je $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ i zavisi od količine metil grupa koje se nalaze na polarnoj glavi fenolnog prstena. α -tokoferol, zahvaljujući tri metil grupe imaju najveću antioksidativnu aktivnost (Hussain i sar., 2013). Ciklus sinteze tokoferola mogu vršiti jedino fotosintetički organizmi, tj. odvija se u zelenim delovima biljaka. Prekursori za biosintezu ovih jedinjenja su homogentizinska kiselina (HGH) i fitil difosfat (PDP) (Wang i sar., 2013).

Tokoferoli fizički i hemijski štite lipide i druge membranske komponente onemogućavajući reakcije sa O_2 u hloroplastima, sprečavajući time lipidnu autooksidaciju (Marquardt i sar., 2013). Tokoferoli se akumuliraju kod tolerantnih biljaka kao odgovor na stres izazvan visokim temperaturama, vodnim deficitom, visokim salinitetom (Munne-Bosch i Alegre, 2000; Espinoza i sar., 2013).

e) Glutation

Glutation (GSH) je ćelijska komponenta male molekulske masa koja se sintetiše u hloroplastima i citoplazmi biljnih ćelija. GSH ima veoma važnu ulogu u uklanjanju ROS nastalog pri stresu održavajući na taj način ćelijski redoks balans (Meyer i Hell, 2005). U biljnim ćelijama se nalazi redukovana forma GSH koja može donirati elektron ROS molekulima i prevesti ih na taj način do netoksičnog oblika. Pri doniranju elektrona GSH postaje takođe reaktivan, međutim zajedno sa drugim GSH molekulom formira disulfid glutaciona, tzv. oksidovani glutacion (GSSG). U zdravim biljnim ćelijama 90% glutaciona se nalazi u GSH obliku (Mittler i sar., 2004). GSH ima veliki afinitet prema citoplazmatičnom H_2O_2 , ali i prema drugim ROS kao što su O_2^- i OH^- (Noctor i Foyer, 1998; Wang i sar., 2008). Međutim, glavna uloga GSH je regeneracija AA, kroz AA-GSH ciklus gde ima ulogu kofaktora enzima dehidroaskorbat dehidrogenaze (Noctor i Foyer, 1998; Halliwell, 2006).

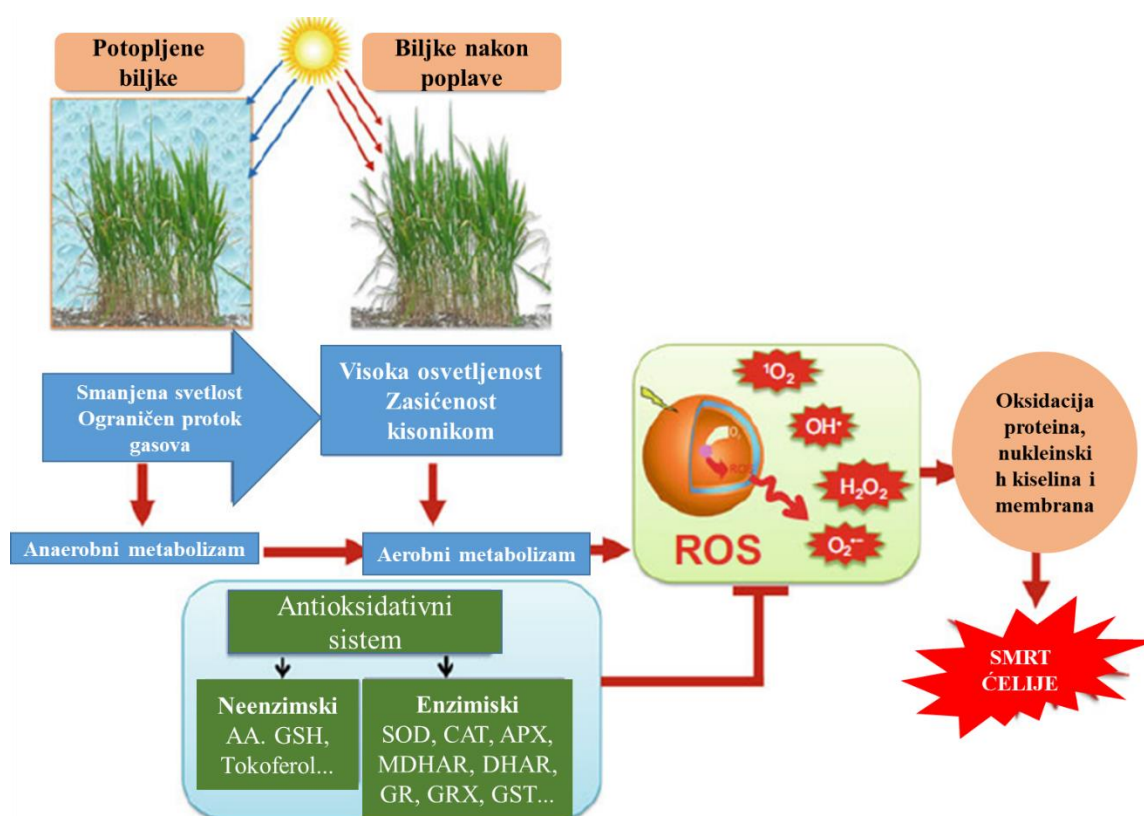
Istraživanja su pokazala povećanje koncentracije GSH pri vodnom suficitu u listovima tolerantnih i netolerantnih biljaka *Zea mays* (Jamei i sar., 2009; Chugh i sar., 2011), citrusa (Arbona i sa, 2008) i *Cajanus cajan* (Duhan i sar., 2017). Lesser (2006) naglašava da je veoma važno održavanje koncentracije GSH u biljnim ćelijama tokom vodnog suficita.

2.5.3. Oksidativni stres i antioksidativni metabolizam u uslovima vodnog suficita i deficita

Stres izazvan vodnim suficitom izaziva oksidativna oštećenja usled nastanka ROS (Blokina i sar., 2003). Pri uslovima vodnog suficita fotosintetički elektrontransportni lanac (ETC) je inhibiran te vodi ka nastanku povećane koncentracije ROS i posledično nastanka oksidativnog stresa (Ashraf, 2009).

Vodni suficit generalno stvara anaerobne uslove, koji vode ka hipoksiji i anoksiji kod biljaka, a kao rezultat toga nastaju ROS koji izaziva mnoga oštećenja u ćeliji (Halliwell i Gutteridge, 1999; Ashraf, 2009; Slika 2.20). Membranske lipide mogu direktno oštetiti OH[•] i H₂O₂ uz nastanak velike količine MDA, te neaktivnih enzima koji sadrže SH grupe (Ahmed i sar., 2002; Hossain i sar., 2009). Povećana koncentracija vodonik peroksida može inhibirati reakcije u Kalvinovom ciklusu i FSII (Ashraf, 2012).

Porast koncentracije MDA i vodonik peroksida izmereno je u korenu biljke *Vigna sinensis* pri vodnom suficitu (El-Enany i sar., 2013).



Slika 2.20. Nastanak ROS i detoksifikacija pre i posle vodnog suficita. U toku vodnog suficita biljke prelaze na aerobni metabolizam, dok u periodu nakon poplave sa povećanjem koncentracije kisonika metabolizam se menja u aerobni, usled čega dolazi do proizvodnje velikih količina ROS-a. Kako bi se ukonili nastali ROS molekuli aktivira se neenzimski i enzimski antioksidativni sistem, dok u slučaju nedovoljne količine istih ili prvelike koncentracije ROS dolazi do oksidativnih oštećenja makromolekula i smrti ćelije (Khan i Khan, 2017; modifikovano).

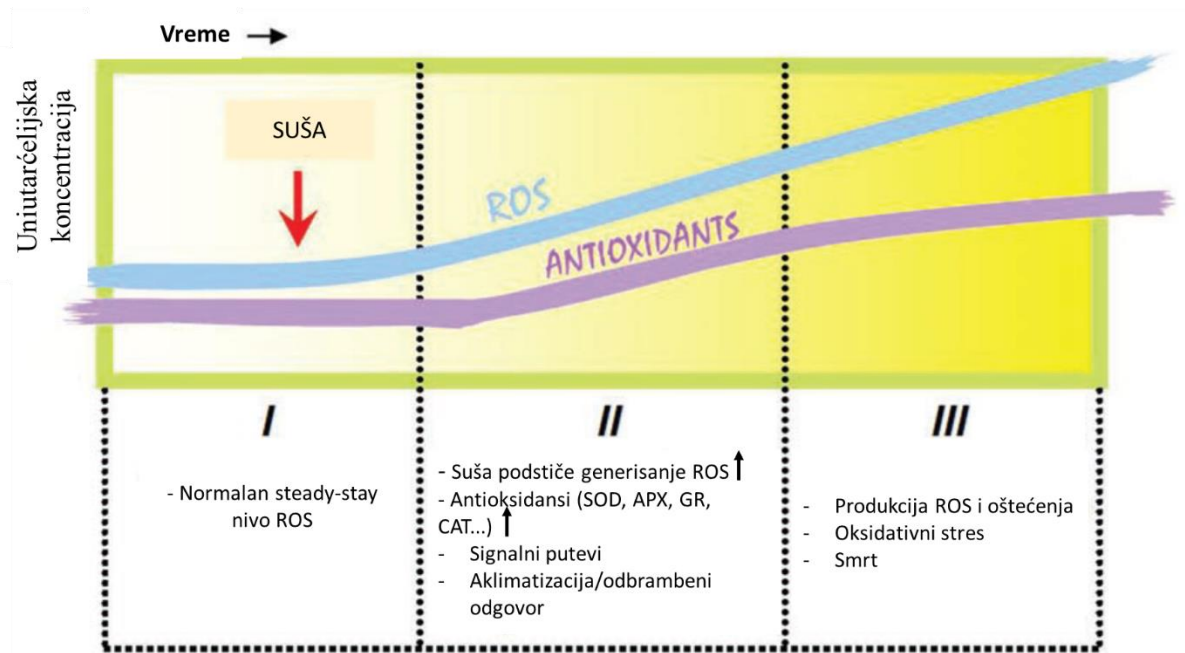
U normalnim uslovima u ćeliji se nalazi velika količina antioksidativnih enzima i metabolita koji mogu smanjiti ili ukloniti ROS i time smanjiti oksidativna oštećenja. Međutim, pri vodnom deficitu dolazi do povećanja koncentracije ROS i oksidativnog stresa, čime se bavi veliki broj studija (Malenčić i sar., 2000, Blokhina i sar., 2003, Foyer i Noctor, 2005; Sarker i Oba, 2018) (Slika 2.21). ROS izazivaju lipidnu peroksidaciju i dovode do oštećenja membrana. Pored toga dovode do degradacije proteina, inaktiviraju enzime (Sairam i sar., 2005). Tolerantni genotipovi biljaka ne bi samo trebali zadržavati vodu tokom vodnog deficita nego bi trebali imati veoma efikasan sistem koji će ih štititi od oksidativnih oštećenja.

Tokom vodnog deficita povećana aktivnost antioksidativnih enzima je povezana sa smanjenim nivoom lipidne peroksidacije, a u vezi sa tolerantnošću na vodni deficit (Bowler i sar., 1992). Antioksidansi male molekulske mase kao što su Car, tokoferoli, GSH, AA mogu

reagovati sa skoro svim vrstama ROS. Posebnu ulogu imaju poliamini u prevenciji fotooksidativnog oštećenja (Tadolini, 1988; Løvaas, 1996).

Usled različitih genetskih predispozicija, različiti hibridi iste vrste mogu imati različit odgovor na stres iz spoljašnje sredine kao i odgovor na oksidativna oštećenja nastala pri istom. Zato je neophodno pronaći hibride koji će biti tolerantni na vodni deficit, sa naglaskom na pronalaženja mehanizama za prevazilaženje ili smanjivanje oksidativnih oštećenja izazvanih istim (Foyer i sar., 1997). Naime, studije Foyer i sar. (1997) upućuju na činjenicu da su najveća oštećenja izazvana abiotičkim ili biotičkim stresorima povezana sa oksidativnim oštećenjima na ćelijskom nivou.

Zlatev i sar. (2006) u svojoj studiji objašnjavaju da pri kraju perioda vodnog deficita dolazi do nakupljanja vodonik peroksida i OH[•]. Visoke koncentracije H₂O₂ dovode do lipidne peroksidacije, smanjenje metaboličkih funkcija i narušavanje integriteta cele ćelije (Menconi i sar., 1995; Velikova i sar., 2000). Vodonik peroksid može da difunduje kroz membranu na veće distance izazivajući promene u redoks statusu susednih ćelija i tkiva, gde u veoma malim koncentracijama izaziva antioksidativni odgovor (Foyer i sar., 1997). Produkcija H₂O₂ indukovana vodnim deficitom u mezofilu lista može biti povezana sa promenama u strukturi ćelijskog zida (Scandalios i sar., 1997).



Slika 2.21. Model koji objašnjava promene u metabolizmu tokom vodnog deficita u tri sukcesivne faze. Normalan nivo ROS-a pri vodnom defcitu (I). Povećan nivo ROS zbog zatvaranja stoma, povećana signalna transdukcija (II), prolongiran vodni deficit rezultira eskalaciji produkcije ROS koji više ne može biti uklonjen antioksidativnim sistemom i rezultira smrću ćelijom (Cruz de Carvalho, 2008; modifikovano).

Tabela 2.5. Uticaj vodnog deficita i suficita na enzimske i neenzimske antioksidante

Tip stresa	Biljka (organ)	Trajanje stresa	Enzimski i neenzimski antioksidanti	Odgovor	Referenca
VODNI SUFICIT	<i>Sesamum indicum</i> (list)	2, 4, 6 i 8 dana	APX, GPX, CAT, GSH GR, AA	↑ ↓	Anee i sar., 2019.
	<i>Cajanus cajan</i> (list) Genotip ICP 301	2, 4, 6 dana	SOD, APX, GR, CAT	↑	Kumutha i sar., 2009.
	<i>Cajanus cajan</i> (list) Genotip PUSA 207	2, 4, 6 dana	SOD, APX, GR, CAT	↓	Kumutha i sar., 2009.
	<i>Citrus paradise</i> (list)	13, 18, 23, 28 dana	SOD, APX, GR, CAT DHAR, MDHAR	↑ ↓	Hossain i sar., 2009.
	<i>Zea mays</i> (list)	2, 4, 6, 8, 10 dana	CAT, POX, SOD	↑	Bin i sar., 2010
	<i>Zea mays</i> (list)	3, 6, 9 dana	CAT, POX, SOD	↑	Tian i sar., 2019b
	<i>Zea mays</i> (list)	48, 96, 144, 196 sati	AA, GHS, SOD, CAT, APX u prvim h SOD, CAT, APX kasnije	↑ ↓	Jamei i sar., 2009;
	<i>Zea mays</i> (koren)	72 sata	AA, GSH SOD, CAT, APX	↑ ↓	Chugh i sar., 2011
	<i>Hordeum vulgare</i> (list)	1, 4, 8, 12, 18 dana	CAT, POX, SOD, GR	↑	Zhang i sar., 2007a
	<i>Cajanus cajan</i> (list) ICPL 84023	2, 4, 6 dana	SOD, APX, GR, CAT	↑	Sairam i sar., 2009.

VODNI DEFICIT	<i>Cajanus cajan</i> (list) ICP 7035	2, 4, 6 dana	SOD, APX, GR, CAT	↓	Sairam i sar., 2009.
	<i>Malus prunifolia</i> (list)	12 dana	SOD, POD, APX, GR, DHAR, GSH, AA	↑	Wang i sar., 2012
	<i>Malus hupehensis</i> (list)	12 dana	SOD, POD, APX, GR, DHAR GSH, AA	↑	Wang i sar., 2012
	<i>Oryza sativa</i> (list)	24 sata	SOD, APX, MDHAR, DHAR, GR CAT	↑ ↓	Sharma i Dubey, 2005a
	<i>Oryza sativa</i> (nadzemni deo biljke)	2 dana	MDHAR, DHAR, GR SOD, APX, CAT, POX	↑ ↓	Boo i Jung, 1999
	<i>Beta vulgaris</i> (list)		SOD, CAT, GRX	↑	Sayfzadeh i Rascid, 2011
	<i>Triticum sativum</i>		SOD, CAT, GR	↑	Sgherri i sar., 2000
	<i>Ailanthus althissima</i> (list)	14 dana	SOD, CAT	↑	Gibbs i sar., 1995

3. Ciljevi

istraživanja

Cilj ovog istraživanja je bio utvrđivanje interhibridne razlike u odgovoru na vodni suficit i deficit antioksidativnog sistema zaštite u listu dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606, što bi dalje dalo mogućnost selekcije otpornijeg hibrida.

Ciljevi su realizovani merenjem sledećih parametara u listovima sadnica kukuruza izloženih uslovima vodnog suficita, odnosno deficita:

- Fizioloških parametara: koncentracije fotosintetičkih pigmenata, relativnog sadržaja vode, koncentracije solubilnih proteina i slobodnog prolina;
- Parametara oksidativnog stresa: koncentracije H₂O₂ i MDA;
- Antioksidativnih parametara: aktivnosti enzimskih antioksidanasa (SOD, CAT, APX i POD) te koncentracije neenzimskih antioksidanasa (polifenola).

Hipoteze:

H1: Stres izazvan vodnim suficitom i deficitom će dovesti do promena u fiziološkim parametrima, kao što su koncentracije fotosintetičkih pigmenata, relativni sadržaj vode u biljkama, koncentracije solubilnih proteina te koncentracija slobodnog prolina, kod ispitivanih hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606).

H2: Vodni suficit i deficit će inicirati promene u oksidativnim parametrima, kao što su koncentracije H₂O₂ i MDA, kod ispitivanih hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606).

H3: Stres izazvan vodnim suficitom i deficitom će dovesti do promena u antioksidativnom mehanizmu (aktivnosti SOD, CAT, POX i APX) ispitivanih hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606).

H4: Promene u merenim parametrima zavisice od intenziteta trajanja stresa i genetičkim predispozicijama.

H5: Ispitivani hibridi kukuruza ZP 555 i ZP 606, shodno različitim genetskim predodređenostima, će pokazati interhibridne razlike te drugačije strategije antioksidativnog i fiziološkog odgovora na ova dva abiotička stresna faktora.

4. Materijal i metode

4.1. Biljke korištene u eksperimentu

Kukuruz (*Zea mays L.*) je biljka poreklom iz Srednje Amerike koja ima kosmopolitsko rasprostranjenje i pripada porodici trava (Poaceae). Kao jedna od tri žitarice koje su najvažnije i najviše korištene u ishrani ljudi i životinja vrlo često je bila model za proučavanje.

Morfološki parametri. Kukuruz je jednogodišnja jednodoma biljka sa opštim karakteristika monokotiledonih biljaka.

Koren. Koren kukuruza je žiličast i može rasti u dubinu zemlje i do 3 m. Korenov sistem se sastoji od primarnog i sekundarnog korenja. Primarni koren se sastoji od glavnog korena, bočnih korena i mezokotilenodih korena. Sekundarno korenje se razvija iz podzemnih ili nadzemnih nodija stabljike.

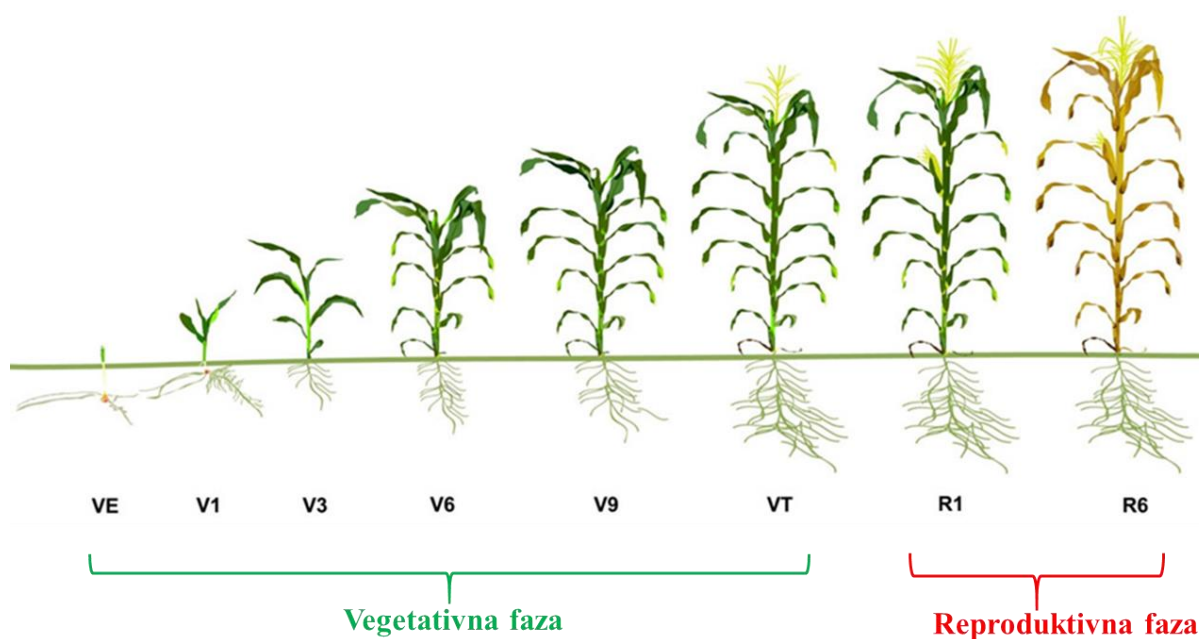
Listovi i stablo. Prema mestu gde nastaju razlikuje se više tipova listova kukuruza: klicini listovi, pravi listovi ili listovi stabljike i listovi omotača klipa. Pravi listovi su sedeći listovi sa paralelnom nervaturom koja kreće sa svakog nodusa. Pravi listovi su građeni od lisne ploče, ligule i rukavca. Stabljika - sastavljena je od nodusa i internodusa, cilindrična i ispunjena parenhimom.

Cvet i cvast. Ova žitarica koja može narasti i do 2 m visine ima razdvojene muške i ženske cvetove čineći cvasti metlicu od muških cvetova i klip od ženskih cvetova. Muška cvast (metlica) je pozicionirana na vrh stabljike i sastoji se od srednje ose i bočnih grana na kojima se nalaze klasići. Sa druge strane, klip je pozicioniran u pazuhu listova i se sastoji od zadebljalog vretena na koje su uzdužno poređani klasići sa ženskim cvetovima. Klip je po građi analog metlici uz redukciju bočnih grana. Tučak čine svilenkaste niti prekrivene dlačicama koje luče lepljivu tečnost koja omogućava hvatanje polenovih zrna.

Plod. Plod kukuruza je zrno (*caryopsis*) koji je građen od tri osnovna dela: perikarpa, klice i endosperma. Zrno je bogato proteinima (najveći procenat u endospermu, a manji procenat u klici) i šećerima. Najveći procenat endosperma čini skrob te i neke druge vrste prostih šećera. Zrno kukuruza sadrži oko 34% ulja, 19% proteina u 28% tečnosti (šećera, proteina rastvorenih u vodi, minerala i vitamina). Najveći deo ulja kukuruza čini linoleinska kiselina (polinezasićena ulja), dok najveći procenat od ukupnih proteina, preko 65% čine albumini (proteini rastvorljivi u vodi) i globulini. Perikarp ploda je bogat celulozom i hemicelulozom (Eckhoff i sar., 2003).

Razvojne faze. Tokom razvojnog stadijuma kukuruz prolazi kroz vegetativnu i reproduktivnu fazu (Slika 4.1). Vegetativnu fazu čine podfaze: klijanje i nicanje (VE), faza prvih listova (V1), faza drugih listova (V2), faza trećih listova (V3), faza metličjenja (VT), dok

reproduktivnu fazu čine: faza sviljanja (R1), vodena faza (R2), mlečna faza (R3), faza voštane zrelosti (R4), faza potpune zrelosti (R6) (Kiniry, 1991).



Slika 4.1. Razvojne faze biljke kukuruza (*Zea mays* L.). Skraćenice: VE – faza klijanja, V1 – faza prvih listova, V2 – faza drugih listova, V3 – faza trećih listova, V6 – faza šestih listova, V9 – faza devetih listova, VT – faza metličanja, R1 – faza sviljanja, R6 – zrelost (https://www.pioneer.com/us/agronomy/staging_corn_growth.html)

Sistematika kukuruza. Kukuruz pripada porodici trava (Poaceae) u okviru vrste *Zea mays* postoji još osam različitih podvrsta kukuruza (www.plants.usda.gov). Biološka klasifikacija vrste je predstavljena u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Biološka klasifikacija kukuruza *Zea mays* L.

Regnum (Carstvo)	Plantae
Subregnum (Podcarstvo)	Tracheobionta
Superdivisio (Nadrazdeo)	Spermatophyta
Divisio (Razdeo)	Magnoliophyta
Classis (Klasa)	Liliopsida
Subclassis (Podklasa)	Commelinidae
Ordo (Red)	Poales
Familia (Familija)	Poaceae
Genus (Rod)	Zea
Species (Vrsta)	<i>Zea mays</i> L.

Hibridi kukuruza. Kukuruz ima veliki broj različitih sorti koje koriste veliki broj istraživača pri ukrštanju i kreiranju velikog broja hibrida. Međusobnim ukrštanjem različitih sorti kukuruza dobija se potomstvo koje je mnogo kvalitetnije u odnosu na roditeljsku liniju. Kvalitet se ogleda u većem prinosu, otpornosti na različite biotičke i abiotičke faktore, bolja prilagođenost različitim uslovima sredine i dr. Usled fizičke odvojenosti muških i ženskih cvetova postupak hibridizacije je znatno olakšan i strogo kontrolisan. U ovom radu su korištena dva hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606 koja se koriste u usevima u Republici Srpskoj.

Hibrid ZP 555 se karakteriše kao kukuruz sa velikim prinosom koji ima veliku toleranciju na vodni deficit i raste na podlozi čija zemlja je veoma plodna na nadmorskoj visini do 500 metara (www.mrizp.rs). Biljka dostiže visinu od oko 230 cm. Prinos je 15 t suvog zrna po hektaru (www.mrizp.rs). Ovaj hibrid kukuruza (Slika 4.2A; 4.3. A, B, C) pripada FAO (Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija, eng. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) grupi srednjeg ili prelaznog vremena zrenja koji imaju veoma dobru brzinu otpuštanja vlage (Čamdžija i sar., 2012).

Hibrid ZP 606 (Slika 4.2B; 4.3 D, E, F) se takođe karakteriše kao kukuruz sa velikom tolerancijom na vodni deficit i takođe preferira plodna zemljišta koja se nalaze ispod 400 metara nadmorske visine. Biljka dostiže visinu od oko 260 cm (www.mrizp.rs). Prinos ovog

kukuruz je 15,5 t suvog zrna po hektaru (www.mrizp.rs). Za razliku od prethodnog hibrida ovaj hibrid pripada grupi kasnog vremena zrenja koji takođe ima jako dobru brzinu otpuštanja vlage (Čamdžija i sar., 2012). Oba tipa hibrida imaju sličnu genetsku roditeljsku liniju.

Ova dva hibrida su novija u procesu hibridizacije i savremeni trendovi oplemenjivanja se kreću upravo ka kreiranju hibrida nižeg habitusa, uspravnog položaja listova, klipova sa velikim brojem zrna, i sa velikom otpornošću na otpuštanje vlage iz zrna u periodu sazrevanja (Čamdžija i sar., 2012).

A)



B)



Slika 4.2. Morfologija klipa dva testirana hibrida kukuruza ZP 555 (A) i ZP 606 (B) (www.mrizp.rs).

4.2. Postavka eksperimenta i priprema uzoraka

a) Dizajn eksperimenta

Biljke su za potrebe eksperimenta uzgojene u oglednoj prostoriji Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, Bosna i Hercegovina.

Za oba eksperimenta su korištena semena dva hibrida kukuruza (ZP 606 i ZP 555) dobijena sa Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd.

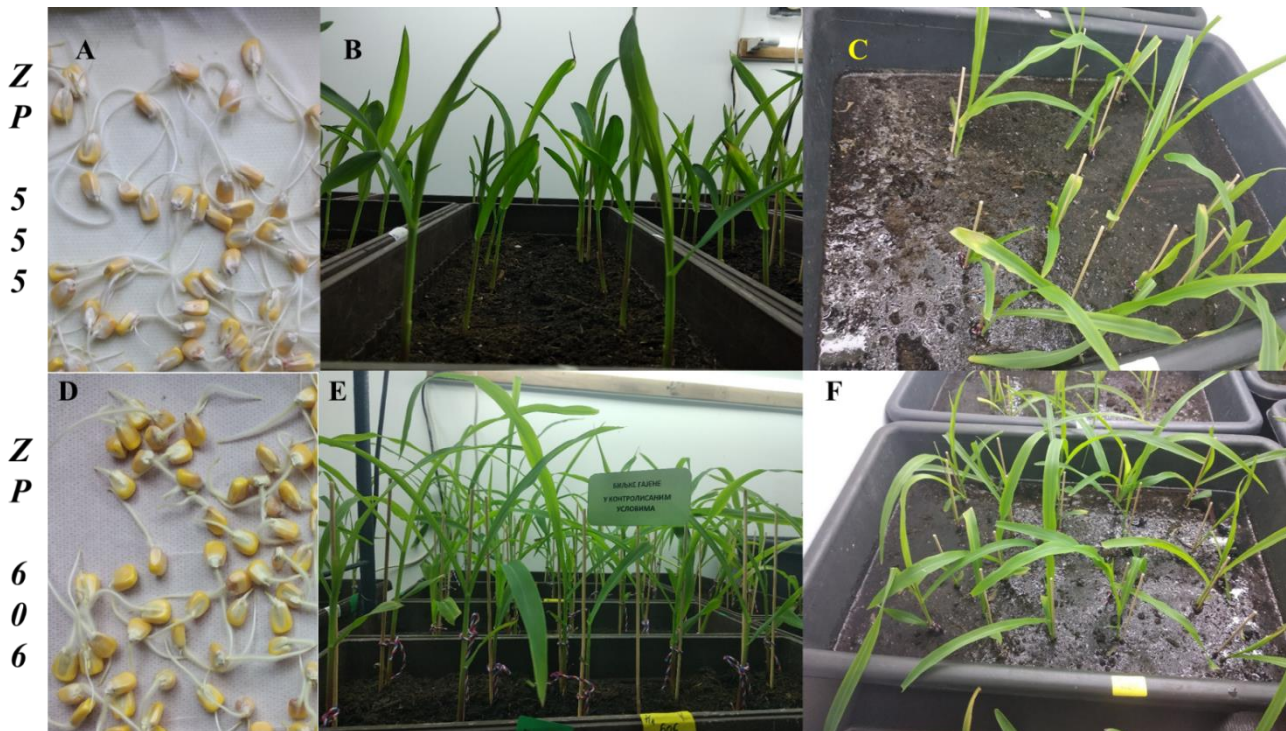
U saksije zapremine 12 L, napunjene humusom, posađeno je po 10 biljaka u razmaku od 10 cm, koje su imale konstantan izvor svetlosti (16/8 režim svetlo/mrak) tokom celog eksperimenta. Po eksperimentu (vodni deficit/suficit) zasejano je 100 jedinki po hibridu, što je činilo 400 individua ukupno za oba hibrida i oba tretmana. Hibridi su u uslovima sa dovoljnom količinom vode gajeni 30 dana, nakon čega su podeljeni u eksperimentalne grupe.

a) Eksperiment I – Vodni suficit

Prvi deo eksperimenta, za utvrđivanje uticaja vodnog suficita na dva ispitivana hibrida je vršen u periodu od januara do februara 2019. godine. Nakon 30 dana rasta u optimalnim uslovima, biljke su podeljene u dve grupe: biljke koje su i dalje rasle u kontrolnim uslovima i biljke koje su rasle u uslovima vodnog suficita. Polovina biljaka (5 saksija/50 biljaka po hibridu) je bila potopljena u velike bazene sa vodom (60 L), u visini od 5 cm iznad površine zemlje. Bazeni su punjeni srednje hladnom vodom sa česme, te je pri svakom uzorkovanju merena koncentracija kiseonika (oksimetar (HANNA, HI-9142, sa tačnošću 0.1 mg L^{-1}) i pH vrednost. Potopljene biljke su uzorkovane u različitim vremenskim periodima, formirajući tako sledeće eksperimentalne grupe (Slika 4.3; 4.4):

- * H₅₅₅K, H₆₀₆K – kontrolna grupa³,
- * H₅₅₅6h, H₆₀₆6h – eksperimentalna grupa uzorkovana nakon 6h,
- * H₅₅₅24h, H₆₀₆24h - eksperimentalna grupa uzorkovana nakon 24h,
- * H₅₅₅72h, H₆₀₆72h - eksperimentalna grupa uzorkovana nakon 72h,
- * H₅₅₅144h, H₆₀₆144h - eksperimentalna grupa uzorkovana nakon 144h.

³ Biljke iz kontrolne grupe su uzorkovane pri svakom satu vodnog suficita zajedno sa ekperimentalnom grupom. Ali su se pri obradi rezultata sve vrednosti za kontrolu po parametrima analizirale zajedno, te je predstavljena samo jedna tačka.



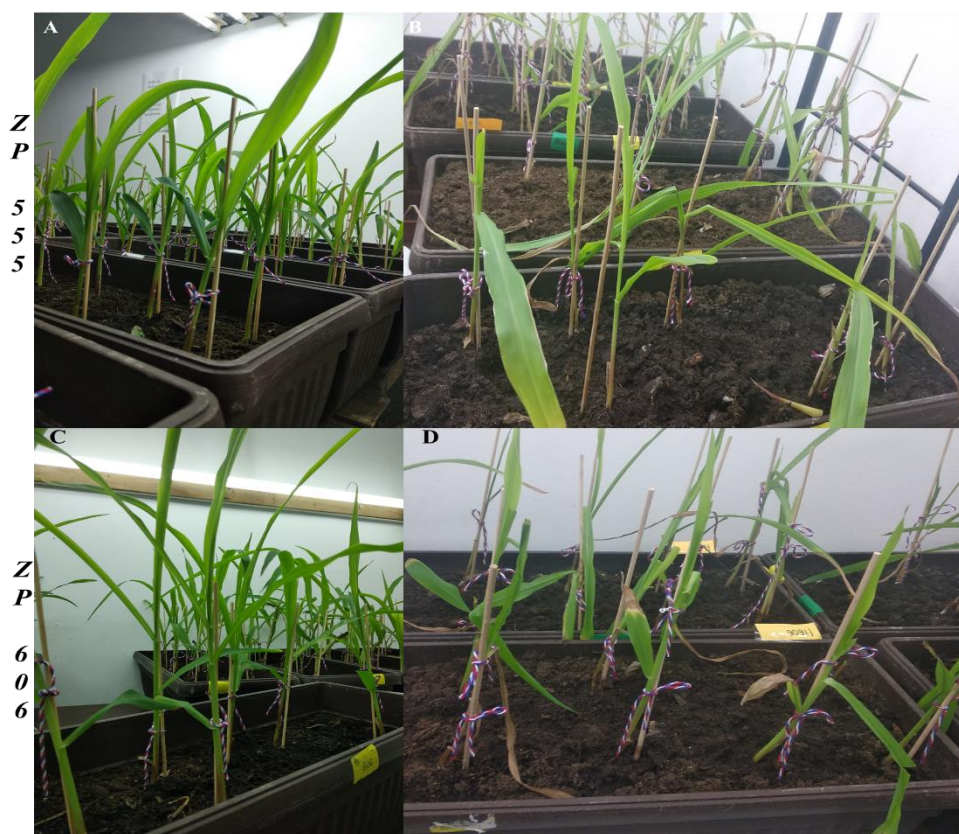
Slika 4.3. Kontrolni i eksperimentalni uzorci dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) tokom izlaganja vodnom suficitu. Seme hibrid ZP 555 (A), zatim hibrid ZP 555 u kontrolnim uslovima (B) i uslovima vodnog suficita (C), te seme hibrid ZP 606 (D), zatim hibrid ZP 606 u kontrolnim uslovima (E) i uslovima vodnog suficita (F) (Lukić, 2019, originalna fotografija).

b) Eksperiment II – Vodni deficit

Drugi deo eksperimenta, za utvrđivanje vodnog deficita, vršen je u periodu od avgusta do kraja septembra 2019. godine. U ovom delu eksperimenta, biljke su takođe nakon 30 dana gajenja u optimalnim uslovima podeljene u dve grupe: kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalna grupa je bila izložena potpunom deficitu vode (Slika 4.4; 4.5).

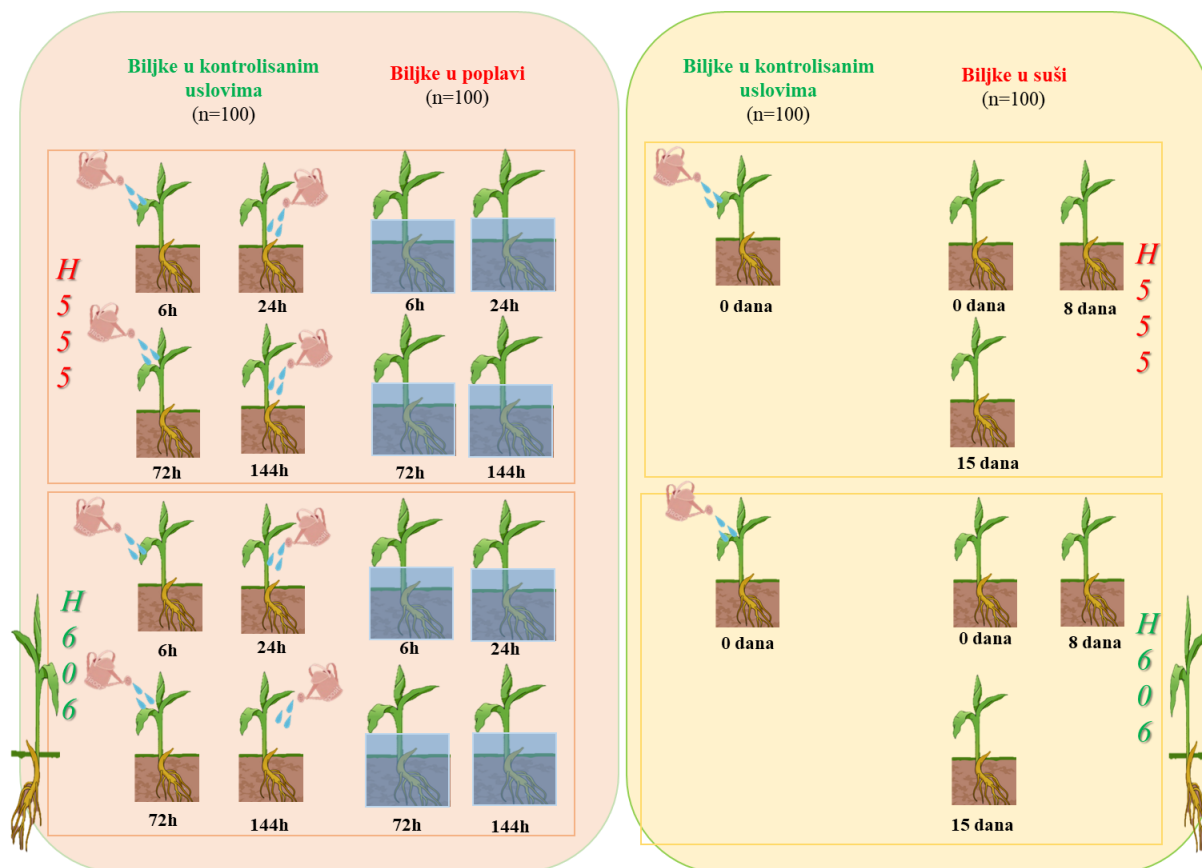
Biljke iz ove grupe su uzorkovane nakon:

- * H₅₅₅K, H₆₀₆K⁴ – kontrolna grupa uzorkovana prvog dana primene stresa.
- * H₅₅₅8d, H₆₀₆8d - eksperimentalna grupa uzorkovana nakon 8 dana vodnog deficita.
- * H₅₅₅15d, H₆₀₆15d - eksperimentalna grupa uzorkovana nakon 15 dana vodnog deficita.



Slika 4.4. Kontrolni i eksperimentalni uzorci dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) tokom izlaganja vodnom deficitu. Hibrid ZP 555 u kontrolnim uslovima (A) i uslovima vodnog deficita (B), hibrid ZP 606 u kontrolnim uslovima (C) i uslovima vodnog deficita (D) (Lukić, 2019, originalna fotografija).

⁴ Uzorkovanje kontrolnih biljaka vršeno je samo prvog dana ekperimenta, pre podvrgavanja uslovima vodnog deficita. Razlog ovakvog uzorkovanja je bio nedostatak biljaka za ekperimentalne i kontrolne uslove. Biljke u vodnom deficitu brzo gube žive listove koji su neophodni za analize, te je bilo neophodno ostaviti više biljaka za ovaj tretman.



Slika 4.5. Dizajn eksperimenta za biljke izložene suficitu i deficitu vode.

b) Priprema uzoraka

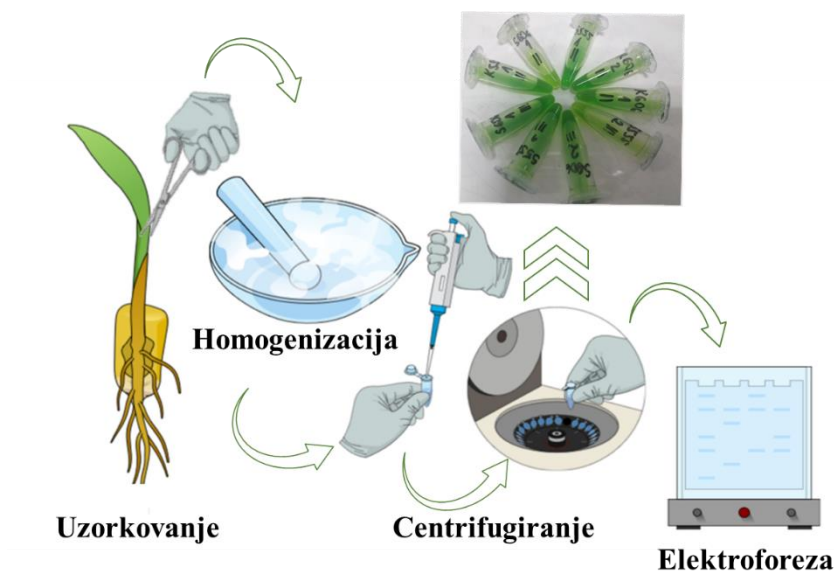
a) Priprema homogenata i ekstrakcija proteina

Pri svakom uzorkovanju sakupljeno je po deset listova sa više različitih biljaka iz istog eksperimentalnog tretmana ili kontrole, te je pripremljen mešoviti uzorak radi bolje reprezentativnosti. Za pripremu homogenata, tkiva su izmerena na tehničkoj vagi (greška $\pm 0,01$ g) te su sprašena u tečnom azotu uz upotrebu avana i tučka a nakon sprašivanja odvagano je po 0,5 g tkiva uzorka i ekstrahovano sa 4 mL pufera za ekstrakciju.

Pufer za ekstrakciju proteina je sadržao:

- 0,1 M natrijum-fosfatni pufer (Na Pi), pH 6,4,
- 0,02% polioksietilen sorbitol estar (Tween),
- 1% polivinilpirolidon (PVP)
- 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)

Isti pufer za ekstrakciju je korišten kod oba eksperimenta. Zatim su uzorci centrifugirani na 10 000 rpm, 10 min na 8°C. Nakon centrifugiranja izdvojene su dve frakcije, talog i supernatant (Slika 4.6). Supernatant je dalje korišten za određivanje koncentracije proteina, aktivnosti CAT, POX i izoenzimskih profila POX i SOD. Uzorci su zamrznuti na -20°C do daljih analiza.



Slika 4.6. Shematski prikaz postupka uzorkovanja, homogenizacije i ekstrakcije te elektroforeze (www.mindthegraph.com; Lukić, 2019, originalna fotografija).

4.3. Određivanje fizioloških parametara

4.3.1. Određivanje relativnog sadržaja vode (RWC)

Određivanje relativnog sadržaja vode je vršeno prema metodi Barrs i Weatherley (1962). Za određivanje RWC u listovima biljaka korištena su tri lista kukuruza iz svake ekperimentalne grupe. Listovi kukuruza su prvo isprani destilovanom vodom i blago posušeni, a zatim je na analitičkoj vagi odvagana sveža masa (FW) pojedinačnih listova. Listovi su postavljeni u petrijevke na vatu natopljenom destilovanom vodom u cilju dobijanja turgidnih ćelija (24 h, na +4 °C) i ponovo je odvagana masa (TW) pojedinačnih listova. Zatim su listovi sušeni 24 h na temperaturi od 75 °C, nakon čega je ponovo odvagana masa suvih listova (DW).

Za izračunavanje relativnog sadržaja vode u listovima kukuruza korištena je sledeća formula:

$$\text{RWC} = \left(\frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \right) \times 100 \quad [\%]$$

FW – sveža masa (*engl. Fresh Weight*)

DW – suva masa (*engl. Drought Weight*)

TW – turgidna masa (*engl. Turgid Weight*)

4.3.2. Ekstrakcija i određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata

Određivanje i izračunavanje koncentracije ukupnih fotosintetičkih pigmenata izvršena je prema metodi Lichtenthaler i Wellburn (1983).

Neophodni reagensi:

- 80% metanol
- CaCO₃;

Postupak: 0,5 g biljnog tkiva je homogenizovano sa 5 mL 80% metanola uz dodatak CaCO₃ te centrifugirano na 10 000 rpm, 10 min na 4°C. Za određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata korišten je supernatant dobijen ekstrakciom nakon cetrifugiranja. Apsorbance su očitavane spektrofotometrijski na 470 nm (Car), 653 nm (hlorofil *b*; Chl *b*) i 660 nm (hlorofil *a*; Chl *a*) koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan). Za izračunavanje koncentracije pigmenata korištene su sledeće formule:

Hlorofil *a*: $Ca = 15,65 \times A_{660} - 7,34 \times A_{653}$

Hlorofil *b*: $Cb = 27,05 \times A_{653} - 11,21 \times A_{660}$

Karotenoidi: $C_{kar} = \frac{1000 A_{470} - 12,2 \times Cb}{245}$

Rezultati su izraženi u mg/gFW, te je za preračunavanje istih korištena sledeća formula:

$$C = \frac{Cx \times V \times R}{m \times 1000} \quad [\text{mg g}^{-1}\text{FW}]$$

Cx – koncentracija pigmenata;

V – zapremina ekstrakta (mL);

R – razblaženje;

m – sveža masa biljnog tkiva u g.

4.3.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu određivana je metodom po Lowry i sar. (1951).

Princip reakcije: Lowry metod se zasniva na reakciji formiranja kompleksa jona bakra sa azotom iz peptidnih veza proteina, i dodatno redukcije Folin-Čikalteovog reagensa i oksidacije aromatičnih aminokiselina (uglavnom triptofana i tirozina), što povećava senzitivnost metode. Maksimum apsorpcije je na 550 nm.

Neophodni reagensi

Tabela 4.2. Potrebni reagensi za Lowry-evu metodu

Rastvor 1	2% Na ₂ CO ₃ u 0,1 M NaOH
Rastvor 2	1% rastvor CuSO ₄ x 5H ₂ O
Rastvor 3	2% rastvor K-Na-tartarata
Rastvor 4	98 mL Rastvora 1+ 1 mL Rastvora 2 + 1 mL Rastvora 3

Postupak: Kvantifikacija proteina je vršena dodavanjem 100 µL uzorka, 100 µL dH₂O vode i 3 mL Reagensa 4 (Tabela 4.2), nakon mešanja smeša je inkubirana 15 min. Nakon inkubacije u svaku je epruvetu je dodato po 600 µL Folin-Čikalteov-og reagensa (razblaženog sa destilovanom vodom u omeru 1:2), nakon mešanja epruvete su inkubirane u mraku 30 min. Apsorbanca je merena na 550 nm koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan).

Za seriju standardnih rastvora korišten je rastvor goveđeg albumin seruma (BSA, eng. *bovine serum albumin*) (opseg koncentracija 0 – 1 mg/mL). Postupak merenja apsorbance za standardne rastvore urađeno je na isti način kao i za uzorke. Na osnovu konstruisane krive zavisnosti apsorbance od koncentracije proteina dobijena je jednačina pravca iz koje se izračunava koncentracija proteina u uzorku. Jednačina pravca korištena u ovom eksperimentu je: $y = 1,476x - 0,0056$.

Napomena: Kod razblaženih uzoraka ukupna koncentracija je pomnožena sa faktorom razblaženja.

4.3.4. Određivanje koncentracije prolina

Princip reakcije: Određivanje koncentracije prolina je veoma važno kako bi se utvrdio fiziološki status biljke i generalno za razumevanje tolerancije na stres kod biljaka. U ovom radu je korištena spektrofotometrijska metoda po Carillo i Gibon (2011). Pri određivanju koncentracije prolina korišten je ninhidrinski reagens koji u reakciji sa prolinom na niskom pH daje proizvod crvene boje čija se apsorbancija može meriti na 520 nm.

Neophodni reagens:

- Reakciona smeša (0,6 g ninhidrina, 36 mL sirćetne kiseline i 12 mL etanol, 12 mL destilovane vode)
- Standardni rastvor prolina u opsegu koncentracija 0,005 - 0,2 mM

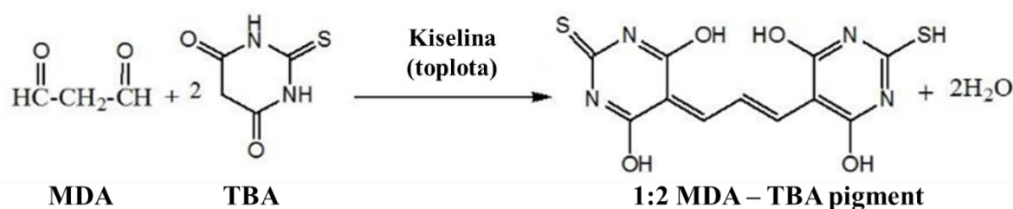
Postupak: Za određivanje ukupne koncentracije prolina u uzorku odmereno je 200 mg biljnog tkiva prašnog u tečnom azotu i homogenizovano je sa 4 mL rastvora etanol-voda (70:30). Homogenat je inkubiran 2 h na 37°C u vodenom kupatilu, a nakon toga centrifugiran 10 minuta na 10 000 rpm. Za dalju analizu je korišteno 500 µL supernatanta i 1 mL reakcione smeše. Sva merenja su rađena u triplikatu. Apsorbancija je merena na 520 nm koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan).

Za izračunavanje koncentracije prolina korišteni su standardni rastvori prolina u opsegu od 0,005 mM do 0,2 mM i standardna prava $y = 0,1004 x - 0,0091$ ($R^2=0,996$).

4.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa

4.4.1. Određivanje koncentracije MDA

Princip reakcije: Koncentracija malondialdehida je određena metodom po Heath i Packer (1968). Za određivanje stepena lipidne peroksidacije neophodno je merenje nekih od proizvod same reakcije, kao što su: lipid hidroperoksida, konjugovanih diena, hidroksilne kiseline, etana te MDA. MDA je dialdehid koji u organizmu nastaje kao krajnji proizvod razgradnje polinezasićenih masnih kiselina pri lipidnoj peroksidaciji (Hagege i sar., 1995). TBA (tiobarbiturna kiselina) može reagovati sa MDA dovodeći do proizvoda roze (crvene) boje u kiselom rastvoru, te se koncentracija MDA može izračunati spektrofotometrijskim merenjem intenziteta dobijene boje na 532 nm. Visoke temperature ubrzavaju reakciju dok je niske temperature usporavaju (Slika 4.7).



Slika 4.7. Shematski prikaz reakcije između MDA i TBA (Azizi i sar., 2017; modifikovano).

Neophodni reagensi:

- 0,5% TBA
- 20% i 0,1% trihlorsirćetna kiselina (TCA)

Postupak: Za određivanje MDA korišteni su listovi iste starosti koji su usitnjeni do praha uz pomoć tečnog azota, a zatim je 1 g biljnog tkiva homogenizovan sa 7 mL 0,1% TCA. Svaki uzorak je rađen u triplikatu. Zatim su uzorci centrifugani na 10 000 rpm, 20 min. Dobijeni supernatant (0,5 mL) je pomešan sa 1 mL 0,5% TBA rastvorene u 20% TCA. Nakon mešanja uzorci su kuvani 30 min na 95°C i zatim su ohlađeni na ledu. Uzorci su ponovo centrifugirani na 10 000 rpm 10 min i nakon toga merene su apsorbance na 532 nm i 600 nm (apsorpcija ekstrakta) koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan). Slepa proba je bila 1,5 mL 0,5% TBA u 20% TCA.

Koncentracija MDA je računata prema formuli:

$$MDA = \frac{A_{532} - A_{600}}{\varepsilon} \times \frac{V}{gFW} \quad [\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}]$$

$D_{A_{532-600}}$ - razlika apsorbanci očitanih spektrofotometrijski na 532 nm i 600 nm;

ε – ekstinkcioni koeficijent malondialdehida ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

V – zapremina ekstrakta (mL);

gFW – masa svežeg biljnog tkiva u g.

4.4.2. Određivanje koncentracije H₂O₂

Određivanje koncentracije H₂O₂ u uzorku vršeno je metodom po Sergiev i sar. (1997).

Neophodni reagensi:

- 0,1% TCA;
- 10 mM NaPi (pH 6,8);
- 1 mL 1M KI.

Postupak: Za određivanje koncentracije H₂O₂ korišteno su listovi iste starosti kao i za ostale analize. Biljni materijal (1 g) je usitnjen do praha sa tečnim azotom i homogenizovan sa 7 mL 0,1% TCA u triplikatu. Nakon centrifugiranja smeše na 10 000 rmp, 20 min supernatan je odvojen i pomešan sa 0,5 mL 10 mM NaPi (pH 6,8) i 1 mL 1 M KI. Koncentracija je merena u svim uzorcima u triplikatu. Slepu probu je činio 0,5 mL supernatanta i 1,5 mL 10 mM NaPi (pH 6,8), te je pri izračunavanju oduzimana slepa proba od uzorka. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski, koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan), na talasnoj dužini od 390 nm. Standardna kriva je konstruisana za opseg koncentracija H₂O₂ od 0,05 do 1 mM. Određivanje koncentracije H₂O₂ je određeno na osnovu standardne krive $y = 1,545 x - 0,0674$, $R^2 = 0,997$, a rezultati su izraženi u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$.

4.5. Određivanje parametara antioksidativnog sistema

4.5.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Princip reakcije: Vodonik peroksid pokazuje maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost CAT je određena praćenjem razlaganja H₂O₂ na datoj talasnoj dužini, pri čemu je smanjenje apsorbanace proporcionalno aktivnosti CAT (Beutler, 1984).

Neophodni reagensi:

- puferu za ekstrakciju (0,1 M NaPi pH 6,4; 1 mM PMSF; 0,2% Tween; 1% PVP);
- 3% H₂O₂

Postupak: Reakciona smeša za merenje aktivnosti CAT, ukupne zapremine 1 mL, je sadržala: 35 µL supernatant, 10 µl 3% H₂O₂ i do 950 µL pufer za ekstrakciju. Meren je porast apsorbanace od 0 – 60 s na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) na λ=240 nm.

Za izračunavanje CAT je korištena sledeća formula:

$$CAT = \frac{\Delta A \times V_r}{\varepsilon(H_2O_2) \times m} \quad \left[\frac{\mu mol}{min \times gFW} \right]$$

$$\Delta A = A_{t0} - A_{t60}$$

V_r - zapremina ekstrakcionog pufera (mL),

ε – ekstinkcioni koeficijent za vodonik peroksid (40 mM⁻¹cm⁻¹);

4.5.2. Određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza Klase III (POX)

Princip reakcije: Određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza je vršeno spektrofotometrijskom metodom opisanom u Kukavica i sar. (2009). Peroksidaze su antioksidativni enzimi koji katalizuju prevođenje vodonik peroksid u vodu u prisustvu fenolnih jedinjenja kao kosupstrata.

Nephodni reagensi:

- Pufer za ekstrakciju (1 M NaPi, pH 6,4; 1 mM PMSF, 0,2% TWEEN; 1% PVP)
- 1 M pirogalol (kosupstrat);
- 1 M H₂O₂;
- 100 mM, NaPi (pH 6,4).

Postupak 1: Reakciona smeša (V= 3 mL) je sadržala 2,86 mL 100 mM, NaPi (pH 6,4), 30 µL 1 M pirogalola, 100 µL ekstrakta lista kukuruza i reakcija je započeta dodatkom 10 µL 1 M H₂O₂. Merenje porasta apsorbance na 430 nm, koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan), je vršeno u triplicatu. Talasna dužina od 430 nm predstavlja maksimum apsorpcije nastalog proizvoda oksidacije pirogalola purpurigalina (A₄₃₀, ε = 12 mM⁻¹).

Za izračunavanje POX aktivnosti spektrofotometrijski korištena je sledeća formula:

$$POX = \frac{\Delta A \times V_r}{\varepsilon (\text{purpurigalina}) \times m} \quad \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg FW}} \right]$$

$\Delta A = A_{t60} - A_{t0}$ — razlika između početne apsorbance 0 - 60s;

V_r - zapremina ekstrakcionog pufera (mL);

ε – ekstinkcioni koeficijent za purpurigalina (12 mM⁻¹ cm⁻¹);

m – sveža masa tkiva u g.

4.5.3. Ekstrakcija i određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

Princip reakcije: Određivanje APX je vršeno spektrofotometrijskom metodom modifikovanom prema Nakano i Asada (1981). APX je veoma važan enzim u antioksidativnom sistemu zaštite koji uklanja vodonik peroksid generisan u citoplazmi i hloroplastima. U ovom radu aktivnost APX je merena spektrofotometrijski, prateći smanjenje apsorbance na 290 nm. Kao supstrat za APX korišten je askorbat.

Neophodni reagensi za ekstrakciju APX:

- Pufer za ekstrakciju (90 mM NaPi pH 7,8, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 8% glicerol, 5 mM askorbat)

Postupak ekstrakcije: Za određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze homogenizovano je 0,5 g biljnog tkiva (prethodno sprasjenog u tečnog azota uz pomoć avana i tučka) sa 4 mL pufera za ekstrakciju. Ekstrakt je zatim centrifugiran 20 min na 10 000 rpm. Supernatant je korišten za dalja merenja.

Neophodni reagensi za ekstrakciju APX:

- 90 mM NaPi pH 7,8 pufer
- 3% H₂O₂
- 0,5 mM askorbat

Reakciona smeša za merenje aktivnosti APX (1 mL) je sadržala 935 µL 50 mM NaPi pH 7,0, 50 µL biljnog ekstrakta, 5 µL 0,5 mM askorbat i 10 µL 3% H₂O₂. Apsorbanca je merena na 290 nm i praćeno je smanje apsorpcije tokom jednog min koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan). Sva merenja su rađena u triplikatu.

Za izračunavanje APX aktivnosti spektrofotometrijski korištena je sledeća formula:

$$APX = \frac{\Delta A \times V_r}{\varepsilon (\text{askorbata}) \times m} \quad \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg FW}} \right]$$

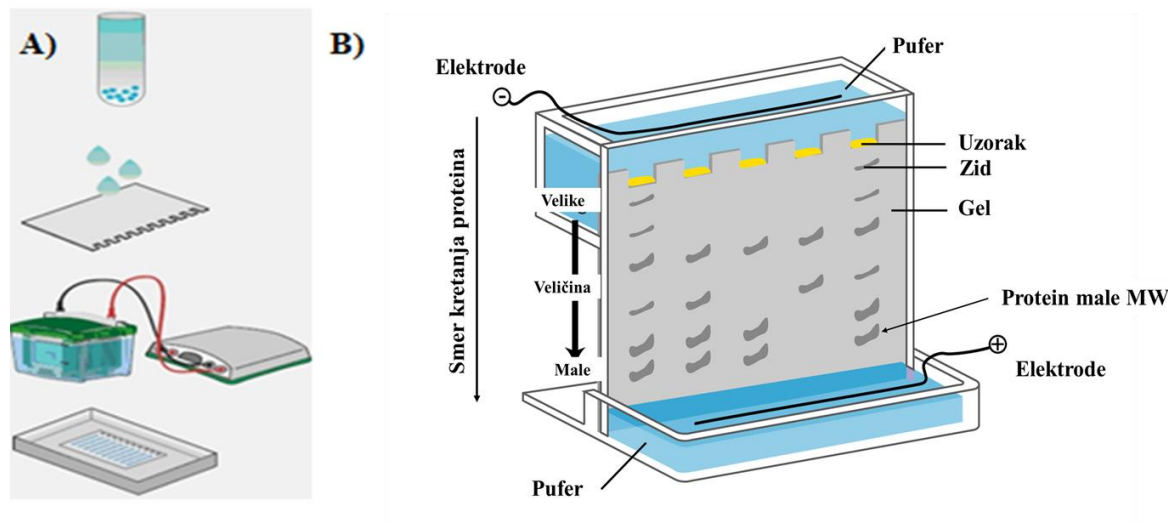
$\Delta A = A_{t60} - A_{t0}$ — razlika između početne apsorbance 0 – 60 s;

V_r - zapremina ekstrakcionog pufera (mL);

ε – ekstinkcioni koeficijent za askorbat (2,8 mM⁻¹ cm⁻¹);

4.5.4. Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (PAGE)

U svrhu analize proteinskih frakcija urađena je metoda elektroforeze proteina na poliakrilamidnom gelu (PAGE) u nativnim uslovima. Nativna gel elektroforeza sa 5% gelom za koncentrovanje i 10% gel za razdvajanje korištena je za dobijanje izoenzimskih profila (Slika 4.8 B,C).



Slika 4.8. Aparatura za elektroforezu (A) i primer gela za elektroforezu (B) <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>; modifikovano).

Princip reakcije: Elektroforeza je fizičko-hemijska metoda koja radi na principu električnog polja u kojem se molekule kreću kroz rastvore. Naime, naelektrisane čestice se pod dejstvom homogenog električnog polja kreću ka anodi ili katodi kroz rastvor slabog elektrolita (pufer). Metoda se može koristiti za razdvajanje proteini na osnovu molekularne mase i naelektrisanja. Brzina kretanja jedne naelektrisane čestice zavisi od: naelektrisanja čestice, veličine i oblika naelektrisane čestice, jačine električnog polja, karakteristike potporne sredine, temperature (Trenkovski i sar., 2006).

Neophodni reagensi:

Tabela 4.3. Potrebni rastvori za pripremu i izvođenje nativne elektroforeze

1.	Monomerni rastvor (akrilamid)	Akrilamid	58,4 g
		Bisakrilamid	1,6 g
		dH ₂ O do	200 mL
2.	Pufer gel za razdvajanje (1 M Tris HCl; pH 8,8)	Tris	36,3 g
		dH ₂ O do	200 mL
		4 M HCl do	pH 8,8
3.	Pufer za gel za koncentrovanje (0,5 M Tris HCl; pH 6,8)	Tris	6 g
		dH ₂ O do	100 mL
		4 M HCl do	pH 6,8
4.	Pufer za elektroforezu	Tris	3 g
		Glicin	14,4 g
		dH ₂ O do	1 L
5.	Inicijator polimerizacije 10 %	APS	0,2 g
		dH ₂ O do	2 mL

Postupak: Postupak pripreme gelova i elektroforeze je urađen na aparatu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). Gelovi su pripremljeni između dve staklene ploče, najpre izlivajući gel za razdvajanje (10%) koji se sastoji do 4 mL 30% akrilamida, 2,5 mL 0,5 M Tris pufera pH 8,8, 2,5 mL 10% APS, 0,004 mL tetrametiletildiamid (TEMED) i 3,3 mL vode (Tabela 4.4). Nakon polimerizacija gelova za razdvajanje dodati su rastvori i za gel za koncentrovanje (5%), koga čine: 0,830 mL 0,5 M Tris pufera pH 6,8, 0,630 mL 10% APS, 0,005 mL TEMED i 3,4 mL vode (Tabela 4.4). Nakon pripreme gelova pristupilo se pripremi uzoraka za elektroforezu. Ekstrakcija biljnog materijala je opisana u tački 4.3.

Uzorci su pomešani sa puferom za uzorke koji je sadržao:

- 50 mM Tris pH 6,8
- 10% glicerol
- 0,001% bromfenol plavo

Pre nanošenja na gel uzorci su pripremani tako što je pomešano je 100 µL uzorka i 50 µL pufera za uzorke kada su praćene POX izoforme, dok je za praćenje SOD izoformi pomešano

100 μ L uzorka i 25 μ L pufera za uzorke, a količina ukupnih proteina koja je nanošena na gel je uvek bila 15 μ g.

Kada su uzorci nanoseni na gelove, isti su premešteni u kadicu za elektroforezu u kojoj je dodat pufer koji je sadržao: 0,025 M Tris i 0,192 M glicin pH 8,3. Konstantna voltaža od 100 V primenjena je dok su uzorci prolazili kroz gel za koncentrovanje, a povećana je na 150 V za prolazak kroz gel za razdvajanje.

Tabela 4.4. Sastav gelova za nativnu poliakrilamidnu elektroforezu

Komponente	5% gel za koncentrovanje	10% gel za razdvajanje za SOD
	(5 mL)	(10 mL)
Zapremina (mL)		
H₂O	3,4	3,3
30% akrilamid	0,830	4,0
0,5 M Tris	0,630 (pH 6,8)	2,5 (pH 8,8)
10% APS	0,05	0,1
TEMED	0,005	0,004

4.5.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

Princip reakcije: Izoforme SOD izolovane iz biljnog tkiva su razdvojene na gelu za nativnu elektroforezu. Specifično bojenje SOD izoformi na elektroforeskom poliaktilamidnom gelu rađeno je prema Beauchamp i Fridovich (1971). Pri ovom bojenju koristi se nitro blue tetrazolium (NBT) koje predstavlja veoma važno jedinjenje za detekciju O_2^- . Aktivnost SOD se određuje kao sposobnost inhibicije reakcije između NBT i O_2^- .

Postupak: Nakon završetka elektroforeze gel se inkubira u rastvoru za bojenje i inkubira 30 min u mraku. Rastvor za bojenje SOD sadrži:

- 40 mL 0,1M Tris, pH 7,8
- 1 mM etilendiamintertra sirćetna ksileina (EDTA)
- 0,245 mM NBT
- 0,133 mM riboflavina
- 1,72 mM TEMED

Gel se nakon inkubacije u rastvoru za bojenje ispere destilovanom vodom i osvetli (5-15 min). Na mestima gde su izoforme superoksid dismutaza pojavljuju se ahromatske trake u odnosu na ljubičasto obojen gel. Aktivnost SOD i procenat inhibicije određen je denzitometrijski na osnovu gela za nativnu elektroforezu pomoću programa TotalLab.

4.5.6. Specifično bojenje POX

Princip reakcije: Specifično bojenje POX je urađeno prema metodi Kukavica i sar., 2013. Pod uticajem POX α -hloronaftol oksiduje u prisistvu H_2O_2 generišući jedinjenje tamno-plave boje koje je vidljivo na prozirnem poliakrilamidnom gelu.

Postupak: Izoforme POX izolovane iz biljnog tkiva su razdvojene nativnom elektroforezom. Nakon završene elektroforeze gel je inkubiran 10 – 30 min u mraku.

Rastvor za bojenje POX sadrži:

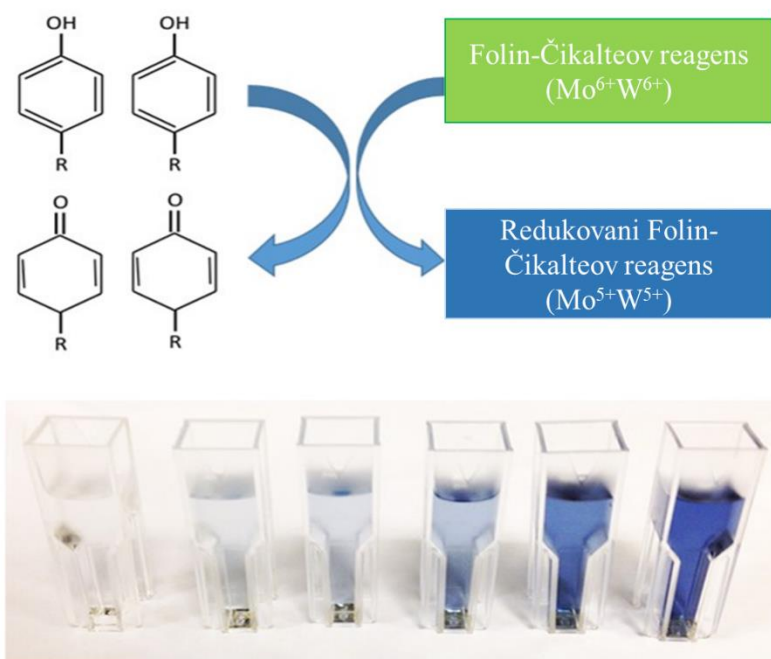
- 5 mg 0,01% α -hloronaftanola;
- 5 mL 80% metanola;
- 45 mL NaPi pufera (pH 6,4),
- 0,03% H_2O_2 .

Gel se nakon inkubacije u rastvoru za bojenje ispere destilovanom vodom. Na mestima gde su izoforme peroksidaze pojavljuju se ljubičaste trake u odnosu na proziran gel. Aktivnost POX je određen denzitometrijski na osnovu gela za nativnu elektroforezu pomoću programa TotalLab.

4.5.7. Određivanje koncentracije polifenola

a) Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Princip reakcije: Koncentracija ukupnih polifenola je određena Folin-Čikalteovom metodom koja je opisana od strane Singleton i Rossi (1965). Folin-Čikalteov reagens je rastvor koji sadrži Na volframat 2-hidrat i Na molibdat 2-hidrat kao osnovne komponente koje rade po principu oksido-redukcionih reakcija. U reakciji sa polifenolnim jedinjenjima formira se obojeni hromogen. Komponente Folin-Čikalteovog reagensa reaguju sa polifenolima samo pri baznim uslovima koji se postižu dodatkom natrijum karbonata. U baznim uslovima polifenolna jedinjenja disosuju i formiraju fenolne anijone koji redukuju Folin-Čikalteov reagens i formiraju plavu boju (Slika 4.9). Intenzitet dobijene boje se meri spektrofotometrijski očitavanjem apsorbance na 720 nm (Huang i sar., 2005).



Slika 4.9. Shematizovana reakcija Folin-Čikalteovog reagensa i polifenolnih jedinjenja (<https://bioquochem.com>)

Neophodni reagensi:

- 80% metanol;
- 1M Na₂CO₃;
- Folin-Čikalteov reagens.

Postupak: Koncentracija ukupnih polifenola je dobijena ekstrakcijom 0,5 g biljnog tkiva sa 4 mL 80% metanola. Smeša je inkubirana 60 min na tamnom na 37°C (vorteks svakih 5 min po 15 s). Smeša je zatim centrifugana na 10 000 rmp 10 minuta na 8°C. 100 µL supernatanta je pomešano sa 450 µL 1 M Na₂CO₃, te 450 µL Folin-Čikalteovim reagensom (odnos reagens a i vode 1:2). Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 724 nm koristeći UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan).

Standardna kriva korištena u ovom radu je konstruisana na osnovu standardnih rastvora za galnu kiselinu: $y = 0,613x - 0,0161$, $R^2 = 0,9897$. Rezultati su izraženi kao mg g⁻¹FW.

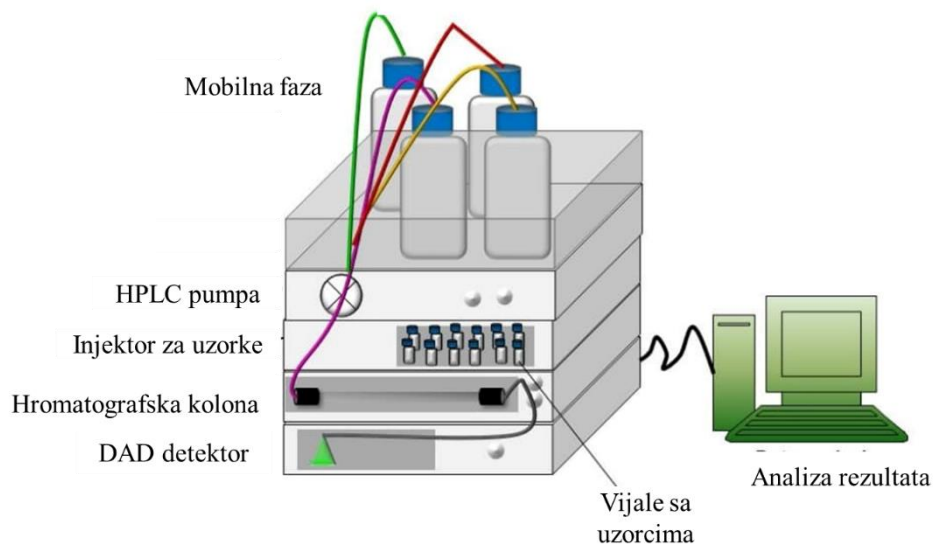
b) Određivanjem koncentracije polifenola HPLC metodom

Princip reakcije: Za analizu koncentracije pojedinačnih polifenola korištena je metoda tačne hromatografije visokih performansi (eng. HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) (DAD-HPLC Agilent 1260 Infinity). Na Slici 4.10 se nalazi shematski prikaz osnovnih delova neophodnih za izvođenje HPLC metode: rezervoar mobilne faze, HPLC pumpa, injektor za uzorke, hromatografska kolona te detektor u ovom radu je korišten DAD (engl. DAD – *Diode-Array Detection* detektor).

Postupak: Koncentracija polifenola je dobijena ekstrakcijom 0,5 g biljnog tkiva sa 4 mL 80% metanola. Smeša je inkubirana 60 min na tamnom na 37°C (vorteks svakih 5 min po 15 s). Smeša je zatim centrifugirana na 10 000 rpm 10 minuta na 8°C. Uzorci su zatim filtrirani kroz filter čija su okca bila promera 0,45 mm. Tako pripremljeni uzorci su korišteni za razdvajanje tečnom hromatografijom.

Hromatografija: Stacionarnu fazu je činila kolona EC-C18, Poroshell-120 (4.6 x 50 mm, veličina čestica 2,7 µm). Mobilnu fazu su činili rastvori: 0,1% sirćetna kiselina i acetonitril, pri čemu je protok bio 0,5 mL min⁻¹. Temperatura kolone je podešena na 25°C, a injektovano je 2 µL uzorka. Detekcija je vršena na $\lambda = 280$ nm. Za ispiranje je korišten 9% metanol koji je puštan kroz kolonu zajedno sa 91% rastvorom sirćetne kiseline na 0,8 min. Rastvor acetonitrila je postepeno povećan za 55% nakon 1,5 min, za 40% nakon 2,3 min, te 30% acetonitrila 6,8 min, i na kraju 40% acetonitrila za 8 min. Polifenolna jedinjenja su identifikovana poredeći retenciono vreme komponenti uzorka sa odgovarajućim standardima.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)



Slika 4.10. Shematski prikaz delova hromatografa za izvođenje tečne hromatografije visokih performansi (engl. HPLC – High Performance Liquid Chromatography) (<https://slideplayer.com/slide/6660641/>, modifikovano).

c) Određivanjem koncentracije pojedinačnih polifenola upotrebom**UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS**

Princip reakcije: Za razdvajanje, detektovanje i kvantifikaciju pojedinačnih polifenola vršeno je upotrebom Dionex Ultimate 3000 tečne hromatografije ultra visokih performansi (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC*) sa dodatnim detektorom (DAD) na koga je povezan TQS Quantum Access Max triple-kvadripol (QQQ) masenim spektrofotometrom (MS) (Thermo Fisher Scientific, Bazel, Švajcarska). U ovom radu je korištena metoda opisana od strane Pešić i sar. (2019).

Neophodni reagensi:

- Acetonitrile (FisherScientific, Lafforo, Belika Britanija)
- 1% mravlja kiselina (FisherScientific, Lafforo, Belika Britanija);
- Metanol (AppliChem, Češir, SAD).;
- Ultra čista dejonizovana voda (Millipore, Billerica, SAD);
- Standardi polifenola (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka).

Postupak: Koncentracija polifenola⁵ je dobijena ekstrakcijom 0,5 g suvog biljnog tkiva sa 4 mL 80% metanola. Smeša je zatim centrifugirana na 10 000 rmp 10 minuta na 8°C. Za razdvajanje pojedinačnih polifenolnih komponenti korištena je Synchronis C 18 kolona (100 x 2,1 mm, 1,7 µm veličine partikula) (ThermoFisher Scientific). Mobilna faza se sastojala od sledećih rastvora: (A) ultra čiste dejonizovane vode sa 1% mravljom kiselinom i (B) acetonnitrila (skala za MS, Fisher Scientific Lafforo, Belika Britanija). Temperatura kolone je bila 30°C, a injektovano je 0,3 mL/min, dok je detekcija vršena na talasnim dužinama od 254 i 280 nm. Gradijent eluiranja: 5% acetonnitrila u prvih 2 min, 2–14 min 5–95% acetonnitrila, 14–14,2 min 95–5% acetonnitrila, 5% acetonnitrila do 15. min.

TSQ Quantum Access Max QQQ maseni spektrofotometar je bio podešen na sledeći način: voltaža 5000 V, gas (N₂), pritisak 40 AU, pritisak jonskog gasa 1 AU i pritisak pomoćnog gasa (N₂) je bio 8 UA, kapilarna temperature je bila 300°C. Polifenolne komponente su identifikovane komparacijom sa komercijalnim standardima Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) sa direktnim poređenjem sa masenim spektrima, karakterističnim fragmentima i

⁵ Uzorci za vodni suficit i deficit su urađeni u jednom ponavljanju i predstavljeni kvalitativno. Usled velikog broja prethodno urađenih metoda, za ove analize nije bilo dovoljno biljnog tkiva. Takođe, usled nedostatka biljnog tkiva za biljke koje bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8h, nije bilo moguće uraditi UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS metodu.

karakterističnim retencionim vremenom. Totalna količina pojedinačnih komponenti je izražena u mg Kg⁻¹ suve mase.

4.6. Statistička obrada podataka

Gelovi nativnom elektroforezom su analizirani u programu Image Master Total Lab TL 120 program (Nonlinear Dynamics Ltd, Durham, USA). Svi rezultati su statistički obrađeni koristeći program Microsoft Excel 2019 te program R, verzija 3.6.0. Razlike između srednjih vrednosti dobijenih rezultata utvrđene su ANOVA analizom i Studentovim t-testom, te Pearsonovi koeficijenti korelacije sa nivoom značajnosti 5% ($p < 0,05$). Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (SD).

5. Rezultati i diskusija

Usled evidentnih klimatskih promena i sve češćih i dužih sušnih perioda u toku leta, sa jedne strane, i fluktuaciji u količini i učestalosti padavina tokom godine, sa druge strane, evidentna je važnost istraživanja mehanizama i efikasnosti odgovora kukuruza, kao jedne od najvažnijih kultivisanih biljaka, na uslove vodnog suficita i deficita. Upravo istraživanje oba tipa vodnog stresa na istim genotipovima kukuruza je ključno za razumevanje stresa u prirodnom okruženju gde su smene vodnog suficita i deficita sve učestalije u toku godine. Raspored sušnih i vlažnih, ili poplavnih dana u godini određuje kompoziciju i distribuciju biljnog sveta u geografskom kontekstu (Kreft i Jetz, 2007). U skladu sa prethodnim, sprovedena istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji imala su za cilj bolje razumevanje odgovora dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) na ova dva tipa abiotičkog stresa (vodni suficit i deficit), a na temelju analize fizioloških i biohemijskih pokazatelja. Osim toga, kao jedan od ciljeva istraživanja postavljeno je i pojašnjene interhibridne razlike ukoliko bi postojala kao odgovor datih hibrida na ova dva tipa stresa, u smislu definisanja tolerantnijeg hibrida.

U našem radu rezultati za vodni deficit i suficit su uporedo i diskutovani zbog bolje interpretacije i objašnjenja dobijenih rezultata. Kroz analizu svakog pojedinačnog parametra razmatrana je manja ili veća osetljivost/tolerantnost ispitivanih hibrida na vodni suficit/deficit, a na kraju poglavlja Rezultati i diskusija sve je sumirano i izveden generalni zaključak o mehanizmu i toleranciji hibrida na ispitivane stresne uslove.

5.1. Ispitivanje efekata vodnog suficita na dva hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606

Tokom stresa izazvanog vodnim suficitom koren biljaka se nalaze u okruženju sa smanjenom koncentracijom kiseonika. Usled smanjenja koncentracije kiseonika nastaje stanje hipoksije, odnosno anoksije ukoliko kiseonika uopšte nema u okruženju u kome biljke rastu. Zbog toga dolazi do značajnog smanjenja uticaja na proces respiracije. Kako bi prevazišle ovakav oblik stresa biljke redukuju sve procese za koje je neophodan kiseonik, te tako aerobni metabolizam menjaju anaerobnim. S toga ATP dobijaju anaerobnom fermentacijom iako je u ovom slučaju dobijaju mnogo manje količine ATP u odnosu na aerobnu glikolizu, ali se NAD^+ regeneriše putem mlečne ili alkoholne fermentacije (Bailey-Serres i Voesenek, 2008).

Kao posledica hipoksije dolazi do smanjenja citoplazmatičnog pH, i nastajanja acidoze. Još uvek nije do kraja objašnjen nastanak acidoze usled hipoksije ali neka od mogućih pojašnjenja su da acidoza nastaje usled pasivnog „curenja“ H^+ iz vakuole u citoplazmu,

hidrolize Mg^{2+} , zatim usled akumulacije ko-proizvoda anaerobne fermentacije koji nisu uklonjeni iz ćelije, te sinteza laktata (Chang i sar., 2000). Osim akumulacije laktata dolazi i do akumulacije etanola pri alkoholnoj fermentaciji, čije koncentracije mogu dostići za biljke toksični nivo.

Kako bi izbegle ovakav scenario biljke formiraju adaptivne strukture koje im mogu pomoći u usvajanju što veće koncentracije kiseonika tokom vodnog suficita, pa tako formiraju aerenhim u korenu, adventivne korene (Jackson i Drew, 1984) te lakune i lenticеле na nadzemnom delu biljaka (Asheaf, 2012).

U našem radu u cilju ispitivanja mehanizama i postojanja eventualnih interhibridnih razlika u odgovoru dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) u uslovima stresa izazvanog vodni suficitom, biljke kukuruza su bile izložene vodnom suficitu pri kontrolisanim uslovima temperature i fotoperioda. Neposredno pre i nakon 6, 24, 72 i 144 h od početka tretmana uzorkovani su listovi biljaka i odmah homogenizovani. U uzorcima su određivani fiziološki parametri, oksidativni parametri i parametri antioksidativnog sistema zaštite datih hibrida. Od fizioloških parametara mereni su: koncentracija fotosintetičkih pigmenata (hlorofila i karotenoida) te koncentracija proteina, a od parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite: koncentracije MDA, H_2O_2 , ukupnih polifenola, te koncentracija pojedinačnih polifenola, kao i aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i POX.

5.1.1. Fizičko-hemijski parametri vode u kojoj su biljke bile potopljene tokom tretmana

Rezultati u ovom radu su nedvosmisleno pokazali da su biljke izložene vodnom suficitu izložene i uslovima hipoksije. Koncentracija kiseonika u vodi u kojoj su biljke bile potopljene je merena nakon 6, 24, 72 i 144 h od početka tretmana, a rezultati su prikazani u Tabeli 5.1. Sa produžavanjem perioda vodnog suficita zabeleženo je smanjenje koncentracije kiseonika u vodi u kojoj su biljke bile potopljene. Nakon 24 h od vodnog suficita koncentracija kiseonika se smanjila za -47% i dalje nastavila značajano da opada, te je nakon 72 h zabeleženo smanjenje od -77% te -82% nakon 144 h, u poređenju sa prvim satima vodnog suficita (Tabela 5.1). Sa druge strane vrednosti temperature i pH su bile bez velikih oscilacija tokom trajanja vodnog suficita. Najveća pH vrednost je izmerena nakon 72 i 144 h vodnog suficita i iznosila je 7,98. Sa druge strane, prosečna temperature vode u toku trajanja vodnog suficita je iznosila 19,5 °C. Zbog toga je očekivano da promene svih ostalih parametara budu u skladu sa potvrđenim stanjem hipooksije.

Tabela 5.1. Koncentracija kiseonika, temperatura i pH vrednost izmerene u vodi u kojoj su bile potopljene biljke oba hibrida (ZP 555 i ZP 606) kukuruza nakon 6, 24, 72 i 144 h od početka vodnog suficita.

Fizičko-hemijski parametri	Eksperimentalne grupe			
	6 h	24 h	72 h	144 h
Temperatura (°C)	19,5	19,5	19,0	20,0
pH vrednost vode	7,67	7,81	7,98	7,98
Koncentracija kiseonika (mg/L)	8,25	4,32	1,85	1,37

5.1.2. Fiziološki parametri

Kako je odgovor i tolerantnost biljke na stres izazvan vodnim suficitom i deficitom veoma kompleksan, u ovom istraživanju je analizirano nekoliko ključnih fizioloških parametara čija se promena često povezuje s odgovorom biljaka na različite oblike stresa, kao što su koncentracija proteina i fotosintetičkih pigmenata. Cilj tih analiza je bio ustanoviti kako indukovani stres nastao vodnim suficitom kod dva hibrida kukuruza utiče na pomenute parametre, ali i uočavanje eventualnih interhibridnih razlika.

a) Koncentracija hlorofila

Faktori kao što su zatvaranje stoma, smanjenje koncentracije hlorofila, smanjenje površine lista, značajno utiču na smanjenje intenziteta fotosinteze i transpiracije pri vodnom stresu (Malik i sar., 2001). Koncentracija fotosintetičkih pigmenata u hloroplastima nije konstantna i zavisi od spoljašnjih faktora (Ronzhina, 2004). Pa tako destrukcija hlorofila, a s tim i smanjenje intenziteta fotosinteze, koji su usko povezani, je detektovana kod biljaka koje su gajene u nepovoljnim uslovima životne sredine.

Prema našim rezultatima, vodni suficit nije značajno uticao na promene u koncentraciji Chl *a* kod ZP 606 hibrida, ali je indukovala značajne promene u koncentraciji Chl *a* kod ZP 555 hibrida (Tabela 5.2). Naime, izmereno je povećanje koncentracije Chl *a* kod hibrida ZP 555 nakon 24 h i 72 h u poređenju sa kontrolom (Tabela 5.2). Osim toga uočene su promene u koncentraciji Chl *b* kod oba hibrida. Vodni suficit je izazvao povećanje koncentracije Chl *b* kod hibrida ZP 555 nakon 24 h i 72 h. Dok je sa druge strane zabeleženo smanjenje koncentracije Chl *b* kod hibrida ZP 606 ali je statistički značajno smanjenje zabeleženo nakon 24 h od primenjenog stresa, iako je trend pada uočen već nakon 6h. Međutim, nakon 72 i 144h vodnog suficita izmereno je povećanje koncentracija Chl *b* kod biljaka ZP 606 u odnosu nakon 24h, i bilo je na nivou kontrolne grupe (Tabela 5.2).

Literaturni podaci ukazuju da Chl *b*, može biti više oštećen nego Chl *a* pri stresnim uslovima (Mauchamp i Methym, 2004). Odnos hlorofila *a* i *b* je veoma važan aspekt koji govori o nivou stresa u biljci. Kod ZP 555 značajno smanjenje odnosa Chl *a/b* zabeleženo je samo kod biljaka koje su u uslovima vodnog suficita provele 24 h ($p=0,009$). Terletskaya i sar. (2017) su ukazali na važnost ovog parametra za adaptaciju biljaka na promene u životnoj sredini. Smatra se da vrste sa manjim Chl *a/b* pokazuju veću adaptiranost na negativne uslove iz životne sredine (Terletskaya i sar., 2017). Međutim u našem radu vodni suficit nije imao značajnog efekta na

odnos hlorofila *a* i *b* kod hibrida ZP 606 tokom celog tretmana. Ovaj podatak bi mogao ukazati da nije bilo značajnih promena u strukturi fotosintetičkog aparata nakon primenjenog stresa indukovano vodnim suficitom kod ovog hibrida što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili autori Terletskaia i sar. (2017).

Promene u koncentraciji hlorofila su povezane sa njegovom destrukcijom ili biosintezom tokom stresnih uslova. Rezultati mnogih studija su pri uslovima vodnog suficita zabeležili i povećanje (Estill i sar., 1991; Pirzad i sar., 2011) i smanjenje (Mafakheri i sar., 2010; Akram i Ashraf, 2011; Din i sar., 2011) koncentracije hlorofila kod osetljivih kultivara i vrsta monokotiledonih i dikotiledonih biljaka. Takođe, rezultati mnogih studija govore da pri procesu degradacija, Chl *b* može biti preveden u Chl *a* (Santos, 2004; Eckardt, 2009). Tako je i u našem radu stres, koji je izazvan vodnim suficitom, doveo je do promene u koncentraciji ispitivanih fotosintetičkih pigmenata kod oba hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606).

Razlike u koncentraciji Chl *a* i Chl *b*, kao i Chl *a/b* kod dva hibrida kukuruza, a prema literaturnim podacima, ukazuju da bi se hibrid ZP 606 mogao označiti kao osetljiviji, a hibrid ZP 555 tolerantaniji na vodni suficit.

b) Koncentracija karotenoida

Karotenoidi imaju važnu ulogu u procesu fotosinteze kao antena pigmenti a pored toga važni su antioksidativni molekuli (Pospíšil i Prasad, 2014). Rezultati za koncentracije karotenoida određenih u uslovima vodnog suficita ispitivanih hibrida, ZP 555 i ZP 606, prikazani su u Tabeli 5.2. Promene koncentracije Car, u našem radu, su imale suprotan trend kod dva ispitivana hibrida. U prvim satima vodnog suficita hibrida ZP 555 (6, 24 i 72 h) koncentracija Car je bila značajno veća u poređenju sa kontrolom datog hibrida. Međutim, zabeleženo je smanjenje koncentracije Car kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 144 h i tako da je vrednost bila na nivou kontrole hibrida ZP 555. Povećanje koncentracije karotenoida može biti povezano sa njegovim antioksidativnim osobinama. Karotenoidi imaju sposobnost vezivanja i neutralizacije singlet kiseonika u hloroplastima, peroksil radikala generisanog tokom procesa lipidne peroksidacije i uklanjanje ekscitovanog Chl (Inze i Van Montagu, 1995; Arora i sar., 2002; Stahl i Sies, 2003; Tracewell i sar., 2001; Logan i sar., 2007; Sharma i sar., 2012; Noctor i sar., 2015).

Porast koncentracije Car je pokazana u radu autora Barickman i sar. (2019) pri izlaganju biljaka vrste *Cucumis sativa* vodnom suficitu u trajanju od 10 dana.

Međutim, pri stresu izazvanom vodnim suficitom kod ZP 606 hibrida zabeležen je trend smanjenja koncentracije Car kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6 h, ali statistički značajno smanjenje je izmereno tek nakon 24 h u poređenju sa biljaka u kontroli hibrida ZP 606 (Tabela 5.2). Nakon 24 h koncentracija ovih pomoćnih pigmenata se povećala, tako da je kod biljaka izloženih vodnom suficitu u trajanju od 72 i 144 h bila na nivou kontrole. Istraživanja drugih autora takođe ukazuju na smanjenje koncentracije Car i ukupnog Chl tokom izlaganja biljaka različitih vrstavodnom suficitu, kao što su *Vigna radiata* (Kumar i sar., 2013), *Triticum aestivum* (Collaku i Harrison, 2002) te *Allium fistulosum* (Yiu i sar., 2008).

Biljke hibrida ZP 555 u uslovima vodnog suficita su imale veću koncentraciju Car u odnosu na kontrolne biljke, i na osnovu ovog parametra bi se moglo reći da je ovaj hibrid tolerantnijim na ovu vrstu stresa. Kod hibrida ZP 606, vodni suficit je indukovao smanjenje koncentracije Car čineći ga osetljivim na ovaj tip stresa kada je ovaj parametar u pitanju.

Tabela 5.2. Koncentracija fotosintetičkih pigmenata izmerena kod dva hibrida kukuruza u listovima kontrolnih i biljaka izloženih vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h.

Fotosintetički pigmenti		Ekperimentalne grupe				
		Kontrola	6 h	24 h	72 h	144 h
ZP 555	Chl a [mg g ⁻¹ FW]	4,74±0,592 c	4,56±0,101 bc	4,90±0,674 b	5,92±0,456 a	4,72±0,169 bc
	Chl b [mg g ⁻¹ FW]	1,71±0,389 b	1,87±0,198 ab	2,10±0,116 a*	2,15±0,048 a	1,82±0,218 ab*
	Chl a/b	2,65±0,123 a	2,87±0,291 ab*	2,14±0,286 b	2,78±0,187 ab*	2,61±0,324 ^{ab}
	Car [mg g ⁻¹ FW]	0,43±0,184 b	0,52±0,047 a	0,60±0,077 a*	0,58±0,045 a	0,43±0,085 b
ZP 606	Chl a [mg g ⁻¹ FW]	5,06±0,784 ab	4,36±1,366 ab	4,147±0,048 b	5,38±0,225 a	5,63±0,803 ab
	Chl b [mg g ⁻¹ FW]	1,91±0,279 a	1,79±0,531 ab	1,64±0,164 b*	2,20±0,085 a	2,14±0,389 a*
	Chl a/b	2,60±0,183 a	2,47±0,207 a *	2,53±0,219 a	2,43±0,108 a *	2,60±0,360 a
	Car [mg g ⁻¹ FW]	0,51±0,059 a	0,43±0,135 ab	0,34±0,036 b*	0,55±0,042 a	0,53±0,0139 ab

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (standardna devijacija).

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

d) Koncentracija ukupnih proteina

Promene u koncentraciji solubilnih proteina su veoma značajan adaptivni odgovor biljaka izloženih vodnom suficitu ili deficitu. Tako je vodni suficit uticao na promenu sinteze proteina kod oba ispitivana hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606). Rezultati merenja koncentracije ukupnih proteina kod ova dva hibrida kukuruza u uslovima vodnog suficita prikazani su u Tabeli 5.3.

U našem radu, hibrid ZP 555 je pokazao značajne promene u koncentraciji ukupnih proteina tek nakon 72 h vodnog suficita, gde se koncentracija ukupnih proteina značajno povećala za +32% u odnosu na kontrolne biljke hibrida ZP 555 ($p=0,03$) (Tabela 5.3). Sa druge strane, kod hibrida ZP 606, kao odgovor na izlaganje biljaka vodnom suficitu nakon 6 h izmereno je značajno veće povećanje koncentracije ukupnih proteina (+52%) u poređenju sa kontrolom ($p=0,02$). Međutim, kod istog hibrida nakon što su biljke bile 24 h u uslovima vodnog suficita koncentracija proteina se smanjila za -36% u odnosu na biljke koje su provele u vodnom suficitu 6 h. Iako se tokom 72 i 144 h vodnog suficita sinteza proteina povećala, tako da je koncentracija ukupnih proteina bila veća za +22% u odnosu na kontrolu hibrida ZP 606, ovo povećanje je bilo bez statističke značajnosti (Tabela 5.3). Akumulacija solubilnih proteina održava osmotski potencijal biljne ćelije, te je svojstven genotipovima tolerantnijim na vodni suficit (Rai i sar., 2004; Ou i sar., 2011; Yu i sar., 2017). Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim izlaganjem biljaka kukuruza vodnom suficitu u trajanju od 5, 10 i 15 dana u radu Tian i sar. (2019b).

Naši rezultati su takođe pokazali, da je hibrid ZP 606 imao veći nivo sinteze proteina kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u poređenju sa biljkama hibrida ZP 555. Najveća razlika između hibrida je detektovana kod biljaka koje su provele 6 h u uslovima vodnog suficita, gde je koncentracije ukupnih proteina kod hibrida ZP 606 bila veća za +33% od koncentracije ukupnih proteina kod hibrida ZP 555 ($p=0,003$). Osim u prvim satima (6 h), primećena je takođe i značajna razlika u poslednjim satima vodnog suficita (144 h) između hibrida, gde je koncentracija ukupnih proteina bila veća kod hibrida ZP 606 u odnosu na hibrid ZP 555 (+21, $p=0,04$) (Tabela 5.3). Kako je prethodno rečeno da veća koncentracije solubilnih proteina omogućava održanje osmotskog potencijala te je time svojstvenija biljkama koje su tolerantne na vodni suficit (Rai i sar., 2004; Ou i sar., 2011; Yu i sar., 2017), tako se oba testirana hibrida mogu okarakterisati kao tolerantni na vodni suficit kada je u pitanju ovaj parametar.

Tabela 5.3. Koncentracija ukupnih proteina izmerena kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) u listovima kontrolnih i biljaka izloženih vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h.

Proteini	Eksperimentalne grupe				
	Kontrola	6 h	24 h	72 h	144 h
ZP 555 [mg g ⁻¹ FW]	3,53±0,318 b	3,79±0,128 b*	3,73±0,151 b	4,69±0,099 a	3,69±0,494 b*
ZP 606 [mg g ⁻¹ FW]	3,67±0,404 bc	5,58±0,356 a*	3,56±0,421 c	4,67±0,188 b	4,71±0,184 b*

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (standardna devijacija).

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

5.1.3. Parametri oksidativnog stresa

U ovom istraživanju je analizirano nekoliko ključnih metabolita i parametre oksidativnog stresa čija se promena vrednosti često povezuje sa odgovorom biljke na stres izazvan vodnim suficitom. Cilj analiza je bio ustanoviti kako vodni suficit kod dva hibrida kukuruza utiče na sledeće značajne parametre oksidativnog stresa: koncentracija vodonik peroksida i koncentracija malondialdehida, aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i POX, te sadržaj polifenola.

a) Koncentracija vodonik peroksida

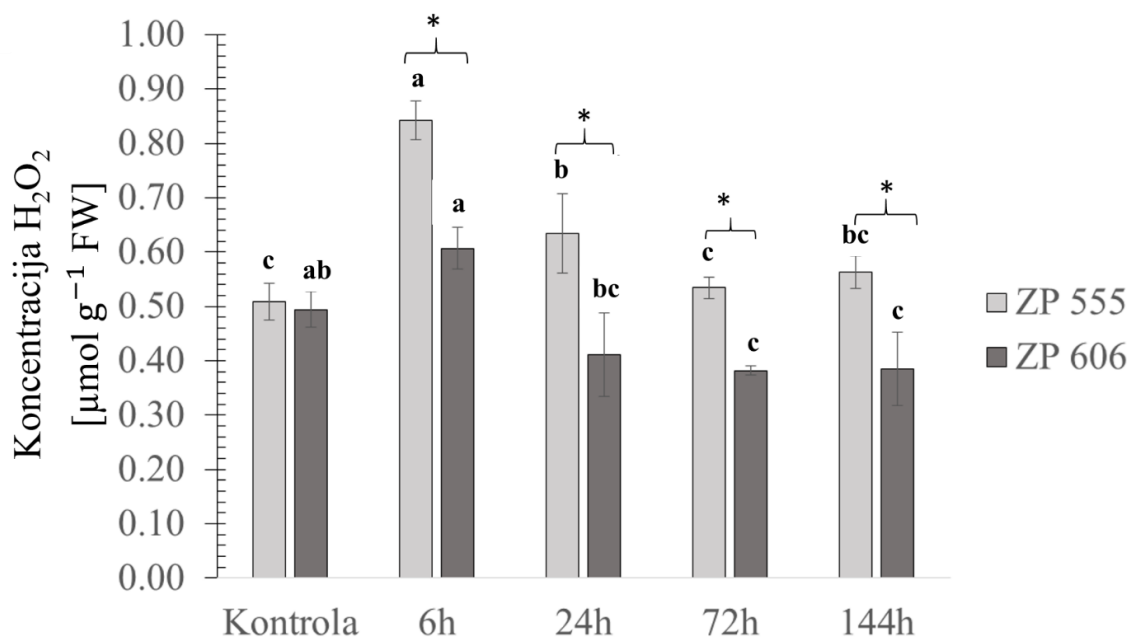
Vodni suficit dovodi do povećane produkcije ROS i posledično oksidativnog stresa kod biljaka (Xiong i sar., 2002). ROS su neizbežni ko-proizvodi fotosinteze (Apel i Hirt, 2004; Li i sar., 2009). Međutim, povećana proizvodnja ROS je upravo zabeležena u uslovima stresa kada je fotosinteza inhibirana. U ovakvim uslovima, dolazi do redukcije elektron transportnog lanca u svetloj fazi fotosinteze te nastanka ekscitovanog triplet hlorofila. Ekscitovani hlorofil energiju može preneti na kiseonik pri čemu nastaje singlet kiseonik, dok „curenje“ elektrona sa elektron transportnog lanca dovodi do nastanka superoksid anjon radikala i ostalih ROS. Povećana proizvodnja ROS dovodi do narušavanja strukture FS II i oksidativnih procesa, kao što su lipidna peroksidacija, inhibicija enzima, oksidacija proteina i nukleinskih kiselina, što na kraju može dovesti do smrti ćelije (Greene, 2002). Treba naglasiti da je H_2O_2 manje reaktivan u poređenju sa drugim ROS, međutim može biti izuzetno štetan zbog stabilnosti i sposobnosti difundovanja kroz membrane unutar i između ćelija, omogućavajući na taj način nastanak veoma reaktivnog hidroksilnog radikala u Fentonovoj reakciji (Feierabend, 2005). Zbog navedenog je aklimatizacija na povećane koncentracije ROS, koje nastaju tokom stresa, od krucijalne važnosti za rast i razvoj biljaka (Foyer i Noctor, 2005a, b).

U našem radu kao posledica vodnog suficita izmerena je veće koncentracije H_2O_2 u prvim satima vodnog suficita kod oba ispitivana hibrida (Slika 5.1). Najveća koncentracija H_2O_2 je izmerena nakon 6 h trajanja vodnog suficita kod oba ispitivana hibrida, ali statistički značajno povećanje je samo kod hibrida ZP 555. Naime, kod ZP 555 hibrida u prvim satima vodnog suficita, nakon 6 i 24 h dolazi do značajnog porasta koncentracije H_2O_2 od +39% ($p=0,001$) i +20% ($p=0,05$) u poređenju sa kontrolom. Nakon 24 h sledi postepen pad koncentracije H_2O_2 , ali se statistički značajno ne razlikuje od kontrole. Veliki broj studija je pokazao povećanje koncentracije H_2O_2 pri dužem ili kraćem izlaganju biljaka vodnom suficitu (Bansal i

Srivastava, 2012; Yadav i Srivastava, 2017; Tian i sar., 2019b). Povećano generisanje H_2O_2 je povezano upravo sa hipooksničnim uslovima koji su evidentni pri vodnom suficitu gde se koren biljaka nalazi u okruženju sa smanjenom koncentracijom kiseonika, pri ovom tipu stresa (Bailey-Serres i Voesensk, 2008).

Kod drugog ispitivanog hibrida ZP 606, kao odgovor na vodni suficit u našem radu je izmereno značajno smanjenje koncentracije H_2O_2 nakon 72 h i 144 h. U prvim satima vodnog suficita (6 h) izmeren je blagi porast koncentracije H_2O_2 u poređenju sa kontrolom, međutim sa produženim izlaganjem vodnom suficitu dolazi do smanjenja koncentracije H_2O_2 kod hibrida ZP 606 u poređenju sa njegovom kontrolom. Tako je nakon 72 i 144 h od primenjenog stresa zabeleženo statistički značajano smanjenje koncentracije H_2O_2 za -22% ($p=0,02$) odnosno -23% ($p=0,01$) u poređenju sa kontrolom ispitivanog hibrida. Smanjenje koncentracije H_2O_2 detektovano kod hibrida ZP 606 u poređenju sa njegovom kontrolom može ukazati na veću tolerantnost ovog hibrida na stres izazvan vodnim suficitom u odnosu na hibrid ZP 555. Prema literaturnim podacima, manja koncentracije H_2O_2 je adaptivna prednost tolerantnih genotipova kukuruza na stres izazvan vodnim suficitom, dok sa druge strane osetljivi genotipovi imaju manju adaptivnu plastičnost, što ih vodi ka većim oštećenjima uzrokovanim stresom (Yadav i Srivastava, 2017). Autori su do navedenih zaključaka došli ispitivanjem uticaja vodnog suficita u trajanju od 6 dana na biljke kukuruza starosti 20 dana. Slično istraživanje uticaja vodnog suficita u trajanju od 6 dana sprovedli su Bansal i Srivastava (2012) na dva genotipa *Cajanus cajan*, starosti 20 dana. Autori su pokazali da osetljivi genotipovi generišu veće koncentracije H_2O_2 , a tolerantniji genotipovi sadrže značajno manje koncentracije H_2O_2 (Bansal i Srivastava, 2012). Još jedan primer koji govori u prilogu smanjenju koncentracije H_2O_2 kod tolerantnih genotipova, a povećanju kod osetljivih genotipova je ispitivanje uticaja vodnog suficita u trajanju od 2, 4 i 6 dana na biljke *Vigna radiata*, starosti 25 dana (Sairam i sar., 2011).

Generalno veće koncentracije H_2O_2 su izmerene kod ZP 555 hibrida u poređenju sa ZP 606. Statistički značajna razlika između hibrida je zabeležena tokom celog eksperimentalnog perioda, tj. nakon 6 h ($p=0,02$), 24 h ($p=0,01$), 72 h ($p=0,0003$) i 144 h ($p=0,02$) vodnog suficita. Upravo zbog zabeležene značajne interhibridne razlike u pogledu koncentraciji H_2O_2 pri izlaganju vodnom suficitu, u poređenju sa literaturom kada je ovaj parametar u pitanju, se može reći da je hibrid ZP 555 osetljiviji na testirani stres, dok je hibrid ZP 606 tolerantniji na ovaj tip stresa.



Slika 5.1. Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

b) Koncentracija malondialdehida

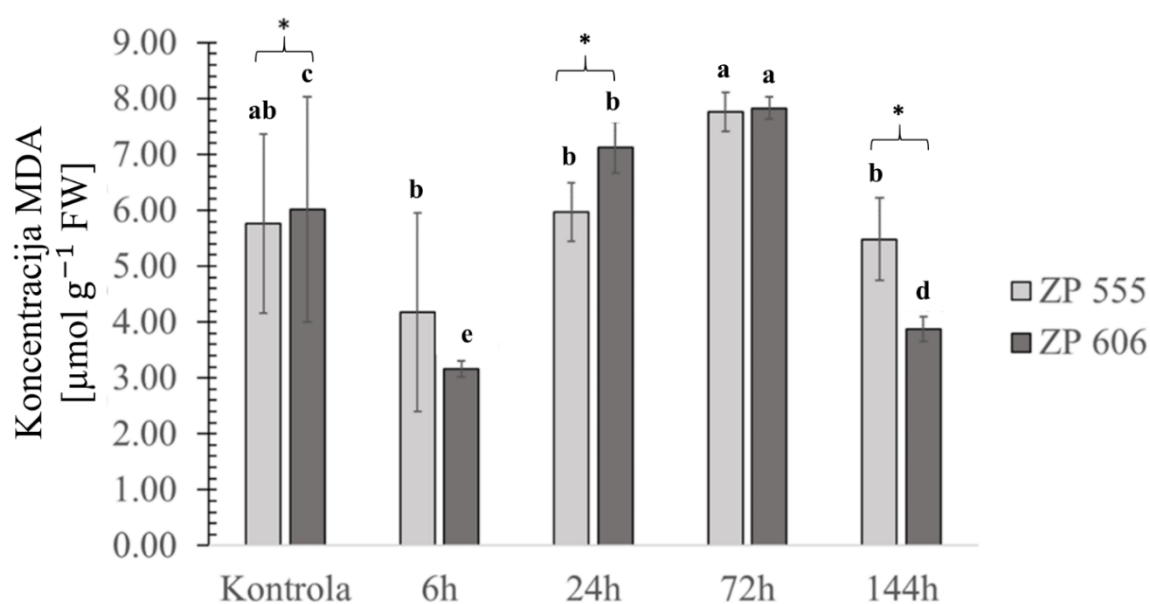
Još jedan veoma značajan parametar koji ukazuje na nastanak oksidativnog stresa izazvanog vodnim suficitom i deficitom jeste proizvod lipidne peroksidacije, malondialdehid (MDA), koji se koristi kao veoma važan indikator oštećenja ćelijske membrane nastalih pod uticajem ROS (Wang i sar., 2014; Noctor i sar., 2015). H₂O₂ kao i drugi ROS se smatraju inicijatorima lipidne peroksidacije kod biljaka kukuruza (Yan i sar., 1996), pa se tako MDA koristi kao veoma dobar indikator generisanja ROS tokom stresa te kao marker oksidativnog stresa kod biljaka. Osim toga što predstavlja proizvod lipidne peroksidacije i ukazuje na stepen oštećenja membrana, pokazano je da MDA ima štetna dejstva na DNK formirajući deoksiguanozin i deoksiadenozin (Marnett, 1999). Osim toga, novija istraživanja ukazuju da primarni i sekundarni proizvodi lipidne peroksidacije utiču negativno ne samo na lipide nego i na proteine FSII (Yamauchi i sar., 2008; Pospišil i Yamamoto, 2017).

Rezultati merenja koncentracije MDA, kao pokazatelja stepena lipidne peroksidacije, kod oba ispitivana hibrida nakon izloženosti vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h, prikazani su na Slika 5.2. Ispitivani hibridi kukuruza u našem istraživanju su pokazali interhibridne razlike u pogledu koncentraciji MDA u uslovima vodnog suficita. Naime, koncentracija MDA je bila nepromenjena kod hibrida ZP 555 dok je koncentracije MDA, kod hibrida ZP 606, varirala u zavisnosti od dužine trajanja vodnog suficita. Iako zabeležene promene u koncentraciji MDA pri izlaganju vodnom suficitu kod hibrida ZP 555 nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu, nakon 72h od početka tretmana izmerena je najveća koncentracija MDA, ali se statistički nije značajno razlikovala od koncentracije MDA izmerene kod kontrolnih biljaka.

Sa druge strane, vodni suficit je doveo do značajne promene u stepenu lipidne peroksidacije kod hibrida ZP 606 pri čemu je koncentracija MDA varirala u zavisnosti od trajanja stresa. U prvim satima (6 h) i poslednjim satima (144 h) vodnog suficita je izmereno značajno smanjenje koncentracije MDA za -47% ($p=0,002$) i -35% ($p=0,006$) kod hibrida ZP 606 u poređenju sa kontrolom. Međutim, koncentracija MDA se značajno povećala za +30% nakon 24 i 72 h od aplikacije stresa u poređenju sa kontrolom hibrida ZP 606. U radu Ren i sar. (2016) izmereno je povećanje koncentracije MDA kod kukuruza, u tri razvojna stadijuma: 3 lista (V3), 6 listova (V6) i 10 dana nakon faze metličanja (10 VT), koji su bili izloženi vodnom suficitu u trajanju od 3 i 6 dana. Osim toga, autori ukazuju na važnost starosti biljaka pri izlaganju ovom tipu stresa, jer je pokazano da su najosetljivije bile V3 biljke, dok su

najotpornije na vodni suficit bile biljke koje su se nalazile u fazi deset dana nakon metličanja (Ren i sar., 2016). Povećanje koncentracije MDA pri vodnom suficitu je pokazano i kod drugih biljnih vrsta: *Mentha aquatica* L. (Haddadi i sar., 2016), *Saccharum sp.* (Jain i sar., 2016) i *Vigna angularis* (Ullah i sar., 2017), *Triticum aestivum* (Tan i sar., 2008). Takođe, Bin i saradnici (2010) ukazuju da pri izlaganju mladih sadnica, otpornog (genotip HZ32) i osetljivog (genotip K12), genotipa kukuruza vodnom suficitu u trajanju od 2, 4, 6, 8 i 10 dana dolazi do povećanja koncentracije MDA kod osetljivog genotipa kukuruza (genotip K12) do 6 dana nakon izlaganja vodnom suficitu, te nije zabeležena značajna promena koncentracije MDA kod tolerantnog genotipa kukuruza pri stresu. Do sličnih rezultata se došlo i u radu Rai i sar. (2004) gde je izmerena veća koncentracija MDA kod osetljivih genotipova u odnosu na tolerantne genotipove izložene uslovima vodnog suficita. Tolerantni genotipovi imaju sposobnost dužeg zadržavanja vode i održavanja membranske stabilnosti (Deshmukh i sar., 1991; Gupta i Gupta, 2005). Intenziviranje oksidativnog stresa u uslovima vodnog suficita za posledicu ima intenzivniju lipidnu peroksidaciju i manju stabilnost membrana. Manji indeks membranske stabilnosti podrazumeva izraženiju lipidnu peroksidaciju, što je posledica izraženijeg oksidativnog stresa u uslovima vodnog suficita.

Izmerene su interhibridne razlike u samoj kontroli, gde je hibrid ZP 555 imao manju koncentraciju MDA u odnosu na hibrid ZP 606 ($p=0,03$). Osim u kontroli, izmerene su značajno manje koncentracije MDA u uzorcima hibrida ZP 555 nakon 24 h ($p=0,05$) dok je u uzorcima nakon 144 h vodnog suficita zabeležena značajno veća koncentracija MDA ($0,03$) u poređenju sa hibridom ZP 606. Iz prethodno rečenog može se zaključiti da je hibrid ZP 606 otporniji pri dužem izlaganju vodnom suficitu.



Slika 5.2. Koncentracija malonildialdehida (MDA) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

5.1.4. Antioksidativni sistem zaštite

Antioksidativni sistem zaštite je jedan od najvažnijih adaptivnih mehanizama tokom vodnog suficita deficita. Funkcionisanje ovog sistema je različito i zavisi od genotipa biljaka (osetljivi ili tolerantni genotipovi), od tipa stresa i dužine stresa, kao i razvojnog stadijuma biljaka. Razlike u adaptaciji između genotipova nastaju usled varijabilnosti njihovih antioksidativnih sistema (Pastori and Trippi, 1992; Turcsanyi i sar., 1994; Kraus i sar., 1995). Indukovanje antioksidativnog sistema zaštite se smatra kao značajna osobina rezistentnih genotipova biljaka na vodni suficit i deficit. Mnoga istraživanja govore u prilog podsticanja antioksidativnog sistema zaštite, njegovog enzimskog i neenzimskog dela, kao metodu smanjenja oksidativnog stresa i progresivnog razvoja tolerantnih genotipova biljaka (Sharma i Dubey, 2005a; de Carvalho, 2008). Osim toga, nedavno je pokazano da je memorija biljaka, a time i favorizovanje tolerantnih genotipova upravo povezano sa povećanom aktivnošću antioksidativnog sistema zaštite (Lukić i sar., 2020). Naime, do sada je utvrđeno da genotipovi koji su tolerantni na vodni suficit formiraju aerenhim, imaju povećanu koncentraciju šećera, veću aktivnost enzima zaduženih za fermentaciju pri anaerobnom metabolizmu, zatim unapređen antioksidativni sistem (Almagir i Uddin, 2011). Tako se smatra da su genotipovi biljaka koji generišu manje ROS, imaju veće aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije neenzimskih komponenti, tolerantniji su na vodni suficit (Yin i sar., 2010; Li i sar., 2018).

Aktivnosti antioksidativnih enzima

U našem radu aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, POX i CAT) merena je u listovima dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606, nakon izlaganja vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h i hipooksija izazvana vodnim suficitom je dovele do značajnih promene u aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima.

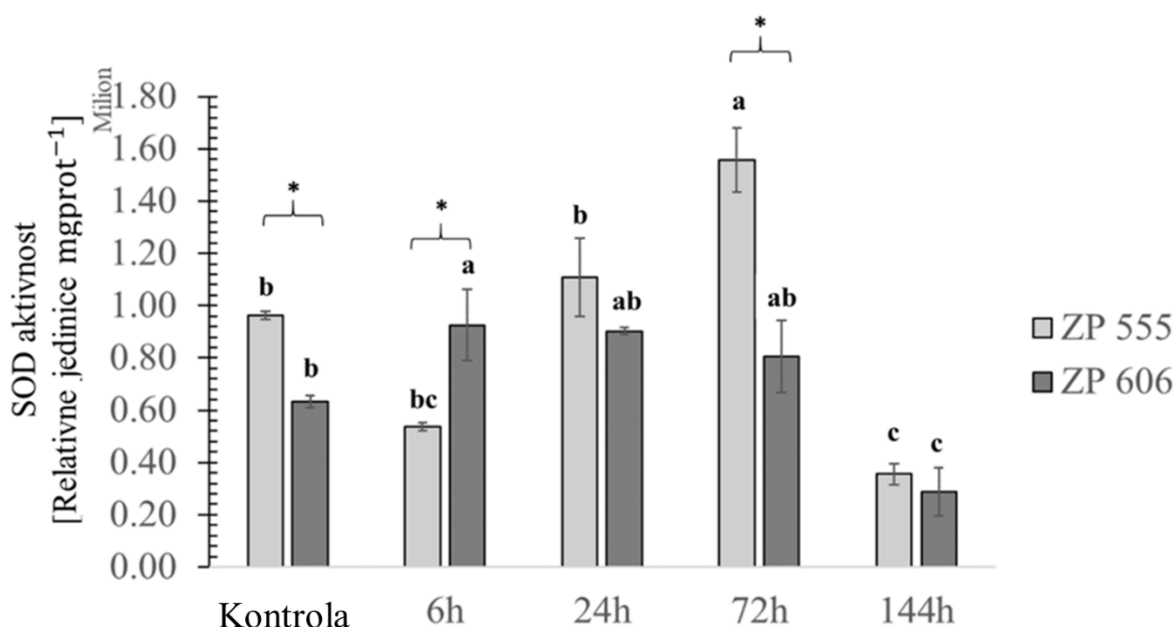
a) Aktivnost superoksid dismutaza (SOD)

Kao najveći izvor superoksid anjon radikala smatra se FSII tokom procesa fotosinteze (Fischer i sar., 2013). SOD je ključni enzim koji katalizuje reakciju dismutacije dva molekula superoksid anjon radikala do H_2O_2 (Giannopolitis i Ries, 1977). S toga SOD predstavlja prvu liniju odbrane protiv generisanih ROS tokom vodnog deficita i suficita. U uslovima vodnog suficita u našem eksperimentu izmerene su značajne promene u aktivnosti SOD kod biljaka izloženih vodnom suficitu u odnosu na kontrolu kod oba ispitivana hibrida kukuruza. Rezultati merenja aktivnosti SOD kod ispitivanih hibrida u uslovima vodnog suficita su prikazani na Slici 5.3. Generalno, odgovor SOD na uslove hipooksije se ogledao u postepenom povećavanju aktivnosti SOD sa dužinom izlaganja biljaka vodnom suficitu, te naglim smanjenjem aktivnosti u poslednjim satima izlaganja stresu.

Izlaganje biljaka ZP 555 hibrida vodnom suficitu je izazvalo postepeno povećanje aktivnosti SOD kod biljaka izloženih vodnom suficitu u trajanju od 24 h, a zatim je svoj maksimum dostigla nakon 72 h vodnog suficita (+38%, $p=0,02$) u poređenju sa kontrolom (Slika 5.3). Sa druge strane, maksimum aktivnosti SOD kod biljaka ZP 606 je izmeren već nakon 6 h vodnog suficita, gde došlo je do značajnog povećanja aktivnosti SOD (+32%) u poređenju sa kontrolom ($p=0,04$). Povećana aktivnost SOD je mehanizam odbrane i uklanjanja velike koncentracije superoksid anjon radikala iz ćelije koji se generišu u uslovima vodnog suficita i deficita i ima krucijalnu funkciju u preživljavanju biljaka (Kukreja i sar., 2005; Gambarova i Gins, 2008; Gapinska i sar., 2008). Tako je povećanje aktivnosti SOD pokazano i kod drugih vrsta izloženih vodnom suficitu kao što su: citrusi (Hossain i sar., 2009), *Cajanus cajan* (Kumutha i sar., 2009), *Hordeum vulgare* (Zhang i sar., 2007a). Međutim, Ahmed i sar. (2002) su pokazali da dolazi do smanjenja aktivnosti SOD kod biljaka vrste *Vigna radiata*, starosti 21 dan, nakon izlaganja vodnom suficitu u trajanju od 8 dana, što može ukazati na osetljivost ove vrste na ovaj tip stresa. Bin i sar. (2010) ukazuju da tolerantniji genotipovi kukuruza, na stadijumu mladih sadnica (V3), imaju veću aktivnost SOD u listovima u odnosu na osetljive genotipove kukuruza pri izlaganju vodnom suficitu u trajanju od 2, 4, 6, 8 i 10

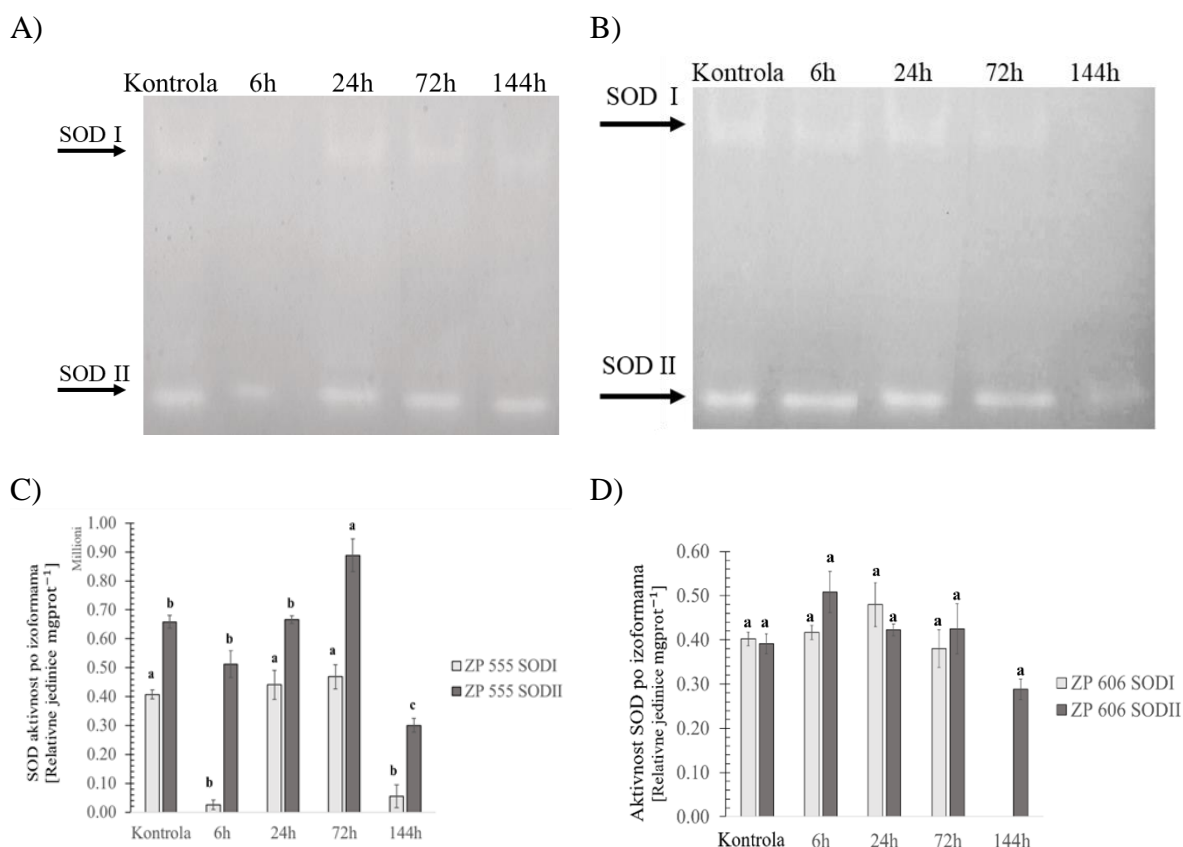
dana. Takođe, autori Yadav i Srivastava, (2017) su ukazali na povećanje aktivnosti SOD u korenu kod tolerantnog genotipa kukuruza, starosti 20 dana, u odnosu na osetljivi pri izlaganju vodnom suficitu u trajanju od nula do šest dana. Pokazano je da genotipovi koji su tolerantni na vodni suficit i deficit povećavaju aktivnost SOD (Yadav i Srivastava, 2017) što predstavlja snažan mehanizam zaštite od oksidativnog stresa izazvanog ovim tipovima stresa.

U našem radu, nakon produženog tretmana vodnog suficita, tj. nakon 144 h od početka vodnog suficita, došlo je do značajnog smanjenje aktivnosti SOD kod oba tipa hibrida (za -50% kod ZP 555 ($p=0,01$), te -72% kod hibrida ZP 606 ($p=0,009\%$) u poređenju sa kontrolom (Slika 5.3), što ukazuje da su oba genotipa podjednako osetljiva na produženi vodni suficit, kada je u pitanju ovaj parametar.



Slika 5.3. Ukupna aktivnost superoksid dismutaza (SOD) izmerene kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Izoenzimski profil SOD se nije menjao tokom trajanja vodnog suficita (Slika 5.4 A, B). Detektovane su dve SOD izoforme obeležene kao SOD I (Rf=0,440) i SOD II (Rf=0,834) kod oba ispitivana hibrida u kontroli i eksperimentalnim grupama. Kod hibrida ZP 606 detektovana je ujednačena aktivnost obe izoforme, međutim nakon produženog vodnog suficita (144 h) došlo je do potpune inhibicija SOD I (4B, D), dok kod ZP 555 ova izoforma je konstantno imala manji udeo u ukupnoj aktivnosti SOD, sa izrazito malim vrednostima nakon 6 i 144 h. Promene u aktivnosti SOD I su generalno imale najveći efekat opisane promene u ukupnoj aktivnosti SOD.



Slika 5.4. Izoenzimski profil superoksid dismutaza (SOD) kod ZP 555 (A) i ZP 606 (B) hibrida te SOD aktivnost za pojedinačne SOD izoforme izmerena kod ZP 555 (C) i ZP 606 (D) kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h. Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima.

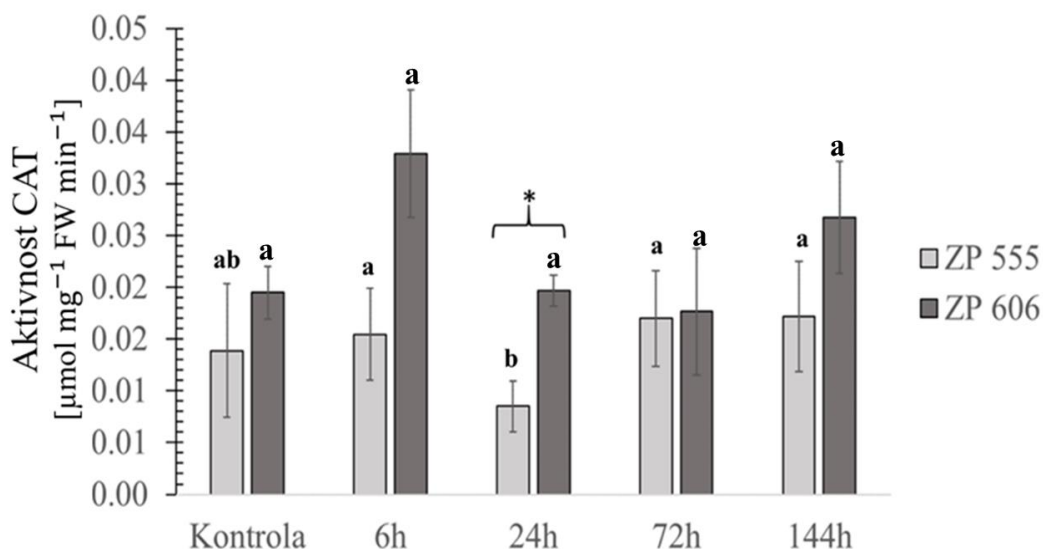
b) Aktivnost katalaza (CAT)

Važnu ulogu u odbrani ćelija od ROS ima CAT koja katalizuje razgradnju H_2O_2 . Katalaza je enzim koji se nalazi kod svih aerobnih eukariota i ima sposobnost direktnog prevođenja H_2O_2 do H_2O i O_2 , što čini ovaj enzim nezamenljivim enzimom u uslovima oksidativnog stresa nastalog usled izlaganja biljaka različitim tipovima stresa, ali i stresa izazvanog vodnim suficitom i deficitom (Van Breusegem i sar., 2001). Katalaza je izuzetno efikasan enzim pri višim koncentracijama H_2O_2 . Jedan molekul CAT može katalizovati razgradnju oko 6×10^6 molekula H_2O_2 u vodu i kiseonik u jednoj minuti.

Aktivnost CAT je merena kod biljaka oba hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606 koje su rasle u kontrolnim uslovima i kao i kod biljaka koje su rasle u uslovima vodnog suficita 6, 24, 72 i 144 h. Rezultati za oba ispitivana hibrida su prikazani na Slika 5.5. Promene u aktivnosti CAT izazvane vodnim suficitom nisu bile statistički značajne ni kod jednog ispitivanog hibrida u odnosu na kontrolne biljke. Neznatne promene aktivnosti CAT kao posledica vodnog suficita su primećene kod hibrida ZP 555. Naime, najniža aktivnost CAT je izmerena kod biljaka koje su u uslovima vodnog suficita bile 24 h, gde je aktivnost CAT smanjena za -38% u odnosu na kontrolne biljke, bez statističke značajnosti, ali je bila značajno niža u odnosu na druge tretmane (6 h za -45% ($p=0,03$), odnosno nakon 72 h od -67% ($p=0,03$)). Zabeležene promena u aktivnosti CAT kod ZP 606 tokom vodnog suficita nisu se statistički značajno razlikovale. Trend je bio sledeći: vodni suficit je indukovao prvo porast aktivnosti CAT, nakon 6 h vodnog suficita, a zatim je detektovano smanjenja aktivnosti, nakon 24 i 72 h u poređenju sa biljkama koje su rasle u kontrolnim uslovima hibrida ZP 606. Međutim, nakon blagog smanjenja aktivnosti CAT, u 144 satu vodnog suficita izmeren je blagi porast aktivnosti CAT u poređenju sa kontrolom hibrida ZP 606.

Druga istraživanja pokazuju da pri dužem izlaganju vodnom suficitu ipak dolazi do povećanja aktivnosti CAT. U radu Bin i sar., 2010 u listovima i kod tolerantnog i kod osetljivog genotipa kukuruza (stadijum sadnica) izmereno je povećanje aktivnosti CAT pri izlaganju 2, 4, 6, 8 i 10 dana vodnom suficitu. Osim kod biljaka kukuruza, zabeleženo je povećanje aktivnosti CAT kod biljke *Sesamum indicum*, starosti 21 dan, pri izlaganju vodnom suficitu u trajanju od 2, 4, 6 i 8 dana (Anee i sar., 2019), kao i kod tolerantnog genotipa *Hordeum vulgare* (genotip Xiumai 3) u odnosu na osetljivi genotip (genotip Gerdner) pri izlaganju vodnom suficitu u trajanju od 1, 4, 8, 12 i 18 dana (Zhang i sar., 2007a). Međutim, smanjenjena ili nepromenjena aktivnost CAT kod nekih vrsta može ukazati na važnost drugih antioksidativnih enzima, poput POX i APX u uklanjanju H_2O_2 generisanog tokom stresa (Harinasut i sar., 2003).

Razlika između hibrida, a kao odgovor na vodni suficit, je primećena kod biljaka koje su u uslovima vodnog suficita provele 24 h, gde je aktivnost CAT bila veća za +56% kod ZP 606 biljaka u odnosu na biljke hibrida ZP 555. Neznatno veće aktivnosti CAT su izmerene kod hibrida ZP 606 i kod kontrole i tokom tretmana.



Slika 5.5. Aktivnosti katalaze (CAT) izmerene kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafikonu su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

c) Aktivnost peroksidaza Klase III (POX)

Peroksidaze Klase III, pored CAT i APX, imaju veoma važnu ulogu u eliminaciji H₂O₂ nastalog tokom vodnog suficita i deficita. U ovom radu je praćena aktivnost nespecifičnih POX koje pripadaju Klasi III, a predstavljaju jedini enzim koji uklanja H₂O₂ iz ekstracelularnog prostora (Veljović Jovanović i sar., 2018).

Rezultati za aktivnosti POX u uslovima stresa izazvanog vodnim suficitom kod dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606 prikazani su na Slici 5.6. Kao odgovor na stres izazvan vodnim suficitom kod oba hibrida kukuruza je izmeren porast aktivnosti POX što se može smatrati kao mehanizam odbrane od ROS.

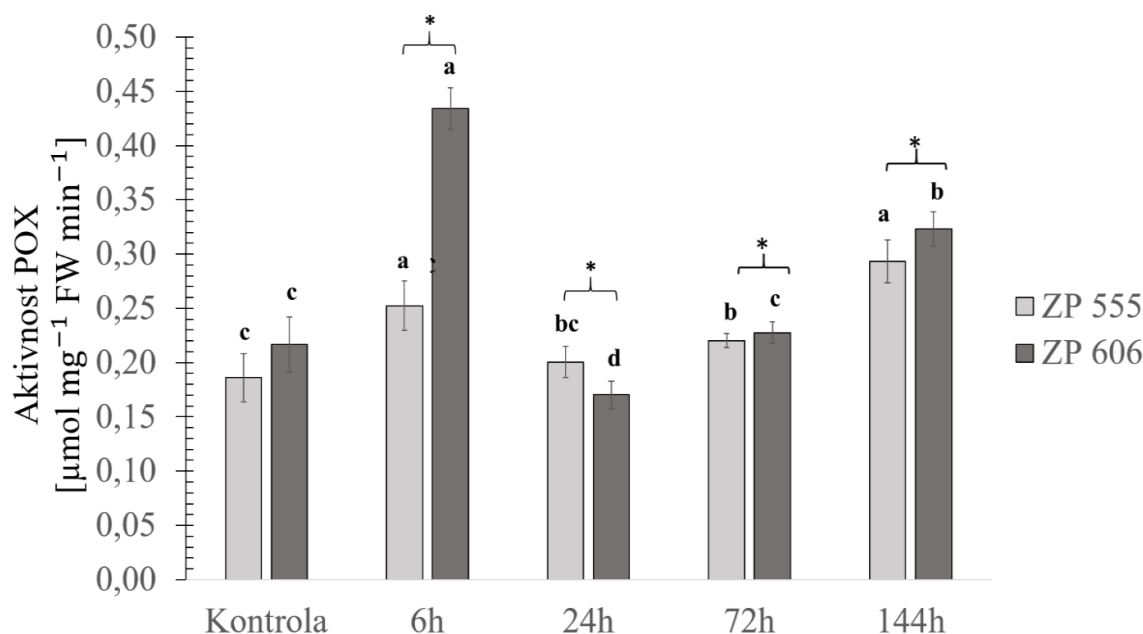
Biljke hibrida ZP 555 izložene vodnom suficitu su imale veću aktivnost POX u odnosu na kontrolne biljke. Zabeležen je postepen porast aktivnosti POX kod ovog hibrida, nakon 6 h od +27% (p=0,01) i nakon 72 h od +15% (p=0,02) u poređenju sa biljkama koje su rasle u kontrolnim uslovima. Osim toga, najveća aktivnost POX je izmerena kod biljaka koje su u uslovima vodnog suficita bile 144 h, kada je aktivnost bila veća za +36% (p=0,01) u odnosu na kontrolne biljke hibrida ZP 555.

Kod hibrida ZP 606 najveća aktivnost POX je izmerena u listovima biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6 h (+50%, p=0,0005) u poređenju sa kontrolnim biljkama (Slika 5.6). Takođe, u odnosu na uzorke koji su bili izloženi vodnom suficitu 6 h izmereno je značajno smanjenje aktivnosti POX kod biljaka koji su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 24 h (-20%, p=0,02). Kao odgovor na izlaganje biljaka vodnom suficitu u trajanju od 144 h aktivnost POX, je bila povećana za +33% u odnosu na kontrolu hibrida ZP 606 (p=0,008).

U saglasnosti sa našim rezultatima su rezultati dobijeni i kod drugih genotipa i biljnih vrsta kod kojih je ispitivan uticaj vodnog suficita. Povećanje aktivnosti POX je izmereno u prva četiri dana vodnog suficita, a zatim je zabeleženo smanjenje aktivnosti POX u listovima *Zea mays*, na stadijumu mladih sadnica u radu Bin i sar. (2010). Osim toga porast aktivnosti je zabeležen i kod drugih biljnih vrstama, kao što su: *Triticum arvensis* (Tan i sar., 2008), *Hordeum vulgare* (Zhang i sar., 2007a) kao i kod biljke *Cajanus cajan* (Bansal i Srivastava, 2012) koje su na duži ili kraći period bile izložene uticaju vodnog suficita.

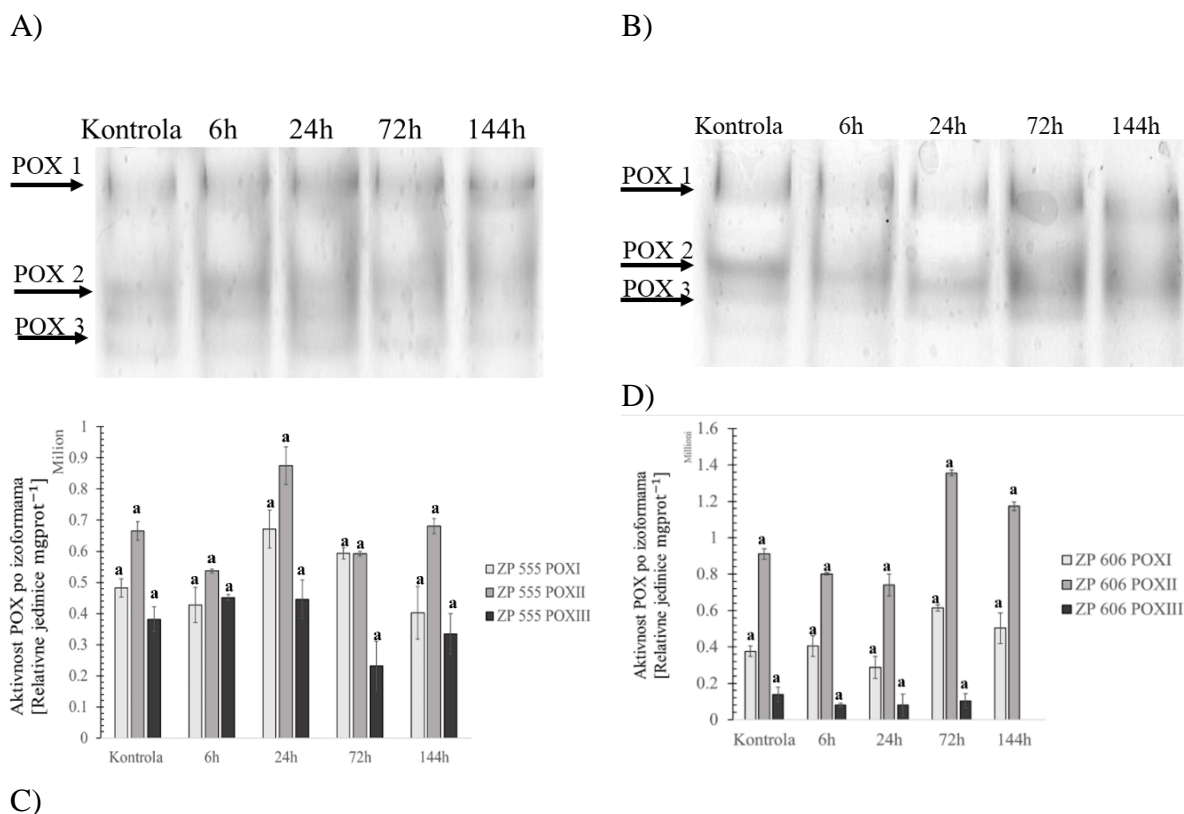
Kako naši rezultati pokazuju, odgovor na hipoksiju izazvanu vodnim suficitom kod ispitivana dva hibrida je dinamički bio različit. Tako je aktivnost POX kod ZP 555 hibrida postepeno rasla sa produženjem perioda izlaganja vodnom suficitu, dok je sa druge strane kod ZP 606 izmerena najveća aktivnost u prvih 6 h vodnog suficita. Razlike između hibrida su uočene u svim satima vodnog suficita, 6 h (p=0,007), 24 h (p=0,04), 72 h (p=0,05) te nakon

144 h ($p=0,003$), a generalno je aktivnost POX bila veća kod hibrida ZP 606. Iz dobijenih rezultata za aktivnosti POX bi se moglo zaključiti da oba hibrida imaju podjednaku toleranciju na stres izazvan vodnim sušicom.



Slika 5.6. Ukupna aktivnost Klase III peroksidaza (POX) izmerene kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom sušicom u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafikonu su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Kada su u pitanju POX izoenzimski profili, detektovane su po tri POX izoforme kod hibrida ZP 555 kod kontrolnih biljaka i biljaka koje bile podvrgnute vodnom sušicom. Izoenzimski profil POX je takođe bio promenjen kod hibrida ZP 606. Tri detektovane POX izoforme, označene kao POX I ($R_f=0,268$), POX II ($R_f=0,339$) i POX III ($R_f=0,429$), su detektovane kod kontrolnih biljaka hibrida ZP 555, kao i kod biljaka koje su u uslovima vodnog sušice provela 6, 24, 72 i 144 h (Slika 5.7 A, C). Za razliku od hibrida ZP 555, kod hibrida ZP 606 je detektovana potpuna inhibicija POX III izoforme kod biljaka koje su bile izložene vodnom sušicom 144 h, dok su kod ostalih eksperimentalnih grupa i kontrole detektovane po tri izoforme. Kod oba hibrida izoforma POXII je dala najveći doprinos ukupnoj POX aktivnosti (Slika 5.7A, B).



C)

Slika 5.7. Izoenzimski profili peroksidaza Klase III (POX) kod ZP 555 (A) i ZP 606 (B) hibrida te aktivnost pojedinačnih POX izoformi kod ZP 555 (C) i ZP 606 (D) kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h. Na graficima su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Neenzimski antioksidativni sistem zaštite

a) Koncentracija ukupnih polifenola

Polifenoli predstavljaju neenzimski deo antioksidativnog sistema zaštite koji imaju sposobnost uklanjanja ROS i povećanje otpornosti na abiotičke i biotičke faktore spoljašnje sredine (Grace, 2005; Boo i sar., 2011; Korayem i sar., 2012). Polifenolne komponente imaju ulogu donora elektrona POX u vakuolama i apoplastu, s toga mogu doprineti antioksidativnoj funkciji i neutralizaciji vodonik peroksida (Grace, 2005). Polifenoli kao donori i protona i elektrona mogu da učestvuju u eliminaciji H_2O_2 , ali takođe mogu biti i helatori metala (Blokina i sar., 2003; Pourcel i sar., 2007; Gill i Tuteja, 2010).

Povećanje ukupne koncentracije polifenolnih komponenti, kao što su na primer flavonoidi, odgovor je na različite abiotičke stresne faktore (vodni deficit, UV zračenje, niske temperature i slično) (Chalker-Scott, 1999; Sakihama i sar., 2002; Michalak, 2006). U našem eksperimentu povećana koncentracija polifenola, kod hibrida ZP 555, nakon 24 h (+11%, $p=0,03$) i 72 h (+8%, $p=0,05$) je izmerena kao odgovor na vodni suficit u poređenju sa kontrolnim biljkama (Tabela 5.4). Međutim, nakon 144 h od početka vodnog suficita koncentracija polifenola je bila značajno smanjena za -31% ($p=0,005$). Kod hibrida ZP 606 je izmereno značajno povećanje koncentracije polifenola nakon 6 h (+8%, $p=0,04$), 24 h (+5%, $p=0,05$), te za +8% ($p=0,04$), kod biljaka izloženih vodnom suficitu 144 h u poređenju sa kontrolom hibrida ZP 606 (Tabela 5.4). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Alhdad i sar. (2013) koji su detektovali veće koncentracije polifenolnih komponenti kod biljaka vrste *Suaeda maritima* pri vodnom suficitu. Takođe, mnoga istraživanja su pokazala postojanje u ukupnoj koncentraciji polifenola između tolerantnih i osetljivih vrsta (Jiménez i sar., 2015) ili genotipova, kao odgovor na vodni suficit (Bansal i Srivastavam, 2012).

U pogledu interhibridne razlike, uočava se razlika u odgovoru ispitivanih hibrida na uslove vodnog suficita kada je u pitanju koncentracija polifenola. Vodni suficit je indukovao kod hibrid ZP 555 povećanje koncentracije polifenola u prvim satima vodnog suficita dok je nakon 144 h došlo da smanjenja koncentracije polifenola. Sa druge strane, izmeren porast koncentracije ukupnih polifenola nakon 6, 24 i 144 h kod ZP 606 ukazuje da je hibrid ZP 555 otporniji na vodni suficit samo u prvim satima, dok je hibrid ZP 606 otporniji i pri dužem i pri kraćem izlaganju vodnom suficitu.

Tabla 5.4. Koncentracija ukupnih polifenola u listovima hibrida (ZP 555 i ZP 606) kukuruza kod kontrolnih biljaka i biljaka izloženih vodnom suficitu na 6, 24, 72 i 144 h.

	Polifenoli	Eksperimentalne grupe				
		Kontrola	6 h	24 h	72 h	144 h
ZP 555	[mg g ⁻¹ FW]	2,21±0,261 b*	2,21±0,056 b	2,49±0,113 a	2,36±0,032 a*	1,52±0,090 c*
ZP 606	[mg g ⁻¹ FW]	2,10±0,181 b*	2,29±0,038 a	1,79±0,111 b	2,20±0,173 a*	2,27±0,146 a*

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (standardna devijacija).

Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima.

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$.

Statistički značajna razlika između hibrida su predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

a) Koncentracija pojedinačnih polifenola

Osim ukupne koncentracije polifenola u uzorcima dva ispitivana hibrida kukuruza određena je koncentracija pojedinačnih polifenola upotrebom HPLC/DAD i UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS metoda. Dve navedene metode su urađene u svrhu pokazivanja potencijalnih razlika u rezultatima pri različitim ekstrakcijama (iz svežeg (HPLC/DAD) i suvog (UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS) tkiva i upotrebe različitih detektora.

HPLC/DAD metoda

Povećanje antioksidativnog kapaciteta sa kvalitativnim i kvantitativnim povećanjem koncentracije polifenola ima veoma važnu ulogu u preživljavanju i toleranciji na abiotički stres (Lin i sar., 2006). Osim ukupne koncentracije polifenola u uzorcima dva ispitivana hibrida kukuruza određena je koncentracija pojedinačnih polifenola HPLC metodom. Literaturni podaci su pokazali da apoplast kukuruza sadrži najviše polifenola koji su prekursori za sintezu lignina, među kojima je najviše zastupljen koniferil alkohol, zatim kumarinska kiselina, te ferulična kiselina. Osim prekursora za sintezu lignina, u listu kukuruza su detektovane u manjim koncentracijama hlorogena i kafeična kiselina (Maksimović i sar., 2008). Značajno povećanje ukupne koncentracije polifenola i ferulične kiseline je izmereno u listu kukuruza tolerantnog na vodni deficit (genotip Tina), starosti tri sedmice, koji je stresu bio izložen dve sedmice (Hura i sar., 2008). U našem radu, HPLC metodom u ispitivanim hibridima kukuruza detektovana su tri polifenolne komponente, i to dve iz grupe flavonoida, katehin i malvidin i jedna iz grupe hirdoksibenzoevih kiselina, galna kiselina. Pri analizi rezultata retenciono vreme pojedinačni pikova je poređeno sa retencionim vremenom već poznatih standarda. Prosečno poklapanje retencionog vremena dobijenog pri analizi uzoraka sa standardom katehina je bilo 91%, sa standardom galne kiselina je bilo 77,8% te sa standardom malvidina 79,4%.

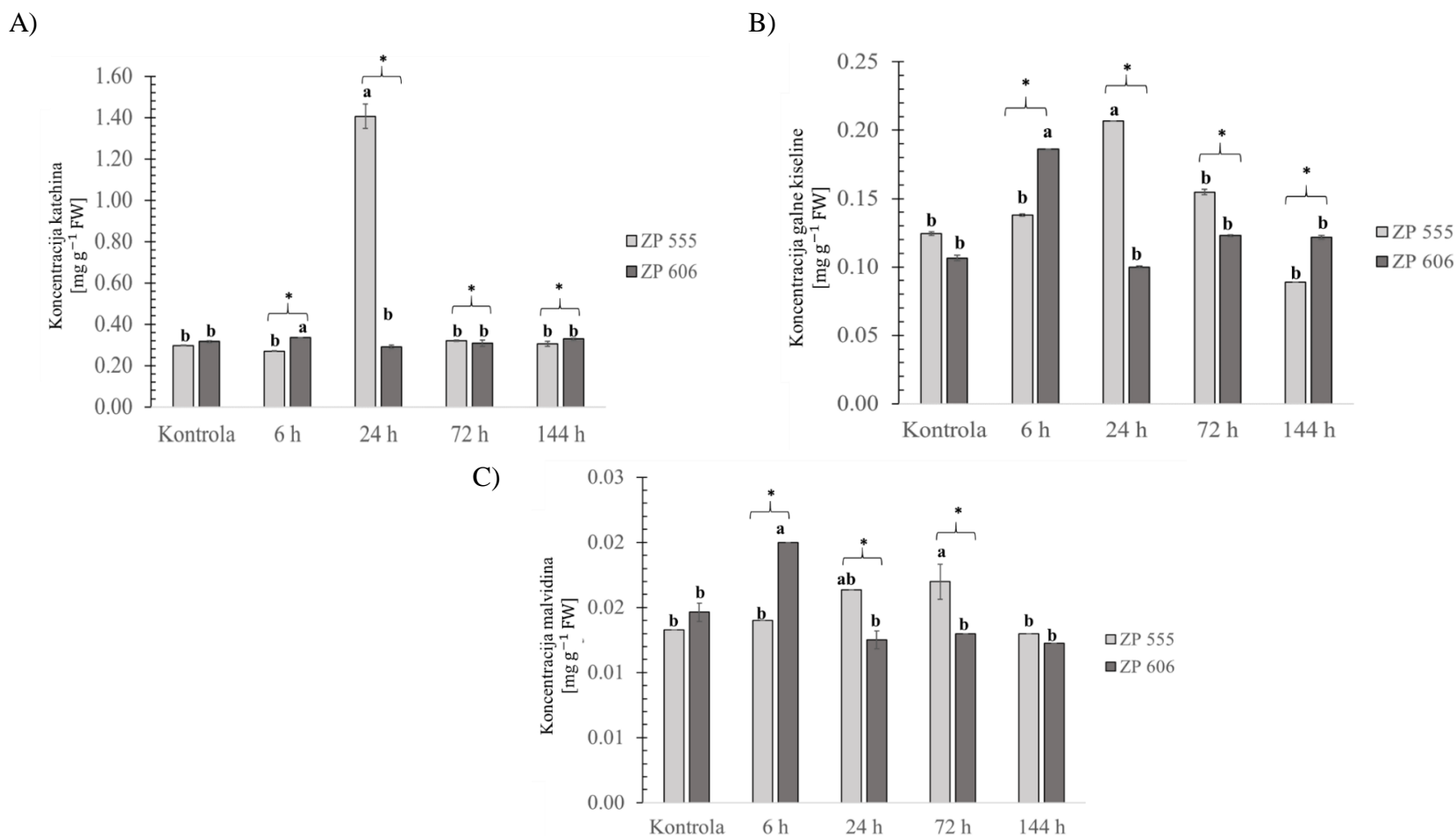
Katehin je flavonoid koji u većim koncentracijama ima sposobnost sa jedne strane direktnog uklanjanja ROS, dok sa druge strane ima sposobnost heliranja jona Fe. Zahvaljujući osobini uklanjanja viška jona Fe iz biljnog tkiva, onemogućava odvijanje Fentonove reakcije pri kojoj nastaje štetni hidroksil radikal (Chobot i Huber, 2009). Pokazano je da katehin ima veću antioksidativnu sposobnost od ostalih flavonoida, te od neenzimskih antioksidanasa askorbinske kiseline i GSH (Grzesik i sar., 2018). Upravo zbog navedenih antioksidativnih sposobnosti, pokazano je da su veće koncentracije katehina svojstvene biljkama koje su tolerantnije na abiotički stres (Close i McArthur, 2002; Grace, 2005; Hatier i Gould, 2008). U našem radu kod oba hibrida izmerena je najveća koncentracija katehina u odnosu na ostale

detektovane polifenole (Slika 5.8A). Kao odgovor na stres izazvan vodnim suficitom izmerena je najveća koncentracije katehina kod biljaka hibrida ZP 555 koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 24 h (+79%, $p=0,0008$) u poređenju sa kontrolom. Sa druge strane najveća koncentracija katehina kod biljaka ZP 606 je izmerena 6 h nakon vodnog suficita (+10%, $p=0,05$) (Slika 5.8A).

Galna kiselina takođe ima izražena antioksidativna svojstva koja se ogledaju u efikasnom uklanjanju ROS, azotnih reaktivnih vrsta, peroksila i hidroperoksid radikata (Bors i Michel, 1999; Marino i sar., 2014). Stres nastao kao rezultat izlaganja biljaka vodnom suficitu je doveo do značajnih promena u koncentracijama galne kiseline kod biljaka oba hibrida koje su bile izložene vodnom suficitu (Slika 5.8 B). Naime, značajno povećanje koncentracije galne kiseline kod hibrida ZP 555 za 40% ($p=0,03$) izmereno je nakon 24 h vodnog suficita u poređenju sa kontrolom. Sa druge strane, najveća koncentracija galne kiseline kod hibrida ZP 606 je izmerena već nakon 6 h od početka vodnog suficita (+43%, $p=0,02$).

Malvidin je polifenol iz grupe antocijanina koji je u najmanjim koncentracijama bio prisutan u uzorcima kukuruza (Slika 5.8C). Antioksidativna svojstva su takođe detektovana i kod antocijana, uključujući i malvidin (Rossetto i sar., 2002). Takođe je pokazano da u prisustvu katehina malvidin ima mnogo veća antioksidativna svojstva inhibirajući time lipidnu peroksidaciju (Rossetto i sar., 2002). Naši rezultati su pokazali značajno povećanje koncentracije malvidina kod biljaka koje su u vodnom suficitu bile 72 h (+24%, $p=0,005$) u poređenju sa kontrolom kod hibrida ZP 555, dok je kod hibrida ZP 606 najveća koncentracija malvidina detektovana nakon 6 h vodnog suficita (+30%, $p=0,02$) (Slika 5.8 C).

Takođe, detektovana je značajna interhibridana razlika u koncentraciji katehina između biljaka koje su bile izložene stresu u trajanju od 6 h ($p=0,0001$), 24 h ($p=0,0001$), 72 h ($p=0,008$) i 144 h ($p=0,005$) (Slika 5.8A). Osim toga značajna razlika između hibrida u koncentraciji galne kiseline izmerena je i kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6 h ($p=0,0001$), 24 h ($p=0,002$), 72 h ($p=0,0003$) i 144 h ($p=0,0001$). I u koncentraciji malvidina između hibrida su uočene razlike za 6 h ($p=0,004$), 24 h ($p=0,006$) i 72 h ($p=0,004$) trajanja vodnog suficita.



Slika 5.8. Koncentracija katehina (A), galne kiseline (B) i malvidina (C) izmerene kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 h kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafikonu su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS metoda

Upotrebom UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS detektovano je ukupno 13 polifenolnih komponenti (Tabela 5.5). Naime, detektovane su fenolne kiseline iz grupe hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarična, ferulična, ruzmarinska i kafeična kiselina) i hidroksibenzoevih kiselina (protokatehnična kiselina), te flavonoidi (izorhamnetin i rutin (flavonoli), eriodiktiol (flavanon), hispidulin, narcisin i viteksin (flavoni), te slobodna hininska kiselina. Takođe, detektovano je jedno jedinjenje iz grupe monoterpenoidnih iridoida - iridoidni glukozid deoksiloganinska kiselina. UHPLC/DAD hromatogrami ekstrakata dva hibrida kukuruza su prikazani u Prilogu 3.

Polifenolne komponente su detekovane u apoplastu i vakuolama (Sirikantaramas i sar., 2008; Ferreres i sar., 2011). Polifenoli mogu biti supstrati za POX, ali i sami uklanjati H₂O₂ koja ima sposobnost difundovanja kroz ćelijski zid u ostale organele, a posebno vakuolu. Prisustvo polifenola, AA i POX u vakuoli i kreiranja polifenol/AA/POX kompleksa omogućava uklanjanje velikih koncentracije H₂O₂ iz ove organele (Ferreres i sar., 2011). Ovaj ROS difunduje iz hloroplasta, pri svetloj fazi fotosinteze, u vakuolu.

Kada su u pitanju fenolne kiseline, izmerena je najviša koncentracija *p*-kumarične kiselina kod oba tretirana hibrida u kontrolnim i tretiranim uzorcima. Takođe, zabeležena je visoka koncentracija hidroksicinamičnih kiselina, ferulične i kafeična kiselina, kod oba hibrida kukuruza.

Naši rezultati su slični i literaturnim podacima koji su pokazali da apoplast kukuruza sadrži najviše polifenola koji su prekursori za sintezu lignina, među kojima je najviše zastupljen koniferil alkohol, zatim kumarična kiselina, te ferulična kiselina. Osim prekursora za sintezu lignina, u listu kukuruza su detektovane u manjim koncentracijama hlorogena i kafeična kiselina (Maksimović i sar., 2008). Takođe, ferulična i *p*-kumarična kiselina su prisutne u trans obliku kao slobodne ili vezane za ćelijski zid. Ferulična kiselina je najviše zastupljena u ćelijskom zidu monokotila i pronačena je u svim tkivima kukuruza, a posebno u zrnu (Das i Singh, 2016).

U radu Ferreres i sar. (2011) pokazano je da kvercetin i kafeična kiselina imaju veći afinitet za H₂O₂ i predstavljaju odličan supstrat za POX, dok ferulična kiselina ima nizak afinitet za ovaj ROS i predstavlja lošiji supstrat za POX. Razlog za nizak afinitet POX za feruličnu kiselinu jeste što je ona vezana za ćelijski zid (Ros Barcelo i sar., 2004; Ralph i sar., 2004), dok se kvercetin i kafeična kiselina akumuliraju u vakuoli (Harborne i Williams, 2000; Marinova i sar., 2007). POX ima veći afinitet za sustrat koji je lokalizovan u vakuoli u odnosu na onaj u ćelijskom zidu (Ferreres i sar., 2011).

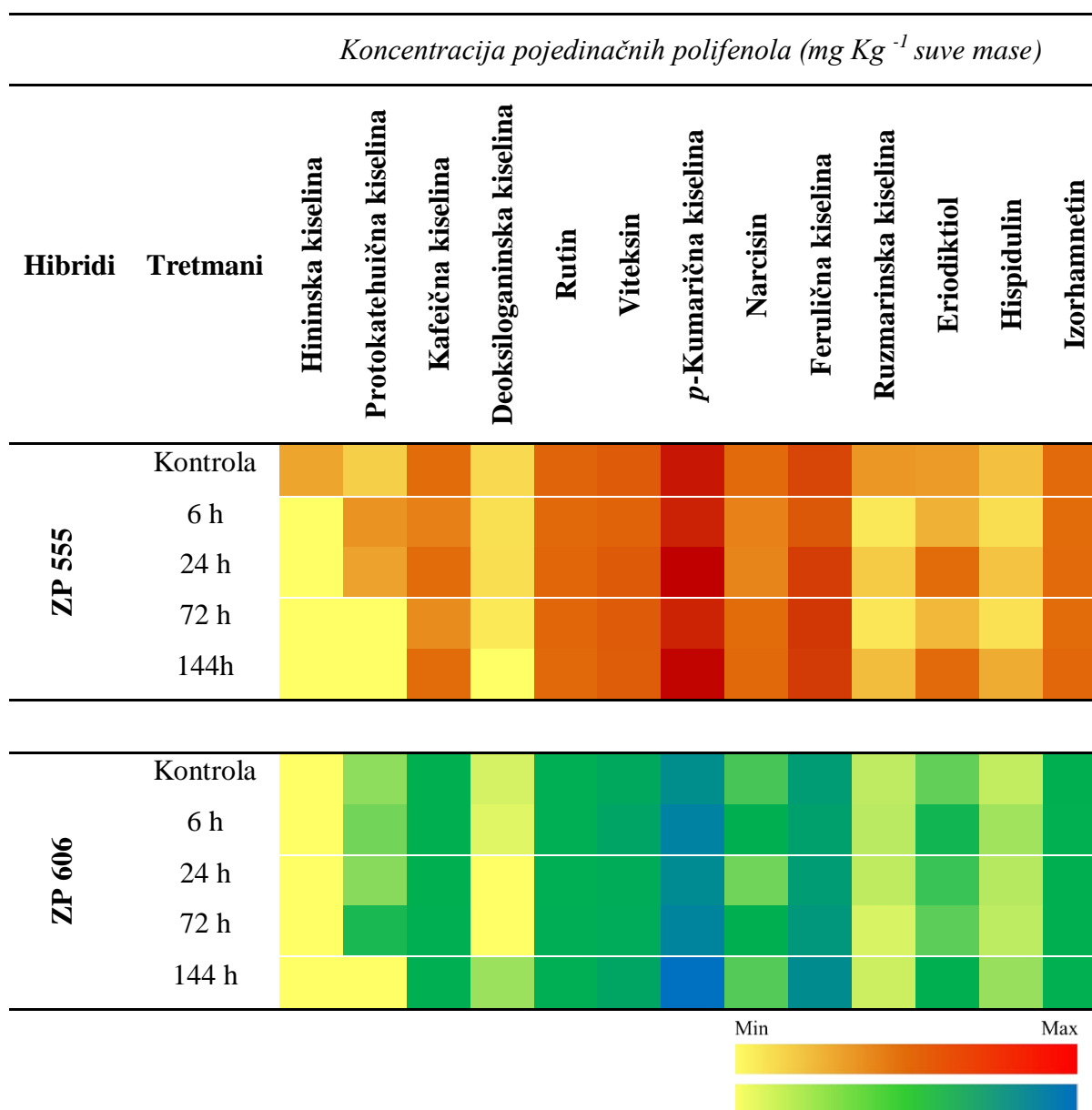
Protokatehnična kiselina je detektovana kod kontrolnih biljaka (ZP 555 i ZP 606), te je značajno povišena koncentracija ovog jedinjenja kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6 h, 24 h (ZP 555) te 72 h (samo kod hibrida ZP 606). Sa druge strane, detektovana je potpuna inhibicija sinteze protokatehnične kiseline kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 72 h (ZP 555) i 144 h (ZP 555 i ZP 606).

Kada su u pitanju flavonoidi, detektovane su slične koncentracije izorhamnetina, rutina, narcisina i viteksina kod kontrolnih i tretiranih biljaka ZP 555 i ZP 606. Flavonoidi imaju značajnu antioksidativnu ulogu, prvenstveno u sprečavanju lipidne peroksidacije (Liu i sar., 2011).

Među analiziranim jedinjenjima, najniže koncentracije zabeležene su u slučaju hininske i deoksiloganinske kiseline, kod oba hibrida. Naime, hininska kiselina je detektovana samo kod kontrolnih biljaka hibrida ZP 555, dok kod biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu nije detektovana. Sa druge strane kod hibrida ZP 606, hininska kiselina nije detektovana kod kontrolnih i kod biljaka izloženih vodnom suficitu.

Deoksiloganinska kiselina je detektovana u vrlo niskim koncentracijama kod kontrolnih biljaka (ZP 555 i ZP 606) i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu u trajanju od 6 h (ZP 555 i ZP 606), 24 h i 72h (ZP 555). Međutim, akumulacija deoksiloganinske kiseline je značajno indukovana nakon 144 h vodnog suficita kod hibrida ZP 606. Potpuno odsustvo ovog iridoidnog glukozida je zabeleženo nakon 144 h u uslovima vodnog suficita kod hibrida ZP 555 i nakon 24 h i 72 h kod hibrida ZP 606.

Tabela 5.5. Toplotna mapa jedinjenja zabeleženih u listovima dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) izloženih vodnom suficitu, dobijenih HPLC/DAD/(-)HESI-MS² metodom.



Korelacija između merenih parametara u uslovima vodnog suficita

Vrednosti za korelacione koeficijente između merenih parametara za oba hibrida (ZP 555 i ZP 606) su prikazane u Tabeli 5.6. Kada su u pitanju parametri oksidativnog stresa za hibrid ZP 555 su dobijene slabe negativne korelacije između koncentracije H₂O₂ i aktivnosti POX ($r=-0,270$), SOD ($r=-0,120$) i CAT ($r=-0,173$), te pozitivna korelacija sa ukupnom koncentracijom polifenola ($r=0,304$). Međutim, kod hibrida ZP 606 je detektovana jaka pozitivna korelacija između koncentracije H₂O₂ i aktivnosti SOD ($r=0,635$), te nešto slabija u odnosu na aktivnost CAT ($r=0,392$).

Kada je upitanju koncentracija MDA kod hibrida su dobijene različite vrednosti za korelacije. Kod hibrida ZP 555 za MDA su zabeležena jaka pozitivna korelacija sa aktivnošću SOD ($r=0,666$), slaba pozitivna korelacija sa koncentracijom polifenolima ($r=0,294$), a sa druge strane jaka negativna korelacija sa koncentracijom H₂O₂ ($r=-0,755$). Za razliku od hibrida ZP 555, kod hibrida ZP 606 je detektovana jaka negativna korelacija između MDA i aktivnosti CAT ($p=-0,947$), aktivnosti POX ($p=-0,887$) i koncentracije polifenola ($p=-0,825$), te slaba negativna korelacija sa koncentracijom H₂O₂ ($p=-0,292$).

Tabela 5.6. Korelacija između merenih parametara u uslovima vodnog suficita kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606).

	MDA		H ₂ O ₂		CAT		POX		SOD		Phe	
	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606
MDA	1	1										
H₂O₂	-0,755	-0,292	1	1								
CAT	0,082	-0,947	-0,173	0,392	1	1						
POX	-0,032	-0,887	-0,270	0,141	0,571	0,928	1	1				
SOD	0,666	0,318	-0,120	0,635	-0,196	-0,047	-0,683	-0,232	1	1		
Phe	0,294	-0,825	0,304	0,027	-0,553	0,842	-0,788	0,981	0,848	-0,339	1	1

Crvena - statistički značajna negativna korelacija; zelena – statistički značajna pozitivna korelacija ($p \leq 0,05$).

Kada su u pitanju korelacije između antioksidativnih enzima međusobno, detektovana je pozitivna korelacija između aktivnosti POX i CAT kod hibrida ZP 555 ($r=0,571$) te ZP 606 ($r=0,928$). Jaka negativna korelacija je detektovana između aktivnost POX i aktivnosti SOD kod hibrida ZP 555 ($r=-0,682$), te slabija negativna korelacija kod hibrida ZP 606 ($r=-0,232$). Kod hibrida ZP 555 detektovana jaka negativna korelacija ($r=-0,788$) između aktivnosti POX i koncentracije polifenola, a kod hibrida ZP 606 jaka pozitivna korelacija ($r=0,981$) između ova dva parametra.

5.2. Ispitivanje efekata vodnog deficita na dva hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606

Efekat stresa uzrokovanog vodnim deficitom ispitivan je kod dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606. Nakon 30 dana gajenja u kontrolisanim uslovima, formirana je eksperimentalna grupa biljaka, oba hibrida, koja je bila izložena potpunom vodnom deficit. Listovi biljaka iz kontrolne i eksperimentalne grupe izložene vodnom deficit su uzorkovani nakon 8 i 15 dana od početka tretmana. U uzorcima ispitivane su promene fizioloških parametara i parametara oksidativnog stresa i antioksidativnog sistema zaštite. Kako abiotički stresovi, uključujući i vodni deficit, dovode do promene u ekspresiji gena koji su odgovorni za povećanu sintezu osmolita i aktivnost antioksidativnih enzima kod tolerantnijih genotipova (Iqbal, 2018), poređene su promene datih parametara oba hibrida da bi se iz interhibridnih razlika mogli doneti zaključci o tolerantnijem hibridu kada je upitanju vodni deficit.

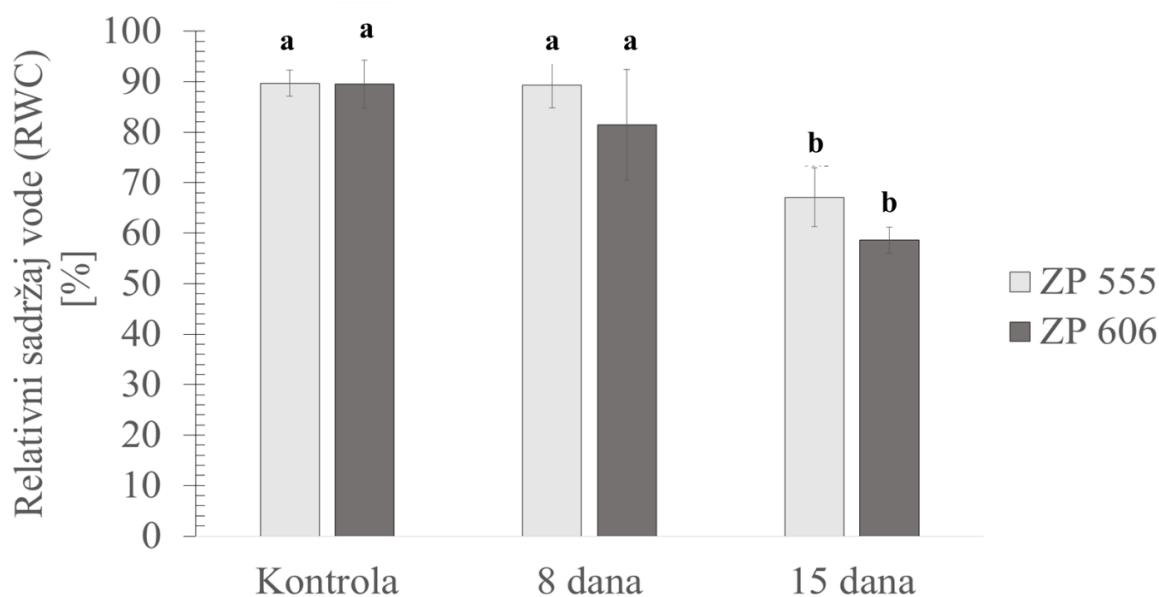
5.2.1. Fiziološki parametri

a) *Relativni sadržaj vode (RWC)*

U uslovima nedostatka vode, fizičke ili fiziološke, narušava se ravnoteža između usvajanja i odavanja vode, i kao posledica toga dolazi do promene sadržaja vode u biljkama. Zbog toga prvi pokazatelj uticaja vodnog deficita jeste smanjenje relativnog sadržaja vode (RWC) u listovima. Rezultati merenja RWC u kontrolnim i biljkama izloženim vodnom deficitu 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606, prikazani su na Slika 5.9. Kod oba hibrida kukuruza je nakon prvih 8 dana vodnog deficita izmereno blago smanjenje RWC u listovima biljaka u poređenju sa biljkama koje su rasle u kontrolnim uslovima. Međutim, statistički značajan pad RWC u listova biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu zabeležene su nakon 15 dana vodnog deficita, gde je zabeležen gubitak od -25% ($p=0,03$) kod hibrida ZP 555 te -35% ($p=0,01$) kod biljaka hibrida ZP 606 u odnosu na kontrolu (Slika 5.9).

Smanjenje RWC pri vodnom deficitu se smatra mehanizmom koji je svojstven biljkama koje izbegavaju vodni deficit (engl. *drought escape*) i imaju sposobnost da završe svoj životni ciklus pre vodnog deficita, pre nego biljake koje su tolerantne na vodni deficit (Persons i Howe, 1984; Grashoff i Ververke, 1991). Biljke ovog tipa imaju veoma dobru plastičnost, rastu vrlo ograničeno tokom perioda vodnog deficita, produkujući veoma malo cvetova i semena, ali tokom vlažnog perioda rastu veoma brzo i produkuju veliki broj semena. Što se tiče kukuruza, generalno na vodni deficit netolerantni genotipovi imaju izraženije smanjenje RWC tokom vodnog deficita od tolerantnijih genotipova. Tako, smanjenje RWC za oko 30% kod osetljivih kultivara kukuruza detektovali su autori Moussa i Abdel-Aziz (2008). Takođe, tolerantni genotipovi kukuruza (genotipovi: Tx205, C2A554-4 i B76) su održali viši nivo RWC (smanjenje RWC je bilo oko 15% u odnosu na kontrolu) kada su bili izloženi vodnom deficitu u odnosu na osetljive genotipove (genotipovi: B73 i C273A) (smanjenje RWC oko 35%), koji su pokazali redukciju RWC već pri prvim fazama vodnog deficita (Chen i sar., 2012). Osim toga, smanjenje RWC je zabeleženo i kod osetljivih genotipova *Oryza sativa* (17-85%), starosti 10 dana, pri izlaganju vodnom deficitu u trajanju od 24h, 48h i 72h dok je kod je kod tolerantnog genotipa zabeleženo smanjenje od 15-19% (Pyngrope i sar., 2013).

U našem radu, uočene su i interhibridne razlike u smislu manjeg RWC kod hibrida ZP 606 (-35%) u odnosu na hibrid ZP 555 (-25%) nakon 15 dana tretmana, ali pomenute razlike nisu bile statistički značajne. Razlike u procentu RWC kod dva hibrida kukuruza, a prema literaturnim podacima, ukazuju da bi se hibrid ZP 606 mogao označiti kao osetljiviji, a hibrid ZP 555 tolerantniji za trajanje vodnog deficita od 15 dana.



Slika 5.9. Relativni sadržaj vode (RWC) izmeren hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi) u kontroli i u biljkama koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana. Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima.

Koncentracija fotosintetičkih pigmenata

Vodni deficit dovodi do redukcije fotosinteze usled smanjenja površine lista, zatvaranja stoma ili nekih drugih metaboličkih prepreka (Al-Tawaha i sar., 2017). Nastavljanje svetle faze fotosinteze i tokom vodnog deficita, pri limitiranoj koncentraciji CO₂, kao rezultat ima redukciju fotosintetičkog elektron-transportnog lanca, a koji za posledicu ima redukciju molekularnog kiseonika i produkuju ROS. Sa druge strane, ROS dovodi do velikih oštećenja na fotosintetičkom aparatu (Lawlor i Cornic, 2002; Al-Tawaha i sar., 2017). Uticaja vodnog deficita na proces fotosinteze je vrlo često praćen smanjenjem koncentracije ključnih fotosintetičkih pigmenata, nastalog usled redukcije asimilacije CO₂ (Gill i Tuteja, 2010; Zlatev i Lidon, 2012; Ashraf i Harris, 2013; Moharramnejad i sar., 2019). Stres izazvan vodnim deficitom u našem radu, doveo je do promena u koncentraciji ispitivanih fotosintetičkih pigmenata kod oba ispitivana hibrida kukuruza. Merene su koncentracije Chl *a* i *b*, kao i Car. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.6.

a) Koncentracija hlorofila

Vodni deficit je izazvao veće promene u koncentraciji fotosintetičkih pigmenata u odnosu na vodni suficit. Promene koncentracije Chl izazvane vodnim deficitom su detektovane kod oba hibrida kukuruza i prikazane su u Tabela 5.7. Naime hibridi su imali isti odgovor na vodni deficit kada je u pitanju koncentracija Chl *a* pa je tako zabeleženo značajno smanjenje koncentracije Chl *a* kod oba ispitivana hibrida kukuruza nakon 8 dana (-29% kod ZP 555 (p=0,03) i -27% kod hibrida ZP 606 (p=0,03) i 15 dana (-22% (p=0,04) kod hibrida ZP 555 i -27% (p=0,03) kod hibrida ZP 606) trajanja vodnog deficita (Tabela 5.7). Smanjenje koncentracije hlorofila, detektovano u uslovima različitih vrsta abiotičkog stresa, je posledica inhibicije sinteze ili ubrzane razgradnje hlorofila (Poljakoff-Mayber, 1981; Smirnoff i Colombe, 1988). S druge strane, kod tolerantnih vrsta formiraju se jače molekulske veze između hlorofila i lipid-protein kompleksa membrane hloroplasta, i na taj način se hlorofil učini otpornijim (Poljakoff-Mayber, 1981; Smirnoff i Colombe, 1988). Rajasekar i sar. (2016) su u svom radu pokazali da dolazi do smanjenja koncentracije Chl *a* i koncentracija ukupnog Chl kod biljaka kukuruza izloženih vodnom deficitu u trajanju od četiri dana. Autori su takođe pokazali i da dolazi i do smanjenja koncentracije Chl *b* u uslovima izloženosti biljaka kukuruza vodnom deficitu. Međutim, stres izazvan vodnim suficitom u našem radu je indukovao povećanje koncentracije Chl *b* kod hibrida ZP 555 i ZP 606. Naime, povećanje koncentracije Chl *b* za +30% (p=0,03) izmereno je nakon 8 dana vodnog deficita kod oba hibrida kukuruza

u poređenju sa kontrolnim biljkama. Sa produženjem trajanja vodnog deficita u eksperimentalnim biljkama izmereno je povećanje koncentracije Chl *b* od +28% ($p=0,02$) kod ZP 555, i +31% ($p=0,03$) kod hibrida ZP 606 u odnosu na kontrolne biljke. Razlog za razlike u dobijenim rezultatima u našem radu, mogu biti različiti genetički varijeteti kukuruza kao i dužina trajanja vodnog deficita u odnosu na one opisane u radu Rajasekar i sar. (2016).

Kukuruz se smatra žitaricom koja ima veću otpornost na stres izazvan vodnim deficitom, a sa druge strane veliku osetljivost na stres izazvan vodnim suficitom (Kono i sar., 1987; Iijima i sar., 1991; Grzesiak i sar., 2014). Vodni deficit može indukovati povećanje intenziteta fotosinteze kod tolerantnih genotipova u odnosu na senzitivne genopove kukuruza (Moussa i Abdel-Aziz, 2008). Tako, veća koncentracija hlorofila je izmerena kod genotipova kukuruza koji su tolerantni na vodni deficit u odnosu na genotipove koji su osetljivi na ovaj stres (Khayatnezhad i sar., 2011). Osim toga, Zaefzadeh i Goliov (2009) su pokazali da tolerantni genotipovi biljaka generalno imaju veće koncentracije hlorofila pri vodnom deficitu. Osim koncentracije Chl *a* i Chl *b* i promena njihovog odnosa može ukazati na nivo stresa (Tabela 5.7). Usled smanjenja koncentracije Chl *a* i povećanja koncentracije Chl *b* nisu detektovane promene u odnosu Chl *a* i *b* ni kod jednog hibrida.

Kada je u pitanju interhibridna razlika u toku vodnog deficita, možemo reći da oba hibrida su pokazala isti odgovor, tj. smanjenje koncentracije Chl *a* i povećanje Chl *b* u odnosu na kontrolu, time ne menjajući ukupan sadržaj hlorofila. Iako je zabeležen trend smanjenja odnosa Chl *a/b* kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju i 8 i 15 dana kod oba hibrida kukuruza u odnosu na kontrole, ove promene su bile bez statističke značajnosti.

b) Koncentracija karotenoida

Kao jedni od hloroplastnih antioksidanasa, Car, ne učestvuju u direktnoj eliminaciji superoksida, vodonik peroksida, ali imaju značajnu ulogu u balansiranju produkcije i u uklanjanja slobodnih radikala tokom fotosinteze. Car, kao što su lutein i zeaksantin su efikasni tilakoidni antioksidansi lokalizovani u blizini FS I i FS II (Foyer, 2018). Upravo zbog toga, promena koncentracije Car u uslovima vodnog deficita i u kontrolnim uslovima dva hibrida kukuruza ZP 606 i ZP 555 je veoma bitan parametar, a rezultati su prikazani u Tabela 5.7.

Stres izazvan vodnim deficitom indukovao je smanjenje koncentracije Car kod oba hibrida. Nakon 8. dan vodnog deficita zabeleženo je smanjenje od -75% ($p=0,03$) kod ZP 555, odnosno -67% ($p=0,04$) kod ZP 606 hibrida. Iako je nakon 15 dana vodnog deficita zabeležen blagi porast koncentracije Car kod oba hibrida u odnosu na 8. dan vodnog deficita, kod ZP 555 (+60%) i kod ZP 606 (+25%), koncentracija je i dalje bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolne biljke. U suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu, autori Rahman i sar. (2004) su izmerili povećanje koncentracije Car pri izlaganju dva kultivara kukuruza vodnom deficitu. Sa druge strane, smanjenje koncentracije Car izmerena je kod biljaka kukuruza izloženih vodnom deficitu u trajanju od četiri dana u radu Rajasekar i sar. (2016).

U našem radu nije zabeležena statistički značajna interhibrida razlika kada je u pitanju koncentracija Car osim između kontrola ispitivanih hibrida. Vodni deficit je indukovao smanjenje koncentracije Car kod oba hibrida čineći ih osetljivim na ovaj tip stresa kada je ovaj parametar u pitanju.

Tabela 5.7. Koncentracija fotosintetičkih pigmenata (Hlorofila *a* (Chl *a*) i *b* (Chl *b*) i karotenoida (*Car*)) određena spektrofotometrijski u kontrolnim uzorcima hibrida kukuruza ZP 555 i uzorcima izloženim 8 i 15 dana vodnom deficitu.

Fotosintetički pigmenti		Eksperimentalne grupe			
		Kontrola	8 dana	15 dana	
ZP 555	Chl <i>a</i>	[mg g ⁻¹ FW]	0,83±0,070 ^{a*}	0,59±0,045 ^b	0,65±0,031 ^b
	Chl <i>b</i>	[mg g ⁻¹ FW]	0,33±0,023 ^b	0,47±0,041 ^a	0,46±0,030 ^a
	Chl <i>a/b</i>		2,50±0,037 ^a	1,25±0,012 ^a	1,406±0,024 ^a
	Car	[mg g ⁻¹ FW]	0,08±0,011 ^{a*}	0,02±0,001 ^b	0,05±0,009 ^b
ZP 606	Chl <i>a</i>	[mg g ⁻¹ FW]	0,88±0,064 ^{a*}	0,64±0,025 ^b	0,65±0,032 ^b
	Chl <i>b</i>	[mg g ⁻¹ FW]	0,35±0,064 ^b	0,50±0,025 ^a	0,51±0,032 ^a
	Chl <i>a/b</i>		2,53±0,165 ^a	1,28±0,174 ^a	1,35±0,006 ^a
	Car	[mg g ⁻¹ FW]	0,09±0,011 ^{a*}	0,03±0,031 ^b	0,04±0,001 ^b

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (standardna devijacija).

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Koncentracija ukupnih proteina

Suprotno stimulisanoj sintezi solubilnih proteina kod testiranih hibrida kukuruza koja je pokazana kao odgovor na vodni suficit izmereno je smanjenje koncentracije solubilnih proteina pri vodnom deficitu kod oba ispitivana hibrida kukuruza nakon vodnog deficita u poređenju sa kontrolom (Tabela 5.8).

Nakon 8. dana vodnog deficita izmereno je smanjenje koncentracije solubilnih proteina za -22% ($p=0,01$) kod hibrida ZP 555 i -24% ($p=0,01$) kod hibrida ZP 606. Sa prolongiranim izlaganjem vodnom deficitu u trajanju od 15 dana izmereno je dodatno smanjenje koncentracija solubilnih proteina za -15% ($p=0,001$) kod hibrida ZP 555, odnosno -2% ($p=0,01$) kod hibrida ZP 606 (Tabela 5.8). Smanjenje koncentracije proteina izmerena je i u radu Rajasekar i sar. (2016) kod biljaka kukuruza izloženih vodnom deficitu u trajanju od četiri dana, što ne doprinosi adaptivnoj plastičnosti biljaka. Značajno smanjenje koncentracije solubilnih proteina izmereno je u korenu i listovima 36 dana starih sadnica pirinča koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 10 dana (Sharma i Dubey, 2005). Takođe, smanjenje koncentracije solubilnih proteina može nastati kao posledica inhibicije sinteze proteina neophodnih za odvijanje fotosinteze, koja je tokom vodnog deficita takođe inhibirana. Kod tolerantnih genotipova dolazi do sinteze proteina stresa, kao što su LEA i dehidrini (Mohammadkhani i Heidari, 2008).

Između hibrida nisu izmerene značajne razlike u koncentraciji proteina kao odgovor na vodni deficit, a hibridi bi se mogli obeležiti kao osetljivi na vodni deficit zbog smanjenja koncentracije proteina pri izlaganju vodnom deficitu.

Tabela 5.8. Koncentracija ukupnih proteina izmerena u kontrolnim uzorcima dva hibrida kukuruza (ZP 606 i ZP 555) i uzorcima izloženim 8 i 15 dana vodnom deficitu.

Proteini	Ekperimentalne grupe		
	Kontrola	8 dana	15 dana
ZP 555 [mg g ⁻¹ FW]	6,11±0,223 ^a	4,76±0,207 ^b	3,82±0,045 ^b
ZP 606 [mg g ⁻¹ FW]	6,26±0,033 ^a	4,77±0,324 ^b	4,64±0,950 ^b

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (standardna devijacija).

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima, a statistički značajne razlike između hibrida su predstavljene zvezdicama ($p < 0,05$). Uzorci bez zvezdica nisu bili statistički značajni.

Koncentracija prolina

Pri stresnim uslovima, kao što je vodni deficit, dolazi do značajne akumulacije prolina, čime se smanjuje oštećenje ćelija tokom ovog tipa abiotičkog stresa. Prolin kao osmolit ima vrlo značajne uloge u održavanju funkcionisanja ćelije kroz održanje stabilne strukture proteina, ćelijske membrane, fotosintetskih komponenti (Banu i sar., 2009), ali takođe ima značajnu ulogu u eliminaciji singlet kiseonika (Alia i Maysik, 2001) i hidroksil radikala (Smirnoff i Cumbes, 1989) što ga čini i neenzimskim antioksidansom.

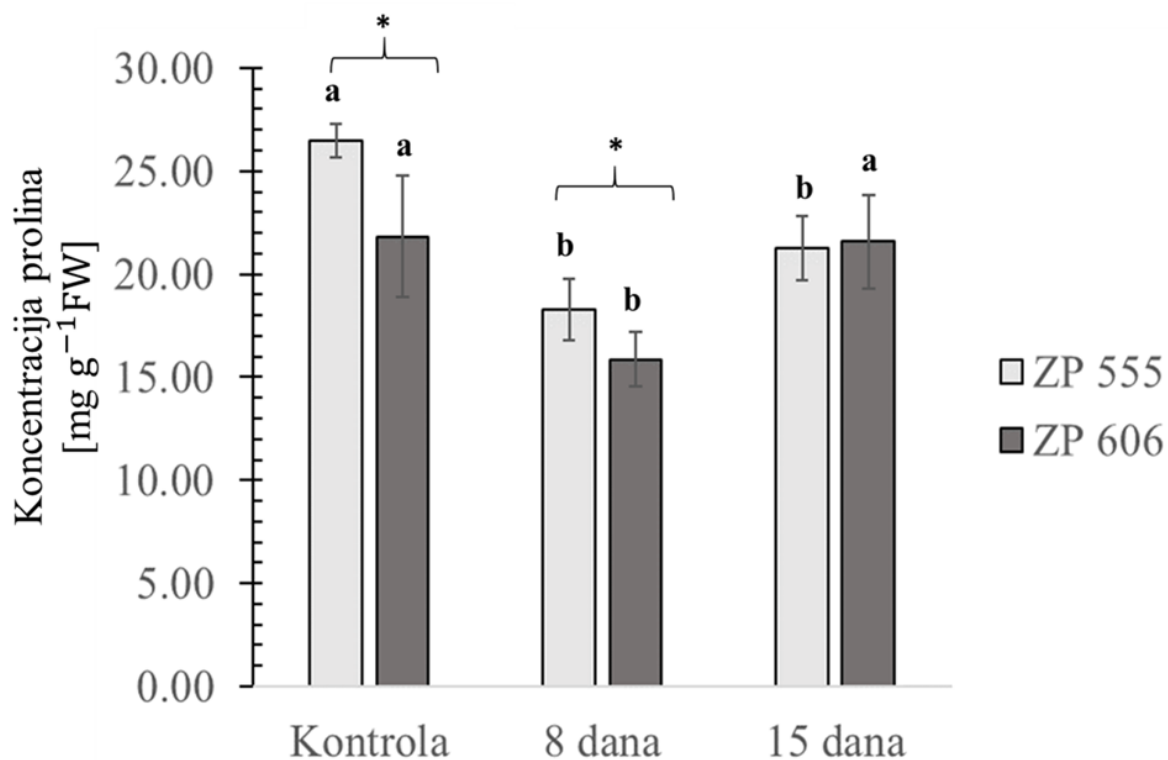
U listovima dva ispitivana genotipa kukuruza, u našem radu, nije detektovana akumulacija prolina u uslovima vodnog deficita. Naime, stres izazvan vodnim deficitom je indukovao smanjenje koncentracije prolina kod ZP 555 hibrida nakon 8 dana za -31% ($p=0,03$) i 15 dana za -20% ($p=0,04$) trajanja vodnog deficita. Sličan odgovor na vodni deficit je zabeležen i kod hibrida ZP 606. Značajno smanjenje koncentracije prolina od -27% ($p=0,05$) je izmereno kod hibrida ZP 606 nakon 8 dana od primenjenog stresa u poređenju sa kontrolnim biljkama. Liu i sar. (2011) su pokazali smanjenje koncentracije prolina sa produženim izlaganjem vodnom deficitu (100 dana), usled metaboličkih oštećenja kod četiri vrste drveća: *Roussonetia papyrifera*, *Cinnamomum bodinieri*, *Platycarya longipes* i *Pteroceltis tatarinowii*.

Sa druge strane, nakon 15 dana kod ZP 606 koncentracija prolina se značajno povećala u poređenju sa biljkama koje su bile izložene stresu u trajanju od 8 dana (+26%, $p=0,05$) i dostigla nivo kontrole. Vodni deficit indukuje povećanje koncentracije prolina u znatno većoj meri u odnosu na druge aminokiseline kod kukuruza, pa se tako vrlo često uzima kao evaluacioni parametar za selekciju varijeteta koji su otporni na vodni deficit (Song i sar., 2011). Tako, biljke kod kojih je zabeležene veća koncentracija prolina se smatraju tolerantnijima na stres izazvan vodnim deficitom (Song i sar., 2011). Akumulacija prolina je svojstvena genotipovima biljaka koje su otpornije na vodni deficit pri čemu je uloga prolina zaštita ćelijske strukture. U suštini, pri smanjenju količine vode u ćeliji značaj prolina kao i ostalim osmoprotektanata je u vezivanju vode čime se održavaju hidrofilne interakcije u ćeliji i stabilizacija ćelijske strukture.

Ako se uzme u obzir da koncentracija prolina predstavlja osnovnu strategiju pri zaštiti biljaka od ovog tipa stresa (Chen i sar., 2007) i da se ovaj parametar uzima kao jako važan za određivanje tolerantnih odnosno osetljivih genotipova na vodni deficit, pri čemu se treba uzeti u obzir dužina trajanja stresa te starost biljaka, može se zaključiti da bi se, u odnosu na ovaj parametar, oba testirana hibrida mogla okarakterisati kao osetljivi na stres izazvan vodnim

deficitom. Jabeen i sar. (2008) su pokazali da izlaganje 12 dana starih genotipova kukuruza vodnom deficitu u trajanju od 15 dana dovodi do povećanja koncentracije prolina. Takođe, izmerena je veća akumulacija prolina kod genotipa kukuruza koji je tolerantan na vodni deficit u odnosu na genotip koji je osetljiv na ovaj tip stresa, kod 15 dana starih biljaka izloženih 15 dana vodnom deficitu (Oregon i sar., 1993). Tolerancija na vodni deficit je u pozitivnoj korelaciji sa akumulacijom prolina kod mnogih vrsta žitarica kao što su ječam (Nayyar i Walia, 2003), riže (Hsu i sar., 2003), kukuruz (Efeoğlu i sar., 2009), *Brassica juncea* (Madan i sar., 1995).

Veća koncentracije prolina izmerena je kod ZP 555 hibrida i kod kontrolnih uzoraka i kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu od 8 dana u odnosu na hibrid ZP 606. Što se tiče odgovora na vodni deficit može se reći da su generalno hibridi imali isti trend odgovora na vodni deficit kada je u pitanju koncentracija prolina. Međutim, sličan trend koncentracije prolina kod dva hibrida kukuruza, a uzimajući u obzir prethodno pomenute literaturne podatke, u smislu značaja akumulacije prolina i otpornosti na vodni deficit, možemo reći da su oba hibrida podjednako osetljiva na vodni deficit.



Slika 5.10. Koncentracija prolina izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

5.2.2. Parametri oksidativnog stresa

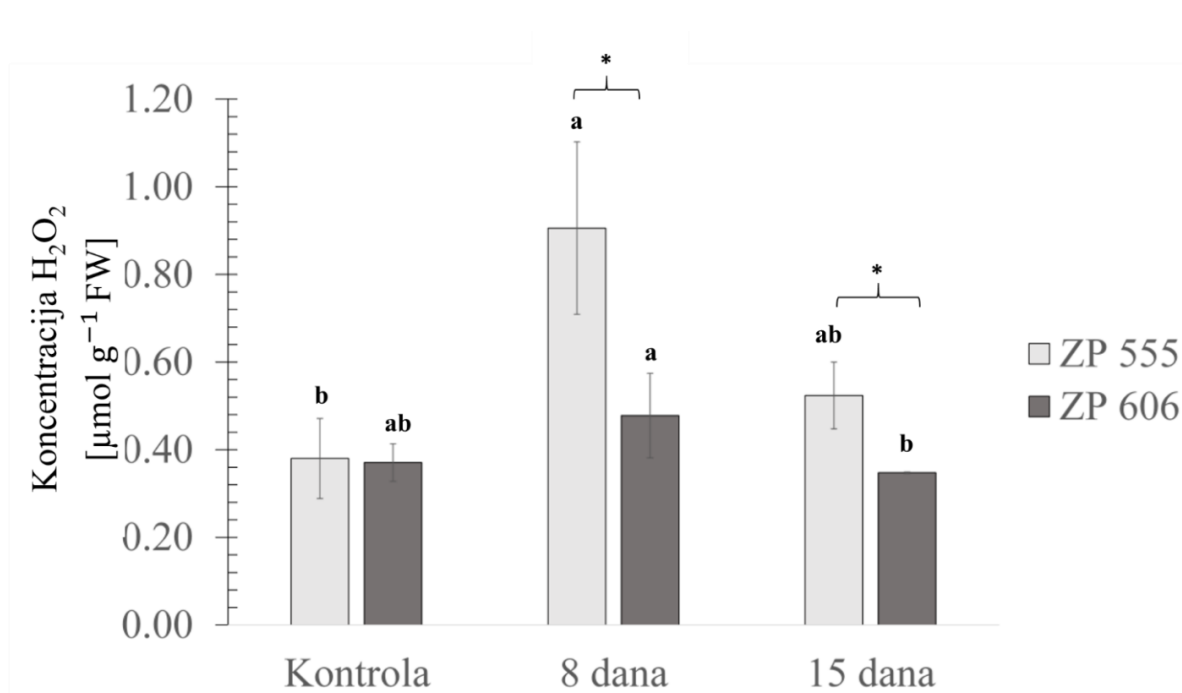
a) *Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2)*

Osim promene u metabolizmu proteina, tokom vodnog deficita dolazi i do značajnih promena u metabolizmu kiseonika i nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Koncentracija H_2O_2 kod oba ispitivana hibrida kukuruza je prikazana na Slika 5.11. Naši rezultati pokazuju da vodni deficit rezultuje povećanim generisanjem H_2O_2 kod hibrida ZP 555.

U listovima hibrida ZP 555 je izmereno značajno povećane koncentraciju H_2O_2 (+58%, $p=0,03$) kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu 8 dana u poređenju sa kontrolnim biljkama. Nakon 15 dana vodnog deficita nivo H_2O_2 je značajno smanjen u odnosu na 8. dan tretmana (-42%, $p=0,05$), iako veći (+28%) bio je bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu.

Sve promene kod hibrida ZP 606 bile su bez statističke značajnosti. U odgovoru na vodni deficit u trajanju od 8 dana izmereno je blago povećanje koncentracija H_2O_2 za +22% u poređenju sa kontrolnim biljkama. S prolongiranim trajanjem vodnog deficita (15. dana vodnog deficita) nivo H_2O_2 je bio značajno manji u odnosu na tretman od 8. dana (-27%, $p=0,04$), ali u odnosu na kontrolu ZP 606 je bio neznatno smanjen, za oko -7%. U literaturi je pokazano da tolerantni genotipovi pšenice, starosti 34 dana, u uslovima vodnog deficita u trajanju od 42 i 72 dana pokazuju manju koncentraciju H_2O_2 i bolju adaptiranost na vodni deficit u odnosu na osetljive genotipove (Khanna-Chopra i Selote, 2007). Osim toga Selote i Khanna-Chopra (2004) su pokazali sličan odgovor tolerantnih genotipova riže na vodni deficit, gde je kod tolerantnog genotipa izmerena značajno manja koncentracija H_2O_2 i veća aktivnost antioksidativnih enzima te značajno veći prinos u odnosu na genotip riže koji je bio osetljiv na vodni deficit. Kao parametri za definisanje tolerantih genotipova uzima se smanjenje parametara oksidativnog stresa i povećanje antioksidativnih sistema zaštite (Khanna-Chopra i Selote, 2007).

Naši rezultati su pokazali značajnu interhibridnu razliku u pogledu koncentraciji H_2O_2 pri izlaganju vodnom deficit. Izmerena je znatno veća koncentracija vodonik peroksida kod hibrida ZP 555 u odnosu na hibrid ZP 606 tokom vodnog deficita što može ukazati da je hibrid ZP 555 osetljiviji na ovaj tip stresa, u odnosu na hibrid ZP 606.



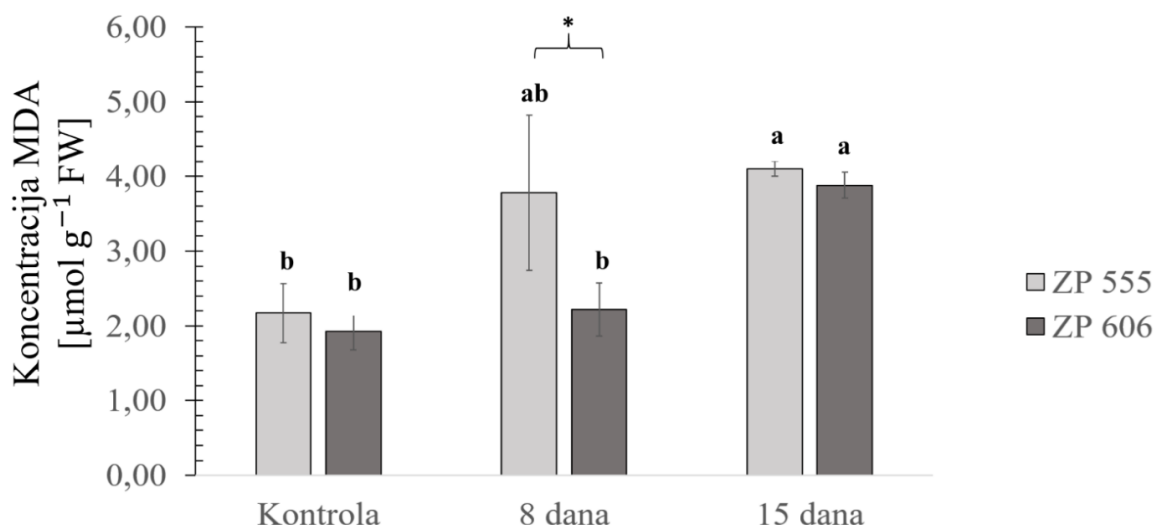
Slika 5.11. Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t -testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

b) Koncentracija malonildialdehida (MDA)

Pri vodnom deficitu, u našem radu, kod oba ispitivana hibrida kukuruza, izmereno je povećanje koncentracije MDA (Slika 5.12). Rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da generalno pri stresnim uslovima, koncentracija MDA u listovima i korenu biljaka raste sa dužinom izlaganja stresu (Guo i sar., 2018a).

Blago povećanje koncentracije MDA izmereno je kod oba ispitivana hibrida kukuruza nakon 8 dana vodnog deficita, ali bez statističke značajnosti. Sa prolongiranjem sušnog perioda za 7 dana (ukupno 15 dana vodnog deficita) izmereno je značajno povećanje koncentracije kod oba hibrida kukuruza, ZP 555 (+47%, $p=0,05$) i ZP 606 (+51%, $p=0,008$). Kod hibrida ZP 606 se uočava značajna razlika između 8. i 15. dana vodnog deficita, gde je povećanje koncentracije MDA kod biljaka koje su u uslovima vodnog deficita provele 15 dana bilo za +44% ($p=0,05$) veće u odnosu na biljke koje su u vodnom deficitu provele 8 dana. Upravo nakon 8. dana vodnog deficita se uočava značajna interhibridna razlika. Chugh i sar. (2013) su izmerili veće koncentracije MDA kod osetljivih genotipova (genotipovi: Trihibrid 321 i Paras) kukuruza u poređenju sa tolerantnim genotipovima (genotipovi: Griza 2 i Parkach), ispitujući uticaj vodnog deficita u trajanju od dve godine u listovima kukuruza od 0 do 42 dana svilanja (R1 germinativna faza razvoja kukuruza). Xin i sar. (2011) su izmerili povećanje koncentracije MDA pri dugom izlaganju vodnom deficitu (25, 38, 65, i 95. dana) i kod osetljivih (genotip Shaandan 911) i kod tolerantnih (genotip Shaandan 9) genotipa kukuruza kada su biljke bile u stadijumu od tri lista. Osim toga, Türkan i sar. (2005) su zabeležili značajno više vrednosti MDA i povećan nivo lipidne peroksidacije kod biljaka pasulja, starosti 35 dana, izloženih vodnom deficitu u trajanju od 7 i 15 dana, što je u skladu sa našim rezultatima. Autori takođe navode kako se intenzitet lipidne peroksidacije povećavao sa prolongiranjem stresa.

Oba ispitivana hibrida kukuruza su pokazala sličan odgovor na stres izazvan vodnim deficitom kada je upitanju koncentracija MDA. Povećanje lipidne peroksidacije detektovano je u uslovima vodnog deficita kod oba hibrida, čineći ih tako osetljivim na ovaj stres.



Slika 5.12. Koncentracija malonildialdehida (MDA) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafikonu su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t -testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

5.2.3. Antioksidativni sistem zaštite

Veliki broj studija je pokazao pozitivnu korelaciju između povećanja aktivnosti i koncentracije antioksidanasa i otpornosti na stres izazvan vodnim deficitom (Ashraf, 2010; Valizadeh i sar., 2013; Moharramnejad i sar., 2016; 2019). Upravo zbog toga je praćen odgovor dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) na uslove vodnog deficita, i to kroz promene u enzimskim (aktivnost SOD, CAT, APX i POX) i neenzimskim (polifenoli) komponentama antioksidativnog sistema zaštite. Rezultati su prikazani na Slikama 5.13-5.18, kao i u Tabeli 5.8.

Antioksidativni enzimi

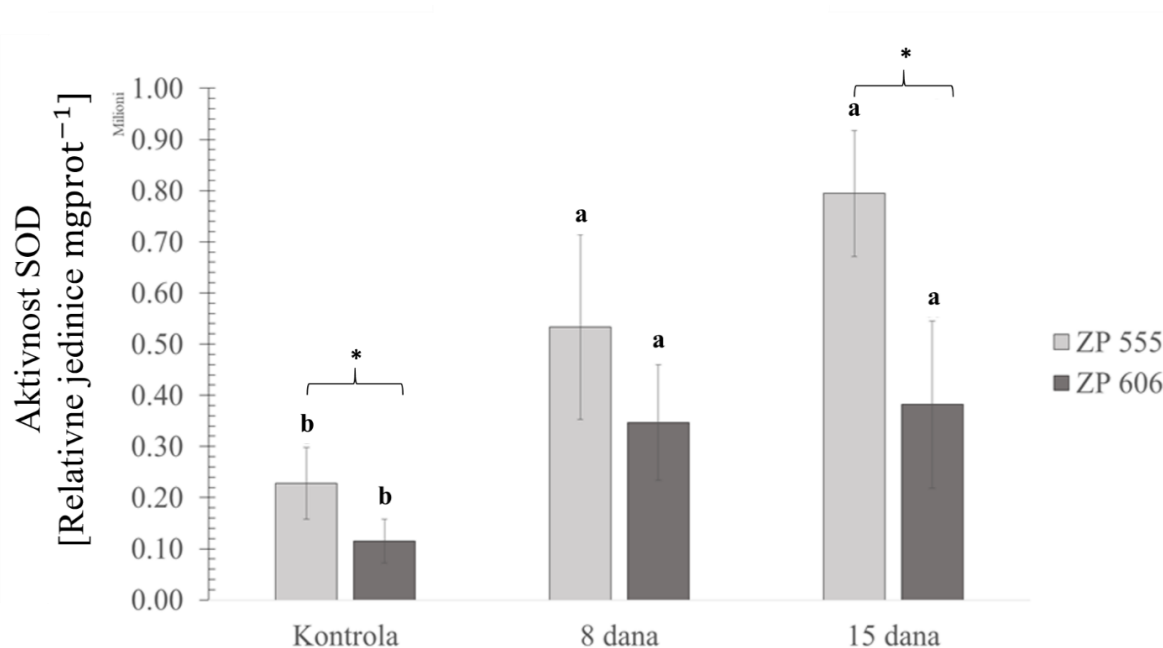
a) Aktivnost superoksida dismutaze (SOD)

Superoxid dismutaza je sveprisutan enzim u biljnim ćelijama sa glavnom funkcijom u eliminaciji superoksid anjon radikala. Kao enzim prve linije odbrane od ROS, SOD učestvuje u skoro svim fiziološkim i biohemijskim reakcijama, omogućavajući biljci bolji adaptivni odgovor na abiotičke stresore (Song i sar., 2009). Upravo iz tog razloga veća aktivnost ovog enzima obezbeđuje tolerantnost biljaka na stres izazvan vodnim deficitom (Guo i sar., 2018b).

Vodni deficit je i u našem eksperimentu indukovao značajne promene u aktivnosti SOD kod oba ispitivana hibrida kukuruza. Kod ispitivanih hibrida kukuruza u uslovima vodnog deficita 8. dana vodnog deficita izmereno je povećanje aktivnost SOD za +57% (0,05) kod hibrida ZP 555 i +67% ($p=0,02$) kod hibrida ZP 606, u odnosu na kontrolne biljke. Nakon 15 dana vodnog deficita kod biljaka je izmereno dodatno povećanje aktivnosti SOD od + 71% ($p=0,01$) kod hibrida ZP 555 i +70% ($p=0,01$) kod hibrida ZP 606 u odnosu na kontrolne biljke. Povećana aktivnost SOD u uslovima vodnog deficita je do sada detektovana kod različitih biljnih vrsta: *Phaseolus vulgaris* (Zlatev i sar., 2006), *Alternanthera philoxeroides* (Wang i sar., 2008), *Oryza sativa* (Sharma i Dubey, 2005b; Wang sar., 2005), *Euphorbia esula* (Davis i Swanson, 2001), *Cassia angustifolia* (Agarwal i Pandey, 2003), *Triticum aestivum* (Singh i Usha, 2003; Chakraborty i Pradhan, 2012) i *Hordeum vulgare* (Salekjalali i sar., 2012).

Iako su promene aktivnosti SOD kod oba hibrida kukuruza u našem radu imale isti trend u uslovima vodnog deficita, značajno veća aktivnost SOD je izmerena kod hibrida ZP 555 u odnosu na ZP 606, s tim što je samo za tretman od 8. dana povećanje bilo bez statističke značajnosti (Slika 5.13). U radu Wang sar. (2012) kad su dve vrste jabuka, jedna tolerantna (*Malus prunifolia*) i druga osetljiva (*Malus huehensis*), bile izložene vodnom deficitu u trajanju

od 12 dana, rezultati su pokazali smanjenu akumulaciju MDA i H_2O_2 , kao i povećanu aktivnost SOD, POX, APX i GR kod *M. pruniflora*, koja je okarakterisana kao tolerantna vrsta. Takođe, izmerena je značajno veća aktivnost SOD kod otpornog genotipa kukuruza (genotip Giza 2), starosti 21 dan, u odnosu na osetljivi genotip (genotip Trihibrid 321) pri izlaganju vodnom deficitu u trajanju od tri sedmice (Moussa i Abdel, 2008). Isti rezultati, povećanje SOD aktivnosti kod tolerantnog genotipa su dobijeni i pri izlaganju četiri sedmice starih sadnica *Sesamum indicum* vodnom deficitu u trajanju od četiri sedmice (Fazeli i sar., 2007).

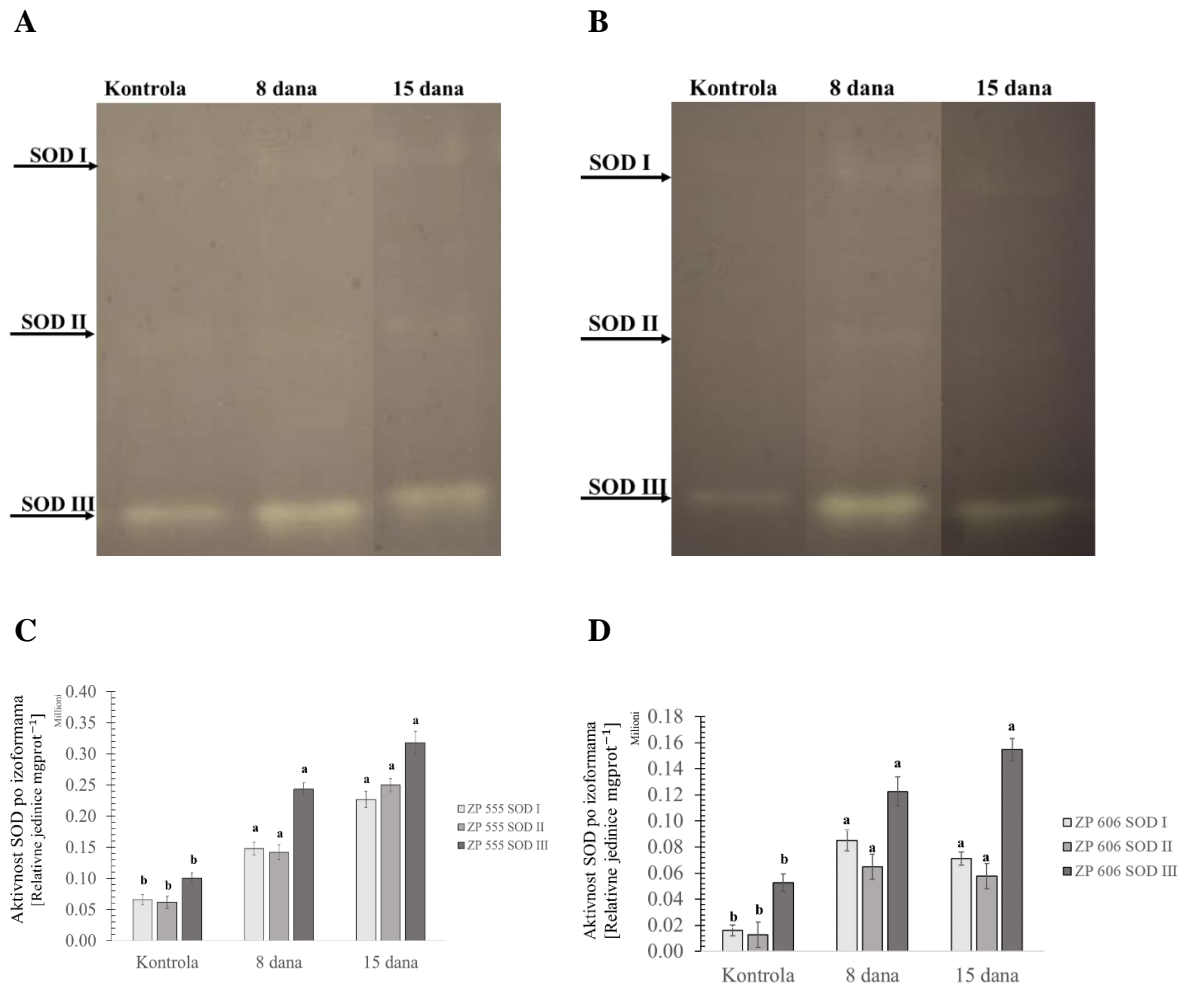


Slika 5.13. Aktivnost superoksid dismutaza (SOD) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Kada su u pitanju SOD izoenzimski profili dobijen je različit broj izoformi u uzorcima listova kukuruza izloženih uslovima vodnog deficita i onih izloženih uslovima vodnog suficita. Razlog dobijenim razlikama između profila može biti u razlici u aktivnosti SOD izoformi uzorkovanih u različitim periodima godine.⁶ Nativnom PAGE dobijenu su izoenzimski profili SOD (Slika 5.14) na kojima su detektovane tri SOD izoforme, obeležene kao SOD I ($R_f=0,463$), SOD II ($R_f=0,670$) i SOD III ($R_f=0,879$), kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu. Vodni deficit nije uticao na promene izoenzimskih profila SOD, ali jeste na njihovu aktivnost. Najveći doprinos u ukupnoj SOD aktivnosti imala je izoforma SOD III, a sa produžetkom trajanja vodnog deficita povećavala se aktivnost obe detektovane SOD izoforme. Slični rezultati su dobijeni u radu Moharramejad i sar. (2016) pri izlaganju mladih sadnica kukuruza vodnom deficitu u trajanju od 5 dana. U navedenom radu su detektovane tri SOD izoforme, pri čemu je kod tolerantnog genotipa kukuruza koji je bio izložen vodnom deficitu detektovano povećanje aktivnosti svih detektovanih izoformi (Moharramejad i sar., 2016).

U našem radu je slična promena u aktivnosti SOD detektovana kod oba hibrida kukuruza u uslovima vodnog deficita. Prema literaturnim podacima, dobijeni rezultati ukazuju da bi oba hibrida mogla biti označena kao tolerantna na vodni deficit kada je ovaj parametar upitanju.

⁶ Na gel elektroforezu je aplikovana ista zapremina uzoraka za oba tretmana (vodni suficit i deficit) preračunata u odnosu na koncentraciju solubilnih protina dobijenih u uzorku. Takođe, metod je ponovljen više puta kako bi se dobili reprezentativniji i relevantniji rezultati.



Slika 5.14. Izoenzimski profili superoksid dismutaza (SOD) kod ZP 555 (A) i ZP 606 (B) hibrida te SOD aktivnost po izoformama izmerena kod ZP 555 (C) i ZP 606 (D) kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana. Na grafikonu su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

b) Aktivnost katalaza (CAT)

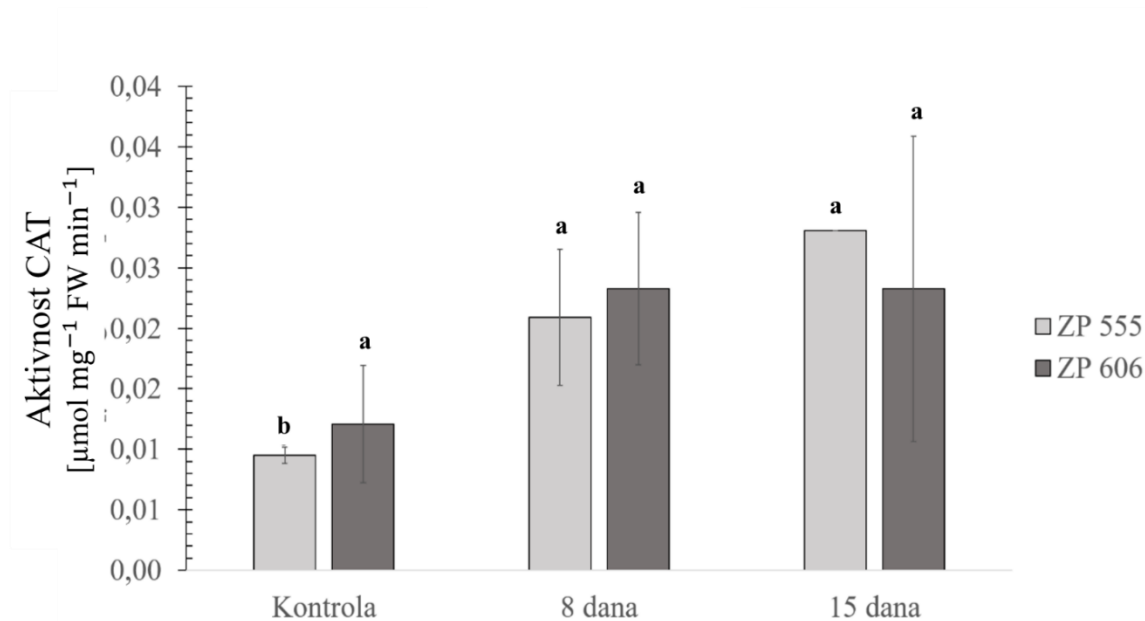
Katalaze su enzimi esencijalni za uklanjanje H_2O_2 u procesu fotorespiracije, oksidacije masnih kiselina i drugim metaboličkim procesima (Noctor i sar., 2000). Aktivnost ovog enzima se smanjuje pri inhibiciji fotorespiracije i indukciji fotosinteze (Noctor i sar., 2000). Sa druge strane, zabeležen je porast aktivnosti CAT pri intenzivnoj fotorespiraciji, što se dešava kod biljaka izloženih vodni deficit (Gill i Tuteja 2010; Foyer i Shigeoka 2011). Takođe, porast peroksisomalne aktivnosti CAT štiti hloroplasti od oksidativnog stresa (Sofa i sar., 2005) što doprinosi održanju balansa između protoka elektrona u fotosintezi i asimilacije CO_2 u Kalvin-Bensonovom ciklusu pri vodnom deficitu (Foyer i Shigeoka, 2011).

Stres izazvan vodnim deficitom, u našem radu, je izazvao značajne promene u aktivnosti CAT, ali samo kod hibrida ZP 555 u poređenju sa kontrolom (Slika 5.15). Kod hibrida ZP 555, značajnije povećanje aktivnosti CAT od +52% ($p=0,008$) je zabeleženo nakon 8 dana vodnog deficita u poređenju sa kontrolom. Sa prolongiranjem vodnog deficita aktivnost CAT je dodatno povećana za +12% iznoseći ukupno +64% ($p=0,008$) u odnosu na kontrolu. Kod hibrida ZP 606 povećanje aktivnosti od 48% u poređenju sa kontrolnim biljkama hibrida je zabeleženo kod biljaka koje su u vodnom deficitu rasle 8 dana, ali je povećanje bilo bez statističke značajnosti (Slika 5.15). U literaturi je pokazano da je povećana aktivnost CAT i APX predstavlja veoma važan pokazatelj da je vrsta tolerantna na vodni deficit (Laxa i sar., 2019).

Istraživanjem Simova-Stoilova i sar. (2010) pokazano je povećanje aktivnosti CAT kod različitih varijeteta pšenice, starosti osam dana, izloženih vodnom deficitu u trajanju od sedam dana. Osim toga, pokazano je povećanje CAT aktivnosti i kod drugih vrsta kao što su *Allium schoenoprasum* (Egert i Tevini, 2002) i *Triticum aestivum* (Dalmia i Sawhney, 2004; Chakraborty i Pradhan, 2012) u uslovima vodnog deficita. Generalno, uočavaju se različiti odgovori na stres izazvan vodnim deficitom kod tolerantnih i osetljivih genotipova različitih vrsta. Pa tako je kod otpornog genotipa kukuruza (genotip Giza 2), starosti 21 dan, izmerena značajno veća aktivnost CAT u odnosu na osetljivi genotip (genotip Trihibrid 321) pri izlaganju vodnom deficitu u trajanju od tri sedmice (Moussa i Abdel, 2008). Isti rezultati, povećanje CAT aktivnosti kod tolerantnog genotipa su dobijeni i pri izlaganju četiri sedmice starih sadnica *Sesamum indicum*, vodnom deficitu u trajanju od četiri sedmice (Fazeli i sar., 2007). Kod ZP 555 hibrida je zabeležen porast aktivnosti ovog enzima tokom vodnog deficita u odnosu na kontrolne uslove i na osnovu ovih rezultata možemo da kažemo da CAT ima

značajnu ulogu pri eliminaciji H_2O_2 , čiji rast tokom vodnog deficita je zabeležen kod ovog hibrida.

Statistički značajna razlika u aktivnost CAT između ispitivanih hibrida kukuruza nije zabeležena, ali je uočljivo da je hibrid ZP 555 imao malo veću aktivnost CAT nakon 15 dana vodnog deficita u odnosu na hibrid ZP 606.



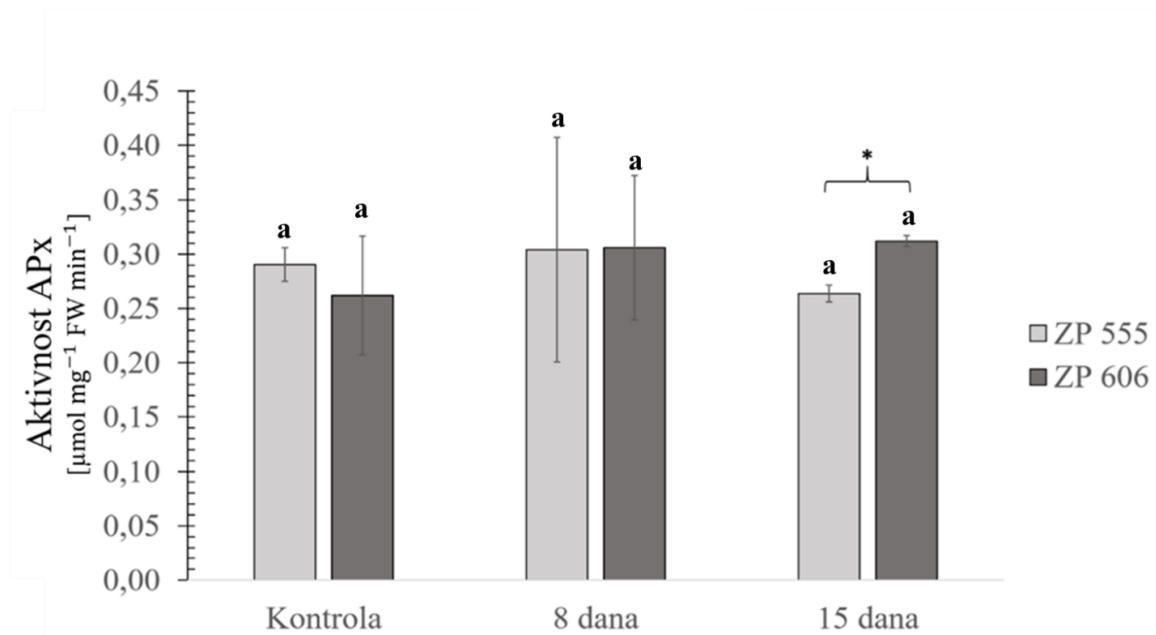
Slika 5.15. Aktivnost katalaza (CAT) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzorak. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

c) Aktivnost askorbat peroksidaze (APX)

Aksorbat peroksidaze je još jedan enzim čija je uloga u uklanjanju H_2O_2 , a detektovan je u stromi i tilakoidima hloroplasta, u mikrozomima te u citosolu. Veća aktivnost ovog enzima obezbeđuje biljkama adekvatniji odgovor pri stresu izazvanim vodnim deficitom (Mittler i Zilinskas, 1994; Kausar i sar., 2012).

U našem radu je aktivnost APX praćena samo kod biljaka izloženih vodnom deficitu, a dobijeni rezultati ukazuju da stres izazvan vodnim suficitom nije značajno uticao na aktivnost APX (Slika 5.16). Naime, iako je izmereno povećanje od +5% (ZP 555) i +14% (ZP 606) u aktivnosti APX kod biljaka koje su u uslovima vodnog deficita provele 8 dana u poređenju sa kontrolnim biljkama, ovaj rast nije imao statističku značajnost. Sa produžetkom trajanja vodnog deficita od 15 dana detektovano je neznatno smanjenje aktivnosti APX od -15% kod biljaka ZP 555 odnosno neznatno povećanje aktivnosti od +16% kod hibrida ZP 606 u odnosu na biljke u kontroli, takođe bez statističke značajnosti. Dosadašnja istraživanja su pokazala povećanje aktivnosti APX kod tolerantnih genotipova biljaka *Tritivum arvensis* (Huseynova, 2012; Singh i sar., 2012) koje su bile izložene vodnom deficitu. Sa druge strane pokazano je i smanjenje aktivnosti APX kod osetljivih genotipova pri izlaganju vodnom deficitu, kod vrsta: *Triticum arvensis* (Singh i sar., 2012) i *Triticum durum* (Huseynova, 2012). Rezultati analize osetljivih genotipova kukuruza, u fazi svilanja, nisu pokazali značajne promene u aktivnosti APX pri vodnom deficitu, pri čemu su uzorci uzimani od 0 do 42 dana faze svilanja u radu Chugh i sar. (2013).

Na osnovu toga može se zaključiti da kod ispitivanih hibrida kukuruza, ključnu ulogu, u uklanjanju H_2O_2 pri vodnom deficitu verovatno imaju POX i CAT.



Slika 5.16. Aktivnost askorbat peroksidaze (APx) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog *t*-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

d) Aktivnost peroksidaza (POX)

U procesu uklanjanja H_2O_2 iz ćelije veoma značajnu ulogu imaju u POX. Osim uloge u uklanjanju vodonik peroksida, ovi enzimi imaju sposobnost generisanja H_2O_2 jednoelektronskom redukcijom kiseonika pri oksidaciji reduktanata (NAD(P)H, askorbata, polifenola ili auksina). Generisani H_2O_2 učestvuje u oksidativnim reakcijama u apoplastu kao supstrat ili u polimerizacionim reakcijama (lignifikacija, odrvenjavanja i dr.) ćelijskog zida (Kukavica i sar., 2012). Povećana ili smanjena aktivnost ovog enzima pomaže otpornost biljaka ka različitim vrstama abiotičkog stresa (Shao i sar., 2008). Tako je povećana aktivnost ovog enzima svojstvena biljkama koje su tolerantnije na stres izazvan vodnim deficitom (Mouharramejad i sar., 2019).

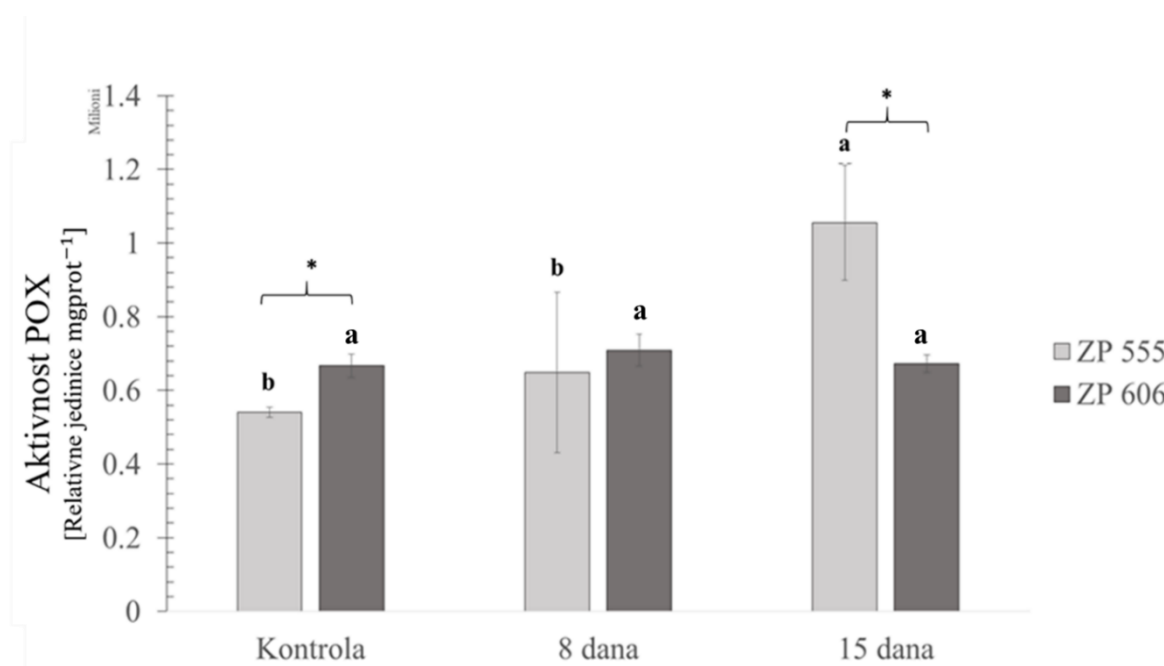
Aktivnost peroksidaza Klase III merena je kod oba ispitivana hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606, izložena uticaju vodnog deficita, a rezultati su prikazani na Slici 5.17. Kao odgovor na prolongiranu vodni deficit uočeno je značajno povećanje aktivnosti POX samo kod hibrida ZP 555.

U našem radu, nedostatak vode u periodu od 8 dana, imao je za posledicu porast aktivnosti POX za +17% kod hibrida ZP 555 u odnosu na biljke koje su rasle u kontrolnim uslovima. Studentovim t-testom je utvrđena značajna promena u aktivnosti POX tek kod biljaka koje su u uslovima vodnog deficita rasle 15 dana pri čemu je aktivnost POX povećana za +49% ($p=0,02$) u odnosu na kontrolne biljke, a +39% ($p=0,04$) u odnosu na biljke koje su 8 dana rasle u uslovima vodnog deficita. Sa druge strane, prestanak navodnjavanja u periodu od 8 i 15 dana kod biljaka ZP 606 nije indukovao značajne promene u aktivnosti POX u odnosu na biljke koje su rasle u kontrolnim uslovima. Naime. studentovim t-testom nisu utvrđene značajne promene u aktivnosti ovog enzima tokom vodnog deficita kod ovog hibrida.

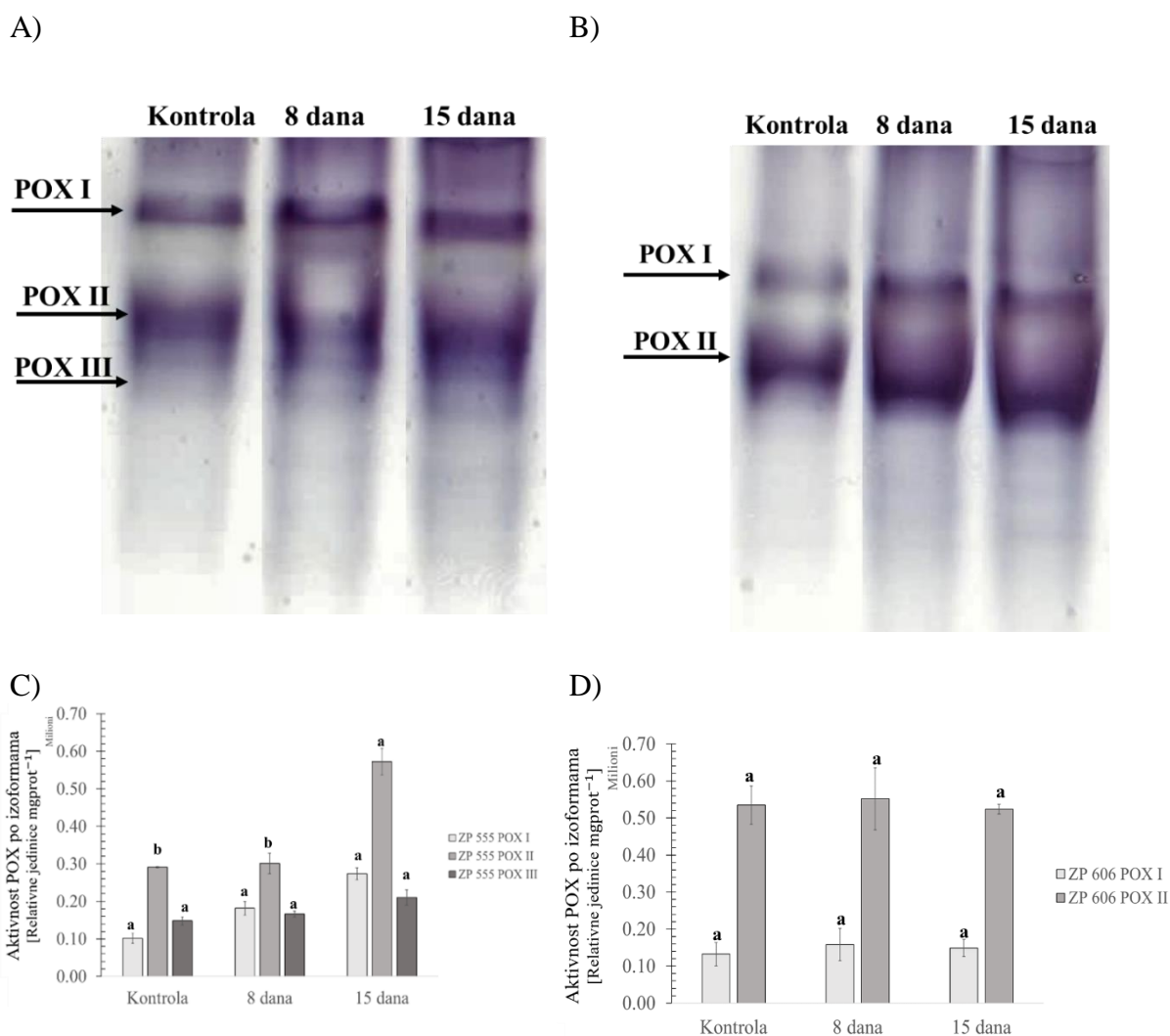
Istraživanja pokazuju da postoje razlike između genotipova kukuruza koji su otporni na vodni deficit u odnosu na neotporne genotipove. Pa tako je kod otpornog genotipa kukuruza (genotip Giza 2), starosti 21 dan, izmerena značajno veća aktivnost POX u odnosu na osetljivi genotip (genotip Trihibrid 321) pri izlaganju vodnom deficitu u trajanju od tri sedmice (Moussa i Abdel, 2008). Mouharramejad i sar. (2019) su dobili iste rezultate izlažući dva hibrida kukuruza (otpornog i tolerantnog) vodnom deficitu u trajanju od 27 dana (pre cvetanja). Isti rezultati, povećanje POX aktivnosti kod tolerantnog genotipa su dobijeni i pri izlaganju sadnica četiri sedmice starih *Sesamum indicum*, vodnom deficitu u trajanju od četiri sedmice (Fazeli i sar., 2007). Takođe, rezultati koje smo dobili za hibrid ZP 555 su slični rezultatima koji su dobili autori Shao i sar. (2008) gde je zabeležena povećana aktivnost POX kod različitih

genotipova pšenice izloženih uticaju vodnog deficita. Osim toga, izlaganje soje vodnom deficitu u trajanju od sedam dana rezultovalo je povećanjem aktivnosti POX (Zhang i sar., 2006). Indukcija aktivnosti POX izmerena je kod tolerantnih vrsta citrusa (starosti jednu godinu) i pri dužem izlaganju vodnom deficitu u trajanju od 24 dana (Hussain i sar., 2018).

U našem istraživanju pokazana je interhibridna razliku u aktivnosti POX unutar istog tipa stresa, ali i između različitih tipova stresa. Hibrid ZP 555 je imao isti mehanizam eliminacije H₂O₂, pomoću POX, nastalog i tokom vodnog suficita i deficita. Sa druge strane, hibrid ZP 606 je imao različit odgovor na vodni deficit i suficit, gde je tokom vodnog suficita povećana aktivnost POX, a sa druge strane tokom vodnog deficita nije zabeležena promena aktivnosti. Iz pokazanih rezultata se može zaključiti da je hibrid ZP 555 tolerantniji na vodni deficit u odnosu na hibrid ZP 606, kada je u pitanju ovaj parametar.



Slika 5.17. Aktivnost peroksidaza Klase III (POX) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.



Slika 5.18. Izoenzimski profili POX kod ZP 555 (A) i ZP 606 (B) hibrida te aktivnost pojedinačnih POX kod ZP 555 (C) i ZP 606 (D) kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana. Na grafikonu su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Nativnom elektroforezom je utvrđen izoenzimski profil POX u listovima biljaka kontrolne grupe, kao i biljaka koje su bile izložene uslovima vodnog deficita u trajanju od 8 i 15 dana, kod oba ispitivana hibrida kukuruza, a rezultati su prikazani na Slika 5.18. Kod hibrida ZP 555 su detektovane tri POX izoforme obeležene na sledeći način: POX I ($R_f=0,107$), POX II ($R_f=0,222$) i POX III ($R_f=0,270$) (Slika 5.18 A, C). Međutim, kod hibrida ZP 606 su zabeležene samo dve POX izoforme obeležene kao POX I ($R_f=0,196$) i POX II ($R_f=0,295$) (Slika 5.18 B, D). Vodni deficit nije uticao na promene izoenzimskog profila u smislu broja izoformi, ali je uticao na promene u aktivnosti istih. Najveća aktivnost POX kod oba hibrida je zabeležena kod izoforme POX II (Slika 5.18 C, D).

Kao odgovor na vodni deficit aktivnost POX je generalno bila manja u listovima hibrida ZP 606 u odnosu na hibrida ZP 555. Verovatno i izmenjen izoenzimski profil je uticao na smanjenje aktivnosti POX kod ZP 606 hibrida.

Neenzimski antioksidativni sistem zaštite

a) *Koncentracija ukupnih polifenola*

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji učestvuju u izgradnji ćelijskog zida (uglavnom lignina), imaju odbrambenu ulogu pri biotičkom i abiotičkom stresu (Đurović, 2019). Osim toga ova jedinjenja imaju veoma važnu ulogu u uklanjanju ROS generisanih pri stresnim uslovima (Zhang i sar., 2020). Pri oksidativnom stresu, nastalom usled vodnog deficita, suficita, UV zračenja i slično, dolazi do indukcije biosinteze plifenolnih jedinjenja. Kao najbolji antioksidansi pokazali su se polimerni polifenoli i tanini, a mali polifenolni molekuli često imaju ulogu pro-oksidanasa (Zhang i sar., 2020). U zavisnosti od supstituenta, strukture bočnog niza, te pozicije na prstenu zavisi i antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja. Tako su hidroksicinamične kiseline bolji antioksidanti u odnosu na hidroksibenzoeve kiseline (najveća aktivnost je zabeležena kod galne kiseline) (Đurović, 2019). Sa druge strane, flavonoidi imaju veoma važnu antioksidativnu ulogu iz razloga što su veoma reaktivni donori vodonika i elektrona (Giada, 2013). Uloga ovih jedinjenja pri stresnim uslovima je veoma važna. Rezultati merenja koncentracije ukupnih polifenola kod ZP 555 i ZP 606 hibrida kukuruza u uslovima vodnog deficita, su prikazani u Tabela 5.9.

Za razliku od stresa izazvanog vodnim suficitom, stres izazvan vodnim deficitom je indukovao smanjenje koncentracije polifenola kod oba ispitivana hibrida kukuruza. Naime, prestanak navodnjavanja u periodu od 8 dana kod oba hibrida je kao posledicu imao smanjenje koncentracije ukupnih polifenola za -35% ($p=0,05$) (ZP 555) te za -28% ($p=0,05$) (ZP 606) u odnosu na kontrolu. Međutim, hibridi nisu imali jedinstven odgovor na produženo trajanje vodnog deficita od 15 dana, i izmereno je smanjene koncentracije ukupnih polifenola za -34% ($p=0,05$) kod ZP 555, dok kod hibrida ZP 606 koncentracija ukupnih polifenola, nakon 15 dana, se smanjila za neznatnih -16% u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti.

Smanjenje koncentracije polifenola je detektovano i kod osetljivih genotipova biljake *Salvia officinalis*, dok je povećanje istog svojstveno tolerantnim genotipovima (Bettaieb i sar., 2011). Osim pomenutih uloga polifenola, polifenoli prisutni u tkivu lista mogu zaštititi dublje slojeve mezofila lista, absorbujući vidljivu svetlost, na ovaj način polifenoli imaju ulogu u ograničavanju ekscitacije hlorofila. U skladu sa ovom činjenicom uočena je povećana količina polifenola u listovima kukuruza genotipova tolerantnih na vodni deficit (Hura i sar., 2008).

Značaju polifenola kod biljaka izloženih stresu, govori i činjenica da je aktivnosti fenilalanin amonijumlijaze (PAL), enzima koji je ključan za put sinteze fenil-propanoidea

(Kacperska, 1993), takođe veoma važan pokazatelj aklimatizacije biljaka uslovima stresa (Kacperski, 1993; Leyva i sar., 1995; Bettaieb i sar., 2011).

Nakon poređenja koncentracije polifenola između hibrida nije uočena značajna razlika, ali generalno nešto je manja koncentracija ukupnih polifenola kod hibrida ZP 555 kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana u odnosu na biljke hibrida ZP 606. Indukovano značajno smanjenje koncentracije ukupnih polifenola kod hibrida ZP 555 i ZP 606, čini oba hibrida osjetljivim na vodni deficit, kada je ovaj parametar u pitanju.

Tabela 5.9. Koncentracija ukupnih polifenola izmerena u kontrolnim uzorcima dva hibrida kukuruza (ZP 606 i ZP 555) i uzorcima izloženim osam i 15 dana vodnom deficitu.

	Polifenoli	Eksperimentalne grupe		
		Kontrola	8 dana	15 dana
ZP 555	[mg g ⁻¹ FW]	2,61±0,257 ^a	1,69±0,027 ^b	1,71±0,235 ^b
ZP 606	[mg g ⁻¹ FW]	2,61±0,004 ^a	1,89±0,096 ^b	2,17±0,039 ^{ab}

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± SD (standardna devijacija).

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

b) Koncentracija pojedinačnih polifenola

U ovom radu je ispitan uticaj vodnog deficita na dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) na koncentraciju pojedinačnih polifenola koristeći pri tome dve različite metode: HPLC/DAD i UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS. HPLC/DAD analizom detektovana su tri polifenola: katehin, galna kiselina i malvidin. Sa druge strane, upotrebom UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS metode detektovano je 12 polifenola i to iz grupe hidroksicinamičnih kiselina (p-kumarična, ferulična, ruzmarinska i kafeična kiselina), hidroksibenzoevih kiselina (protokatehnična kiselina), te iz grupe flavonoida (rutin (flavonol-glikozid), narcisin, eriodiktiol, hispidulin (flavon), izorhamnetin (flavonol) te viteksin).

HPLC/DAD metoda

Osim ukupne koncentracije polifenola u uzorcima dva ispitivana hibrida kukuruza određena je koncentracija pojedinačnih polifenola HPLC metodom. Pri analizi rezultata retenciono vreme pojedinačnih pikova je poređeno sa retencionim vremenom već poznatih standarda. Prosečno poklapanje retencionog vremena dobijenog pri analizi uzoraka sa standardom katehina je bilo 91%, sa standardom galne kiselina je bilo 77,8% te sa standardom malvidina 79,4%.

U našem radu u svim uzorcima kod oba ispitivana stresa izmerena je najveća koncentracija flavonola katehina, a zatim galna kiselina, dok je izmerena najmanja koncentracija antocijana malvidina u svim ispitivanim uzorcima oba hibrida.

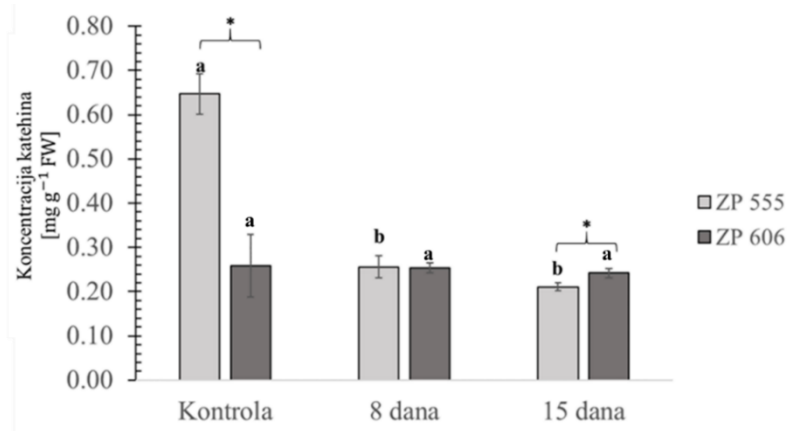
U ispitivanim uzorcima oba hibrida od detektovanih polifenola, izmerena je najveća koncentracija katehina (Slika 5.19A). Kao odgovor na stres izazvan vodnim deficitom izmereno je značajno smanjenje koncentracije katehina kod biljaka hibrida ZP 555 koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 (-66%, $p=0,05$) i 15 (-67%, $p=0,04$) dana u poređenju sa kontrolom (Slika 5.19). Smanjenje koncentracije katehina kod hibrida ZP 555 pri vodnom deficitu može ukazati na osetljivost ovog hibrida na vodni deficit. Upravo promene detektovane u koncentraciji katehina pri vodnom deficitu kod hibrida ZP 555 najviše doprinose izmerenim promenama ukupnih polifenola.

Galna kiselina pri većim koncentracijama ima sposobnost uklanjanja hidroksil radikata, dok pri manjim količinama ima helatorsku sposobnost (Marino i sar., 2014). Osim toga, ovaj polifenol inhibira lipidnu peroksidaciju (Badhani i sar., 2015). Sve ove osobine je čine dobrim antioksidansom koji pri većim količinama može ukloniti ROS a time učiniti biljke otpornijim na različite tipove stresa. Međutim, stres nastao kao rezultat izlaganja biljaka vodnom deficitu nije doveo do značajnih promena u koncentracijama galne kiseline i melvidina kada je u pitanju hibrid ZP 555. Uočen je trend smanjenja koncentracije galne kiseline i malvidina kod biljaka koje su u vodnom deficitu provele 8 i 15 dana u poređenju sa kontrolom ZP 555, ali bez statističke značajnosti.

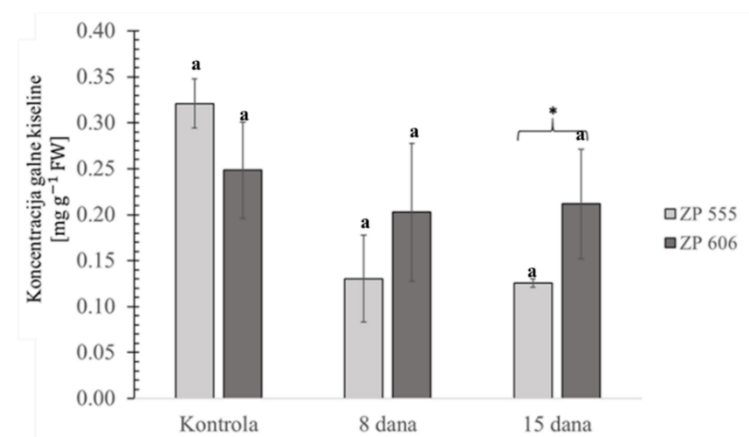
Vodni deficit nije značajno uticao na koncentraciju katehina, galne kiseline i malvidina u listovima biljaka hibrida ZP 606 (Slika 5.19). Uočen je blagi negativan trend sa produženjem trajanja vodnog deficita u poređenju sa kontrolnim biljaka hibrida ZP 606 kod sva tri ispitivana polifenola.

Detektovana je značajna interhibrida razlika u koncentraciji katehina između kontrolnih uzoraka ($p=0,02$) te uzoraka biljaka koje su bile izložene stresu u trajanju od 15 dana ($p=0,05$) (Slika 5.19). Osim toga značajna razlika između hibrida u koncentraciji galne kiseline izmerena je i kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 15 dana ($p=0,002$). Genaralno, veća koncentracija katehina, malvidina i galne kiseline je izmerena u kontroli kod hibrida ZP 555, međutim pri izlaganju vodnom deficitu, detektovana je veća koncentracija pomenutih polifenola kod hibrida ZP 606 u odnosu na hibrid ZP 555.

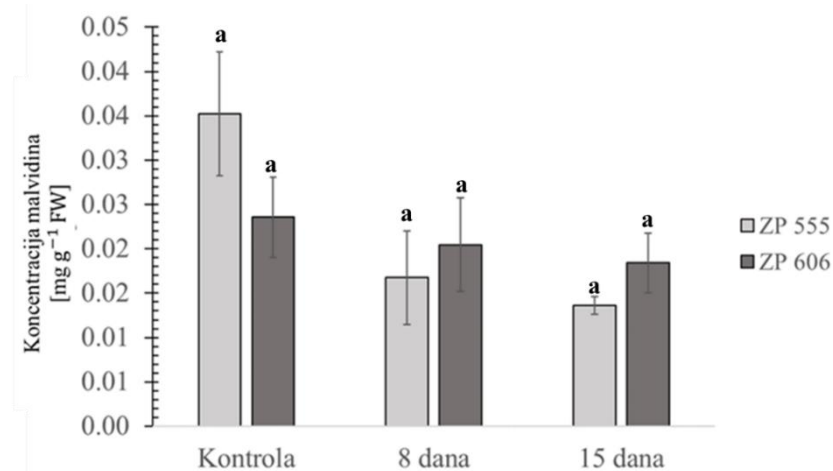
A)



B)



C)



Slika 5.19. Koncentracija katehina (A), galne kiseline (B) i malvidina (C) izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 – svetlo sivi i ZP 606 – tamno sivi). Na graficima su predstavljene srednje vrednosti i standardne devijacije uzoraka. Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS

Upotrebom UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS detektovano je ukupno 12 polifenolnih komponenti (Tabela 5.9).

Kada su u pitanju fenolne kiseline, izmerena je najviša koncentracija *p*-kumarične kiseline kod oba tretirana hibrida, kako u kontrolnim uslovima, tako i u uslovima vodnog deficita. Na toplotnoj mapi je uočljivo blago opadanje koncentracije *p*-kumarične kiseline kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu tokom 15 dana. Takođe, izmerena je visoka koncentracija ostalih analiziranih hidroksicinamičnih kiselina (ferulične i kafeične kiseline) kod oba hibrida kukuruza. Slično *p*-kumaričnoj kiselini, izmereno je blago opadanje koncentracije ferulične kiseline kod biljaka koje su bile izložene uslovima vodnog deficita u trajanju od 15 dana.

Protokatehnična kiselina je detektovana kod kontrolnih biljaka (ZP 555 i ZP 606), te je značajno povišena njena koncentracija kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 15 dana. Ovaj trend je uočen kod oba testirana hibrida kukuruza.

Hura i sar. (2008) su u svom radu zabeležili značajno povećanje ukupne koncentracije polifenola i ferulične kiseline u listu kukuruza tolerantnog na vodni deficit (hibrid Tina), starosti tri sedmice, koji je stresu bio izložen dve sedmice. Sa druge strane, u našem radu je uočen porast sadržaja samo protokatehnične kiseline kod oba ispitivana hibrida kukuruza.

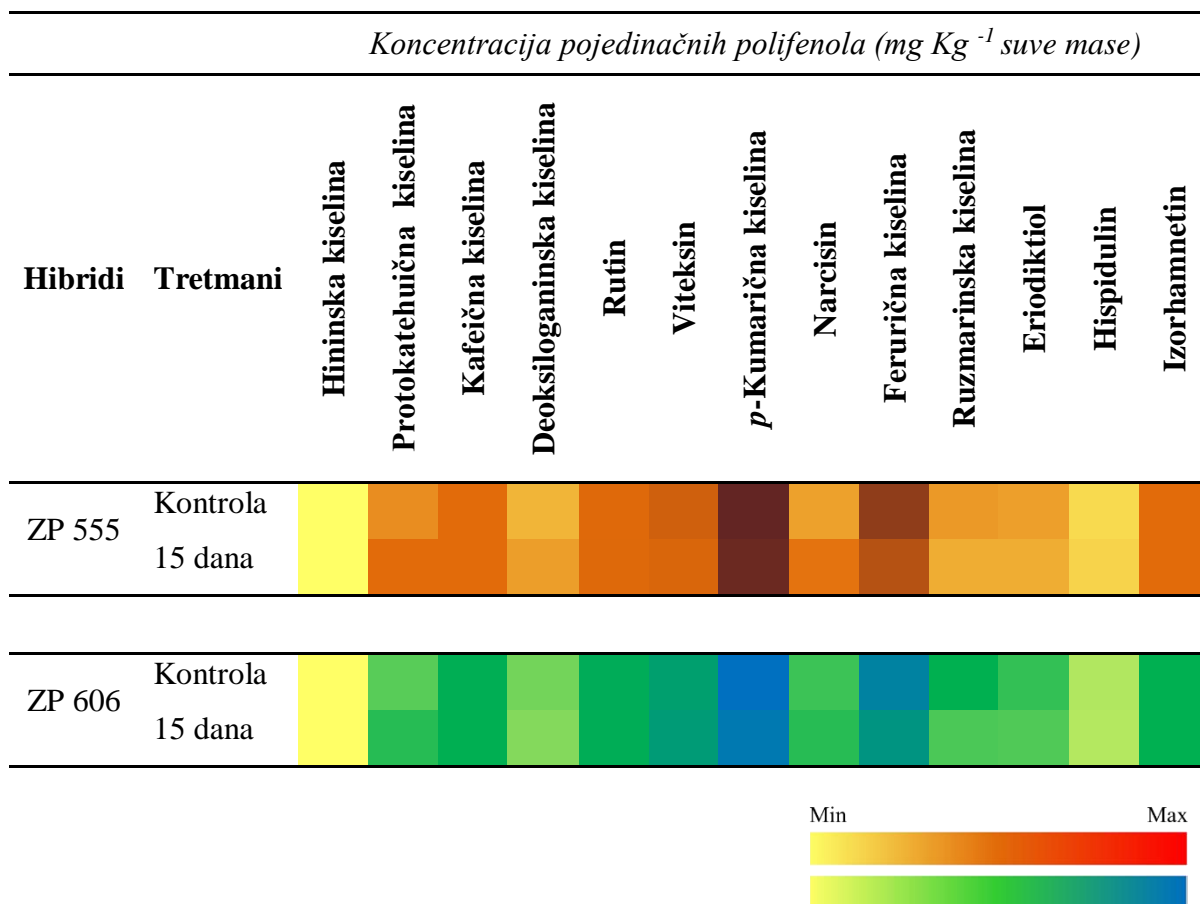
Kada su u pitanju flavonoidi, detektovane su slične koncentracije izorhamnetina, rutina, narcisina, ruzmarinske kiseline i viteksina kod kontrolnih i tretiranih biljaka ZP 555 i ZP 606 hibrida.

Zabeležene su niske koncentracije hispidulina i deoksiloganinske kiseline kod oba hibrida. Deoksiloganinska kiselina je detektovana u vrlo niskim koncentracijama kod kontrolnih biljaka (ZP 555 i ZP 606) i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu. Detektovan je blagi porast deoksiloganinske kiseline kod ZP 555 biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 15 dana. Flavonoidi su jedinjenja koja imaju veoma izražena antioksidativna svojstva u biljnoj ćeliji. Li i sar. (2021) su pokazali da povišena koncentracija flavonoida kod mladih biljaka kukuruza čini biljke otpornijim na vodni deficit, sniženjem koncentracije H₂O₂, usled efikasnijeg antioksidativnog sistema zaštite. Osim toga, kod ovih biljaka je primećena intenzivnija fotosinteza, bolji prinos biomase biljaka, te povećan odnos mase korena i nadzemnog dela u korist korena (Li i sar., 2021). Takođe, Gao i sar. (2020) su pokazali da vodni deficit indukuje akumulaciju sekundarnih metabolita, kao što su flavonoidi kod vrsta *Adonis amurensis* i *Adonis pseudoamurensis*, što je dovelo do značajnog smanjenja

koncentracije vodonik peroksida kod biljaka tolerantnih na ovaj tip abiotičkog stresa. Naime, geni citohrom P₄₅₀ monooksigenaze imaju veoma značajnu ulogu u oksidativnom i antioksidativnom metabolizmu (Rao i sar., 2020). U nedavno objavljenom istraživanju, Rao i sar. (2020) su ukazali da je ekspresija citohrom P₄₅₀ gena u pozitivnoj korelaciji sa povećanom koncentracijom flavonoidima i povećanom rezistencijom na vodni deficit. Naime, transgen CsCYT75B1 (citohrom P450 75B1) je unesen u biljku *Arabidopsis thaliana* te su ove biljke bile podvrgnute vodnom deficitu u trajanju od 14 dana. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je povećana ekspresija CsCYT75B1 gena pri vodnom deficitu dovela do značajnog povećanja ukupne koncentracije flavonoida, čime su smanjeni nivou oksidativnog stresa i povećana antioksidativna zaštita, te povećana tolerantnost ovih biljaka na vodni deficit (Rao i sar., 2020). Nepromenjena ili smanjena koncentracija flavonoida, kao što je detektovano kod naših testiranih hibrida upućuje na zaključak da su oba tipa hibrida podjednako osetljiva na vodni deficit kada je ovaj parametar u pitanju.

Sniženje koncentracije ukupnih polifenola koje je detektovano kod biljaka izloženih vodnom deficitu je pokazano i pri detekciji pojedinačnih polifenola.

Tabela 5.9. Toplotna mapa pojedinačnih jedinjenja kvantifikovanih UHPLC/(-)HESI-MS² metodom u uzorcima dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) izloženih vodnom deficitu.



Korelacija između merenih parametara pri vodnom deficitu

Korelacija između merenih parametara oksidativnog stresa i sistema antioksidativne odbrane u uslovima vodnog deficita za oba hibrida kukuruza, je predstavljena u Tabeli 5.10.

Koncentracija H_2O_2 je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju sa aktivnosti APX ($r=0,433$), kao i negativnu sa koncentracijom polifenola ($r=-0,407$) i prolina ($r=-0,547$) kod hibrida ZP 555. Takođe, koncentracija H_2O_2 nije imala značajnu korelaciju sa aktivnosti CAT i POX kod pomenutog hibrida. Sa druge strane kod hibrida ZP 606 je uočena pozitivna korelacija između koncentracije H_2O_2 i aktivnosti CAT ($r=0,272$), jaka pozitivna korelacija između koncentracije H_2O_2 i aktivnosti POX ($r=0,667$) te negativna korelacija između koncentracije H_2O_2 i aktivnosti APX ($r=-0,318$) i koncentracijom prolina ($r=-0,700$).

Koncentracija MDA kao još jedan od parametara oksidativnog stresa kod hibrida ZP 555 je pokazao jaku pozitivnu korelaciju sa aktivnošću CAT ($r=0,924$), SOD ($r=0,750$) te POX ($r=0,299$), a sa druge slabu negativnu korelaciju sa koncentracijom prolina ($r=-0,327$). Kod hibrida ZP 606 uočena je nešto slabija pozitivna korelacija između koncentracije MDA i aktivnosti CAT ($r=0,385$), SOD ($r=0,336$) i jaka pozitivna korelacija sa aktivnošću APX ($r=0,648$).

Koncentracija prolina izmerena kod biljaka hibrida ZP 555 je pokazala jaku pozitivnu korelaciju sa koncentracijom polifenola ($r=0,813$), te jake negativne korelacije sa sledećim parametrima: aktivnosti APX ($r=-0,841$), aktivnosti SOD ($r=-0,522$), koncentracijom H_2O_2 ($r=-0,547$), te slabiju negativnu korelaciju sa aktivnosti CAT ($r=-0,248$), aktivnosti POX ($r=-0,376$) i koncentracijom MDA ($r=-0,327$). Sa druge strane, koncentracija prolina je kod ZP 606 pokazala drugačije korelacije: jaku pozitivnu korelaciju sa koncentracijom polifenola ($r=0,627$), jaku negativnu korelaciju sa koncentracijom H_2O_2 ($r=-0,700$) i aktivnosti CAT ($r=-0,477$). Osim toga slaba negativna korelacija je takođe pokazana između koncentracije prolina i aktivnosti SOD ($r=-0,355$) te pozitivna korelacija između koncentracije prolina sa koncentracijom MDA ($r=0,353$) kod hibrida ZP 606.

Korelacija između antioksidativnih parametara kod oba tipa kukuruza je prikazana u Tabeli 5.10. Iz dobijenih korelacionih koeficijenata se može videti jaka pozitivna povezanost između aktivnosti CAT i aktivnosti POX ($p=0,511$) i aktivnosti SOD ($p=0,842$) kod hibrida ZP 555. Ovakva pozitivna korelacija između aktivnosti SOD, POX i CAT ukazuje da je porast SOD praćen porastom POX i CAT aktivnosti što predstavlja rezultat hitnog uklanjanja vodonik peroksida. Slična korelacija je i kod hibrida ZP 606, gde je uočena jaka pozitivna korelacija

između aktivnosti CAT sa aktivnosti SOD ($p=0,616$) te slabija pozitivna korelacija sa aktivnosti POX ($r=0,228$). Sa druge strane jaka negativna korelacija je pokazana između aktivnosti CAT i koncentracije polifenola kod hibrida ZP 555 ($r=-0,589$) i ZP 606 ($r=-0,404$).

Osim sa aktivnošću CAT, vrednosti za aktivnosti POX su takođe pokazale pozitivnu korelaciju i sa aktivnošću SOD ($r=0,832$) kod hibrida ZP 555, dok nešto slabiju pozitivnu korelaciju sa aktivnosti SOD ($r=0,318$) kod hibrida ZP 606. Aktivnost POX nije pokazala značajnu korelaciju sa koncentracijom polifenola kod hibrida ZP 555, ali je pokazana značajna negativna korelacija između ova dva parametra kod hibrida ZP 606 ($r=-0,595$).

Aktivnost APX je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju sa koncentracijom polifenola ($r=0,490$) kod hibrida ZP 555, a sa ostalim merenim antioksidansima nije pokazala značajnu korelaciju. Sa druge strane, kod hibrida ZP 606 je uočena slaba pozitivna korelacija između aktivnosti APX i aktivnosti SOD ($r=0,272$) te jaka negativna korelacija sa aktivnosti POX ($r=-0,532$) dok sa drugim antioksidansima nije pokazala značajnu korelaciju.

Tabela 5.10. Korelacija između parametara izmerenih u vodnom deficitu kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606).

	H ₂ O ₂		MDA		Prolin		APX		CAT		SOD		POX		Phe	
	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606
H₂O₂	1	1														
MDA	0,084	-0,392	1	1												
Prolin	-0,547	-0,700	-0,327	0,353	1	1										
APX	0,433	-0,318	-0,180	0,648	-0,841	0,018	1	1								
CAT	0,098	0,272	0,924	0,385	-0,248	-0,447	-0,296	0,111	1	1						
SOD	0,131	0,128	0,750	0,336	-0,522	-0,355	0,103	0,272	0,842	0,616	1	1				
POX	-0,053	0,667	0,299	-0,167	-0,376	-0,250	0,163	-0,532	0,511	0,228	0,832	0,318	1	1		
Phe	-0,407	-0,952	-0,744	0,148	0,813	0,627	0,490	0,187	-0,589	-0,404	-0,613	-0,093	-0,190	-0,595	1	1

Crvena - statistički značajna negativna korelacija; zelena – statistički značajna pozitivna korelacija ($p \leq 0,05$).

5.3. Razlike u metaboličkom odgovoru između hibrida kukuruza pri vodnom suficitu i deficitu

Statistički vrlo značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka izloženih vodnom suficitu i deficitu kod oba hibrida kukuruza uočene su u intenzitetu lipidne peroksidacije, koncentraciji vodonik peroksida, prolina i polifenola, kao i kod enzimskih antioksidativnih mehanizama u celini. Dobijene razlike upućuju na zaključak da su primenjeni tretmani izazvali oksidativni stres i odbrambene reakcije u listu kukuruza.

Povećanje aktivnosti SOD i POX tokom vodnog suficita i smanjenje koncentracije H_2O_2 kod hibrida ZP 606 ukazuje da je hibrid ZP 606 tolerantniji na stres izazvan vodnim suficitom u odnosu na hibrid ZP 555 (Tabela 5.11). Osim toga, korelacijom je jasno uočeno da su polifenoli i POX zajedno uključeni u eliminaciju ROS kod hibrida ZP 606, što nije slučaj kod hibrida ZP 555. Takođe, Zhong i sar. (2010) nedvosmisleno ukazuju da se povećanje aktivnosti SOD i POX, povećanje koncentracije polifenola, te smanjenje koncentracije MDA može uzeti kao marker za određivanje tolerantnih genotipova kukuruza koji se nalaze u fazi mladih sadnica.

Istraživanja u području strukturne i funkcionalne metabolomike i genomike biljaka trebala bi dovesti do razvoja novih genotipova kukuruza sa poboljšanim nutritivnim i agronomskim svojstvima te sa većom tolerancijom na evidentne abioičke stresove koji nastaju kao rezultat klimatskih promena. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio ispitivanje i utvrđivanje razlika između dva hibrida kukuruza u metaboličkom odgovoru na rast u uslovima vodnog deficita i suficita, uz hipotezu da imaju različite genetske predispozicije. Na osnovu prethodno izloženih rezultata dobijenih u ovom radu i literaturnih podataka može se jasno izdvojiti hibrid ZP 606 kao tolerantniji na stresne uslove i potencijalno preživljavanje većeg broja jedinki u uslovima vodnog suficita.

Kada je u pitanju drugi stres, vodni deficit, antioksidativna odbrana hibrida ZP 555 na vodni deficit je bazirana na većoj aktivnosti SOD za uklanjanje superoksida anjon radikala i CAT i POX zaduženih za eliminaciju H_2O_2 koji je evidentno povećan nakon 8 dana vodnog deficita u ovom eksperimentu (Tabela 5.11). U našem radu uočena je jaka pozitivna korelacija između ovih enzima. Međutim, detektovano je vraćanje na kontrolni nivo koncentracije H_2O_2 nakon 15 dana vodnog deficita, što je takođe praćeno povećanjem aktivnosti POX i CAT koji su zaduženi za njegovu eliminaciju iz ćelije. Smatra se da je SOD zadužen za eliminaciju ROS iz unutrašnjosti ćelije (Scandalon, 1993), dok su POX i CAT zadužene više za eliminaciju ROS iz membrana ćelije (Chen i sar., 2013) pri vodnom deficitu. Sa druge strane, mehanizam

odbrane kod hibrida ZP 606 je bio baziran samo na većoj aktivnosti SOD i uklanjanju superoksid anjon radikala nastalog pri stresu. Nisu detektovane veće koncentracije H_2O_2 kod ovog hibrida u periodu vodnog deficita ali nisu detektovane ni veće aktivnosti enzima zaduženih za njegovo uklanjanje, kao što su CAT, POX i APX. Kod oba hibrida je stimulirana lipidna peroksidacija kod biljaka koje su rasle u uslovima vodnog deficita. Osim toga, oba hibrida imaju smanjenu akumulaciju prolina u periodu stresa, što ih čini osjetljivijim na stres izazvan vodnim sušicom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da hibridi imaju različite mehanizme uklanjanja neravnoteže nastale između povišene koncentracije ROS i antioksidanasa kao posljedica uticaja vodnog deficita, ali je osjetljivost hibrida na ovaj tip abiotičkog stresa vrlo slična, te niti jedan hibrid ne možemo okarakterisati kao otpornim na stres izazvan vodnim deficitom na osnovu parametara koji su mereni. Doprinos ovakvim rezultatima mogu imati i dužina trajanja stresa kao i razvojna faza biljaka.

Tabela 5.11. Komparativna tabela izmerenih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u vodnom suficitu i deficitu kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606). U tabeli su predstavljene statistički značajne razlike između 6, 24, 72 i 144 sati vodnog suficita i kontrole, te 8 i 15 dana vodnog deficita i kontrole.

Parametari	Vodni suficit								Vodni deficit				Literaturni podaci
	6 h		24 h		72 h		144 h		8 dana		15 dana		
	ZP 55 5	ZP 60 6	ZP 55 5	ZP 60 6	ZP 55 5	ZP 60 6	ZP 55 5	ZP 60 6	ZP 555	ZP 606	ZP 555	ZP 606	
RWC	/		/		/		/				↓	↓	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv Rampino i sar., 2006; Mouharramnejad i sar., 2019.
H ₂ O ₂	↑		↑			↓		↓	↑				↓ Tolerantan ↑ Osetljiv Selote i Khana-Chopra i sar., 2004; Sairam i sar., 2011; Yadav Bansal i Srivastava, 2012; i Srivastava, 2017; Mouharramnejad i sar., 2019.
MDA		↓		↑		↑		↓			↑	↑	↓ Tolerantan ↑ Osetljiv Ashraf, 2009; Bin i sar., 2010; Chung i sar., 2011; Mouharramnejad i sar., 2019.
Proteini		↑			↑				↓	↓	↓	↓	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv Rai i sar., 2004; Yu i sar., 2017.
Prolin	/		/		/		/		↓	↓	↓		↑ Tolerantan ↓ Osetljiv Oregon i sar., 1993; Mussa i Abdel, 2008; Efeolu i sar., 2009.
CAT									↑		↑		↑ Tolerantan ↓ Osetljiv Zhang i sar., 2007a, b; Fazeli i sar., 2007; Moussa i Abdel, 2008; Simova Stoilova, 2010; Mouharramnejad i sar., 2019.
SOD		↑			↑		↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv Fazeli i sar., 2007; Moussa i Abdel, 2008; Bin i sar., 2010; Wang i sar., 2012; Yadav i Srivastava, 2017; Mouharramnejad i sar., 2019.

APX	/	/	/	/								↑ Tolerantan ↓ Osetljiv	Singh i sar., 2012; Hoseynova, 2012; Wang sar., 2012.	
POX	↑	↑		↓	↑		↑	↑			↑	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv	Fazeli i sar., 2007; Moussa i Abdel, 2008; Bin i sar., 2010; Wang i sar., 2012; Mouharramnejad i sar., 2019.	
Polifenoli	↑		↑		↑		↓	↑	↓	↓	↓	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv	Bansal i Srivanstava, 2012; Jiménez i sar., 2015.	
Car	↑		↑	↓	↑				↓	↓	↓	↓	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv	Tian i sar., 2019a.
Chl <i>a</i>			↑		↑				↓	↓	↓	↓	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv	Khayatnezhad i sar., 2011; Mouharramnejad i sar., 2019.
Chl <i>b</i>			↑	↓	↑				↑	↑	↑	↑	↑ Tolerantan ↓ Osetljiv	Khayatnezhad i sar., 2011; Mouharramnejad i sar., 2019.
Chl <i>a/b</i>			↓										↓ Tolerantan ↑ Osetljiv	Terletskaya i sar., 2017.

↓ - statistički značajno smanjenje vrednosti u odnosu na kontrolu; ↑ - statistički značajno povećanje vrednosti u odnosu na kontrolu; / - parametar nije određivan.
Zelena boja – tolerantan hibrid, crvena – osetljiv hibrid.

6. Zaključci

Cilj teze je bio da se ispituju uticaji vodnog suficita i deficita na dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606), na temelju fizioloških i biohemijskih pokazatelja. Osim toga, cilj teze je obuhvatao i ispitivanja interhibridnih razlika u odgovoru na stres u cilju pronalaska tolerantnih hibrida. Istraživanja su sprovedena na dva hibrida kukuruza, sa različitim genetskim predispozicijama, pri čemu su hibridi izlagani vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 sata, te vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana.

Na osnovu fizioloških istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Stres izazvan vodnim suficitom je doveo do promena u koncentraciji fotosintetičkih pigmenata kada su u pitanju oba hibrida pri čemu su detektovane i razlike između hibrida. Promena u koncentraciji fotosintetičkih pigmenta je usko povezana sa promenama u procesu fotosinteze. Povećana sinteza Chl *a* i *b*, kao i karotenoida je izmerena kod hibrida ZP 555 nakon 24 i 72 sata vodnog suficita te i nakon 6 h kada je u pitanju koncentracija karotenoida. Sa druge strane, kod hibrida ZP 606 je detektovana smanjena sinteza Chl *b* i karotenoida nakon 24 sata trajanja stresa. Promene u koncentraciji fotosintetičkih pigmenata uzrokovane vodnim deficitom su imale za posledicu istovetan odgovor hibrida koji se ogledao kroz sniženje koncentracije Chl *a* i karotenoida i porast koncentracije Chl *b* tokom izlaganja vodnom deficitu.
- U uslovima vodnog suficita kod oba hibrida je uočen porast koncentracije solubilnih proteina (moguće proteina glikolize, proteina uključenih u anaerobni metabolizam, proteina zaduženih za održavanje osmotskog potencijala ćelije). Naime, kod hibrida ZP 555, nakon 72 h, a ZP 606 nakon 6 h izmeren je porast koncentracije solubilnih proteina. Takođe, izmereno je značajno sniženje koncentracije proteina kod jedinki oba testirana hibrida kukuruza podvrgnutih vodnom deficitu, koje može ukazati na sniženu sintezu proteina ili intenzivnije uklanjanje oštećenih proteina kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u trajanju od 8 i 15 dana.
- Vodni deficit je doveo do sniženja koncentracije slobodnog prolina kod oba testirana hibrida nakon 8 dana vodnog deficita, a nakon 15 dana samo kod hibrida ZP 555.

Osim fizioloških pokazatelja, izmereni su i parametri oksidativnog stresa i antioksidativnog sistema zaštite u listovima oba hibrida kukuruza u uslovima vodnog deficita i suficita. Na osnovu istraživanja i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Stres izazvan vodnim suficitom i vodnim deficitom za posledicu je imao porast koncentracije H₂O₂ kod hibrida ZP 555 (nakon 6 i 24 h, kada je u pitanju vodni suficit, odnosno 8 dana, kada je u pitanju vodni deficit). Sa druge strane, kod hibrida ZP 606 izmereno je sniženje koncentracije H₂O₂ tokom stresa (nakon 72 i 144 h vodnog suficita).
- Kao posledica lipidne peroksidacije, nastale u uslovima vodnog deficita i suficita, nastaje ko-produkt MDA. Uočene su interhibridne razlike kada je u pitanju koncentracija MDA tokom vodnog suficita, gde je nakon 6 i 144 h došlo do porasta koncentracije MDA kod hibrida ZP 606, dok je sniženje koncentracije MDA uočeno nakon 24 i 72 h. Vodni suficit nije indukovao porast koncentracije MDA kod hibrida ZP 555.

Sa druge strane, uočena je indukcija lipidne peroksidacije kod oba ispitivana hibrida nakon 15 dana vodnog deficita, što se ogleda kroz porast koncentracije MDA.

- Stres izazvanog vodnim deficitom i vodnim suficitom dovodi do intenzivnije aktivnosti SOD kod oba hibrida kukuruza. (ZP 555, nakon 72 h vodnog suficita te nakon 8 i 15 dana vodnog deficita, odnosno nakon 6 h vodnog suficita i 8 i 15 dana deficita, kod hibrida ZP 606).
- Stres izazvan vodnim suficitom nije doveo do značajnih promena u aktivnosti CAT, ali je sa druge strane detektovana znatno viša aktivnost POX kod oba hibrida.

U uslovima vodnog deficita je detektovana interhibridna razlika koja se ogleda kroz intenziviranje aktivnosti CAT i POX kod hibrida ZP 555, dok kod hibrida ZP 606 nije detektovan porast aktivnosti ovih enzima.

- Porast koncentracija ukupnih polifenola u prvim satima vodnog suficita kod ZP 555 (nakon 24 i 72 h) i ZP 606 hibrida nakon 6, 24 i 144 h), porastom koncentracija pojedinačnih polifenola, katehina (24 h, ZP 555 i 6 h, ZP 606), galne kiseline (24 h, ZP 555 i 6 h ZP 606) i malvidina (72 h, ZP 555 i 6 h ZP 606) kao odgovor na vodni suficit. Sa druge strane, upotrebom UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS metode detektovano je 13 polifenolnih komponenti, pri čemu su u uzorcima najzastupljenije *p*-kumarična i ferulična kiselina. Kada su u pitanju flavonoidi, detektovane su značajne koncentracije rutina, izorhamnetina, narcisina i viteksina.

- Vodni deficit je indukovao značajno opadanje koncentracije ukupnih polifenola kod oba ispitivana hibrida i sniženje koncentracije katehina kod hibrida ZP 555. Takođe, u uzorcima izloženih vodnom deficitu detektovano je 12 polifenolnih jedinjenja, korišćenjem UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS metode. Najzastupljenija fenolna jedinjenja u uzorcima dva hibrida kukuruza izloženih vodnom deficitusu p-kumarična, ferulična i kafeična kiselina.
- Ovim istraživanjem su dobijeni vrlo važni podaci o osetljivosti ispitivanih hibrida kukuruza na stres vodnim deficitom i vodnim suficitom. Dobijeni rezultati pokazuju sniženje koncentracije MDA i H₂O₂, te porast aktivnosti antioksidativnih enzima zajedno sa povišenom koncentracijom neenzimskih komponenti kod hibrida ZP 606, što nedvosmisleno navodi na zaključak da je ovaj hibrid tolerantniji na stres izazvan vodnim suficitom.
- Mehanizam otpornosti oba testirana hibrida kukuruza na stres izazvan vodnim deficitom ogleda se kroz snižavanje koncentracije proteina i prolina, te porast koncentracije MDA, zatim sniženje koncentraciju ukupnih polifenola, ali kroz blagi porast aktivnosti SOD, što čini oba hibrida podjednako osetljivim na stres izazvan vodnim deficitom.

7. Literatura

- Agarwal, S, & Pandey, V. (2003). Stimulation of stress-related antioxidative enzymes in combating oxidative stress in Cassia seedlings. *Indian Journal of Plant Physiology*, 8(3), 264-269.
- Ahmed, S, Nawata, E, Hosokawa, M, Domae, Y, & Sakuratani, T. (2002). Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Science*, 163(1), 117-123.
- Akhtar, I, & Nazir, N. (2013). Effect of waterlogging and drought stress in plants. *International Journal of water resources and environmental sciences*, 2(2), 34-40.
- Akram, N. A, & Ashraf, M. (2011). Improvement in growth, chlorophyll pigments and photosynthetic performance in salt-stressed plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by foliar application of 5-aminolevulinic acid. *Agrochimica*, 55(2), 94-104.
- Alamgir, H, & Uddin, S. N. (2011). Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Australian Journal of Crop Science*, 5(9), 1094–1110.
- Alexieva, V, Sergiev, I, Mapelli, S, & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Alhdad, G. M, Seal, C. E, Al-Azzawi, M. J, & Flowers, T. J. (2013). The effect of combined salinity and waterlogging on the halophyte *Suaeda maritima*: the role of antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 120-125.
- Ali, M. A, Sarwern, A. K. M. G, & Prodhan, A. K. M. A. (1999). Effect of water stress on the growth features of different maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, 31, 455–460.
- Ali, M. B, Singh, N, Shohael, A. M, Hahn, E. J, & Paek, K. Y. (2006). Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science*, 171(1), 147-154.
- Alia, M.P, & Matysik, J. (2001). Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21, 191–203.

- Allen, C.F. Hirayama, O. Good, P. in: Goodwin T.W. (1966). *Biochemistry of Chloroplasts*, vol. 1, Academic Press, London, pp. 195e200.
- Allen, D. J, & Ort, D. R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate
- Al-Tawaha, A. R, Turk, M. A, Abu-Zaitoon, Y. M, Aladaileh, S. H, Al-Rawashdeh, I. M, Alnaimat, S, & Wedyan, M. (2017). Plants adaptation to drought environment. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23(3), 381-388.
- Anee, T. I, Nahar, K, Rahman, A, Mahmud, J. A, Bhuiyan, T. F, Alam, M. U, & Hasanuzzaman, M. (2019). Oxidative damage and antioxidant defense in *Sesamum indicum* after different waterlogging durations. *Plants*, 8(7), 196.
- Anjum, S. A, Ashraf, U, Tanveer, M, Khan, I, Hussain, S, Shahzad, B, & Wang, L. C. (2017). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Anjum, S. A, Tanveer, M, Ashraf, U, Hussain, S, Shahzad, B, Khan, I, & Wang, L. (2016). Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17132-17141.
- Anjum, S. A, Wang, L, Farooq, M, Xue, L, & Ali, S. (2011). Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(6), 409-417.
- Apel, K, & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, 373-399.
- Arbona, V, Hossain, Z, López-Climent, M. F, Pérez-Clemente, R. M, & Gómez-Cadenas, A. (2008). Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*, 132(4), 452–466.
- Arbona, V, Manzi, M, Ollas, C. D, & Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4885-4911.

- Ardebili, N. O, Saadatmand, S, Niknam, V, & Khavari-Nejad, R. A. (2014). The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (12), 3199–3205.
- Armstrong, J, & Armstrong, W. (1988). Phragmites australis—A preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways. *New phytologist*, 108(4), 373-382.
- Arora, A, Sairam, R. K, & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 82, 1227-1238.
- Arora, P, Bhardwaj, R, & Kanwar, M. K. (2012). Effect of 24-epibrassinolide on growth, protein content and antioxidative defense system of Brassica juncea L. subjected to cobalt ion toxicity. *Acta physiologiae plantarum*, 34(5), 2007-2017.
- Asada, K. (2000). The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), 391-396.
- Aschi-Smiti, S, Chaibi, W, Brouquise, R, Berenice-Ricard, B, & Saglio, P. (2004). Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in Trifolium subterraneum ‘Park’. *Annals of botany*, 91(2), 195-204.
- Aservatham, G. S. B, Sivasudha, T, Jeyadevi, R, & Ananth, D. A. (2013). Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans—an overview. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4356-4369.
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances*, 27(1), 84-93.
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances*, 28(1), 169-183.
- Ashraf, M. A. (2012). Waterlogging stress in plants, a review. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 1976–1981.

- Ashraf, M. A, Ahmad, M. S. A, Ashraf, M, Al-Qurainy, F, & Ashraf, M. Y. (2011). Alleviation of waterlogging stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by exogenous application of potassium in soil and as a foliar spray. *Crop pasture science*, 62(1), 25-38.
- Ashraf, M. F. M. R, & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.
- Ashraf, M. H. P. J. C, & Harris, P. J. (2013). Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51(2), 163-190.
- Ashraf, M, & Arfan, M. (2005). Gas exchange characteristics and water relations in two cultivars of *Hibiscus esculentus* under waterlogging. *Biologia Plantarum*, 49(3), 459-462.
- Aslam, M, Maqbool, M. A, & Cengiz, R. (2015). Drought stress in maize (*Zea mays* L.): Effects, resistance mechanisms, global achievements and biological strategies for improvement. Springer.
- Azizi, M, Ghourchian, H, Yazdian, F, Bagherifam, S, Bekhradnia, S, & Nyström, B. (2017). Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line. *Scientific reports*, 7(1), 5178.
- Bacanamwo, M, & Purcell, L. C. (1999). Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *Journal of Experimental Botany*, 50(334), 689-696.
- Badhani, B, Sharma, N, & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc Advances*, 5(35), 27540-27557.
- Bailey-Serres, J, & Voesenek, L. A. C. J. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol*, 59, 313-339.
- Bajpai, S, & Chandra, R. (2015). Effect of waterlogging stress on growth characteristics and SOD gene expression in sugarcane. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(1), 1-8.

- Bansal, R., & Srivastava, J. P. (2012). Antioxidative defense system in pigeonpea roots under waterlogging stress. *Acta physiologiae plantarum*, 34(2), 515-522.
- Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., & Murata, Y. (2009). Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 166(2), 146-156.
- Barrs, H. D., & Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian journal of biological sciences*, 15(3), 413-428.
- Barickman, T. C., Simpson, C. R., & Sams, C. E. (2019). Waterlogging causes early modification in the physiological performance, carotenoids, chlorophylls, proline, and soluble sugars of cucumber plants. *Plants*, 8(6), 160.
- Barnes, J., Zheng, Y., & Lyons, T. (2002). Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. In *Air pollution and plant biotechnology* (pp. 235-252). Springer, Tokyo.
- Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A., & Getzoff, E. D. (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, 43(25), 8038-8047.
- Barry, P., Young, A. J., & Britton, G. (1990). Photodestruction of pigments in higher plants by herbicide action: I. The effect of DCMU (diuron) on isolated chloroplasts. *Journal of experimental botany*, 41(2), 123-129.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32(1), 216-232.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Berleth, T., & Sachs, T. (2001). Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Current opinion in plant biology*, 4(1), 57-62.

- Bettaieb, I, Hamrouni-Sellami, I, Bourgou, S, Limam, F, & Marzouk, B. (2011). Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4), 1103-1111.
- Beutler, E. (1984). Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 10-1.
- Bin, T, Xu, S. Z, Zou, X. L, Zheng, Y. L, & Qiu, F. Z. (2010). Changes of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of waterlogging-tolerant and waterlogging-sensitive maize genotypes at seedling stage. *Agricultural Sciences in China*, 9(5), 651-661.
- Blokhina, O, & Fagerstedt, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 447-462.
- Blokhina, O, Virolainen, E, & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
- Boo, H. O, Heo, B. G, Gorinstein, S, & Chon, S. U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science*, 181(4), 479-484.
- Boo, Y. C, & Jung, J. (1999). Water deficit - Induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *Journal of Plant Physiology*, 155(2), 255-261.
- Bors, W, & Michel, C. (1999). Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1413-1426.
- Bowler, C, Montagu, M. V, & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*, 43(1), 83-116.
- Bragina, T. V, Rodionova, N. A, & Grinieva, G. M. (2003). Ethylene production and activation of hydrolytic enzymes during acclimation of maize seedlings to partial flooding. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(6), 794-798.
- Čamdžija, Z, Filipović, M, Stevanović, M, Mladenović-Drinić, S, Vančetović, J, & Babić, M. (2012). Prinos i komponente prinosa komercijalnih ZP hibrida kukuruza različitih grupa zrenja. *Selekcija i sementarstvo*, 18(1), 41-48.

- Capon, S. J, Jamesb, C. S, Williams, L, & Quinnc, G. P. (2009). Responses to flooding and drying in seedlings of a common Australian desert floodplain shrub: *Muehlenbeckia florulenta* Meisn. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 178–185.
- Carillo, P, & Gibon, Y. (2011). Protocol: extraction and determination of proline. *PrometheusWiki*.
- Carocho, M, & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Chakir, S, & Jensen, M. (1999). How does *Lobaria pulmonaria* regulate photosystem II during progressive desiccation and osmotic water stress? A chlorophyll fluorescence study at room temperature and at 77 K. *Physiologia plantarum*, 105(2), 256-264.
- Chakraborty, U, & Pradhan, B. (2012). Drought stress-induced oxidative stress and antioxidative responses in four wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 58(6), 617-630.
- Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology*, 70(1), 1-9.
- Chang, W. P, Huang, L, Shen, M, Webster, C, Burlingame, A. L, & Roberts, J. K. (2000). Protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low oxygen environment and identification of protein by mass spectrometry. *Plant physiol*, 122(2), 295-31.
- Chaves, M. M, & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2365-2384.
- Chen, J, Xu, W, Velten, J, Xin, Z, & Stout, J. (2012). Characterization of maize inbred lines for drought and heat tolerance. *Journal of soil and water conservation*, 67(5), 354-364.
- Chen, Q, Tao, S, Bi, X, Xu, X, Wang, L, & Li, X. (2013). Research progress in physiological and molecular biology mechanism of drought resistance in rice. *Am J Mol Biol*, 3(2), 102–107.

- Chen, Y. H., & Hsu, B. D. (1995). Effects of dehydration on the electron transport of *Chlorella*. An in vivo fluorescence study. *Photosynthesis research*, 46(1-2), 295-299.
- Chen, Z., Cuin, T. A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B. P., & Shabala, S. (2007). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(15-16), 4245-4255.
- Chobot, V., Huber, C., Trettenhahn, G., & Hadacek, F. (2009). (±)-Catechin: chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? *Journal of chemical ecology*, 35(8), 980-996.
- Christine, J. D., & Musgrave, M. E. (1994). Characterization of population of rapid cycling *Brassica rapa* L. selected for differential waterlogging tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 45(3), 385-392.
- Chugh, V., Kaur, N., & Gupta, A. K. (2011). Role of antioxidant and anaerobic metabolism enzymes in providing tolerance to maize (*Zea mays* L.) seedlings against waterlogging. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 48, 346-352.
- Chugh, V., Kaur, N., & Gupta, A. K. (2016). Comparison of antioxidant system and anaerobic metabolism in seedlings of contrasting maize genotypes under short term waterlogging. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 15(4), 1-10.
- Chugh, V., Kaur, N., Grewal, M., Gupta, A. K. (2013). Differential antioxidative response of tolerant and sensitive maize (*Zea mays* L.) genotypes to drought stress at reproductive stage. *Indian J Biochem Biophys*, 50(2), 150-8.
- Chung, E., Kim, K. M., & Lee, J. H. (2013). Genome-wide analysis and molecular characterization of heat shock transcription factor family in *Glycine max*. *Journal of genetics and genomics*, 40(3), 127-135.
- Chung, I. M., Kim, J. J., Lim, J. D., Yu, C. Y., Kim, S. H., & Hahn, S. J. (2006). Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress. *Environmental and experimental botany*, 56(1), 44-53.
- Close, D. C., & McArthur, C. (2002). Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores? *Oikos*, 99(1), 166-172.

- Collaku, A, & Harrison, S. A. (2002). Losses in wheat due to waterlogging. *Crop Science*, 42(2), 444-450.
- Cornic, G, & Massacci, A. (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. In *Photosynthesis and the Environment* (pp. 347-366). Springer, Dordrecht.
- Correa-Aragunde, N, Foresi, N, Delledonne, M, & Lamattina, L. (2013). Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 64(11), 3339-3349.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.
- Dai, A. (2013). Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature climate change*, 3(1), 52-58.
- Dalmia, A, Sawhney, V. (2004). Antioxidant defense mechanism under drought stress in wheat seedlings. *Physiol Mol Biol Plants* 10:109–114
- 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.
- Das, A. K, & Singh, V. (2016). Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Food chemistry*, 201, 298-306.
- Daszkowska-Golec, A, & Szarejko, I. (2013). Open or close the gate—stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in plant science*, 4, 138.
- Dat, J. F, Foyer, C. H, & Scott, I. M. (1998). Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant physiology*, 118(4), 1455-1461.
- Dat, J, Folzer, H, Parent, C, Badot, P. M, & Capelli, N. (2006). Hypoxia stress. Current understanding and perspectives. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, 3, 664-674.

- Dat, J, Vandenabeele, S, Vranova, E. V. M. M, Van Montagu, M, Inzé, D, & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5), 779-795
- Davis, D. G, & Swanson, H. R. (2001). Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and experimental botany*, 46(2), 95-108.
- Dawson, J. H. (1988). Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *science*, 240(4851), 433-439.
- de Abreu, I. N, & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241-248.
- Demiral, T, & Türkan, I. (2004). Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?. *Journal of Plant Physiology*, 161(10), 1089-1100.
- Deshmukh, P. S, Sairam, R. K, & Shukla, D. S. (1991). Measurement of ion leakage as a screening technique for drought resistance in wheat genotypes-Short Communication. *Indian Journal of Plant Physiology (India)*.
- De Sousa, C. A. F, & Sodek, L. (2003). Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environmental and Experimental Botany*, 50(1), 1-8.
- DiDonato, M, Craig, L, Huff, M. E, Thayer, M. M, Cardoso, R. M, Kassmann, C. J, Getzoff, E. D. (2003). ALS mutants of human superoxide dismutase form fibrous aggregates via framework destabilization. *Journal of molecular biology*, 332(3), 601-615.
- Dietz, K. J. (2010). Redox-dependent regulation, redox control and oxidative damage in plant cells subjected to abiotic stress. In *Plant Stress Tolerance* (pp. 57-70). Humana Press.
- Din, J, Khan, S. U, Ali, I, & Gurmani, A. R. (2011). Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. *J Anim Plant Sci*, 21(1), 78-82.

- Dixon, R. A, & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.
- Dordas, C, Hasinoff, B. B, Igamberdiev, A. U, Manac'h, N, Rivoal, J, & Hill, R. D. (2003). Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *The Plant Journal*, 35(6), 763-770.
- Dordas, C, Hasinoff, B. B, Rivoal, J, & Hill, R. D. (2004). Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta*, 219(1), 66-72.
- Douce, R, Holtz, R. B, & Benson, A. A. (1973). Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 248(20), 7215-7222.
- Drew, M. C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual review of plant biology*, 48(1), 223-250.
- Drew, M. C, Jackson, M. B, Gifford, S. C, & Campbel, I. R. (1981). Inhibition by silver ions of gas space (*aerenchyma*) formation in adventitious root of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta*, 153(3), 217-224.
- Dufernez, F, Yernaux, C, Gerbod, D, Noël, C, Chauvenet, M, Wintjens, R, & Viscogliosi, E. (2006). The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(2), 210-225.
- Duhan, S, Kumari, A, & Sheokand, S. (2017). Effect of waterlogging and salinity on antioxidative system in pigeonpea plant leaves at different stages of development. *Research on Crops*, 18(3), 559-568.
- Đurović, S. (2019). Uticaj različitih postupaka ekstrakcije na sadržaj i biološka svojstva polifenola i proteina iz semena žute soje različitog porekla. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Eckardt, N. A. (2009). A new chlorophyll degradation pathway. *Plant Cell*, 21, 700.
- Eckhoff, S.R, Paulsen, M.R. & Yang, S.C. (2003). Maize. *Maize*, 3647-3653.

- Edwards, G, & Walker, D. (1983). *C, C: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis*. Univ of California Press.
- Efeoğlu, B, Ekmekçi, Y. A. S. E. M. İ. N, & Çiçek, N. U. R. A. N. (2009). Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African Journal of Botany*, 75(1), 34-42.
- Egert, M, & Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 43-49.
- El-Beltagi, H. S, & Mohamed, H. I. (2013). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 44-57.
- El-Enany, A. E, Al-Anazi, A. D, Dief, N, & Al-Taisan, W. A. A. (2013). Role of antioxidant enzymes in amelioration of water deficit and waterlogging stresses on *Vigna sinensis* plants. *J Biol Earth Sci*, 3(1), B144-B153.
- Else, M. A, Coupland, D, Dutton, L, & Jackson, M. B. (2001). Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum*, 111(1), 46-54.
- Ershova, A. N, Popova, N. V, & Berdnikova, O. S. (2011). Production of reactive oxygen species and antioxidant enzymes of pea and soybean plants under hypoxia and high CO₂ concentration in medium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(6), 982.
- Espinoza, A, San Martín, A, López-Climent, M, Ruiz-Lara, S, Gómez-Cadenas, A, & Casaretto, J. A. (2013). Engineered drought-induced biosynthesis of α -tocopherol alleviates stress-induced leaf damage in tobacco. *Journal of plant physiology*, 170(14), 1285-1294.
- Estill, K, Delaney, R. H, Smith, W. K, & Ditterline, R. L. (1991). Water relations and productivity of alfalfa leaf chlorophyll variants. *Crop science*, 31(5), 1229-1233.

- Faghani, E, Gharechahi, J, Komatsu, S, Mirzaei, M, Khavarinejad, R. A, Najafi, F, ... & Salekdeh, G. H. (2015). Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. *Journal of proteomics*, 114, 1-15.
- Fathi, A, & Tari, D. B. (2016). Effect of drought stress and its mechanism in plants. *International Journal of Life Sciences*, 10(1), 1-6.
- Fayez, K. A, & Bazaid, S. A. (2014). Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13(1), 45-55.
- Fazeli, F, Ghorbanli, M, & Niknam, V. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, 51(1), 98-103.
- Feierabend, J. (2005). Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell, Oxford, 101-140.
- Feng, H, & Stockwell, B. R. (2018). Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biology*, 16(5), e2006203.
- Ferreres, F, Figueiredo, R, Bettencourt, S, Carqueijeiro, I, Oliveira, J, Gil-Izquierdo, A, Perera, D.M, Valentao, P, Andrade, P.B, Duarte, P, Barcelo, A.B. & 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 H₂O₂ affair? *Journal of experimental botany*, 62(8), 2841-2854.
- Fischer, T. W, Kleszczyński, K, Hardkop, L. H, Kruse, N, & Zillikens, D. (2013). Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *Journal of pineal research*, 54(3), 303-312.
- Florez-Sarasa, I, Fernie, A. R, & Gupta, K. J. (2020). Does the alternative respiratory pathway offer protection against the adverse effects resulting from climate change?. *Journal of Experimental Botany*, 71(2), 465-469.

- Folzer, H, Dat, J, Capelli, N, Rieffel, D, & Badot, P. M. (2006). Response to flooding of sessile oak: An integrative study. *Tree Physiology*, 26, 759-766.
- Foolad, M. R. (2007). Current status of breeding tomatoes for salt and drought tolerance. In *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* (pp. 669-700). Springer, Dordrecht.
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and experimental botany*, 154, 134-142.
- Foyer, C. H, & Noctor, G. (2005a). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
- Foyer, C. H, & Noctor, G. (2005b). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.
- Foyer, C. H, Lopez-Delgado, H, Dat, J. F, & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia plantarum*, 100(2), 241-254.
- Foyer, C. H, & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiology*, 155(1), 93-100.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 97-112.
- Fry, S. C. (1986). Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase*, 169-182.
- Fujita, M, Fujita, Y, Noutoshi, Y, Takahashi, F, Narusaka, Y, Yamaguchi-Shinozaki, K, & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 436-442.
- Fukao, T, & Bailey-Serres, J. (2008). Ethylene—a key regulator of submergence responses in rice. *Plant Science*, 175(1-2), 43-51.

- Gambarova, N. G., & Gins, M. S. (2008). Characteristics of oxidative stress of plants with C3 and C4 photosynthesis during salinization. *Russian Agricultural Sciences*, 34(2), 77-80.
- Gambrell, R. P., Patrick, W. H. (1978). Chemical and microbiological properties of anaerobic soils and sediments. In: Hook D D, Crawford R M M, eds, *Plant Life in Anaerobic Environments*. Ann Arbor Science, *Ann Arbor, MI*. pp. 375-423.
- Gao, S, Wang, Y, Yu, S, Huang, Y, Liu, H, Chen, W, & He, X. (2020). Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of Two Adonis species in Northeast China. *Scientia Horticulturae*, 259, 108795.
- Gapińska, M, Skłodowska, M, & Gabara, B. (2008). Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(1), 11.
- Gazaryan, I. G, Chubar, T. A, Mareeva, E. A, Lagrimini, L. M, Van Huystee, R. B, & Thorneley, R. N. (1999). Aerobic oxidation of indole-3-acetic acid catalysed by anionic and cationic peanut peroxidase. *Phytochemistry*, 51(2), 175-186.
- Generosova, I. P, & Vartapetian, B. B. (2005). On the physiological role of anaerobically synthesized lipids in *Oryza sativa* seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(4), 481-488.
- Gharibi, S, Tabatabaei, B. E. S, Saeidi, G, & Goli, S. A. H. (2016). Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(4), 796-809.
- Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases—A role for antioxidants*. *InTech*, 87-112.
- Giannopolitis, C. N, & Ries, S. K. (1977). SOD. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 59, 309-314.

- Gibbs, J, Bruxelle, G. D, Armstrong, W, & Greenway, H. (1995). Evidence for anoxic zones in 2-3 mm tips of aerenchymatous maize roots under low O₂ supply. *Functional Plant Biology*, 22(5), 723-730.
- Gill, S. S, & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gill, S. S, Anjum, N. A, Hasanuzzaman, M, Gill, R, Trivedi, D. K, Ahmad, I, & Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.
- Grace, S. C. (2005). Phenolics as antioxidants. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 141-168.
- Grashoff, C, & Verkerke, D. R. (1991). Effect of pattern of water supply on *Vicia faba* L. 3. Plant water relations, expansive growth and stomatal reactions. *NJAS wageningen journal of life sciences*, 39(4), 247-262.
- Grene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, editors. *The Arabidopsis book*. Rockville: The American Society of Plant Biologists, p. 1–20.
- Grzesiak, M. T, Szczyrek, P, Rut, G, Ostrowska, A, Hura, K, Rzepka, A, & Grzesiak, S. (2015). Interspecific differences in tolerance to soil compaction, drought, and waterlogging stresses among maize and triticale genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(5), 330-343.
- Grzesik, M, Napařo, K, Bartosz, G, & Sadowska-Bartosz, I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food chemistry*, 241, 480-492.
- Guerrero, F, & Mullet, J. E. (1986). Increased abscisic acid biosynthesis during plant dehydration requires transcription. *Plant Physiology*, 80(2), 588-591.
- Gunawardena, A. H, Pearce, D. M, Jackson, M. B, Hawes, C. R, & Evans, D. E. (2001). Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 212(2), 205-214.

- Guo, H, Chen, H, Hong, C, Jiang, D, & Zheng, B. (2017). Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic capacity and restraining ROS accumulation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 141, 119-128.
- Guo, Y. Y, Yu, H. Y, Yang, M. M, Kong, D. S, & Zhang, Y. J. (2018a). Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(2), 244-250.
- Guo, Y. Y, Tian, S. S, Liu, S. S, Wang, W. Q, & Sui, N. (2018b). Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. *Photosynthetica*, 56(3), 861-872.
- Gupta, S, & Gupta, N. K. (2005). High temperature induced antioxidative defense mechanism in seedlings of contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Plant Physiology*, 10(1), 73.
- Gutierrez-Coronado, M. A, Trjo-Lopez, C, & Larqué-Saaveda, A. (1998). Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 563-565.
- Haddadi, B. S, Hassanpour, H, & Niknam, V. (2016). Effect of salinity and waterlogging on growth, anatomical and antioxidative responses in *Mentha aquatica* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(5), 119.
- Hagege, D. (1995). Habituation in plant cell cultures: adaptation to free radical attacks?. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, 189(6), 1183-1190.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- Halliwell, B, & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

- Halliwell, B, & Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Hamilton, E. W, & Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant physiology*, 126(3), 1266-1274.
- Han, C, Liu, Q, & Yang, Y. (2009). Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 58(2), 153–162.
- Hao, P, Zhu, J, Gu, A, Lv, D, Ge, P, Chen, G. & Yan, Y. (2015). An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. *Proteomics*, 15(9), 1544-1563.
- Harinasut, P, Poonsopa, D, Roengmongkol, K, & Charoensataporn, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia*, 29(2), 109-113.
- Haschke, R. H, & Friedhoff, J. M. (1978). Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 80(4), 1039-1042.
- Hasanuzzaman, M, Bhuyan, M. H. M, Zulfiqar, F, Raza, A, Mohsin, S. M, Mahmud, J. A. & 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(8), 681.
- Hatier, J. H, & Gould, K. S. (2008). Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *Journal of Theoretical Biology*, 253(3), 625-627.
- Haupt-Herting, S, & Fock, H. P. (2000). Exchange of oxygen and its role in energy dissipation during drought stress in tomato plants. *Physiologia Plantarum*, 110(4), 489-495.
- Havaux, M, & Niyogi, K. K. (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8762-8767.
- Harborne, JB, & Williams, CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.

- He, J. X, Wang, J, & Liang, H. G. (1995). Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *Physiologia Plantarum*, 93(4), 771-777.
- Heath, R. L, & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hiraga, S, Sasaki, K, Ito, H, Ohashi, Y, & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Hoque, M. A, Banu, M. N. A, Nakamura, Y, Shimoishi, Y, & Murata, Y. (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of plant physiology*, 165(8), 813-824.
- Hossain, Z, Lopez-Climent, M. F, Arbona, V, Pérez-Clemente, R. M, & Gómez-Cadenas, A. (2009). Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*, 166(13), 1391–1404.
- Hsu, S. Y, Hsu, Y. T, & Kao, C. H. (2003). The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46(1), 73-78.
- Huang, D, Ou, B, & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- 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(2), 104-112.
- Huseynova, I. M. (2012). Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(8), 1516-1523.
- Hussain, N, Irshad, F, Jabeen, Z, Shamsi, I. H, Li, Z, & Jiang, L. (2013). Biosynthesis, structural, and functional attributes of tocopherols in planta; past, present, and future perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(26), 6137-6149.

- Hussain, S, Khalid, M. F, Saqib, M, Ahmad, S, Zafar, W, Rao, M. J, ... & Anjum, M. A. (2018). Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(8), 135.
- Iijima, M, Kono, Y, Yamauchi, A, & Pardales, J. R. (1991). Effects of soil compaction on the development of rice and maize root systems. *Environmental and Experimental Botany*, 31(3), 333-342.
- Inzé, D, & Van Montagu, M. (1995). Oxidative stress in plants. *Current opinion in Biotechnology*, 6(2), 153-158.
- IPCC, 2014. Climate change 2014: synthesis report. In: Pachauri, R.K, Meyer, L.A. (Eds.), Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 151.
- Iqbal, M. J. (2018). Role of osmolytes and antioxidant enzymes for drought tolerance in wheat. *Global Wheat Production*, 51.
- Ito, O, Ella, E, & Kawano, N. (1999). Physiological basis of submergence tolerance in rainfed lowland rice ecosystem. *Field Crops Research*, 64, 74-90.
- Jabeen, F, Shahbaz, M, & Ashraf, M. (2008). Discriminating some prospective cultivars of maize (*Zea mays* L.) for drought tolerance using gas exchange characteristics and proline contents as physiological markers. *Pak. J. Bot*, 40(6), 2329-2343.
- Jackson, M. B. (1984). Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. *Flooding and plant growth*, 47-128.
- Jackson, M. B, & Armstrong, W. (1999). Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology*, 1(3), 274-287.
- Jain, R, Singh, S. P, Singh, A, Singh, S, Tripathi, P, Chandra, A, & Solomon, S. (2016). Study on physio-biochemical attributes and metallothionein gene expression affected by chromium (VI) in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Journal of Environmental Biology*, 37(3), 375.

- Jaleel, C. A, Gopi, R, Sankar, B, Gomathinayagam, M, & Panneerselvam, R. (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 42-47.
- 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. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1), 100-105.
- Jamei, R, Heidari, R, Khara, J, & Zare, S. (2009). Hypoxia induced changes in the lipid peroxidation, membrane permeability, reactive oxygen species generation, and antioxidative response systems in *Zea mays* leaves. *Turkish Journal of Biology*, 33(1), 45–52.
- Janas, K. M, Cvikrová, M, Pałagiewicz, A, Szafranska, K, & Posmyk, M. M. (2002). Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science*, 163(2), 369-373.
- Jiménez, J. D. L. C, Cardoso, J. A, Dominguez, M, Fischer, G, & Rao, I. (2015). Morpho-anatomical traits of root and non-enzymatic antioxidant system of leaf tissue contribute to waterlogging tolerance in *Brachiaria* grasses. *Grassland science*, 61(4), 243-252.
- Jones, T. A, Zou, J. Y, Cowan, S. T, & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 47(2), 110-119.
- Justin, S. H. F. W, & Armstrong, W. (1991). Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*, 118(1), 49-62.
- Kacperska, A. (1993). Water Potential Alteration: A Prerequisite or a Triggering Stimulus for the Development of Freezing Tolerance in Overwintering Herbaceous Plants. *Advances in plant cold hardiness*, 73, 91.
- Kamaluddin, M, & Zwiazek, J. J. (2002). Ethylene enhances water transport in hypoxic aspen. *Plant Physiology*, 128(3), 962-969.
- Kaur, P, Bali, S, Sharma, A, Kohli, S. K, Vig, A. P, Bhardwaj, R. & Ahmad, P. (2019). Cd induced generation of free radical species in *Brassica juncea* is regulated by

- supplementation of earthworms in the drilosphere. *Science of The Total Environment*, 655, 663-675.
- Kausar, R, Hossain, Z, Makino, T, & Komatsu, S. (2012). Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Molecular Biology Reports*, 39(12), 10573-10579.
- Kelley, P. M, Godfrey, K, Lal, S. K, & Alleman, M. (1991). Characterization of the maize pyruvate decarboxylase gene. *Plant molecular biology*, 17(6), 1259-1261.
- Khan, J. R, & Khan, A. N. (2017). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. *Springer, Singapore*.
- Khan, M. I. R, Asgher, M, & Khan, N. A. (2014a). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene einmung bean (*Vignaradiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 67–74.
- Khan, P. S. V, Nagamallaiah, G. V, Rao, M. D, Sergeant, K, & Hausman, J. F. (2014b). Abiotic stress tolerance in plants: insights from proteomics. In *Emerging technologies and management of crop stress tolerance* (pp. 23-68). Academic Press.
- Khanna-Chopra, R, & Selote, D. S. (2007). Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2), 276-283.
- Khayatnezhad, M, Gholamin, R, Jamaati-e-Somarin, S, & Zabihi-e-Mahmoodabad, R. (2011). The leaf chlorophyll content and stress resistance relationship considering in corn cultivars (*Zea mays*). *Adv. Environ. Biol*, 5(1), 118-122.
- Khedr, A. H. A, Abbas, M. A, Wahid, A. A. A, Quick, W. P, & Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2553-2562.
- Kingston-Smith, A. H, & Theodorou, M. K. (2000). Tansley Review No. 118: Post-ingestion metabolism of fresh forage. *New Phytologist*, 148(1), 37-55.

- Kiniry, J. R. (1991). Maize phasic development. *Modeling plant and soil systems*, 31, 55-70.
- Klok, E. J, Wilson, I. W, Wilson, D, Chapman, S. C, Erwing, R. M, Somerville, S. C, Peacock, W. J, Dolferus, R, & Dennis, E. S. (2002). Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. *The Plant Cell*, 14(10), 2481-2494.
- Klotz, M. G, & Loewen, P. C. (2003). The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular biology and evolution*, 20(7), 1098-1112.
- Konings, H. (1982). Ethylene-promoted formation of aerenchyma in seedling roots of *Zea mays* L. under aerated and non-aerated conditions. *Physiologia plantarum*, 54(2), 119-124.
- Kono, Y, Yamaguchi, A, Kawamura, N, Tatsumi, J, Nonoyama, T, & Inagaki, N. (1987). Interspecific differences of the capacities of waterlogging and drought tolerances among summer cereals. *Japanese Journal of Crop Science*, 56(1), 115-129.
- Korayem, A. M, El-Bassiouny, H. M. S, Abd El-Monem, A. A, & Mohamed, M. M. M. (2012). Physiological and biochemical changes in different sugar beet genotypes infected with root-knot nematode. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1847-1861.
- Krasensky, J, & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
- Kraus, T. E, McKersie, B. D, & Fletcher, R. A. (1995). Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology*, 145(4), 570-576.
- Kreft, H, & Jetz, W. (2007). Global patterns and determinants of vascular plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5925-5930.
- Król, A, Amarowicz, R, & Weidner, S. (2014). Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6), 1491-1499.

- Kukavica, B, Mojović, M, Vučinić, Ž, Maksimović, V, Takahama, U, & ić, 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.
- Kukavica, B, Morina, F, Janjić, N, Boroja, M, Jovanović, L, & Veljović-Jovanović, S. (2013). Effects of mixed saline and alkaline stress on the morphology and anatomy of *Pisum sativum* L.: The role of peroxidase and ascorbate oxidase in growth regulation. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 265-278.
- Kukavica, B. M, Veljović-Jovanović, S. D, Menckhoff, L, & Lühje, S. (2012). Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *Journal of experimental botany*, 63(12), 4631-4645.
- Kukavica, B, Topalić-Trivunić, Lj, Šuškalo, N, Hasanagić, D, Kukrić, Z, Janjić, N, Savić, A, & Samelak, I. (2017). Metabolički odgovor drvenastih biljaka na ekološke uslove u urbanim sredinama. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka.
- Kukreja, S, Nandwal, A. S, Kumar, N, Sharma, S. K, Unvi, V, & Sharma, P. K. (2005). Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum*, 49(2), 305-308.
- Kumar, P, Pal, M, Joshi, R. & Sairam, R. K. (2013). Yield, growth and physiological response of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) genotypes to waterlogging at vegetative stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 209–220.
- Kumutha, D, Ezhilmathi, K, Sairam, R. K, Srivastava, G. C, Deshmukh, P. S, & Meena, R. C. (2009). Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biologia Plantarum*, 53(1), 75-84.
- Laan, P, Clement, J. M, & Blom, C. W. (1991). Growth and development of *Rumex* roots as affected by hypoxic and anoxic conditions. *Plant and Soil*, 136(2), 145-151.
- Lagrimini, L. M. (1991). Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiology*, 96(2), 577-583.

- Lal, M, Kumari, A, & Sheokand, S. (2019). Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species and Oxidative Metabolism Under Waterlogging Stress. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, 777-812.
- Lal, S. K, Johnson, S, Conway, T, & Kelley, P. M. (1991). Characterization of a maize cDNA that complements an enolase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *Plant Molecular Biology*, 16(5), 787-795.
- Larque-Saavedra, A. (1978). The antitranspirant effect of acetylsalicylic acid on *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 43(2), 126-128.
- Lawlor, D. W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of botany*, 89(7), 871-885.
- Lawlor, D. W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, cell & environment*, 25(2), 275-294.
- Laxa, M, Liebthal, M, Telman, W, Chibani, K, & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94.
- Lee, S. Y, Damodaran, P. N, & Roh, K. S. (2014). Influence of salicylic acid on rubisco and rubisco activase in tobacco plant grown under sodium chloride in vitro. *Saudi journal of biological sciences*, 21(5), 417-426.
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, 68, 253–278.
- Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses* (No. Ed. 2). Academic Press.
- Leyva, A, Jarillo, J. A, Salinas, J, & Martinez-Zapater, J. M. (1995). Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant physiology*, 108(1), 39-46.

- Li, T, Hu, Y, Du, X, Tang, H, Shen, C, & Wu, J. (2014). Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreya grandis* cv. *Merrillii* seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. *PLOS one*, 9(10), e109492.
- Li, W, Mo, W, Ashraf, U, Li, G, Wen, T, Abrar, M, & Hu, J. (2018). Evaluation of physiological indices of waterlogging tolerance of different maize varieties in South China. *Appl. Ecol. Environ. Res*, 16, 2059-2072.
- Li, Z, Wakao, S, Fischer, B. B, & Niyogi, K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual review of plant biology*, 60, 239-260.
- Li, B, Fan, R, Sun, G, Sun, T, Fan, Y, Bai, S, & Song, C. P. (2021). Flavonoids improve drought tolerance of maize seedlings by regulating the homeostasis of reactive oxygen species. *Plant and Soil*, 1-17.
- Lichtenthaler, H. K, & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 591–592
- Lin, K. H, Chao, P. Y, Yang, C. M, Cheng, W. C, Lo, H. F, & Chang, T. R. (2006). The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47(4), 417-426.
- Lin, K. H, Weng, C. C, Lo, H. F, & Chen, J. T. (2004). Study of the root antioxidative system of tomatoes and eggplants under waterlogged conditions. *Plant Science*, 167(2), 355–365.
- Liu, F, Van-Toai, T. T, Moy, L. P, Bock, G, Linford, L. D, & Quackenbush, J. (2005). Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137(3), 1115-1129.
- Liu, J, Wang, C, Wang, Z, Zhang, C, Lu, S, & Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*, 126(1), 261-269.

- Liu, T, Li, Z, Hui, C, Tang, M, & Zhang, H. (2016). Effect of Rhizophagus irregularis on osmotic adjustment, antioxidation and aquaporin PIP genes expression of *Populus canadensis* 'Neva' under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(8), 191.
- Logan, B. A, Adams, W. W, & Demmig-Adams, B. (2007). Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Functional Plant Biology*, 34(9), 853-859.
- Lohse, G, & Hedrich, R. (1992). Characterization of the plasma-membrane H⁺-ATPase from *Vicia faba* guard cells. *Planta*, 188(2), 206-214.
- LØVaas, E. (1996). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 38, pp. 119-149). Academic Press.
- 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.
- Lobo, V, Patil, A, Phatak, A, & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Lucena, M. A, Romero-Aranda, 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(3), 422-429.
- Ma, Q. H. (2007). Small GTP-binding proteins and their functions in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(4), 369-388.
- Madan, S, Nainawatee, H. S, Jain, R. K, & Chowdhury, J. B. (1995). Proline and proline metabolising enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Annals of Botany*, 76(1), 51-57.
- Mafakheri, A, Siosemardeh, A. F, Bahramnejad, B, Struik, P. C, & Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian journal of crop science*, 4(8), 580-583.
- Maksimović, J. D, Maksimović, V, Živanović, B, Šukalović, V. H. T, & Vuletić, M. (2008). Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant science*, 175(5), 656-662.

- Maksymiec, W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 177.
- Malenčić, D, Gašić, O, Popović, M, & Boža, P. (2000). Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(7), 546-548.
- Malik, A. I, Colmer, T. D, Lamber, H, & Schortemeyer, M. (2001). Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(11), 1121 – 1131.
- Malik, A. I, Colmer, T. D, Lambers, H, Setter, T. L, & Schortemeyer, M. (2002). Short-term waterlogging has long-term effects on the growth and physiology of wheat. *New Phytologist*, 153(2), 225-236.
- Marino, T, Galano, A, & Russo, N. (2014). Radical scavenging ability of gallic acid toward OH and OOH radicals. Reaction mechanism and rate constants from the density functional theory. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(35), 10380-10389.
- Marinova, K, Kleinschmidt, K, Weissenbock, G, & Klein, M. (2007). Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology* 144, 432–444.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 83-95.
- Marquardt, D, Williams, J. A, Kučerka, N, Atkinson, J, Wassall, S. R, Katsaras, J, & Harroun, T. A. (2013). Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E. *Journal of the American Chemical Society*, 135(20), 7523-7533.
- Mauchamp, A, & Méthy, M. (2004). Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in *Phragmites australis*. *Environmental and experimental botany*, 51(3), 227-235.

- McNamara, S. T., & Mitchell, C. A. (1989). Differential flood stress resistance of two tomato genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114, 976-980.
- Medina, M. I., Botella, M. A., Quesada, M. A., & Valpuesta, V. (1997). Expression of a highly basic peroxidase gene in NaCl-adapted tomato cell suspensions. *FEBS letters*, 407(3), 357-360.
- Medrano, H., Parry, M. A. J., Socias, X. D. W. L., & Lawlor, D. W. (1997). Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Annals of Applied Biology*, 131(3), 491-501.
- Meisrimler, C. N., Buck, F., & Lüthje, S. (2014). Alterations in soluble Class III peroxidases of maize shoots by flooding stress. *Proteomes*, 2(3), 303-322.
- Menconi, M. C. L. M., Sgherri, C. L. M., Pinzino, C., & Navari-Lzzo, F. (1995). Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *Journal of Experimental Botany*, 46(9), 1123-1130.
- Meyer, A. J., & Hell, R. (2005). Glutathione homeostasis and redoxregulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, 86(3), 435-457.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 523-530.
- Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current opinion in chemical biology*, 8(2), 162-168.
- Mittler, R., & Zilinskas, B. A. (1994). Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*, 5(3), 397-405.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.

- Mittler, R, Vanderauwera, S, Gollery, M, & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Miyashita, Y, Dolferus, R, Ismond, K. P, & Good, A. G. (2007). Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49(6), 1108-1121.
- Mohammadkhani, N, & Heidari, R. (2008). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 23-30.
- Moharramnejad, S. A. J. J. A. D, Sofalian, O. M. I. D, Valizadeh, M, Asghari, A, Shiri, M. R, & Ashraf, M. (2019). Response of maize to field drought stress: oxidative defense system, osmolytes' accumulation and photosynthetic pigments. *Pakistan Journal of Botany*, 51(3), 799-807.
- Moharramnejad, S, Sofalian, O, Valizadeh, M, Asgari, A, & Shiri, M. R. (2016). Response of Antioxidant Defense System to Osmotic Stress in Maize Seedling. *Fresen. Environ. Bull*, 25, 805-811.
- Morgan, J. M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 35(1), 299-319.
- Morina, F, Jovanović, L, Kukavica, B, & Veljović-Jovanović, S. (2008). Peroxidase, phenolics, and antioxidative capacity of common mullein (*Verbascum thapsus* L.) grown in a zinc excess. *Archives of Biological Sciences*, 60(4), 687-695.
- Morina, F, Vidović, M, Kukavica, B, & Veljović-Jovanović, S. (2015). Induction of peroxidase isoforms in the roots of two *Verbascum thapsus* L. populations is involved in adaptive responses to excess Zn²⁺ and Cu²⁺. *Botanica Serbica*, 39(2).
- Moussa, H. R, & Abdel-Aziz, S. M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1(1), 31-36.
- Mubeen, Khan, A. H, Singh, S. P, Singh, A. K, Gautam, A. R, Khan, M. M, & Khan, N. (2017). Effect of water logging and salinity stress on physiological and biochemical changes in

- tolerant and susceptible varieties of *Triticum aestivum* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 975–981.
- Munné-Bosch, S, & Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210(6), 925-931.
- Nakano, Y, & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Nakashima, K, & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant cell reports*, 32(7), 959-970.
- Nakazono, M, Tsuji, H, Li, Y, Saisho, D, Arimura, S, Tsutsumi, N, & Hirai, A. (2000). Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice, increases under submerged conditions. *Plant Physiology*, 124(2), 587-598.
- Nayyar, H, & Walia, D. P. (2003). Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, 46(2), 275-279.
- 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(4), 53-58.
- Noctor, G, & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Noctor, G, Lelarge-Trouverie, C, & Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112, 33-53.
- Noctor, G, Veljovic-Jovanovic, S. & Foyer, CH. (2000). Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redoxsignalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B355, 1465–1475.
- O'regan, B. P, Cress, W. A, & Van Staden, J. (1993). Root growth, water relations, abscisic acid and proline levels of drought-resistant and drought-sensitive maize cultivars in response to water stress. *South African Journal of Botany*, 59(1), 98-104.

- Okuma, E, Murakami, Y, Shimoishi, Y, Tada, M, & Murata, Y. (2004). Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(8), 1301-1305.
- Opperdoes, F. R, Borst, P, & Spits, H. (1977). Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *European journal of biochemistry*, 76(1), 21-28.
- Osakabe, Y, Osakabe, K, Shinozaki, K, & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Ou, L. J, Dai, X. Z, Zhang, Z. Q, & Zou, X. X. (2011). Responses of pepper to waterlogging stress. *Photosynthetica*, 49(3), 339.
- Ouchi, A, Nagaoka, S. I, Suzuki, T, Izumisawa, K, Koike, T, & Mukai, K. (2014). Finding of synergistic and cancel effects on the aroxyl radical-scavenging rate and suppression of prooxidant effect for coexistence of α -tocopherol with β -, γ -, and δ -tocopherols (or-tocotrienols). *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(32), 8101-8113.
- Pan, Y, Wu, L. J, & Yu, Z. L. (2006). Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation*, 49(2-3), 157-165.
- Pandey, S, Fartyal, D, Agarwal, A, Shukla, T, James, D, Kaul, T, & Reddy, M. K. (2017). Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in plant science*, 8, 581.
- Parelle, J, Roudaut, J. P, & Ducrey, M. (2006). Light acclimation and photosynthetic response of beech (*Fagus sylvatica* L.) saplings under artificial shading or natural Mediterranean conditions. *Annals of forest Science*, 63, 257–266.
- Parent, C, Capelli, N, Berger, A, Crèvecoeur, M, & Dat, J. F. (2008). An overview of plant responses to soil waterlogging. *Plant stress*, 2(1), 20-27.
- Parsons, L. R, & Howe, T. K. (1984). Effects of water stress on the water relations of *Phaseolus vulgaris* and the drought resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiologia Plantarum*, 60(2), 197-202.

- Parvin, D., & Karmoker, J. L. (2013). Effects of waterlogging on ion accumulation and sugar, protein and proline contents in *Corchorus capsularis* L. *Bangladesh Journal of Botany*, 42(1), 55-64.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., & Dunand, C. (2007). PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605-1611.
- Pastori, G. M., & Trippi, V. S. (1992). Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant and cell Physiology*, 33(7), 957-961.
- Paul, A. L., Schuerger, A. C., Popp, M. P., Richards, J. T., Manak, M. S., & Ferl, R. J. (2004). Hypobaric biology: Arabidopsis gene expression at low atmospheric pressure. *Plant Physiology*, 134(1), 215-223.
- Penel, C., Van Cutsem, P., & Greppin, H. (1999). Interactions of a plant peroxidase with oligogalacturonides in the presence of calcium ions. *Phytochemistry*, 51(2), 193-198.
- Pezeshki, S. R. (1994). Response of baldcypress (*Taxodium distichum*) seedlings to hypoxia: Leaf protein content, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxy-lase/oxygenase activity and photosynthesis. *Photosynthetica*, 30, 59-68.
- Pezeshki, S. R. (2001). Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46(3), 299-312.
- Pešić, M. B., Milinčić, D. D., Kostić, A. Ž., Stanisavljević, N. S., Vukotić, G. N., Kojić, M. O., Gašić, U., Barać, M., Stanojević, S., Popović, D., Banjac, N. & Tešić, Ž. L. (2019). In vitro digestion of meat-and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected?. *Food chemistry*, 284, 28-44.
- Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R., & Samadi, A. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2483-2488.

- Poljakoff-Mayber, A. (1981). Ultrastructural consequences of drought. In: Paleg LG, Aspinall D (eds) The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. *Academic Press, New York*, pp 389–403
- Pospíšil, P, & Prasad, A. (2014). Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 39-48.
- Pospíšil, P, & Yamamoto, Y. (2017). Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(2), 457-466.
- Pour Najaf, M. (2005). Effect of supplemental irrigation and nitrogen fertilizer and inoculation with Rhizobium bacteria on yield and quality of chickpea cultivars under rainfed conditions. *Soil Master Thesis. Zanjan University*.
- Pourabdol, L, Heidary, R, & Farboodnia, T. (2008). The effects of flooding stress on induction of oxidative stress and antioxidant enzymes activity in *Zea mays* L. seedlings. *Research Journal of Biological Sciences*, 3(4), 391–394.
- Pourcel, L, Routaboul, J. M, Cheynier, V, Lepiniec, L, & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12(1), 29-36.
- Pyngrope, S, Bhoomika, K, & Dubey, R. S. (2013). Reactive oxygen species, ascorbate–glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. *Protoplasma*, 250(2), 585-600.
- Qin, X, & Zeevaart, J. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceeding of National Academy of Science*, 96(26), 15354–15361.
- Radosavljević, M, Mojović, L, Rakin, M, & Milašinović, M. (2009). ZP hibridi kukuruz kao sirovina za proizvodnju bioetanola. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/PTEP*, 13(1), 45-49.

- Rahman, M. U, Gul, S. H. E. R. E. E. N, & Ahmad, I. S. H. F. A. Q. (2004). Effects of water stress on growth and photosynthetic pigments of corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Int J Agric Biol*, 6, 652-655.
- Rai, R. K, Srivastava, J. P, & Shahi, J. P. (2004). Effect of waterlogging on some biochemical parameters during early growth stages of maize. *Indian Journal of Plant Physiology*, 9, 65-68.
- Rajasekar, M, Rabert, G. A, & Manivannan, P. (2016). The effect of triazole induced photosynthetic pigments and biochemical constituents of *Zea mays* L.(Maize) under drought stress. *Applied Nanoscience*, 6(5), 727-735.
- Ram, P. C, Singh, B. B, Singh, A. K, Ram, P, Singh, P. N, Singh, H. P, ... & Setter, T. L. (2002). Submergence tolerance in rainfed lowland rice: physiological basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding. *Field Crops Research*, 76(2-3), 131-152.
- Rampino, P, Pataleo, S, Gerardi, C, Mita, G, & Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, cell & environment*, 29(12), 2143-2152.
- Rao, M. J, Xu, Y, Tang, X, Huang, Y, Liu, J, Deng, X, & Xu, Q. (2020). CsCYT75B1, a citrus cytochrome P450 gene, is involved in accumulation of antioxidant flavonoids and induces drought tolerance in transgenic Arabidopsis. *Antioxidants*, 9(2), 161.
- Ralph, J, Bunzel, M, Marita, J, Hatfield, D, Lu, F, Kim, H, Schatz, PF, Grabber, JH, & Steinhart, H. (2004). Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews* 3, 79–96.
- Ros Barcelo, A, Ferrer, MA, Florenciano, EG, Munoz, R. (1991). The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pI in *Lupinus*. *Botanica Acta* 104, 272–278.
- Ravindranath, S. D, & Fridovich, I. (1975). Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 250(15), 6107-6112.

- Reggiani, R., Cantu, C. A., Brambilla, I., & Bertani, A. (1988). Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. *Plant and Cell Physiology*, 29(6), 981-987.
- Ren, B., Zhang, J., Dong, S., Liu, P., & Zhao, B. (2016). Effects of waterlogging on leaf mesophyll cell ultrastructure and photosynthetic characteristics of summer maize. *PloS one*, 11(9), e0161424.
- Robert, B., Horton, P., Pascal, A. A., & Ruban, A. V. (2004). Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins in vivo. *Trends in plant science*, 9(8), 385-390.
- Roberts, J. K., Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V., & Freeling, M. (1984). Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), 6029-6033.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., & van Dongen, J. T. (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152(3), 1501-1513.
- Ronzhina, E. S. (2004). Structural and functional changes of mesophyll as a possible cause of cytokinin-dependent transport of substances in the leaves isolated. *Plant Physiol*, 51(3), 373-382.
- Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Lunelli, M., Scarpa, M., & Rigo, A. (2002). Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 408(2), 239-245.

- Rubio, M. C, González, E. M, Minchin, F. R, Webb, K. J, Arrese-Igor, C, Ramos, J, & Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia plantarum*, 115(4), 531-540.
- Russell, D. A, & Sachs, M. M. (1991). The maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis. *Molecular and General Genetics*, 229(2), 219-228.
- Sachs, M. M, Freeling, M, & Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell*, 20(3), 761-767.
- Sacks, M. M, Silk, W. K, & Burman, P. (1997). Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant physiology*, 114(2), 519-527.
- Sairam, R. K, Deshmukh, P. S, & Saxena, D. C. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia plantarum*, 41(3), 387-394.
- Sairam, R. K, Dharmar, K, Lekshmy, S, & Chinnusamy, V. (2011a). Expression of antioxidant defense genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 735-744.
- Sairam, R. K, Kumutha, D, Ezhilmathi, K, Chinnusamy, V, & Meena, R. C. (2009). Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant enzyme activities in pigeon pea. *Biologia Plantarum*, 53(3), 493-504.
- Sairam, R. K, Kumutha, D, Ezhilmathi, K, Deshmukh, P. S, & Srivastava, G. C. (2008). Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia plantarum*, 52(3), 401.
- Sairam, R. K, Kumutha, D, Lekshmy, S, & Chinnusamy, V. (2011b). Expression of antioxidant defense genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 735–744.
- Sairam, R. K, Srivastava, G. C, Agarwal, S, & Meena, R. C. (2005). Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49(1), 85.

- Sakihama, Y, Cohen, M. F, Grace, S. C, & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80.
- Salekjalali, M, Haddad, R, & Jafari, B. (2012). Effects of soil water shortages on the activity of antioxidant enzymes and the contents of chlorophylls and proteins in barley. *Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci*, 12, 57-63.
- Salin, M. L, & Bridges, S. M. (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 201(2), 369-374.
- Sancho, M. A, de Forchetti, S. M, Pliego, F, Valpuesta, V, & Quesada, M. A. (1996). Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. *Plant cell, tissue and organ culture*, 44(2), 161-167.
- Santos, C. V. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*, 103(1), 93-99.
- Sarker, U, & Oba, S. (2018). Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Sayfzadeh, S, & Rashidi, M. (2011). Response of antioxidantenzymes activities of sugar beet to drought stress. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(4), 27–33.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7-12.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38(7), 995-1014.
- Scandalios, J. G, Guan, L, & Polidoros, A. N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 34, 343-406.

- Scott, I. M, Dat, J. F, Lopez-Delgado, H, & Foyer, C. H. (1999). Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signaling in plants. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 39, 13-17.
- Selmar, D, & Kleinwächter, M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 42, 558-566.
- Selote, D. S, & Khanna-Chopra, R. (2006). Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiologia Plantarum*, 127(3), 494-506.
- Sergieiev, I, Alexieiva, V, & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 51(3), 121-124.
- Sgherri, C. L. M, Maffei, M, & Navari-Izzo, F. (2000). Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *Journal of Plant Physiology*, 157(3), 273-279.
- Shao, H.B, Chu, L.Y, Shao, M.A, Jaleel, C.A, Mi, H.M, 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C. R. Biol.* 331, 433441.
- Sharma, A, Kumar, V, Shahzad, B, Ramakrishnan, M, Sidhu, G. P. S, Bali, A. S, & Bakshi, P. (2019). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-23.
- Sharma, P, & Dubey, R. S. (2004). Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science*, 167(3), 541-550.
- Sharma, P, & Dubey, R. S. (2005a). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant growth regulation*, 46(3), 209-221.
- Sharma, P, & Dubey, R. S. (2005b). Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal of plant physiology*, 162(8), 854-864.

- Sharma, P, & Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defence system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminium. *Plant Cell Reports*, 26(11), 2027–2038.
- 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.
- Shimoda-Matsubayashi, S, Matsumine, H, Kobayashi, T, Nakagawa-Hattori, Y, Shimizu, Y, & Mizuno, Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene: a predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 226(2), 561-565.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.
- Simova-Stoilova, L, Vaseva, I, Grigorova, B, Demirevska, K, & Feller, U. (2010). Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 200-206.
- Singh, B, & Usha, K. (2003). Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, 39(2), 137-141.
- Singh, S. P. (1993). Effect of non-auxinic chemicals on root formation in some ornamental plant cuttings. *Advances in Horticultural Forestry*, 3, 207-210.
- Singh, S, Gupta, A. K, & Kaur, N. (2012). Differential responses of antioxidative defence system to long-term field drought in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198(3), 185-195.
- Singleton, V. L, & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sirikantaramas, S, Yamazaki, M, Saito, K. (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews* 7, 467–477.

- Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 53-86.
- Smirnoff, N, & Colombe, S. V. (1988). Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *Journal of Experimental Botany*, 39(8), 1097-1108.
- Smirnoff, N, & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Soares, C, de Sousa, A, Pinto, A, Azenha, M, Teixeira, J, Azevedo, R. A, & Fidalgo, F. (2016). Effect of 24-epibrassinolide on ROS content, antioxidant system, lipid peroxidation and Ni uptake in *Solanum nigrum* L. under Ni stress. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 115-125.
- Sofa, 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(6), 13561-13578.
- Sofa, A, Dichio, B, Xiloyannis, C, & Masia, A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32(1), 45-53.
- Song, H, Wang, Y. S, Sun, C. C, Wu, M. L, Peng, Y. L, Deng, C, & Li, Q. P. (2011). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on antioxidant system activities and proline content in *Kandelia candel*. *Oceanological and hydrobiological studies*, 40(3), 9.
- Song, X. S, Wang, Y. J, Mao, W. H, Shi, K, Zhou, Y. H, Nogués, S, & Yu, J. Q. (2009). Effects of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *Physiologia Plantarum*, 135(3), 246-257.
- Srivastava, J. P, Gangey, S. K, & Shahi, J. P. (2007). Water logging resistance in maize in relation to growth, mineral composition and some biochemical parameters. *Indian Journal of Plant Physiology*, 12(1), 28-33.

- Stahl, W, & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- Steffens, B, & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant physiology*, 170(2), 603-617.
- Steffen, Y, Gruber, C, Schewe, T, & Sies, H. (2008). Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 469(2), 209-219.
- Steinman, H. M, Weinstein, L, & Brenowitz, M. (1994). The manganese superoxide dismutase of Escherichia coli K-12 associates with DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28629-28634.
- Stikić, R, & Jovanović, Z. (2012). Fiziologija stresa biljaka. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Stojiljković, S, Stoiljković, M, Bojanić, V, Stojiljković, N, & Radenković, S. (2007). Aquaporins role in water balance disorders. *Acta medica Medianae*, 46(4), 66-73.
- Subrahmanyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*, 46, 339-345.
- Szabados, L, & Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Tadolini, B. (1988). Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochemical Journal*, 249(1), 33-36.
- Tadege, M, Dupuis, I, & Kuhlemeier, C. (1999). Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in plant science*, 4(8), 320-325.
- Tainer, J. A, Getzoff, E. D, Beem, K. M, Richardson, J. S, & Richardson, D. C. (1982). Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of molecular biology*, 160(2), 181-217.
- Takahama, U, & Oniki, T. (2000). Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research*, 113(3), 301-309.

- Talebi, R, Ensafi, M. H, Baghebani, N, Karami, E, & Mohammadi, K. (2013). Physiological responses of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to drought stress. *Environmental and Experimental Biology*, 11, 9-15.
- Tan, W, Liu, J, Dai, T, Jing, Q, Cao, W, & Jiang, D. (2008). Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis waterlogging. *Photosynthetica*, 46(1), 21-27.
- Terletskaia, N, Zobova, N, Stupko, V, & Shuyskaia, E. (2017). Growth and photosynthetic reactions of different species of wheat seedlings under drought and salt stress. *Periodicum biologorum*, 119(1), 37-45.
- Thompson, A. J, Jackson, A. C, Parker, R. A, Morpeth, D. R, Burbidge, A, & Taylor, I. B. (2000). Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 42(6), 833–845.
- Tian, L, Bi, W, Liu, X, Sun, L, & Li, J. (2019b). Effects of waterlogging stress on the physiological response and grain-filling characteristics of spring maize (*Zea mays* L.) under field conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(5), 63.
- Tian, L, Li, J, Bi, W, Zuo, S, Li, L, Li, W, & Sun, L. (2019a). Effects of waterlogging stress at different growth stages on the photosynthetic characteristics and grain yield of spring maize (*Zea mays* L.) Under field conditions. *Agricultural water management*, 218, 250-258.
- Titarenko, T. (2000). Test parameters of revealing the degree of fruit plants tolerance to the root hypoxia caused by flooding of soil. *Plant Physiol. Biochem*, 38(Suppl 115).
- Tracewell, C. A, Vrettos, J. S, Bautista, J. A, Frank, H. A, & Brudvig, G. W. (2001). Carotenoid photooxidation in photosystem II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 61-69.
- Trenkovski, S, Cmiljaniü, R, Smiljakoviü, T, Marinkov, G, & Stojanoviü, L. (2006). OSNOVI TEORIJE ELEKTROFOREZE I MOGUĀNOSTI PRIMENE. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(5-6), 33-43.

- Turcsányi, E, Surányi, G, Lehoczki, E, & Borbély, G. (1994). Superoxide dismutase activity in response to paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Journal of plant physiology*, 144(4-5), 599-606.
- Türkan, I, Bor, M, Özdemir, F, & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
- Ullah, I, Waqas, M, Khan, M. A, Lee, I. J, & Kim, W. C. (2017). Exogenous ascorbic acid mitigates flood stress damages of *Vigna angularis*. *Applied Biological Chemistry*, 60(6), 603-614.
- Valizadeh, M, Moharamnejad, S, & Ahmadi, M. (2018). Changes in Activity Profile of Some Antioxidant Enzymes in Alfalfa Half-sib Families under Salt Stress.
- Van Breusegem, F, Vranová, E, Dat, J. F, & Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414.
- Vartapetian, B. B. (2006). Plant anaerobic stress as a novel trend in ecological physiology, biochemistry, and molecular biology: 2. Further development of the problem. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(6), 711-738.
- Vartapetian, B. B, & Jackson, M. B. (1997). Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany*, 79, 3-20.
- Velikova, V, Yordanov, I, & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science*, 151(1), 59-66.
- Veljovic-Jovanovic, S, Kukavica, B, Stevanovic, B, & Navari-Izzo, F. (2006). Senescence-and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1759-1768.
- 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* (pp. 269-300). Springer, Cham.

- Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., & Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal*, 63(4), 551-562.
- Visser, E. J. W., Bögemann, G. M., Van de Steeg, H. M., Pierik, R., & Blom, C. W. P. M. (2000). Flooding tolerance of *Carex* species in relation to field distribution and aerenchyma formation. *New Phytologist*, 148(1), 93-103.
- Visser, E. J. W., Bogemann, G., Blom, C. W. P. M., & Voesenek, L. A. C. J. (1996). Ethylene accumulation in waterlogged *Rumex* plants promotes formation of adventitious roots. *Journal of Experimental Botany*, 47(3), 403-410.
- Visser, E. J. W., Nabben, R. H. M., Blom, C. W. P. M., & Voesenek, L. A. C. J. (1997). Elongation by primary lateral roots and adventitious roots during conditions of hypoxia and high ethylene concentrations. *Plant, Cell & Environment*, 20(5), 647-653.
- Voesenek, L. A. C. J., Blom, C. W. P. M., & Puorvels, R. H. W. (1989). Root and shoot development of *Rumex* species under waterlogged conditions. *Canadian Journal of Botany*, 67(6), 1865-1869.
- Voet, D., Voet, J.G. (1995). Biochemistry, 2nd ed, Wiley, New York.
- Wang, F. Z., Wang, Q. B., Kwon, S. Y., Kwak, S. S., & Su, W. A. (2005). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of plant physiology*, 162(4), 465-472.
- Wang, J. P., Li, Y. L., & Zhang, J. G. (2008). Effect of high-temperature and excessive-light stress on APX activity in apple peel. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 23, 144-147.
- Wang, J. R., Li, S. X., & Li, K. I. (2001). Effect of water limited deficit stress during different growth stages on leaf enzymes of winter wheat. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 21(1), 47-52.
- Wang, S. Y., Singh, K., & Lin, S. C. (2013). Glaucoma and vitamins A, C, and E supplement intake and serum levels in a population-based sample of the United States. *Eye*, 27(4), 487-494.

- Wang, S, Liang, D, Li, C, Hao, Y, Ma, F, & Shu, H. (2012). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 81-89.
- Wang, X, Cai, X, Xu, C, Wang, Q, & Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1706.
- Wang, X, Vignjevic, M, Jiang, D, Jacobsen, S, & Wollenweber, B. (2014). Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. *Journal of experimental botany*, 65(22), 6441-6456.
- Watkin, E. L. J, Campbell, C. J, & Greenway, H. (1998). Root development and aerenchyma formations in two wheat cultivars and one Triticale cultivar grown in stagnant agar and aerated nutrient solution. *Annals of Botany*, 81(2), 349-354.
- Weidner, S, Karolak, M, Karamac, M, Kosinska, A, & Amarowicz, R. (2009). Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78(2), 97-103.
- Weisiger, R. A, & Fridovich, I. (1973). Superoxide dismutase organelle specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 248(10), 3582-3592.
- Wiseman, B. (2010). Structural and functional analysis of catalase-peroxidases.
- Wrobel, M, Karmac, M, Amarowicz, R, Fra-czek, E, & Weidner, S. (2005). Metabolism of phenolic compounds in *Vitis riparia* seeds during stratification and during germination under optimal and low temperature stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(3), 313-320.
- Wu, Y, & Cosgrove, D. J. (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1543-1553.

- Wuerges, J, Lee, J. W, Yim, Y. I, Yim, H. S, Kang, S. O, & Carugo, K. D. (2004). Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8569-8574.
- Xin, Z. L, Mei, G, Shiqing, L, Shengxiu, L, & Zongsuo, L. (2011). Modulation of plant growth, water status and antioxidative system of two maize (*Zea may* L.) cultivars induced by exogenous glycinebetaine under long term mild drought stress. *Pak J Bot*, 43, 1587-1594.
- Xiong, L, Schumaker, K. S, & Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The plant cell*, 14(suppl 1), S165-S183.
- Yadav, D. K, & Srivastava, J. P. (2017). Temporal changes in biochemical and antioxidant enzymes activities in maize (*Zea mays* L.) under waterlogging stress during early growth stage. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 351-362.
- Yamauchi, Y, Furutera, A, Seki, K, Toyoda, Y, Tanaka, K, & Sugimoto, Y. (2008). Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant physiology and biochemistry*, 46(8-9), 786-793.
- Yan, B, Dai, Q, Liu, X, Huang, S, & Wang, Z. (1996). Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and soil*, 179(2), 261-268.
- Yin, D, Chen, S, Chen, F, Guan, Z, & Fang, W. (2010). Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2), 122-130.
- Yiu, J. C, Liu, C. W, Kuo, C. T, Tseng, M. J, Lai, Y. S, & Lai, W. J. (2008). Changes in antioxidant properties and their relationship to paclobutrazol-induced flooding tolerance in Welsh onion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1222-1230.
- Yordanov, V. V, Velikova, T. T, & Tsonev V. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*, 187-206.

- Yordanova, R. Y, & Popova, L. P. (2001). Photosynthetic response of barley plants to soil flooding. *Photosynthetica*, 39(4), 515-520.
- Yordanova, R. Y, Uzunova, A. N, & Popova, L. P. (2005). Effects of short-term soil flooding on stomata behaviour and leaf gas exchange in barley plants. *Biologia Plantarum*, 49(2), 317-319.
- Young, A. J, & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 385(1), 20-27.
- Yousuf, P. Y, Hakeem, K. U. R, Chandna, R, & Ahmad, P. (2012). Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. In *Abiotic stress responses in plants* (pp. 149-158). Springer, New York, NY.
- Yu, M, Zhou, Z, Deng, X, Li, J, Mei, F, & Qi, Y. (2017). Physiological mechanism of programmed cell death aggravation and acceleration in wheat endosperm cells caused by waterlogging. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(1), 23.
- Zadehbagheri, M, Azarpanah, A, & Javanmardi, S. (2014). Proline metabolite transport an efficient approach in corn yield improvement as response to drought conditions. *Nature*, 566, 76-485.
- Zaefyzadeh, M, Quliyev, R. A, Babayeva, S. M, & Abbasov, M. A. (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of biology*, 33(1), 1-7.
- Zahir, A, Abbasi, B. H, Adil, M, Anjum, S, Zia, M, & Ul-Haq, I. (2014). Synergistic effects of drought stress and photoperiods on phenology and secondary metabolism of *Silybum marianum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 693–707.
- Zaidi, P. H, Rafique, S, Rai, P. K, Singh, N. N, & Srinivasan, G. (2004). Tolerance to excess moisture in maize (*Zea mays* L.): susceptible crop stages and identification of tolerant genotypes. *Field Crops Research*, 90 (2-3), 189–202.

- Zamocky, M, Jakopitsch, C, Furtmüller, P. G, Dunand, C, & Obinger, C. (2008). The peroxidase–cyclooxygenase superfamily: reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 72(2), 589-605.
- Zang, J, & Zang, X. (1994). Can early wilting of old leaves account for much of the ABA accumulation in flooded pea plants? *Journal of Experimental Botany*, 45(9), 1335-1342.
- Zelko, I. N, Mariani, T. J, & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.
- Zhang, G, Tanakamaru, K, Abe, J, & Morita, S. (2007a). Influence of waterlogging on some anti-oxidative enzymatic activities of two barley genotypes differing in anoxia tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(2), 171-176.
- Zhang, J, Jia, W, Yang, J, & Ismail, A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97(1), 111-119.
- Zhang, L, Hu, G, Cheng, Y, & Huang, J. (2008). Heterotrimeric G protein α and β subunits antagonistically modulate stomatal density in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental biology*, 324(1), 68-75.
- Zhang, M, Duan, L, Tian, X, He, Z, Li, J, Wang, B, & Li, Z. (2007b). Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 709-717.
- Zhang, S, Ji, J, Zhang, S, Xiao, W, Guan, C, Wang, G, & Wang, Y. (2020). Changes in the phenolic compound content and antioxidant activity in developmental maize kernels and expression profiles of phenolic biosynthesis-related genes. *Journal of Cereal Science*, 96, 103113.
- Zhong, L. Y, Bin, T, Yong-lian, Z, Ke-jun, M, Zhong, X. U, & Fa-Zhan, Q. I. U. (2010). Screening methods for waterlogging tolerance in maize (*Zea mays* L.) at seedling stage. *Agricultural Sciences in China*, 9, 362.

Zlatev, Z. S, Lidon, F. C, Ramalho, J. C, & Yordanov, I. T. (2006). Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum*, 50(3), 389-394.

Zlatev, Z, & Lidon, F. C. (2012). An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 57-72.

Zorov, D. B, Juhaszova, M, & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.

Internet stranice:

<https://bioquochem.com>

<https://slideplayer.com/slide/6660641/>

<http://plants.usda.gov>

<https://slideplayer.com/slide/14948246/>

<https://frontiersin.org>

<http://sciencedoing.blogspot.ba/2012/09/free-radicals-cause-and-concern.html>

<http://normsfarms.com/what-are-antioxidants/>

https://www.pioneer.com/us/agronomy/staging_corn_growth.html

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>

<https://www.mrizp.rs>

8. Prilozi

Prilog 1.

U Tabeli 8.1. (ZP 555) i 8.2. (ZP 606) su prikazane srednje vrednosti i standardne devijacije koncentracije H₂O₂, MDA, katehina, galne kiseline, malvidina te aktivnost SOD, CAT i POX izmerenih u vodnom suficitu kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su vodnom suficitu bile izložene u trajanju od 6 h, 24 h, 72 h, i 144 h.

U Tabeli 8.3. su prikazane koncentracije pojedinačnih polifenola oba testirana hibrida kukuruza.

Grafički prikazi i toplotne mape ovih parametara se nalaze u poglavlju Rezultati i diskusija.

Tabela 8.1. Parametri izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu 6 h, 24 h, 72 h i 144 h kod ZP 555 hibrida kukuruza. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD.

Parametri	Jedinice	Eksperimentalne grupe				
		Kontrola	6 h	24 h	72 h	144 h
Koncentracija H ₂ O ₂	[$\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$]	0,509 \pm 0,034 ^c	0,842 \pm 0,036 ^{a*}	0,634 \pm 0,073 ^{b*}	0,534 \pm 0,019 ^{c*}	0,563 \pm 0,030 ^{bc*}
Koncentracija MDA	[$\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$]	5,762 \pm 1,596 ^{ab*}	4,171 \pm 1,774 ^b	5,964 \pm 0,519 ^{b*}	7,761 \pm 0,351 ^a	5,483 \pm 0,743 ^{b*}
Aktivnost SOD	[Relativne jedinice mgprot ⁻¹ x10 ⁶]	0,963 \pm 0,015 ^{b*}	0,867 \pm 0,016 ^{bc*}	1,107 \pm 0,122 ^b	1,557 \pm 0,039 ^{a*}	0,300 \pm 0,039 ^c
Aktivnost CAT	[$\mu\text{mol mg}^{-1}\text{FW min}^{-1}$]	0,014 \pm 0,006 ^{ab}	0,015 \pm 0,004 ^a	0,008 \pm 0,002 ^{b*}	0,016 \pm 0,004 ^a	0,017 \pm 0,005 ^a
Aktivnost POX	[$\mu\text{mol mg}^{-1}\text{FW min}^{-1}$]	0,186 \pm 0,022 ^c	0,252 \pm 0,022 ^{a*}	0,200 \pm 0,014 ^{bc*}	0,220 \pm 0,006 ^{b*}	0,293 \pm 0,020 ^{a*}
Koncentracija katehin	[mg g ⁻¹ FW]	0,297 \pm 0,001 ^b	0,270 \pm 0,001 ^{b*}	1,406 \pm 0,058 ^{a*}	0,320 \pm 0,003 ^{b*}	0,305 \pm 0,013 ^{b*}
Koncentracija galne kiseline	[mg g ⁻¹ FW]	0,124 \pm 0,001 ^b	0,138 \pm 0,001 ^{b*}	0,206 \pm 0,001 ^{a*}	0,154 \pm 0,002 ^{b*}	0,089 \pm 0,001 ^{b*}
Koncentracija malvidin	[mg g ⁻¹ FW]	0,013 \pm 0,001 ^b	0,014 \pm 0,001 ^{b*}	0,016 \pm 0,001 ^{ab*}	0,017 \pm 0,001 ^{a*}	0,013 \pm 0,001 ^b

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Tabela 8.2. Parametri izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom suficitu 6 h, 24 h, 72 h i 144 h kod ZP 606 hibrida kukuruza. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD.

Parametri	Jedinice	Eksperimentalne grupe				
		Kontrola	6 h	24 h	72 h	144 h
Koncentracija H ₂ O ₂	[$\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$]	0,494 \pm 0,032 ^{ab}	0,607 \pm 0,038 ^{a*}	0,411 \pm 0,077 ^{bc*}	0,382 \pm 0,009 ^{c*}	0,385 \pm 0,067 ^{c*}
Koncentracija MDA	[$\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$]	6,016 \pm 2,021 ^{c*}	3,156 \pm 0,142 ^e	7,120 \pm 0,459 ^{b*}	7,829 \pm 0,195 ^a	3,870 \pm 0,226 ^{d*}
Aktivnost SOD	[Relativne jedinice mgprot ⁻¹ x10 ⁶]	0,633 \pm 0,022 ^{b*}	0,925 \pm 0,136 ^{a*}	0,902 \pm 0,014 ^{ab}	0,805 \pm 0,137 ^{ab*}	0,288 \pm 0,094 ^c
Aktivnost CAT	[$\mu\text{mol mg}^{-1}\text{FW min}^{-1}$]	0,019 \pm 0,002 ^a	0,032 \pm 0,006 ^a	0,019 \pm 0,001 ^{a*}	0,017 \pm 0,006 ^a	0,026 \pm 0,005 ^a
Aktivnost POX	[$\mu\text{mol mg}^{-1}\text{FW min}^{-1}$]	0,216 \pm 0,025 ^c	0,434 \pm 0,019 ^{a*}	0,170 \pm 0,013 ^{d*}	0,227 \pm 0,010 ^{c*}	0,323 \pm 0,016 ^{b*}
Koncentracija katehin	[mg g ⁻¹ FW]	0,316 \pm 0,004 ^b	0,336 \pm 0,0001 ^{a*}	0,291 \pm 0,008 ^{b*}	0,308 \pm 0,014 ^{b*}	0,328 \pm 0,004 ^{b*}
Koncentracija galne kiseline	[mg g ⁻¹ FW]	0,106 \pm 0,002 ^b	0,186 \pm 0,001 ^{a*}	0,100 \pm 0,001 ^{b*}	0,123 \pm 0,001 ^{b*}	0,122 \pm 0,001 ^{b*}
Koncentracija malvidin	[mg g ⁻¹ FW]	0,015 \pm 0,001 ^b	0,020 \pm 0,001 ^{a*}	0,0125 \pm 0,001 ^{b*}	0,013 \pm 0,001 ^{b*}	0,0123 \pm 0,001 ^{b*}

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Tabela 8.3. Koncentracija pojedinačnih polifenola upotrebom metode UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) izloženih vodnom suficitu u trajanju od 6, 24, 72 i 144 sati.

Hibridi	Tretmani	Hininska kiselina	Protokatehnična kiselina	Kafeična kiselina	Deoksiloganinska kiselina	Rutin	Viteksin	p-Kumarična kiselina	Narcisin	Ferulična kiselina	Ruzmarinska kiselina	Eriodiktol	Hispidulin	Izorhamnetin
ZP 555	Kontrola	0,956	0,517	1,691	0,408	5,674	10,519	48,744	2,392	22,333	1,106	1,074	0,667	2,547
	6h	0,000	1,150	1,357	0,347	2,764	6,266	42,973	1,342	12,605	0,253	0,824	0,355	1,570
	24h	0,000	0,988	1,866	0,357	4,887	11,332	60,753	1,310	27,003	0,557	1,643	0,647	2,466
	72h	0,000	0,000	1,230	0,241	4,432	10,467	41,439	1,682	31,346	0,268	0,756	0,321	1,766
	144h	0,000	0,000	2,023	0,000	2,905	9,550	58,963	2,680	28,243	0,709	2,436	0,882	4,046
ZP 606	Kontrola	0,000	0,537	1,216	0,208	3,679	9,411	35,245	0,879	21,101	0,310	0,750	0,286	1,222
	6h	0,000	0,669	1,597	0,144	3,295	13,194	46,984	1,528	17,079	0,331	1,137	0,446	1,992
	24h	0,000	0,575	1,344	0,000	2,907	5,431	38,210	0,682	20,893	0,309	0,946	0,344	1,265
	72h	0,000	1,095	2,249	0,000	4,034	6,363	44,719	1,340	26,030	0,188	0,780	0,316	1,469
	144h	0,000	0,000	2,470	0,472	3,546	12,520	63,665	0,816	36,703	0,246	1,271	0,498	1,876

Prilog 2.

U Tabelama 8.4. (ZP 555) i 8.5. (ZP 606) su prikazane srednje vrednosti i standardne devijacije relativnog sadržaja vode, koncentracije H₂O₂, MDA, prolina, katehina, galne kiseline, malvidina te aktivnost SOD, CAT, APX i POX izmerenih u vodnom deficitu kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su vodnom deficitu bile izložene u trajanju od 8 i 15 dana.

U Tabeli 8.6. su prikazane koncentracije pojedinačnih polifenola oba tetsirana hibrida kukuruza.

Grafički prikazi i toplotne mape ovih parametara se nalaze u poglavlju Rezultati i diskusija.

Tabela 8.4. Parametri izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu 8 i 15 dana kod ZP 555 hibrida kukuruza, Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD.

Parametri	Jedinice	Eksperimentalne grupe		
		Kontrola	8 dana	15 dana
Relativni sadržaj vode (RWC)	[%]	89,70 \pm 4,751 ^a	89,30 \pm 10,933 ^a	67,10 \pm 2,585 ^b
Koncentracija H ₂ O ₂	[μ mol g ⁻¹ FW]	0,38 \pm 0,091 ^b	0,90 \pm 0,296 ^{a*}	0,52 \pm 0,076 ^{ab*}
Koncentracija MDA	[μ mol g ⁻¹ FW]	2,17 \pm 0,394 ^b	3,78 \pm 1,035 ^{ab*}	4,10 \pm 0,102 ^a
Koncentracija prolina	[mg g ⁻¹ FW]	26,48 \pm 0,798 ^{a*}	18,30 \pm 1,494 ^{b*}	21,23 \pm 1,549 ^b
Aktivnost SOD	[Relativne jedinice mgprot ⁻¹ x10 ⁶]	0,23 \pm 0,070 ^{b*}	0,53 \pm 0,181 ^a	0,79 \pm 0,123 ^{a*}
Aktivnost CAT	[μ mol mg ⁻¹ FW min ⁻¹]	0,01 \pm 0,001 ^b	0,02 \pm 0,005 ^a	0,03 \pm 0,001 ^a
Aktivnost APX	[μ mol mg ⁻¹ FW min ⁻¹]	0,29 \pm 0,015 ^a	0,30 \pm 0,103 ^a	0,26 \pm 0,007 ^{a*}
Aktivnost POX	[Relativne jedinice mgprot ⁻¹ x10 ⁶]	0,54 \pm 0,137 ^{b*}	0,65 \pm 0,218 ^b	1,05 \pm 0,156 ^{a*}
Koncentracija katehin	[mg g ⁻¹ FW]	0,64 \pm 0,045 ^a	0,25 \pm 0,025 ^b	0,21 \pm 0,008 ^{b*}
Koncentracija galne kiseline	[mg g ⁻¹ FW]	0,32 \pm 0,047 ^a	0,13 \pm 0,047 ^a	0,12 \pm 0,004 ^{a*}
Koncentracija malvidin	[mg g ⁻¹ FW]	0,03 \pm 0,017 ^a	0,02 \pm 0,005 ^a	0,01 \pm 0,001 ^a

Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razlik.

Tabela 8.5. Parametri izmerena kod kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu 8 i 15 dana kod ZP 606 hibrida kukuruza, Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD.

Parametri	Jedinice	Eksperimentalne grupe		
		Kontrola	8 dana	15 dana
Relativni sadržaj vode (RWC)	[%]	89,50 \pm 2,629 ^a	81,50 \pm 4,448 ^a	58,60 \pm 9,794 ^b
Koncentracija H ₂ O ₂	[μ mol g ⁻¹ FW]	0,37 \pm 0,043 ^{ab}	0,48 \pm 0,096 ^{a*}	0,35 \pm 0,002 ^{b*}
Koncentracija MDA	[μ mol g ⁻¹ FW]	1,92 \pm 0,246 ^b	2,22 \pm 0,353 ^{b*}	3,88 \pm 0,174 ^a
Koncentracija prolina	[mg g ⁻¹ FW]	21,83 \pm 2,958 ^{a*}	15,86 \pm 1,311 ^{b*}	21,57 \pm 2,301 ^a
Aktivnost SOD	[Relativne jedinice mgprot ⁻¹ x10 ⁶]	0,11 \pm 0,042 ^{b*}	0,35 \pm 0,113 ^a	0,38 \pm 0,1636 ^{a*}
Aktivnost CAT	[μ mol mg ⁻¹ FW min ⁻¹]	0,01 \pm 0,005 ^a	0,02 \pm 0,006 ^a	0,02 \pm 0,013 ^a
Aktivnost APX	[μ mol mg ⁻¹ FW min ⁻¹]	0,26 \pm 0,054 ^a	0,30 \pm 0,066 ^a	0,31 \pm 0,004 ^{a*}
Aktivnost POX	[Relativne jedinice mgprot ⁻¹ x10 ⁶]	0,67 \pm 0,032 ^{a*}	0,71 \pm 0,044 ^a	0,67 \pm 0,023 ^a
Koncentracija katehin	[mg g ⁻¹ FW]	0,26 \pm 0,070 ^a	0,25 \pm 0,011 ^a	0,24 \pm 0,011 ^a
Koncentracija galne kiseline	[mg g ⁻¹ FW]	0,25 \pm 0,053 ^a	0,20 \pm 0,075 ^a	0,21 \pm 0,059 ^{a*}
Koncentracija malvidin	[mg g ⁻¹ FW]	0,02 \pm 0,004 ^a	0,02 \pm 0,005 ^a	0,02 \pm 0,003 ^a

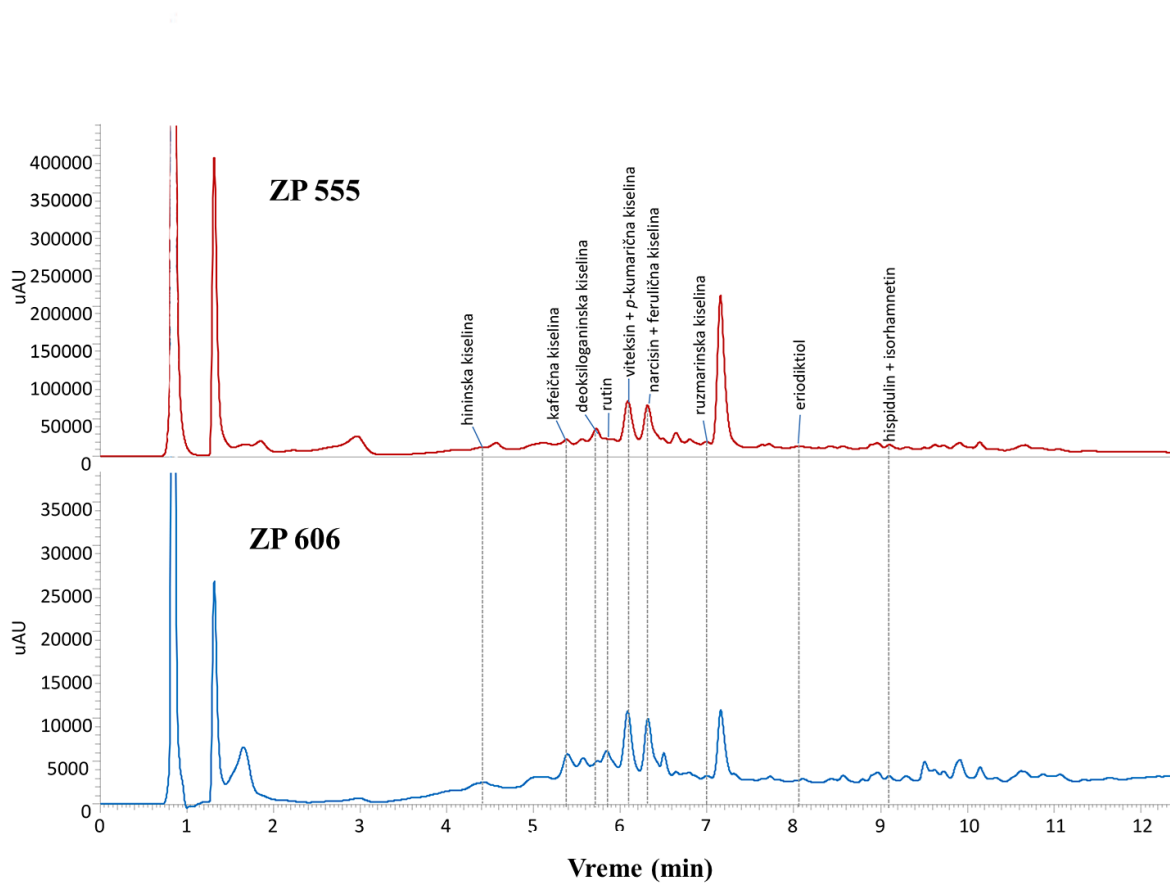
Postojanje statistički značajnih razlika je dobijeno primenom Studentovog t-testa za nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u okviru istog hibrida su predstavljene slovima dok su razlike između hibrida predstavljene zvezdicama. Uzorci bez zvezdica nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Tabela 8.6. Koncentracija pojedinačnih polifenola upotrebom metode UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS kod dva hibrida kukuruza (ZP 555 i ZP 606) izloženih vodnom deficitu u trajanju od 15 dana.

Hibridi	Tretmani	Hininska kiselina	Protokatehnična kiselina	Kafeična kiselina	Deoksiloganinska kiselina	Rutin	Viteksin	p-Kumarična kiselina	Narcisin	Ferulična kiselina	Ruzmarinska kiselina	Eriodiktiol	Hispidulin	Izorhametin
ZP 555	Kontrola	0,000	0,848	1,420	0,557	2,379	8,030	45,197	0,704	30,149	0,760	0,715	0,279	1,156
	15 dana	0,000	1,238	1,231	0,728	2,661	4,255	42,763	1,043	17,020	0,611	0,615	0,328	1,356
ZP 606	Kontrola	0,000	0,671	2,722	0,562	3,936	11,949	40,738	0,785	29,828	1,172	0,819	0,313	1,406
	15 dana	0,000	0,872	1,787	0,494	3,307	14,587	35,554	0,867	18,739	0,723	0,702	0,302	1,382

Prilog 3.

Na Slici 8.1 su prikazani UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS² hromatogrami ekstrakata dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606.



Slika 8.1. Hromatogrami ekstrakata dva hibrida kukuruza, ZP 555 i ZP 606, dobijeni upotrebom UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS² metode.

Biografija autora



Nataša Lukić je rođena 11. decembra 1991. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Gimnaziju je završila u Zvorniku, sa odličnim uspehom. Osnovne studije Biologije upisala je 2010. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, a završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,41. Master akademske studije, smer Biohemija upisala je 2014. godine na Studijskom programu Biologija, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u

Banjoj Luci. Masterirala je 2016. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i tezom: “Karakterizacija proteina skeletne muskulature i jetre bezrepih vodozemaca Republike Srpske“.

Na Departmanu za Biologiju i Ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu upisala je doktorske studije, studijski program Doktor bioloških nauka, 2016. godine. U toku osnovnih, master i doktorskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture, Ministarstva za naučnotehnoški razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske, te stipendista Fonda „dr Milan Jelić“.

Tokom drugog i trećeg ciklusa studija radila je u više osnovnih škola te u Gimnaziji Banja Luka kao profesor biologije. Od 2015. do 2016. godine bila je angažovana na projektu finansiranom od strane Ministarstva za naučnotehnoški razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske, pod nazivom: „Toksični efekat pesticida terbutilazina na antioksidativne enzime i proteine eritrocita ljudi *in vitro*“, te od 2018. do 2019. na projektu „Istraživanja biohemijskih mehanizama odgovora biljaka na hipoksiju i povećanu koncentraciju reaktivnih vrsta kiseonika pod uticajem poplave i suše“ a zatim od 2019. do 2020. na projektu „Biohemijska karakterizacija antioksidativnog kapaciteta fenolnih jedinjenja iz odabranih ljekovitih biljaka sa područja Republike Srpske“, u svojstvu saradnika. Učestvovala je u više radionica i obuka (TAIEX i TEMPUS) organizovanih od strane Evropske komisije.

U toku doktorskih studija boravila je na IAESTE stručnoj praksi na Institutu za pejzažnu ekologiju i ekologiju biljaka Univerziteta Hohenheim u Štutgartu, Nemačkoj. Od 2019. godine je na ovom Institutu zaposlena kao naučni saradnik na projektu: „Transgeneracijska plastičnost biljaka nastala kao rezultat klimatskih promena. Testiranje biljne memorije pri hroničnom i povremenom vodnom suficitu i deficitu, te različitim tipovima kompeticije“, finansiranom od strane Nemačke fondacije za istraživanja.

Do sada je objavila četiri rada u međunarodnim naučnim časopisima i tri u nacionalnim naučnim časopisima te bila saradnik na tri nacionalna i jednom međunarodnom projektu. Autor je i ko-autor nekoliko saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

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

Назив пројекта/истраживања
Ефекти водног дефицита и суфицита на антиоксидативни систем код два хибрида кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет б) Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Новом Саду. Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом су део пројекта под називом: „Истраживање биохемијских механизма одговора биљака на хипоксију и повећану концентрацију реактивних врста кисеоника насталих под утицајем поплаве и суше“ (19/6-020/961-118/18) финансираног од стране Министарства за научнотехнолошки развој и високо образовање и информационо друштво Републике Српске.
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Докторска дисертација
1.2 Врсте података а) квантитативни 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 <u>преглед литературе</u> ж) мапа, навести врсту з) остало: описати <u>лабораторијски експерименти и мерења</u>
1.3 Формат података, употребљене скале, количина података
1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке: а) Excel фајл, датотека <u>.csv, .xlsx</u> б) SPSS фајл, датотека в) PDF фајл, датотека <u>.pdf</u> д) Текст фајл, датотека <u>.docx</u> е) JPG фајл, датотека <u>.jpg, .tiff</u> ф) Остало, датотека

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли 149 (водни суфицит) и 80 (водни дефицит), укупно 229 варијабли
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, течна хроматографија (HPLC/DAD i

UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS), електрофореза, оксиметар, рН метар.

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?

а) 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) 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

Наташа Лукић, e-mail: natasa.lukic104@gmail.com

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

Наташа Лукић, e-mail: natasa.lukic104@gmail.com

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

Наташа Лукић, e-mail: natasa.lukic104@gmail.com
