

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ana Z. Milosavljević

**Uticaj delimičnog isušivanja korenova
na ekspresiju *NCED*, *TAO1* i *EIL1* gena i
rastenje divljeg tipa i *flacca* mutanta
paradajza (*Lycopersicon esculentum*
Mill.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana Z. Milosavljević

**The effects of partial root-zone drying
on expression of *NCED*, *TAO1* and *EIL1*
genes and growth in tomato wild-type
and *flacca* mutant (*Lycopersicon
esculentum* Mill.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentori:

dr Radmila Stikić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet,
Univerzitet u Beogradu

dr Aneta Sabovljević, docent
Biološki fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Angelina Subotić, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša
Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem se svim članovima ove i drugih institucija koji su mi pružili pomoć i podršku tokom izrade ove disertacije.

Srdačno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Radmili Stikić, na pruženim mogućnostima za rad, nesebičnoj pomoći u interpretaciji rezultata i konsultacijama tokom izrade disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Aneti Sabovljević i dr Angelini Subotić na korisnim savetima i predlozima koje su dale prilikom čitanja disertacije.

Hvala mojoj porodici, prijateljima i svima koji su bili uz mene tokom izrade ove disertacije

Uticaj delimičnog isušivanja korenova na ekspresiju *NCED*, *TAOI* i *EILI* gena i rastenje divljeg tipa i *flacca* mutanta paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Rezime

Cilj ovog istraživanja je bio karakterizacija fizioloških procesa koji su u osnovi regulacije rastenja i razvića biljaka paradajza pod dejstvom delimičnog isušivanja korenova (Partial root-zone drying -PRD), ali i regulisanog deficita navodnjavanja (Regulated deficit irrigation - RDI). Cilj je bio i da se u ova ispitivanja uključe i molekularna istraživanja, koja bi, uz analizu procesa rastenja i drugih fizioloških procesa (vodnog režima, razmene gasova, akumulacije i distribucije stres hormona ABA, kao i usvajanja i distribucije jona), značajno doprinela razumevanju PRD i RDI efekata na paradajz. Zato je praćena ekspresija gena uključenih u biosintetski put ABA (*TAOI* i *NCEDI*) i transdukciju signala etilena (*EILI*). Eksperimentalni model u ovim istraživanjima je bio paradajz (*Lycopersicon esculentum* Mill.), kao kultura koja ima značajne potrebe za vodom i kod koje suša može da izazove značajne efekte na rastenje i razviće. Odabrani su divlji tip (WT), sorta Ailsa Craig, i mutant *flacca* koji se odlikuje smanjenom sintezom hormona ABA. Biljke paradajza divljeg tipa i mutanta *flacca* su nakon prokljavanja presađene u posebno dizajnirane saksije, koje su podeljene na dve polovine plastičnom pločom, čime je omogućeno razdvajanje korenovog sistema u dva hidraulično izolovana kompartimenta. Biljke su gajene u komercijalnom supstratu (Klasmann Potground H) u uslovima fitotronske komore (temperatura dan/noć 26/17 °C, relativna vlažnost vazduha 60%, osvetljenost (PAR) 250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ i dužina fotoperioda od 14 h). Količina vode u supstratu je merena pomoću TDR proba (Time domain reflectometer, TRASE, Soil Moisture Equipment Corp., USA). Primenjivana su tri različita tretmana zalivanja. Optimalno navodnjavanje (Full irrigation - FI) - supstrat u celoj rizosferi je svaki dan zalivan do optimalnog vodnog kapaciteta, odnosno, sadržaja vode u supstratu od 36%. Delimično isušivanje korenovog sistema (PRD) - supstrat u polovini korenovog sistema je zalivan do optimalnog vodnog kapaciteta, dok u drugoj polovini nije zalivan sve dok se sadržaj vode u supstratu nije spustio na 18-20%, kada je vršena inverzija strana zalivanja. Regulisani deficit navodnjavanja (RDI) - biljke su zalivane do vrednosti vode u supstratu od 18%. Vodni potencijal listova i otvorenost stoma su mereni u danu PRD okreta (promene strane zalivanja korena). Ukupni potencijal vode u listu (Ψ_l) meren je u komori pod pritiskom (Soil Moisture

Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA). Provodljivost stoma je merena aparatom porometrom (AP4, Delta-T, Cambridge, U.K.). Na kraju ekperimenta izmerena je sveža i suva masa korena, stabla i listova i određen odnos suve mase izdanka i korena. Sadržaj abscisinske kiseline u listovima je analiziran ELISA testom uz korišćenje visoko specifičnog monoklalnog antitela (MAC 252). Apsorpcija je očitavana na ELISA čitaču (Sunrise, Tecan) na 405nm. Sadržaj Ca, Mg, Fe, Mn, Zn i Cu određivan je atomsko-apsorpcionom spektrofotometrijom, K plamenofotometrijski, dok je sadržaj N određivan metodom po Kjeldahl-u. Ekspresija gena je praćena u danu PRD okreta. Izolacija RNK je urađena primenom RNA-ase plant mini kit-a (Quiagen, Germany). Za sintezu cDNK je korišćen First strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Lithuania). Ekspresija gena je praćena primenom Real Time-PCR (SYBR-Green tehnika; RT-PCR 7500, Applied Biosystems, UK). Rezultati su pokazali da je PRD tretman, kao i RDI, doveo do redukcije rasteanja biljaka. Kada su u pitanju sveža i suva masa organa, kod biljaka divljeg tipa je došlo do redukcije u oba tretmana, dok je kod *flacca* mutanta, PRD tretman doveo do povećanja biomase, za razliku od RDI, koji je doveo do redukcije. Analiza rasta vegetativnih organa je pokazala da su biljke *flacca* mutanta bile značajno niže (za *ca* 40%) i sa manjom obrazovanom svežom i suvom masom u odnosu na divlji tip. Analiza vodnog režima biljaka, na osnovu rezultata potencijala vode (ψ) u listovima i količine vode u supstratu, je pokazala da su RDI biljke bile izložene većem stepenu stresa u odnosu na PRD biljke i to kod oba ispitivana genotipa. Rezultati dnevne dinamike provodljivosti stominih ćelija (g_s) su ukazali da se reakcije na PRD tretman mogu okarakterisati kao reakcije bržeg odgovora, a reakcije na RDI kao reakcije sporijeg odgovora stominih ćelija na sušu. Analiza reakcija stominih ćelija u odnosu na promene potencijala vode u listovima je pokazala da su reakcije zatvaranja stoma, u uslovima RDI, pratile opadanje potencijala vode u listovima, što ukazuje da su ove reakcije stominih ćelija kod oba genotipa rezultat dejstva hidrauličnih signala. Rezultati analize efekata PRD tretmana na vodni režim biljaka su pokazali da su hemijski signali bili odgovorni za reakcije stominih ćelija. Kod divljeg tipa, veći efekat na povećanje sadržaja ABA u listovima imao je PRD tretman, dok je kod *flacca* mutanta to bio RDI tretman. Slično povećanje u sadržaju ABA u listovima kod oba genotipa prilikom PRD tretmana ukazuje da *flacca* mutacija ne pogađa transport ABA iz korena u nadzemni deo. Merenja koncentracije jona, uglavnom, nisu pokazala značajan efekat primenjenih sistema deficita navodnjavanja na usvajanje, akumulaciju

ili distribuciju jona. Najznačajniji je bio uticaj PRD koji je kod oba genotipa ubrzao translokaciju Mn iz korena u listove, što može biti od značaja za adaptivne metaboličke reakcije biljaka na PRD, jer je Mn značajan antioksidacioni agens. Takođe je PRD doveo i do veće akumulacije N kod *flacca* mutanta. Molekularna ispitivanja ekspresije gena u listovima su pokazala razlike između tretmana, tokom njihovog trajanja i između ispitivanih genotipova. Analiza ekspresije sva tri gena u PRD tretmanu je pokazala genotipske razlike. Sličan obrazac ekspresije *TAOI*, *NCED* i *EILI* kod biljaka divljeg tipa ukazuje na moguće sinergističko dejstvo signalnih puteva za ABA i etilen. Sličan trend promena nije pronađen kod *flacca* mutanta. Redukovana *NCED* i značajna *EILI* ekspresija verovatno reflektuje porast u produkciji etilena, koji može da utiče na signale i biosintezu ABA. Kod RDI tretmana, obrazac ekspresije gena u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta je bio sličan, što ukazuje na mogućnost sinergističkog efekta signalnih puteva za ABA i etilen. Pošto je kod *flacca* mutanta bila izražena ekspresija *TAOI* gena i utvrđena akumulacija ABA u listovima, naši rezultati su pokazali da neki drugi gen iz *TAO* familije, a ne *TAOI* kodira enzim abscisinsku aldehidnu oksidazu kod *flacca* mutanta. Generalno, svi ovi rezultati su doprineli razumevanju efekata suše indukovane PRD i RDI tretmanima na paradajz. U budućim istraživanjima bi trebalo analizirati više gena, posebno onih koji su uključeni u put biosinteze i/ili u signalnu mrežu ABA i etilena.

Ključne reči: delimično isušivanje korenova, regulisani deficit irigacije, paradajz, vodni režim, ABA, joni, *NCED*, *TAOI*, *EILI*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj: 582.926.2-11:577.218(043.3)

The effects of partial root-zone drying on expression of *TAOI*, *NCED* and *EIL1* genes and growth in tomato wild-type and *flacca* mutant (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Abstract

The aim of presented PhD thesis was to investigate the physiological mechanisms that are in the base of tomato growth and development under partial root-zone drying (PRD) and regulated deficit irrigation (RDI). Investigations included plant growth, water regime, gas exchange, abscisic acid (ABA) content in the leaves of tomato and ions content in different tomato plant organs. The aim of presented PhD thesis was, also, to assess the expression of *TAOI*, *NCED* and *EIL1* genes in the leaves of tomato under drought treatments of PRD and RDI. The investigated genes are involved in the biosynthesis and signaling pathways of abscisic acid (ABA) and ethylene as key hormones in the reactions of plants to drought. Experiments were done with tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.), wild type (Ailsa Craig) and *flacca* mutant. Tomato was chosen because of its significant needs for water and because drought may have significant effects on its growth and development. Tomato mutant *flacca*, which is chosen for investigation, is defective in the last step of ABA biosynthesis. As a consequence, the endogenous level of ABA in *flacca* tissues is significantly lower than in wild type. Tomato plants wild type (WT) and *flacca* mutant were raised from seed and transplanted into 10 L pots (one plant per pot) filled with commercial compost (Klasmann Potground H) in a growth chamber (photoperiod was 14 h; light intensity at plant level $250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperature 26/17 °C and relative humidity 60%). For PRD experiments the pots were specially designed in such a way that they were separated with plastic sheets into two equally sized compartments. Washed roots of the seedlings were divided into approximate halves and repotted into these two hydraulically separated compartments. The volumetric soil water content (θ) of both compartments of each pot was measured daily using TDR probes (time domain reflectometer, TRASE, Soil Moisture Equipment Corp., USA). After transplantation, plants were subjected to following irrigation treatments: 1) full irrigation (FI), in which the whole root system was irrigated to full substrate holding capacity (θ of 36%); 2) partial root-zone drying (PRD), where one half of the root was irrigated to reach θ of 36% while the other half was allowed to dry, and the irrigation was shifted when θ of the dry side had decreased

to 18-20%. 3) deficit irrigation (RDI), in which water was evenly applied to the whole root system to reach θ of 18%. Leaf water potential and stomatal conductance were measured in day when PRD shift occurred. Leaf water potential was measured by pressure chamber (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA); while stomatal conductance was measured by porometer (AP4, Delta-T, Cambridge, U.K.). At the end of experimental period, fresh and dry weight of roots, stems and leaves were measured and the shoot/root ratio determined. Measurement of ABA content in the leaves of investigated plants was done by ELISA method using a MAC 252 monoclonal antibody for ABA. Plate contents were read at 405 nm by ELISA reader (Sunrise, Tecan). Ca, Mg, Fe, Mn, Cu and Zn content in leaves and roots was measured by atomic absorption spectrophotometry, while N content determination was done by Kjeldahl method. Samples of leaves, for gene expression analysis, were taken after every PRD shifting period. Isolation of RNA was done by using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. For synthesis of cDNA, the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania) was used according to the manufacturer's instructions. Expression of these genes was monitored by using RT-PCR (Real Time PCR SYBR-Green technique, RT-PCR 7500, Applied Biosystems, UK). Results showed that PRD treatment, like RDI, reduced plant growth. In WT plants, both treatments reduced plant organs biomass, while in *flacca* RDI reduced plant organs biomass and PRD increased it. Analysis of plant vegetative organs growth showed that *flacca* plants were smaller and with smaller fresh and dry biomass, compared to WT. Analysis of plant water regime, done on the base of leaf water potential and soil water content measurements, showed that RDI plants were exposed to higher degree of stress, compare to PRD plants, in both genotypes. Results in daily dynamics of stomatal conductance suggested that reactions to PRD treatment may be characterized as faster response reactions, while to RDI as slower response reactions. Measurements of leaf water potential and stomatal conductance showed that the effects of regulated water deficit on stomatal closure were a consequence of plant water regime changes (hydraulic effect). The effects of partial root-zone drying on stomatal closure were a consequence of drought induced chemical effects. Drought also induced increase in leaf ABA content. In WT plants, bigger effect on increase in leaf ABA content had PRD, while in *flacca* it was RDI. The similar increase of leaf ABA content in both genotypes under PRD conditions indicated that the *flacca* mutation did not affect ABA transport

from the root to the shoot. Deficit irrigation treatments did not showed significant effect on ions content and distribution. The most significant effect was effect of PRD, which increased Mn translocation from roots to leaves. This may be important for adaptive metabolic reactions of plants to PRD, because Mn is a powerful natural antioxidant. PRD also increased N content and translocation in *flacca* plants. Results of gene expression confirmed differences in expression of investigated genes under applied treatments, during the treatments` duration as well as between investigated WT and *flacca* plants. The most significant differences between WT and *flacca* were found under PRD treatment. The similar expression pattern of all genes in WT plants could indicate synergistic signaling pathways for ABA and ethylene. In *flacca* reduced *NCED* and significant *EIL1* expression might reflect the increase in ethylene production, which could influence ABA signaling and production occurred under PRD. Under RDI treatment the pattern of all genes in WT and *flacca* leaves was similar and once again it raises the possibility of synergistic effect of ABA and ethylene signaling pathways. Since *flacca* mutant showed both expression of *TAOI* gene and accumulation of ABA in the leaves, our results indicated that other gene from *TAO* family and not *TAOI* are responsible for encoding enzyme abscisic aldehyde oxidase in *flacca*. In general, all these results provide novel insights into the understanding of tomato response to drought induced by PRD and RDI. Future investigations should analyze more genes that underlie the ABA and ethylene biosynthetic and/or signaling pathways.

Key words: Tomato, partial root-zone drying, regulated deficit irrigation, water regime, ABA content, ions, *NCED*, *TAOI*, *EIL1*

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 582.926.2-11:577.218(043.3)

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Suša (vodni deficit)	1
1.2	Utjecaj suše na fiziološke procese	2
1.2.1	Rastenje i razviće biljaka	3
1.2.2	Fotosinteza i metabolizam	4
1.2.3	Vodni režim i reakcije stominih ćelija	5
1.2.3.1	Reakcije stominih ćelija	6
1.2.4	Fitohormoni	7
1.2.4.1	Abscisinska kislina (ABA)	8
1.2.4.2	Etilen	10
1.2.5	Transport i funkcija mineralnih soli	11
1.3	Molekularne osnove dejstva suše	1
1.3.1	ABA-nezavisna genska ekspresija	14
1.3.2	ABA-zavisna genska ekspresija	14
1.4	Percepcija i transdukcija signala suše	16
1.4.1	Hidraulični i hemijski signali	16
1.4.2	Percepcija i prenos signala na ćelijskom nivou	17
1.4.2.1	Percepcija i transdukcija ABA signala	18
1.4.2.2	Transdukcija signala etilena	19
1.5	Mehanizmi tolerancije na sušu	21
1.5.1	Izbegavanje suše	21
1.5.2	Izbegavanje niskih vrednosti potencijala vode	21
1.5.3	Tolerancija na niske vrednosti potencijala vode	21
1.6	Metode deficita navodnjavanja-praktična primena fiziologije stresa	23
1.7	Paradajz kao objekat istraživanja	26
2	CILJ RADA	29

3	MATERIJAL I METODE	30
3.1	Biljni materijal i postavka eksperimenta	30
3.2	Ispitivani parametri i metode	32
3.2.1	Fiziološka istraživanja	32
3.2.1.1	Određivanje sadržaja abscisinske kiseline	34
3.2.1.2	Merenje sadržaja mineralnih elemenata u biljnom materijalu	36
3.2.2	Molekularna istraživanja	38
3.3	Statistička analiza podataka	40
4	REZULTATI	41
4.1	Fiziološka istraživanja	41
4.1.1	Sadržaj vode u zemljištu	41
4.1.2	Rastenje biljaka	43
4.1.2.1	Visina	43
4.1.2.2	Sveža masa stabla, listova i korena	45
4.1.2.3	Suva masa stabla, listova i korena	49
4.1.3	Odnos suve mase korena i izdanka	53
4.1.4	Vodni režim biljaka	55
4.1.4.1	Potencijal vode listova	55
4.1.4.2	Provodljivost stoma	57
4.1.5	Sadržaj abscisinske kiseline u listovima	63
4.1.6	Sadržaj biogenih elemenata u različitim organima biljaka paradajza	64
4.2	Molekularna istraživanja	41
5	DISKUSIJA	81
6	ZAKLJUČCI	95
7	LITERATURA	99

1 UVOD

1.1 Suša (vodni deficit)

Voda je od vitalnog značaja za rast i razvoj biljaka. Vodni stres utiče na širok dijapazon reakcija biljaka, od ekspresije gena i promena u metabolizmu na nivou ćelije do promena u brzini rasta i produktivnosti. Suša, sa *meteorološke tačke gledišta*, se definiše kao period u kome je količina taloga manja od neke normalne vrednosti koja predstavlja višegodišnji prosek za dato područje, a sa *poljoprivredne*, kao period suvog vremena koji izaziva značajno smanjenje prinosa date gajene biljne vrste od prosečnog za odgovarajuće područje (Katz i Glantz, 1977). *Fiziološki*, suša, odnosno vodni deficit, se definiše kao količina vode koja datoj biljci u određenoj fazi ontogeneze nedostaje do potpunog zasićenja tkiva vodom, odnosno, smanjenje turgidnosti tkiva u odnosu na maksimalnu vrednost. Vodni deficit najčešće nastaje kao posledica smanjene količine vode u zemljištu - *zemljišna suša*, ali može nastati i kao rezultat poremećaja u usvajanju vode - *fiziološka suša*.

Najčešće do vodnog deficita dolazi kada transpiracija premašuje nivo usvojene vode. Za razliku od drugih stresnih uticaja, stres izazvan sušom ne nastaje odjednom, već se uglavnom razvija polako i vremenom povećava intenzitet. Često je sušenje zemljišta povezano sa jakom evaporacijom izazvanom sušenjem vazduha i visokom solarnom radijacijom (Larcher, 1995), pa se termin stres suše koristi da opiše stres koji dolazi od kombinacije ovih faktora.

Zbog sve više izraženih klimatskih promena i smanjenja raspoloživih vodnih resursa i to kako za urbane, tako i za industrijske ili poljoprivredne potrebe, suša predstavlja sve veći svetski problem. Posebno je značajan efekat na poljoprivrednu proizvodnju jer smanjuje prinos gajenih biljaka širom sveta (Foolad, 2007). Smatra se da u poređenju sa svim ostalim vrstama abiotskog stresa kojima su biljke izložene u životnoj sredini, suša najviše utiče na rast i produktivnost (Shao *i sar.*, 2008), kao i da gubici prinosa u poljoprivrednoj proizvodnji uzrokovani sušom verovatno premašuju gubitke uzrokovane svim ostalim faktorima zajedno (Foolad, 2007). U našoj zemlji suša je, takođe, značajan stresni činilac, a njeno negativno dejstvo se posebno odražava na gajenje i produktivnost poljoprivrednih kultura, posebno povrtarskih (Spasova *i sar.*,

1997). Na primer, u istočnoj Srbiji (Timočkoj regiji), poslednjih 20 godina sezonska količina padavina opala je za 120 mm, tako da sada iznosi oko 250 mm (Dragović, 1999). Ovakvo stanje je posledica porasta temperatura u toku ljetnjeg perioda. Broj dana sa temperaturom od 30 °C sada je 50, a 1970. godine bio je samo 12, dok je broj dana sa temperaturom od 35 °C sada 10, a 1970. godine bio je 0 (Dodig *i sar.*, 2002). Suša utiče ne samo na agro-ekosisteme, već i na prirodne ekosisteme i to posebno šumske. Zbog svega toga, ispitivanja efekata suše i metoda i postupaka za njeno prevazilaženje dobijaju na sve većem značaju.

Stres suše se najlakše može ukloniti navodnjavanjem biljaka. U svetu se navodnjava, međutim, samo 10% poljoprivrednih površina i to najviše u razvijenim zemljama i ne očekuje se da će se u doglednom vremenu te površine povećavati (FAO, 2002). To je poseban problem za zemlje u razvoju. Kao posledica globalne promene klime i prekomernih zagađenja životne sredine, danas postoji konstantan problem u snabdevanju vodom i njenim kvalitetom, kako za urbane i industrijske, tako i za poljoprivredne namene. Stoga će povećano navodnjavanje imati za posledicu i značajno smanjenja postojećih rezervi vode, a što može da se, potom, odrazi i na postojeće ekosisteme. U skladu sa tim, ali i klimatskim promenama koje sve više utiču na količinu i potrošnju vode (IPCC, 2007), raspoloživa količina vode za potrebe gajenja i navodnjavanja biljaka se mora veoma racionalno koristiti.

1.2 Uticaj suše na fiziološke procese

Nedostatak vode utiče na niz fizioloških procesa kod biljaka i dovodi do različitih metaboličkih promena. Suša ima efekat na skoro sve procese u biljci, uključujući sintezu proteina i komponenti ćelijskog zida, deobu i rastenje ćelija, aktivnost enzima i hormona, reakcije stoma, fotosintezu i respiraciju, senescenciju i abscisiju. Efekat stresa zavisi od njegovog intenziteta, dužine trajanja, biljne vrste i njene otpornosti ili faze ontogeneze na koju stres deluje. Biljke su na sušu mnogo osetljivije u generativnoj nego u vegetativnoj fazi. Pojava suše i visoke temperature u fazi formiranja cvetova, gametogeneze, oprašivanja, formiranja plodova, semena ili krtola može u značajnoj meri da umanju prinos gajenih biljaka. To je poseban problem za poljoprivrednu proizvodnju u onim klimatskim uslovima gde se smanjena količina padavina i visoka temperatura u toku letnjih meseci poklapaju sa fazama najveće osetljivosti biljaka na sušu.

1.2.1 Rastenje i razviće biljaka

Od svih fizioloških procesa rastenje listova je najosetljivije na opadanje potencijala vode u tkivima. Rastenje listova je rezultat procesa deobe i stvaranja novih ćelija i povećanja njihove veličine ekspanzijom ili elongacijom. Suša utiče na rastenje preko redukcije broja (Schuppler *i sar.*, 1998) i /ili veličine ćelija (Đaković i Jovanović, 2003). Smanjena hidraulična provodljivost tkiva u suši izaziva opadanje gradijenta potencijala između ksilema i okolnih elongacionih ćelija, što za posledicu ima opadanje potencijala turgora u ćelijama koje rastu (Boyer, 1968). Efekat suše je rezultat biofizičkih i biohemijskih promena, prvenstveno na nivou ćelijskog zida. Biofizičke promene su vezane za hidrauličke i mehaničke osobine ćelijskog zida, dok su biohemijske uslovljene aktivnošću nekoliko enzima ćelijskog zida (ksiloglukan endotransglikozilaze – XET, peroksidaze, ekspanzina) (Bacon *i sar.*, 1998; Jovanović *i sar.*, 2004), kanala akvaporina kao i dejstvom hormona (abscisinske kiseline i auksina) i pH vrednosti apoplasta (Hsiao i Xu, 2000). Opadanje potencijala turgora u ćelijama redukuje plastičnost (ekstenzibilnost) ćelijskog zida i povećava aktivnost enzima koji usporavaju rastenje ćelijskog zida (posebno peroksidaze). Smatra se da je to povezano sa inaktivacijom plazma membranski vezane H^+ -ATPaze i smanjenim zakišeljavanjem zida. Za razliku od korena, kod listova se osmotska prilagođavanja javljaju sporije, tako da suša dovodi do upadljive inhibicije rasta. Listovi koji rastu u suši obično su sitniji, deblji i sa niskim sadržajem azota.

Iako je brzina raste biljke generalno inhibirana u uslovima suše, vodni deficit obično ima manji uticaj na rastenje korena (Sharp *i sar.*, 2004). Često koren raste i pri vrlo negativnom vodnom potencijalu zemljišta (Sharp *i sar.*, 1988), dok male promene u potencijalu dovode do inhibicije raste izdanka. Povećanje odnosa koren/izdank javlja se u uslovima suše, ali i u uslovima nedostatka hranljivih materija i visokih temperatura zemljišta nepovoljnih za optimalno funkcionisanje korena (Poorter i Nagel, 2000). Moguće da je različita reakcija korena i izdanka pri opadanju potencijala vode strategija biljke da izbegne preteranu dehidraciju za vreme suše (Sharp i Davies, 1989).

Nastavljanje raste korena u uslovima umerenog stresa je posledica brzog osmotskog prilagođavanja koji omogućava delimični oporavak turgora i ponovno uspostavljanje gradijenta vodnog potencijala za usvajanje vode (Hsiao i Xu, 2000). Smatra se da je ova sposobnost korena da nastavi usvajanje vode i u uslovima niskog

vodnog potencijala korelisana sa akumulacijom (abscisinske kiseline) ABA (Wilkinson i Davies, 2002). Povećana koncentracija ABA u ksilemu dovodi do povećanja rastjenja korenovog sistema, a takođe, može uticati na povećanje hidraulične provodljivosti korena (Hose *i sar.*, 2002; Aroco *i sar.*, 2003), što može imati veliki uticaj na brzinu usvajanja vode u uslovima suše (Kang *i sar.*, 1998; Kang *i sar.*, 2002). Novija istraživanja pokazuju da i enzimi ekspanzini imaju značajnu ulogu u održavanju rastjenja primarnog korena u uslovima suše i to nezavisno od koncentracije ABA.

Na nivou ćelije, suša dovodi do promena u propustljivosti ćelijskih membrana i ultrastrukturi citoplazme. Pad turgora dovodi do promena u hidrataciji i prostornoj organizaciji proteinskih molekula. Kao rezultat dehidratacije, dolazi do smanjenja zapremine ćelije, povećanja koncentracije molekula u protoplazmi, promene viskoznosti i smanjenja aktivnosti enzima i razmene materija između ćelijskih kompartmenata.

Kao posledica suše menjaju se i neke morfo-anatomske osobine koje mogu da imaju funkciju u zaštiti i prilagođavanju biljaka suši. Tu spadaju osobine kao što su veći broj stoma po jedinici površine, manja veličina stoma, sitnije ćelije epidermisa, deblja kutikula, sitnije ćelije mezofila, veći broj slojeva ćelija u mezofilu lista, veća debljina lista, ali i razviće vaskularnih tkiva i izražena vaskularizacija (Luković *i sar.*, 2009; Gumenyuk i Musatenko, 2006; Kulkarni *i sar.*, 2007).

1.2.2 Fotosinteza i metabolizam

Na nivou cele biljke stres suše, obično, dovodi do smanjenja intenziteta fotosinteze i usporavanja rasta, u vezi sa promenama u metabolizmu ugljenika i azota.

Pored rastjenja ćelija, proces fotosinteze je, takođe, veoma osetljiv na sušu. Efekat suše na fotosintezu može biti posledica *stomaterne* ili *ne-stomaterne* inhibicije. Poznato je da, kao posledica smanjenja sadržaja vode u zemljištu, dolazi do opadanja potencijala turgora u listovima, što dovodi do smanjenja stepena otvorenosti stoma i fiksacije CO₂, što uslovljava tzv. *stomaternu inhibiciju fotosinteze* (Chaves *i sar.*, 2002). *Nestomaterna inhibicija* ostvaruje se preko efekta na svetlosne reakcije i transport elektrona, a posebno aktivnost fotosistema II (PSII), kao i na metaboličke reakcije fotosinteze i to posebno na aktivnost enzima u procesu karboksilacije i regeneracije akceptora.

Nedostatak vode utiče i na intenziviranje hidrolitičkih procesa, mobilizaciju skroba i povećanje količine supstrata za disanje, pre svega akumulacije monosaharida kao što su glukoza i fruktoza, usled povećane aktivnosti enzima invertaze (Trouverie *i sar.*, 2003). Suša utiče i na translokaciju asimilata, s obzirom da je transport preko floema zavisen od potencijala turgora, tako da pad vodnog potencijala inhibira transport asimilata iz nadzemnog dela u koren. Pored toga, usporeno je usvajanje hranljivih materija iz zemljišta, kao i njihov transport kroz biljku što se nepovoljno odražava na rastenje vegetativnih organa. Kako je rast korena i listova u kompeticiji za asimilate proizvedene u listovima, kao i za vodu i mineralne supstance usvojene korenom, u uslovima vodnog deficita rast nadzemnog dela biljke često biva inhibiran, a rast korena favorizovan u odnosu na rast listova. (Hsiao i Xu, 2000).

1.2.3 Vodni režim i reakcije stominih ćelija

Potencijal vode je osnovni parametar vodnog režima biljaka. Od vrednosti potencijala vode zavisi pravac kretanja vode u tzv. SPAC (soil - plant - atmosphere - continuum) sistemu, odnosno sistemu zemljište - biljka - atmosfera. Voda se kroz biljke spontano kreće od pozitivnijih ka negativnijim vrednostima potencijala vode sledeći hidraturni pad (opadanje vlažnosti) od zemljišta, korena, ka nadzemnim delovima biljaka i atmosferi. Pravac kretanja vode u biljnim ćelijama, tkivima ili između organa, takođe, sledi gradijent potencijala vode.

U vodnom režimu biljaka, ukupan potencijal vode se uglavnom razmatra kao rezultanta dejstva dve osnovne sile i to sile pritiska (turgora) i osmotske sile. To se može predstaviti sledećom jednačinom:

$$\Psi_1 = \Psi_t + \Psi_o$$

gde su:

Ψ_1 - ukupan potencijal vode u biljnim tkivima

Ψ_t - potencijal turgora (pritiska)

Ψ_o - osmotski potencijal

Vrednosti ukupnog potencijala vode u biljnim tkivima su, uglavnom, negativne kao i vrednosti osmotskog potencijala, dok su vrednosti potencijala turgora pozitivne i uslovima suše ili dehidracije dostižu nulte vrednosti. Potencijal turgora nastaje kao

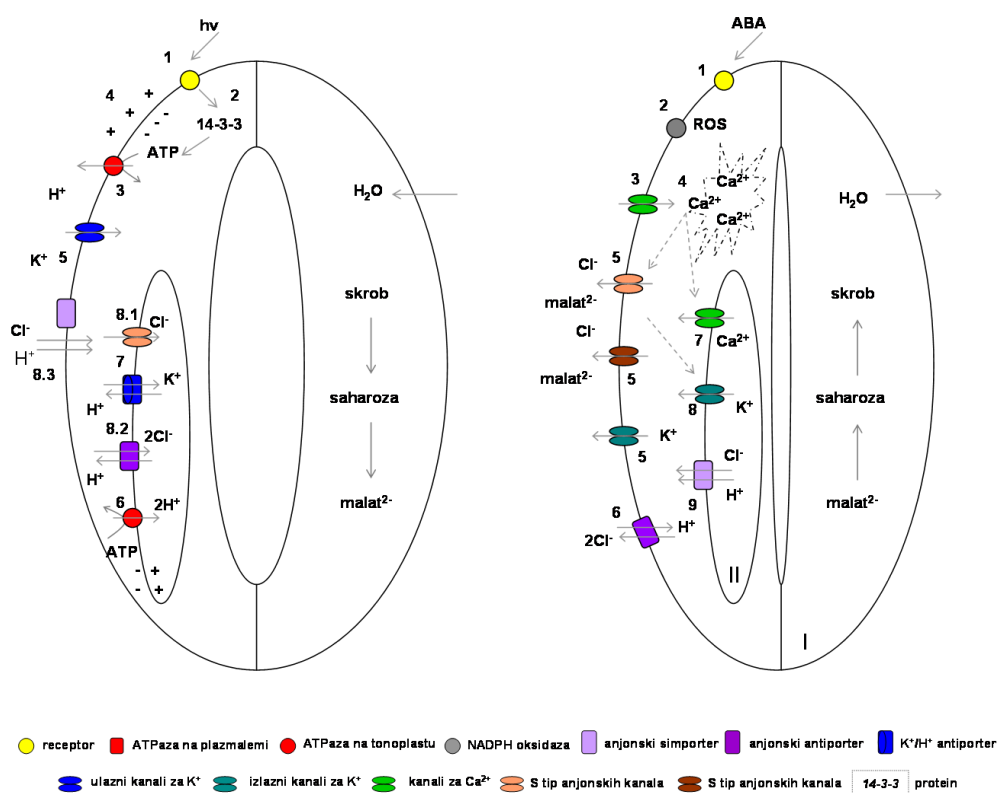
rezultat delovanja spoljašnjeg hidrostatičkog pritiska na vodu u zidovima i membranama biljnih ćelija, a održanje pozitivnih vrednosti turgora je od posebnog značaja za rastenje ćelija i njihovo funkcionisanje. Kada turgor dostigne nulte vrednosti dolazi do kolapsa ćelije.

1.2.3.1 Reakcije stominih ćelija

U transpiraciji se „gubi“ 90% od usvojene vode od strane biljaka, a samo 10% ili manje koristi za potrebe fizioloških procesa. Regulacijom otvorenosti stoma, biljke moraju u suši da regulišu dva suprotna zahteva - maksimalnu fotosintezu uz minimalnu transpiraciju. Zahvaljujući specifičnosti svoje građe, metaboličkih i molekularnih procesa, stome su u stanju da aktivno reaguju na tzv. signale stresa suše (ali i ostalih stresnih faktora) i da u skladu sa njima integrišu i kontrolišu stepen svoje otvorenosti, što može da utiče na fiziološke odgovore biljaka. Stomine ćelije na signale stresa u kraćem vremenskom intervalu reaguju tako što smanjuju transpiraciju, ali održavaju fotosintezu, a u slučaju dugotrajne suše svojim daljim zatvaranjem sprečavaju jaku dehidrataciju tkiva i tako pomažu preživljavanju. Te reakcije stominih ćelija se stoga definišu kao “primarna i sekundarna linija odbrana od suše“ (Kang i Zhang, 2004). Koliko su reakcije stoma složene, pokazuju rezultati da i povećana transpiracija može da predstavlja poželjnu adaptivnu reakciju biljaka jer doprinosi njihovom hlađenju, što je od posebnog značaja za uslove gajenja biljaka gde visoka temperatura prati sušu (Morison *i sar.*, 2008). Takođe, od reakcija stoma zavise transport jona i translokacija asimilata.

Stome reaguju na različite endogene i egzogene stimuluse, koji menjajući turgor ovih ćelija dovode do njihovog otvaranja ili zatvaranja. Promene turgora su rezultat fluksa katjona i anjona kroz jonske kanale na plazmalemi i tonoplastu stominih ćelija (Roelfsema *i sar.*, 2004). Stimulusi za otvaranje stoma, kao što je npr. svetlost, aktiviraju izlazak H^+ jona iz citoplazme stominih ćelija preko plazma-membranske H^+ -ATPaze, što dovodi do hiperpolarizacije membrana i do influksa K^+ i anjona (Cl^-) kroz odgovarajuće jonske kanale (Slika 1.1). Nasuprot tome, u uslovima suše, akumulira se ABA koja sprečava influks ili pojačava efluks K^+ i anjona (Cl^- i $malat^{2-}$), a kao posledica tih promena javlja se redukcija turgora i zatvaranje stoma (Wilkinson i Davies, 2002). Jabučna kiselina (malat) se obrazuje iz skroba koji je nastao kao rezultat fotosinteze u stominim ćelijama. Takođe, ABA indukuje porast kalcijuma u citoplazmi,

koji dalje formira kalcijumski talas (McAinsh *i sar.*, 1995). Ispitivanja više autora su pokazala da povećana koncentracija citoplazmatskog $[Ca^{2+}]_i$ dovodi do depolarizacije membrane aktivirajući K^+_{aut} i inhibirajući K^+_{in} kanale. Noviji rezultati su ukazali i na prisustvo oscilatornih promena u koncentraciji $[Ca^{2+}]_i$, a takođe i to da od kinetike oscilatornih promena zavisi reakcija otvaranja ili zatvaranja stoma (Allen *i sar.*, 2000). Na kompleksnost reakcija stominih ćelija ukazuju i rezultati Prokić *i sar.* (2005, 2006). Oni su pokazali da je otvorenost stominih ćelija rezultat složene interakcije Ca^{2+} , ABA i pH, kao i to da ti odnosi zavise i od biljne vrste.



Slika 1.1 Mehanizmi otvaranja i zatvaranja stoma (Prokić, 2009)

1.2.4 Fitohormoni

U uslovima vodnog stresa dolazi i do promena u koncentraciji i balansu fitohormona koji mogu da indukuju različite fiziološke efekte kod biljaka u zavisnosti od njihove osetljivosti na stres, faze rastjenja i razvića kao i od stepena stresa kojem su izložene. Tako pri stesu suše dolazi do smanjene sinteze auksina, citokinina i giberelina, ali i povećanja ABA i etilena.

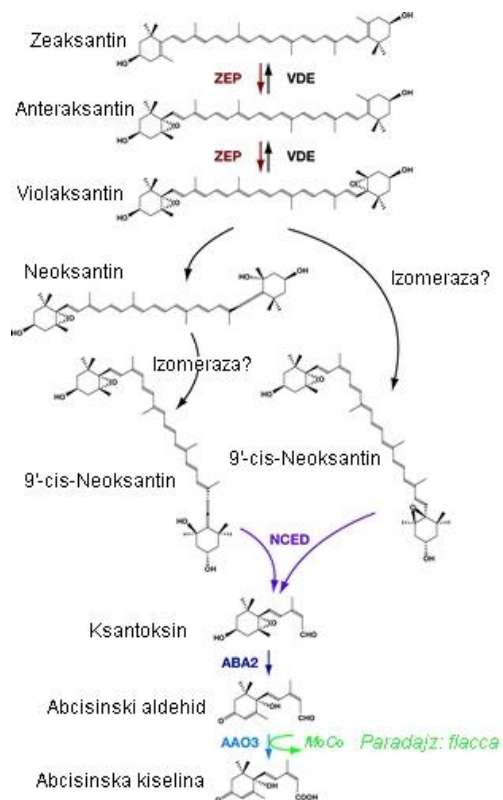
1.2.4.1 Abscisinska kislina (ABA)

Poznato je da biljni hormon abscisinska kiselina ima značajnu ulogu u reakciji biljaka na različite abiotičke i biotičke stresne faktore, koji se zbog toga i naziva „hormon stresa“. Ovaj hormon predstavlja i neku vrstu univerzalnog hemijskog signala stresa koji se transportuje na većim rastojanima. U prvim fazama suše kada zemljište tek počinje da gubi vodu i kada potencijal listova još uvek nije pretrpeo značajnije promene, počinje da se akumulira ABA u korenu. Iz korena ona prelazi u ksilemske elemente i transportuje se kroz nadzemni deo stabla do listova i stoma (Zhang i Davies, 1990). Veliki broj radova govori o povećanju ABA u ksilemskom soku prilikom delovanja suše (Wilkinson i Davies, 2002; Davies *i sar.*, 2005). Taj intezitet, najverovatnije, predstavlja rezultantu nastalu na osnovu prisutne količine ABA u spoljašnjoj sredini i one unutar same biljke. ABA je prisutna u spoljašnjoj sredini, tj. zemljištu, gde dospeva kao produkt mikroorganizama, ali je prisutna i zbog eksudacije iz korena (Jiang i Hartung, 2007). Unutar same biljke, abscisinska kiselina nastaje u procesima sinteze. Neka ispitivanja su pokazala da se ABA sintetiše na rastojanju od 3 cm od samog vrha korena (Zhang i Davies, 1987). Na osnovu mnogobrojnih činjenica može se pretpostaviti da porast ABA u ksilemskom soku nastaje zbog: povećane sinteze ABA u korenu i translokacije, povećane recirkulacije ABA floemom, prevođenja prekursora-ABA u ABA i redukcije katabolizma za ABA.

Biosinteza ABA i geni uključeni u biosintezu

ABA nastaje preko izopentenil-difosfata, od kojih se kasnije dobijaju intermedijeri fitoen i likopen. Ovi intermedijeri ciklizacijom se prevode u β karoten, koji daljom hidroksilacijom daje zeaksantin, od kojeg se preko anteraksantina formira violaksantin. Ove reakcije se odvijaju pod katalitičkim delovanjem enzima epoksidaze. Epoksidaza kod *Arabidopsis thaliana* je kodirana *ABA1* (*ABA deficit 1*) genom, a kod duvana na njegovim ortologom *ABA2*. Takođe, protein koji se sintetiše na *ABA4* genu utiče na prevođenje trans-violaksantina u trans-neoksantin, a pretpostavlja se da tokom dehidratacije on ima važnu ulogu tokom *de novo* sinteze ABA. Takođe u hloroplastu se produkuje 9'cis-epoksikarotenoid dioksidgenaza, *NCED* (*9'cis-epoxycarotenoid dioxygenase*) koja cis-neoksantin prevodi u citoplazmatski ksantoksin, a ovaj korak je tzv. prvi obavezani korak u sintezi ABA. Kod paradajza, 9'cis-epoksikarotenoid dioksidgenaza je kodirana *LeNCED1* genom. Da bi se iz ksantoksina dobio abscisinski aldehid potrebno je prisustvo dehidrogenaze/reduktaze, koja se kod *A. thaliana* sintetiše

na *ABA2* genu. Konačno aldehid se prevodi u kiselinu pod delovanjem aldehidne oksidaze, koja predstavlja enzim dobijen sa *AAO3* gena. Aktivnost aldehidne oksidaze zavisi od molibdenskog kofaktora, u koji se prvo ugradi sumpor delovanjem sulfuraze sa *ABA3* gena (Wasilewsk *i sar.*, 2008). Tako, zbog smanjenog prevođenja aldehida u alkohol je smanjenja i sinteza ABA kod *flacca* mutanata paradajza (Taylor *i sar.*, 1988). *AAO3* može biti uključen kao sastavni deo odgovora na dejstvo suše. Praćenjem lokalizacije ovog enzima došlo se do podatka da je on prisutan u vrhu korena, parenhimskim ćelijama koje se nalaze uz ksilemske elemente, kao i u ćelijama koje su pridružene floemu. Takođe, unutar stoma je izmerena manja aktivnost enzima *AAO3*, dok je njegovo prisustvo u većoj meri zapaženo u neposrednoj okolini stoma (Koiwai *i sar.*, 2004). Kod paradajza su pronađena tri funkcionalna *AO* gena (*TAO1*, *TAO2* i *TAO3*) i dva pseudogena (Min *i sar.*, 2000; Ori *i sar.*, 1997). *TAO1* (tomato aldehyde oxidase 1) je kao i *TAO3* lociran na hromozomu 11. *TAO* geni su mnogo srodniji međuobno (Min *i sar.*, 2000) nego sa bilo kojim od *Arabidopsis* *AO* gena, tako da nije moguće predvideti, na osnovu poređenja sa *Arabidopsis* sekvencama, koji od *TAO* gena kodira za ortolognu ABA-specifičnu aldehidnu oksidazu (Slika 1.2).



Slika 1.2 Biosinteza ABA (prema Nambara i Marion-Poll, 2005)

Efekti ABA

Mnogobrojni efekti i odgovori biljaka na ABA se mogu generalno podeliti na dve kategorije i to: brze i spore. Od brzih efekata ABA najviše su proučavani efekti na stomine ćelije (Mansfield *i sar.*, 1990; Bahrin *i sar.*, 2002; Liu *i sar.*, 2003). Najveći deo aktivnosti se ostvaruje u sporim reakcijama gde ABA deluje na ekspresiju gena.

ABA ima direktnu ulogu u regulaciji rasta listova pod uticajem suše. ABA može uticati na mehaničke osobine ćelijskog zida i tako uticati na smanjenje ekstenzibilnosti zida (Van Volkenburg i Davies, 1983). Neki rezultati ukazuju da ABA inhibira protonsku pumpu na nivou plazmamembrane i na taj način sprečava acidifikaciju ćelijskog zida koja je neophodna za izduživanje. Prema postojećim rezultatima, ABA može uticati na redukciju sadržaja Ca^{2+} u citoplazmi ćelija listova, što može uticati na brzinu sinteze komponenata ćelijskih zidova, kao što je hemiceluloza (Wakabayashi *i sar.*, 1991), a što dovodi do promena mehaničkih osobina ćelijskih zidova i promene u brzini rastenja (Cramer i Jones, 1996). Postoje i rezultati koji ukazuju da ABA povećava aktivnost peroksidaze ćelijskog zida i tako inhibira izduživanje ćelija (Bacon *i sar.*, 1998). ABA utiče i na promenu sastava proteina u ćelijskom zidu povećavajući ekspresiju gena za sintezu proteina bogatih prolinom (PRP) koji mogu inhibirati njegovu akstenzibilnost. Istraživanja su pokazala da postoji diferencijalna ekspresija gena za ovaj protein u biljnim organima koja uslovljava i različitu reakciju biljke, odnosno inhibiciju elongacije hipokotila, dok na elongaciju korena ima minimalan efekat. Povećanje ABA u suši utiče na preusmeravanje ugljenika iz listova koji su požuteli u mlade listove, koji zatim pokazuju viši nivo foto- i antioksidativne zaštite kako stres napreduje, tako da biljka nastavlja rast i sposobna je da se intenzivnije odupre stresu (Munne-Bosch i Alegre, 2004).

1.2.4.2 Etilen

Etilen je po mnogim karakteristikama izuzetna pojava među biljnim hormonima. Prvo, to je jedini hormon koji se na fiziološkoj temperaturi nalazi u gasovitom stanju. Drugo, svi ostali hormoni spadaju u grupe srodnih jedinjenja, dok je etilen jedina supstanca svoje vrste, koja se po biohemiji i fiziološkom dejstvu izdvaja kao samostalna jedinica. Pošto je u nekim procesima antagonist stimulatora rastenja, etilen se često svrstava među inhibitore, međutim to treba shvatiti uslovno. Na primer, etilen inhibira

rastenje stabla, ali stimuliše procese koji se dešavaju na kraju vegetacionog perioda, kao što je sazrevanje plodova, opadanje lišća i starenje.

Biosinteza etilena

Prekursor etilena je L-metionon, od čijih ugljenika 3 i 4 etilen postaje (Yang i Hoffman, 1984). Biosinteza uključuje dva ključna jedinjenja, S-adenozil metionin (SAM) i 1-amino-ciklopropan-1-karboksilnu kiselinu (ACC). Prva reakcija u biosintezi je proizvodnja SAM, koji se u drugom stupnju konvertuje u ACC koji je direktni prekursor etilena. ACC je vrlo važan stupanj u sintezi etilena i verovatno se on transportuje do ćelija koje proizvode etilen. Stupanj na kome se najčešće obavlja regulacija biosinteze etilena je ACC sintaza, usled čega je količina ACC ograničavajući faktor za proizvodnju etilena.

Efekti etilena

Etilen ima efekta na epinastiju, indukciju adventivnih korenova, cvetanje, opadanje listova i plodova, ali, najvažniju ulogu etilen ima u sazrevanju sočnih plodova. Postoje mnogobrojni podaci u literaturi koji pokazuju da je etilen regulator rasta biljaka u uslovima stresa suše. Nekoliko studija je ukazalo na važnost interakcije između ABA i etilena u razvoju i rastenu izdanaka i korena u uslovima suše. Tako, smanjena količina ABA u izdancima uslovljava etilenom indukovanu inhibiciju rastenja nadzemnog dela, dok veća koncentracija ABA u korenu sprečava da etilen inhibira rastenje korena (Sharp, 2002). Ovi rezultati objašnjavaju paradoksalne rezultate da su ABA deficitarni mutanti paradajza manjeg rasta i imaju manje listove od divljeg tipa, kao i da se rastenje listova i stabla može uspostaviti posle egzogene aplikacije ABA. Prema konceptu interakcije ABA i etilena u suši, uloga ABA je da „kontroluje“ da koncentracija etilena ne poraste i inhibira rastenje. Rezultati Sobeih *i sar.* (2004) sa divljim tipom i transgenim biljkama paradajza (ACO1AS- sa niskom stres-indukovanom produkcijom etilena) su pokazali da nema inhibicije rasta listova u posebnom tretmanu suše (partial root-zone drying-PRD), sugerišući da je povećana produkcija etilena u PRD tretmanu odgovorna za inhibiciju rasta listova.

1.2.5 Transport i funkcija mineralnih soli

Biljke usvajaju mineralne elemente uglavnom iz zemljišta, mada, imaju i mogućnost usvajanja preko listova. Iz korena, mineralne soli se u stablo prenose

transpiracionim tokom kroz ksilem. Međutim, ako je transpiracija bila intenzivna, višak soli se iz listova vraća u korenove floemom. Kalcijum se, međutim, kreće samo kroz ksilem i zadržava se u tkivu lista jer se vrlo slabo prenosi kroz elemente floema (Marschner, 1995). Većina soli, a naročito metali, se ne prenosi u slobodnom obliku, ali je izuzetak kalijum koji se uvek prenosi slobodan.

Soli i druge supstance, rastvorene u ksilemskom soku, kreću se kroz biljku pasivno, zajedno sa strujom koju povlači transpiracija. Tako, intenzitet transpiracije može znatno da utiče na snabdevanje nadzemnih delova biljke. Međutim, kada se u biljci transpiracija ograniči, nadzemni delovi, ipak, nisu izloženi nedostatku soli. Pojedini biljni organi, kojima su mineralne soli potrebne, apsorbuju soli iz ksilema, što snižava njihov osmotski potencijal, pa se izvesna količina vode, takođe, transportuje u tom pravcu. Tako, često delovi koji rastu, listovi, cvetovi, plodovi, predstavljaju atraktivne centre koji crpe mnoge supstance iz okolnih tkiva. Pokazano je da pravac kretanja soli koje se kreću floemom, određuju delovi biljke koji rastu. Tkiva koja sadrže rezerve ili listovi koji su završili rasteenje, imaju negativan hemijski potencijal tj. veću koncentraciju pojedinih jona; organi koji rastu, kao što su stablo i koren mlade biljke, mladi listovi, cvetovi i plodovi, imaju pozitivniji potencijal i usled toga se soli kreću niz gradijent potencijala (Marschner, 1995).

Azot je važan za izgradnju proteina i nukleinskih kiselina i najviše utiče na prinos biljaka (Marschner, 1995). Azot utiče i na vodni režim biljaka, jer u prisustvu dovoljne količine azota, biljke intenzivnije transpirišu. Nedostatak ovog elementa smanjuje veličinu i broj stoma po jedinici lisne površine.

Kalijum je verovatno jedini element koji se nikada ne ugrađuje u organska jedinjenja. Najviše ga ima u mladim listovima koji su metabolički vrlo aktivni. U biljci je vrlo pokretljiv i transportuje se uvek u organe koji rastu. Jon kalijuma je aktivator preko 40 enzima. Druga značajna uloga je njegovo učešće u membranskom transportu jer omogućava rad jonskih pumpi, tako da je značajan za pokrete stominih ćelija i transport kroz floem (Mengel i Kirkby, 2001). Kalijum je jedan od najvažnijih elemenata koji učestvuju u uspostavljanju osmotskog potencijala, što osim za pokrete stominih ćelija, ima velikog značaja za rasteenje ćelija. Kao takav, vrlo je značajan u vodnom režimu biljaka.

Kalcijum, pored mnogih drugih značajnih funkcija, igra važnu ulogu u regulaciji ćelijskih aktivnosti, tako što vezivanjem za kalmodulin aktivira mnoge enzime, u prvom redu kinaze i fosfataze, koje kasnije fosforiluju druge enzime (Mengel i Kirkby 2001). Tako, jon kalcijuma ima veoma važnu ulogu kao sekundarni mesendžer u ćeliji. Sa tačke vodnog režima biljaka, vrlo je važan, jer učestvuje u reakcijama stominih ćelija.

Magnezijum učestvuje u građi molekula hlorofila, a joni magnezijuma su aktivatori velikog broja enzima (Marschner, 1995). Gvožđe ima nezamenljivu funkciju u različitim redoks sistemima, a aktivator je i nekih enzima (Marschner, 1995). Mangan je aktivator mnogih enzima, a u hloroplastima ulazi u sastav kompleksa za oslobađanje kiseonika (Mengel i Kirkby 2001). Bakar učestvuje u nekim redoks sistemima, a sastavni je deo citohrom oksidaze i plastocijanina (Mengel i Kirkby 2001). Cink je sastavni deo alkoholne dehidrogenaze i aktivator karbonske anhidraze (Mengel i Kirkby 2001).

1.3 Molekularne osnove dejstva suše

Biljke odgovaraju i adaptiraju se na vodni deficit i na ćelijskom i molekularnom nivou, na primer, akumulacijom osmolita i proteina uključenih u toleranciju stresa. Veliki broj gena različite funkcije je indukovano u uslovima suše (Shinozaki *i sar.*, 2003; Bartels i Sunkar, 2005; Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005). Većina produkata ovih gena ima ulogu u toleranciji i odgovoru na sušu na ćelijskom nivou. Postoje dva regulatorna sistema sušom indukovane genske ekspresije, ABA-zavisni i ABA-nezavisni (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005). Analiza ekspresije gena indukovanih ABA-om je otkrila da neki geni zahtevaju biosintezu proteina za svoju indukciju ABA-om, što sugeriše postojanje bar dva nezavisna puta između produkcije endogene ABA-e i genske ekspresije tokom stresa.

Cis-aktivni i *trans*-aktivni regulatorni elementi koji učestvuju u ABA-nezavisnoj i/ili ABA-zavisnoj genskoj ekspresiji indukovanoj sušom su precizno analizirani na molekularnom nivou (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005).

Promoter gena indukovano sušom, visokim salinitetom i hladnoćom, *RD29A/COR78/LTI78*, sadrži dva glavna *cis*-aktivna elementa, ABRE (ABA-responsive element) i DRE (dehydration-responsive element)/CRT (C-repeat), oba uključena u ekspresiju gena indukovanih stresom (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki,

1994, 2005). ABRE ima ulogu u ABA-zavisnoj, a DRE/CRT u ABA-nezavisnoj genskoj ekspresiji u odgovoru na abiotički stres (Slika 1.2).

1.3.1 ABA-nezavisna genska ekspresija

Nekoliko gena je indukovano sušom, visokim salinitetom i hladnoćom kod *abi* i *aba* mutanata, što znači da ne zahtevaju ABA za svoju ekspresiju, ali odgovaraju na egzogenu ABA. Glavni *cis*-aktivni element u ABA-nezavisnoj genskoj ekspresiji je DRE koji sadrži konzerviranu sekvencu A/GCCGAC. Transkripcioni faktori koji se vezuju za DRE elemente pripadaju ERF/AP2 familiji (Slika 1.3). Izolovani su *CBF/DREB1* i *DREB2* (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005). Produkti *CBF/DREB1* gena, koji su brzo i kratkotrajno indukovani uslovima stresa usled hladnoće, aktiviraju ekspresiju target stres-induktivnih gena (Jaglo-Ottosen *i sar.*, 1998; Liu *i sar.*, 1998; Kasuga *i sar.*, 1999). Ekspresija *CBF/DREB1* gena kod transgenih biljaka povećava toleranciju na smrzavanje, sušu i visok salinitet, što pokazuje da *CBF/DREB1* proteini učestvuju u razvoju tolerancije na stres bez modifikacije (Liu *i sar.*, 1998).

DREB2 geni su indukovani dehidratacijom i mogu aktivirati druge gene uključene u toleranciju suše (Liu *i sar.*, 1998). Ekspresija *DREB2* gena kod transgenih biljaka ne poboljšava toleranciju na stres, što ukazuje na postojanje post-translacione aktivacije *DREB2* proteina (Liu *i sar.*, 1998). *DREB2* protein je eksprimiran u normalnim uslovima i aktivira se osmotskim stresom kroz post-translacionu modifikaciju u ranim fazama odgovora na osmotski stres.

Nekoliko sušom indukovanih gena ne odgovara ni na niske temperature ni na ABA tretman, ukazujući na postojanje još jednog ABA-nezavisnog puta regulacije odgovora na stres usled dehidratacije. Ovi geni uključuju *ERD1* koji je indukovani senescencijom (Nakashima *i sar.*, 1997).

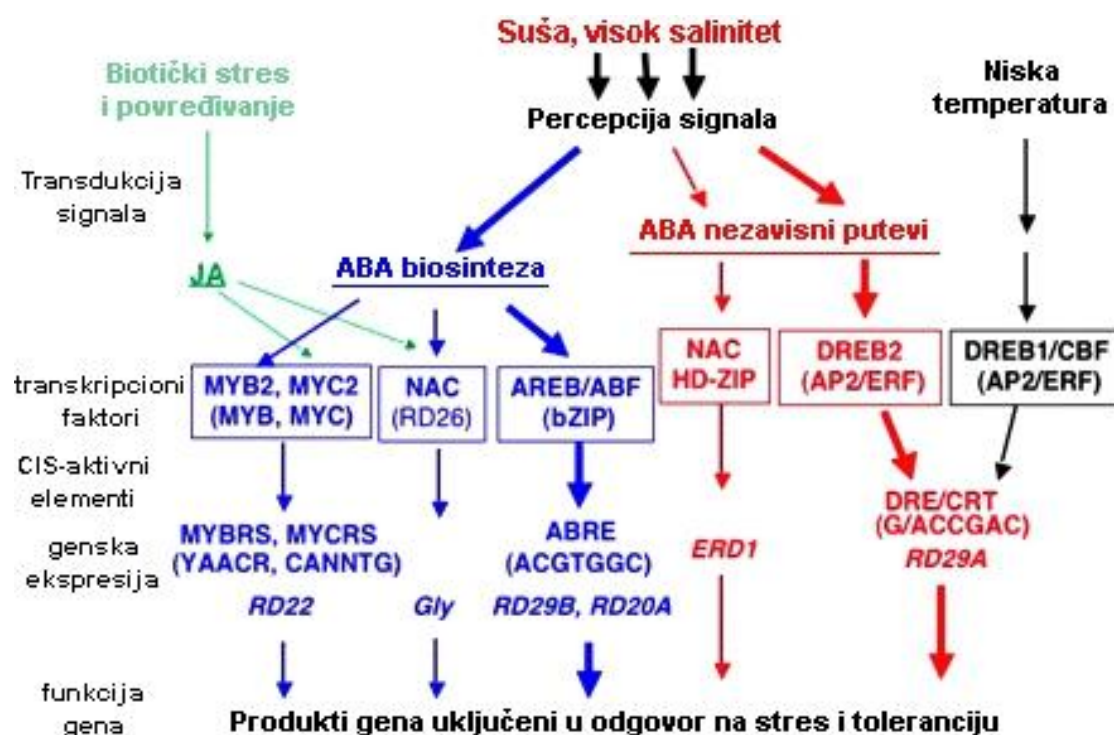
Analizom *ERD1* promotera identifikovana su dva *cis*-aktivna elementa (Simpson *i sar.*, 2003). DNK-vezujući proteini koji interaguju sa ovim *cis*-elementima su identifikovani kao NAC transkripcioni faktori (Tran *i sar.*, 2004).

1.3.2 ABA-zavisna genska ekspresija

Nivo endogene ABA značajno raste kod mnogih biljaka u uslovima suše i visokog saliniteta (Ingram i Bartels, 1996; Bray, 1997). U jednom od ABA-zavisnih

puteva geni indukovani sušom ne zahtevaju biosintezu proteina za svoju ekspresiju. Ovi dehidratacijom-induktivni geni sadrže ABRE (ACGTGGC) kao *cis*-aktivni element u svom promotorskom regionu (Slika 1.2). Dva ABRE motiva su važni *cis*-aktivni elementi koji kontrolišu ABA-zavisnu ekspresiju *RD29B* gena (Uno *i sar.*, 2000). Dva bZIP transkripciona faktora AREB/ABF se vezuju za ABRE aktivirajući ABA-zavisnu gensku ekspresiju (Choi *i sar.*, 2000; Uno *i sar.*, 2000). AREB/ABF proteini zahtevaju ABA-posredovan signal za svoju aktivaciju, što je pokazano njihovom smanjenom aktivnošću kod *aba* i *abi* mutanata. Ovo se dešava verovatno zbog ABA-zavisne fosforilacije AREB/ABF proteina.

Indukcija *RD22* gena je posredovana ABA-om i zahteva biosintezu proteina za ABA-zavisnu ekspresiju. MYC transkripcioni faktor, *atMYC2*, i MYB transkripcioni faktor, *atMYB2*, se vezuju za *cis*-elemente u promoteru *RD22* i kooperativno aktiviraju *RD22* (Abe *i sar.*, 1997, 2003). MYC i MYB proteini se sintetišu nakon akumulacije ABA, definišući svoju ulogu u kasnijim fazama odgovora na stres.



Slika 1.3 Transkripciona regulatorna mreža signala abiotičkog stresa i genske ekspresije (prema Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007)

Identifikovan je i *RD26* gen koji kodira NAC transkripcioni faktor (Fujita *i sar.*, 2004). Ekspresija ovog gena je indukovana sušom, visokim salinitetom, ABA i JA (jasmonska kiselina) tretmanom. RD26 protein je lokalizovan u nukleusu i ima transkripcionu aktivnost. Mnogi JA-induktivni geni su target geni RD26 (Fujita *i sar.*, 2004), što ukazuje na važnu ulogu RD26 u posredovanju između ABA i JA signala tokom odgovora na stres usled suše i povredjivanja biljke (Slika 1.3).

Molekularna istraživanja su posebno doprinela razumevanju percepcije i transdukcije signala suše.

1.4 Percepcija i transdukcija signala suše

Još uvek nije u potpunosti jasno kako biljke prepoznaju stres suše i kako se vrši transdukcija signala između ćelija, tkiva i celog organizma. Ćelije mogu da reaguju na redukovani potencijal vode i potencijal turgora i odgovarajuće promene u osmotskoj komponenti, ali i na promene u ćelijskim makromolekulima (metaboličke promene) ili fizičkim osobinama membrana (interakcije između proteina i lipida). Ispitivanje transdukcije signala suše komplikuje i to što se signali mogu prenositi na kratkim rastojanjima (celularni nivo) ili na dužim (tzv. long distance mehanizam), kao i to što može doći do interakcije i preklapanja signalnih puteva za različite stresore.

1.4.1 Hidraulični i hemijski signali

Dobro je poznato da koren može da registruje promenu abiotičkih faktora, kao što je npr. sadržaj vode u zemljištu. Promena sadržaja vode u zemljištu, koju koren registruje preko rizosfere, indukuje odgovor tzv. signala suše, koji mogu biti hemijski (Wilkinson *i Davies*, 2002) ili hidraulični (Sailendra *i sar.*, 1995; Comstock, 2002) i koji se prenose do nadzemnog dela biljke, odnosno do listova i stominih ćelija, gde indukuju različite reakcije.

Hidraulični signali suše nastaju kao rezultat smanjenog usvajanja vode od strane ćelija korena i opadanja turgora. Prema klasičnom konceptu, efekti suše se razmatraju kao rezultat dejstva hidrauličnih signala, odnosno opadanja turgora u ćelijama.

Hemijski signali su jedinjenja ili molekuli koji se sintetišu u korenu kao odgovor na stres suše i koji se potom, preko ksilema, iz korena transportuju do nadzemnih delova biljke, gde utiču na stepen otvorenosti stoma i rastenje drugih ćelija.

Hemijski signali suše su predmet veoma intenzivnih istraživanja poslednjih godina, jer se pokazalo da do redukcije rasteња u suši može doći i bez opadanja turgora, i da su te promene rezultat tzv. hemijskih signala suše. (Bleckman i Davies, 1985; Zhang i Davies, 1987, 1989). Po ovom konceptu, koren je veoma značajan senzor promena u zemljištu (ne samo smanjenja količine vode, već i promena u mehaničkom sastavu) o kojima „obaveštava“ nadzemni deo, tako što sintetiše metabolite koji se, kao hemijski signali, transportuju ksilemom do nadzemnog dela, gde izazivaju zatvaranje stoma i redukuju rastenje. Hemijski signali prethode hidrauličnim i mogu se označiti kao signali „ranog upozoravanja“ biljaka na stres (Dodd *i sar.*, 1997).

Istraživanja identifikacije hemijskih signala su pokazala da, sem ABA, i drugi hormoni (prvenstveno citokinini i etilen) mogu da budu hemijski signali. Takođe, hemijski signali mogu biti promena pH ksilema, apoplasta i citosola (Wilkinson *i sar.*, 1998; Wilkinson i Davies, 2002; Gao *i sar.*, 2004.), ali i joni kalcijuma (Shang *i sar.*, 2005; Guo *i sar.*, 2008). Povećanje pH ksilemskog soka utvrđeno je u uslovima suše, ali ovaj mehanizam povećanja pH još uvek nije u potpunosti objašnjen. Ispitivanja su pokazala da u uslovima suše dolazi do redukcije aktivnosti plazmamembranske protonske ATPaze u parenhimskim ćelijama oko ksilemskih sudova i da ta promena utiče na vrednost pH ksilema i apoplasta. Kao mehanizam povećanja pH navode se i promene u aktivnosti nitrat reduktaze u korenu i/ili listu biljaka pod stresom. Na promenu pH apoplasta može uticati i povećanje sadržaja nitrata u ksilemu, kao rezultat proton/nitrat kotransporta kroz plazmamembranu ćelija lista.

Istraživanja su pokazala da se mehanizmi transporta signala razlikuju ukoliko se oni prenose na veća rastojanja (od korena do listova) ili manja rastojanja (na ćelijskom nivou). Složenosti ovih istraživanja doprinosi i to što može doći i do međusobne interakcije hemijskih signala, ali i njihove interakcije sa hidrauličnim signalima.

1.4.2 Percepcija i prenos signala na ćelijskom nivou

Pretpostavlja se da je senzor suše na nivou ćelije transmembranski vezana dvokomponentna histidin kinaza koju aktivira porast u osmolarnosti ćelije, a koji je izazvan opadanjem turgora u ćeliji (ćelijskom dehidratacijom). Zato se ova kinaza

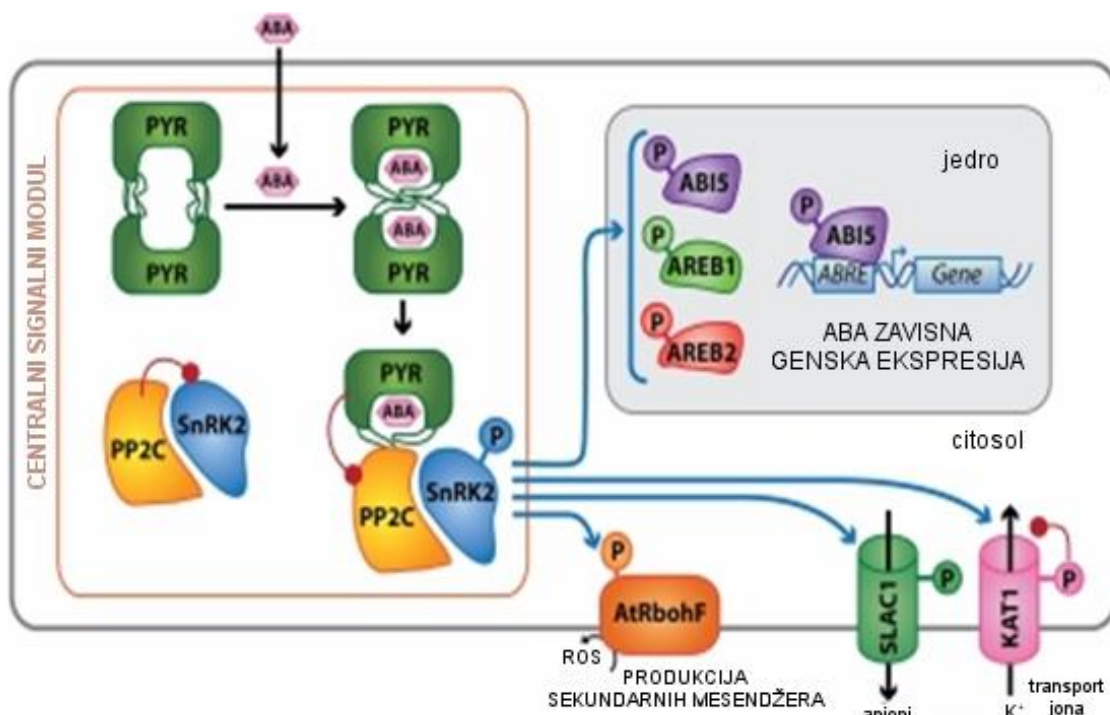
naziva „osmosenzor“ i ona indukuje kaskadu reakcija (transdukcija signala) koje vode ka ekspresiji gena indukovanih dehidratacijom. Takođe je moguće i da razvoj stresa utiče na fizičke osobine membrane, odnosno protein-lipidne interakcije. To može da izazove promene fluidnosti membrana i reorganizaciju citoskeleta, što utiče na kanale za vodu (akvaporine) i jone. Nakon percepcije signala, signalna transdukcija, preko sinteze sekundarnih prenosioca i oslobađanja Ca^{2+} , dovodi do ekspresije gena indukovanih sušom. Produkti ovih gena se mogu klasifikovati na funkcionalne i regulatorne proteine (Shinozaki *i sar.*, 2003).

1.4.2.1 Percepcija i transdukcija ABA signala

U percepciji i transdukciji signala suše posebno je značajna uloga ABA, jer je pokazano da više od 67% gena aktivnih u suši, predstavljaju geni koji su regulisani ABA-om. Postoje dva regulatorna sistema sušom indukovane genske ekspresije, ABA-zavisni i ABA-nezavisni (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2005).

Postoji dosta dilema i podataka o receptorima za ABA. Do sada je predloženo nekoliko ABA membranskih receptora uključujući FCA (Simpson *i sar.*, 2003), GCR2 koji pripada G familiji (Liu *i sar.*, 2007). i CHLC koji je subjedinica Mg-helataze (Shen *i sar.*, 2006).

Kod *A. thaliana* se pokazalo da je 14 rastvorljivih proteina iz grupe PYR/PYL/RCAP sposobno da formira ABA-receptor kompleks i aktivira transkripciju gena na čiju aktivnost utiče ABA. U receptorski kompleks su uključene još dve grupe proteina i to: protein fosfataze 2C (PP2C) i SNF1 - protein kinaza 2 (SnRK2). U ovom modelu PYR/RCAR deluje kao receptor za ABA, PP2C kao negativni regulator signalnog puta, a SnRK2 kao pozitivni regulator nizvodnog signalnog puta (Hubard *i sar.*, 2010). Na taj način je obezbeđena dupla negativna regulacija signalnog puta jer vezivanje ABA za PYR/RCAR inhibira PP2C aktivnost, a PP2C inaktivira SnRK2. Kada ABA nije prisutna, PP2C je aktivan i sprečava SnRK2 aktivnost i prenošenje signala (Slika 1.4).



Slika 1.4 Shema ABA signalnog puta (prema Hubard *i sar.*, 2010)

Postoji veliki broj proteina koji pripadaju ABA-zavisnom putu i koji su indukovani sušom, a čija je ekspresija od posebnog značaja za reakcije biljaka u suši (npr. RD20, RAB18, LEA14, ABI1, ABI2).

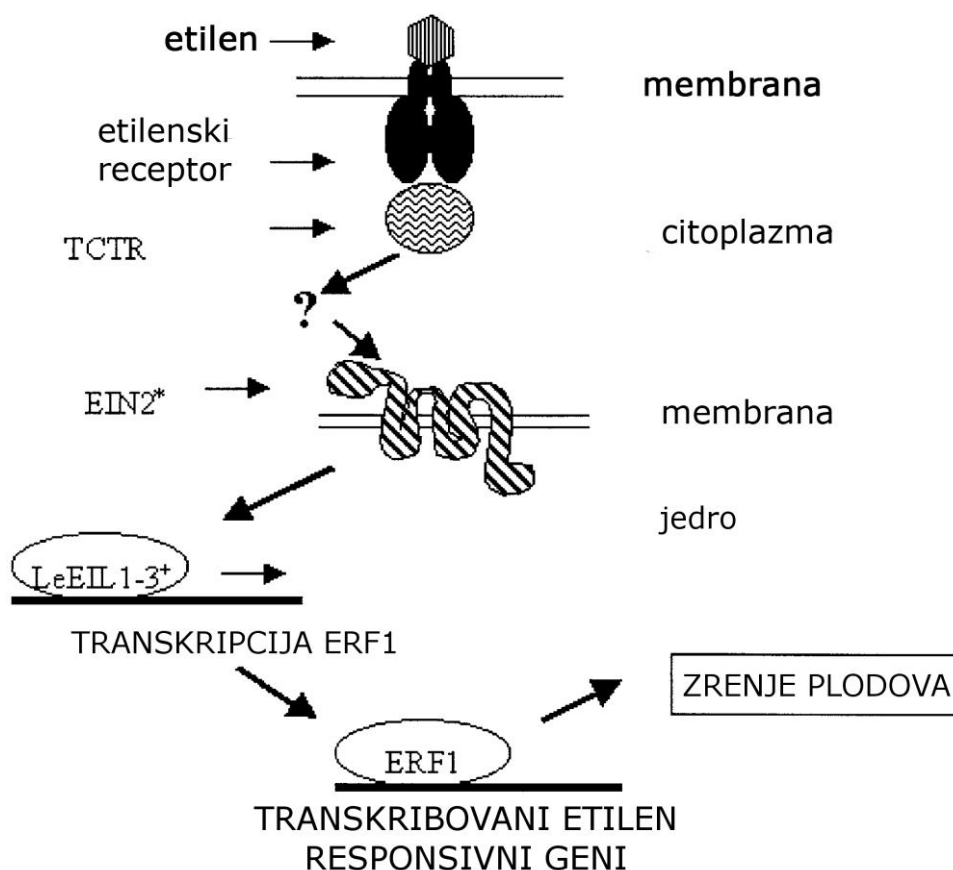
Stomine ćelije imaju specifična mesta za vezivanje ABA i ona su označena kao receptori. Receptori mogu biti smešteni na površini plazma membrane (ekstracelularni) ili u unutrašnjosti ćelija zatvarčica (intracelularni) (Hornberg i Weiler, 1984; Andesro *i sar.*, 1994; Wang i Zhang, 2008). Ekstracelularni receptori su uključeni u proces zatvaranja stoma, a intracelularni u inhibiciju otvaranja stoma (Schwartz *i sar.*, 1994). Postoji i pretpostavka da su ekstraćelijski receptori neophodni u brzom, a intraćelijski u sporom odgovoru na ABA.

1.4.2.2 Transdukcija signala etilena

Transdukcija signala etilena je najbolje proučena kod *A. thaliana*. Percepcija signala je regulisana familijom receptora koju čine ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 i ERS2 (Hua *i sar.*, 1998; Sakai *i sar.*, 1998). Oni moduliraju aktivnost CTR1 koji je negativni regulator u transdukcionom putu. U odsustvu etilena, CTR1 negativno reguliše EIN2 protein (Alonso *i sar.*, 1999). Nakon percepcije etilena, CTR1 se inaktivira i kao

posledica, EIN2 se oslobađa represije. Nizvodno od EIN2 je transkripciona kaskada. EIN2 aktivira transkripcioni aktivator EIN3 (ethylene – insensitive 3) i nekoliko drugih proteina sličnih EIN3 (EILs, EIN3 - like proteins). Ovi proteini aktiviraju druge transkripcione faktore kao što je ERF1 i tako regulišu ekspresiju gena uključenih u odgovor na etilen. Glavna kontrolna tačka u transdukciji signala etilena je transkripcioni faktor EIN3 (Slika 1.5).

Kod paradajza je identifikovano nekoliko receptora za etilen, LeETR1, LeETR2, NR, LeETR4 i LeETR5. Oni moduliraju aktivnost TCTR koji preko EIN2 aktivira transkripcione faktore LeEIL1, LeEIL2 i LeEIL3, a ovi aktivacijom drugih transkripcionih faktora pozitivno regulišu ekspresiju gena uključenih u odgovor na etilen.



Slika 1.5 Transdukcija signala etilena (prema Alexander i Grierson, 2002)

1.5 Mehanizmi tolerancije na sušu

Tolerancija ili otpornost biljaka na sušu može se definisati na dva načina: *biološki*, kao skup adaptivnih reakcija koje omogućavaju preživljavanje biljaka u uslovima suše i *agronomski*, kao skup adaptivnih reakcija kojima se ostvaruje određeni prinos gajenih biljaka u uslovima suše. Biljke mogu da razviju različite adaptivne mehanizme kojima izbegavaju da, uopšte, budu izložene efektu suše ili, ako su već izložene suši razvijaju adaptivne mehanizme kojima izbegavaju/tolerišu niske vrednosti potencijala vode (Ψ) (Verslues *i sar.*, 2006).

1.5.1 Izbegavanje suše

Izbegavanje suše se ogleda u sposobnosti biljaka da završe svoj životni ciklus pre nastupanja vodnog deficita. Najčešće se manifestuje kao *ubrzanje fenofaza* tako da su biljke izložene suši u fazi semena.

1.5.2 Izbegavanje niskih vrednosti potencijala vode

Ukoliko su biljke izložene dejstvu suše, njihova prva reakcija je da održe vodni režim tkiva blizak vrednostima u optimalnim uslovima. To se ostvaruje tako što se *smanjuje odavanje vode* ili *povećava usvajanje vode* (Chaves *i sar.*, 2003). Najbrže i u najkraćem vremenu to se ostvaruje reakcijama stoma koje redukcijom svoje otvorenosti mogu da smanje gubitak vode i tako doprinesu održanju vodnog režima. U dužem vremenskom intervalu reakcije izbegavanja dehidracije se ostvaruju anatomsko-morfološkim promenama na nivou lista koje smanjuju transpiraciju (dlake, povećanje gustine epikutikularnog voska, formiranje kristala na površini listova), redukcijom lisne površine, uvijanjem ili odbacivanjem listova (Chaves *i sar.*, 2003). Povećano usvajanje vode je uslovljeno ubrzanim razvićem korenovog sistema i povećanjem hidraulične provodljivosti korena za vodu (Kang *i sar.*, 1998; Kang *i sar.*, 2002).

1.5.3 Tolerancija na niske vrednosti potencijala vode

Niske vrednosti Ψ u ćelijama i tkivima mogu da dovedu do povreda i poremećaja u funkciji ćelija i njihovih komponenti. Ukoliko se stres razvija unutar biljnih tkiva, reakcije biljaka na stres se ostvaruju održavanjem visokog sadržaja vode uprkos opadanju potencijala vode (*izbegavanje dehidracije*) ili tolerancijom redukovano sadržaja vode (*tolerancija na dehidraciju*) (Morison *i sar.*, 2008).

Izbegavanje dehidracije

Opadanje turgora u uslovima niskih vrednosti Ψ se može sprečiti mehanizmom *osmoregulacije (osmotsko prilagođavanje)* i *povećanjem elasticiteta tkiva* (Chaves i sar., 2003). Osmotsko prilagođavanje podrazumeva *akumulaciju osmotski aktivnih jedinjenja*. Najčešće su to *organska jedinjenja* kao što su aminokiseline (prolin, alanin, glutamin, asparagin), amidi, šećeri (saharoza, fruktani) i alkoholi (manitol, sorbitol). Posebno značajnu ulogu ima prolin koji učestvuje u zaštiti ćelijskih struktura od dehidracije, regulaciji pH ćelija i detoksikaciji slobodnih radikala koji nastaju kao rezultat oksidativnog stresa, a koji, kao sekundarni stres, prati često druge tipove stresa. U osmoregulaciji kao osmotikumi mogu da učestvuju i *neorganska jedinjenja* (razni joni), ali se oni najčešće akumuliraju u vakuoli. Najznačajniji efekat osmoregulacije u listovima je, pored održavanja turgora i zaštite membrana od dehidracije, održanje otvorenosti stoma.

Tolerantnost na dehidraciju

Mezofite koje su otporne na sušu mogu da, u uslovima jake suše, održe strukturu ćelija, posebno membrana i održe metaboličke procese, zahvaljujući specifičnim adaptivnim mehanizmima. Ovi mehanizmi su, prvenstveno, rezultat sinteze *specifičnih proteina* otpornih na sušu koji deluju tako što sprečavaju promene u strukturi proteina i održavaju njihov integritet neophodan za njihovu funkciju i funkciju ćelijskih organela ili membrana. Veliki broj ovih proteina pripada *LEA (late embryogenesis abundant) proteinima* (Shinozaki i sar., 2003). Podgrupa LEA proteina, *dehidrini*, se akumuliraju u uslovima jakog stresa suše, od ostalih se razlikuju po svojoj termostabilnosti, a veoma su hidrofilni. Zbog svojih osobina, u stanju su da interaguju sa hidrofobnim delovima delimično denaturisanih proteina i membranskih struktura i tako stabilizuju i spreče agregaciju proteina u toku stresa suše. U uslovima stresa suše, dolazi i do sinteze specifičnih „*heat shock*“ proteina (HSP) koji predstavljaju molekularne *šaperone* (čuvare) čija je funkcija u održavanju pravilne strukture proteina, kao i u otklanjanju nefunkcionalnih i oštećenih proteina (Vierling, 1991). Pored ovih grupa proteina dolazi i do sinteze *ubikvitina* i *akvaporina*. Akvaporini su od posebnog značaja jer formiraju kanale koji regulišu ulazak molekula vode u ćelije. Pored sinteze proteina, u slovima stresa suše dolazi do sinteze *specifičnih osmolita* čija je funkcija u inaktivaciji reaktivnih vrsta kiseonika koje nastaju u uslovima stresa.

Razumevanju adaptivnih reakcija biljaka na sušu su doprinela molekularna istraživanja koja su omogućila identifikaciju gena čija ekspresija omogućava sintezu specifičnih proteina, posebno onih koji su uključeni u reakcije tolerantnosti na dehidrataciju. Takođe, ova istraživanja, pored teorijske, imaju i praktičnu aplikaciju, u procesu selekcije otpornih genotipova gajenih biljaka na sušu.

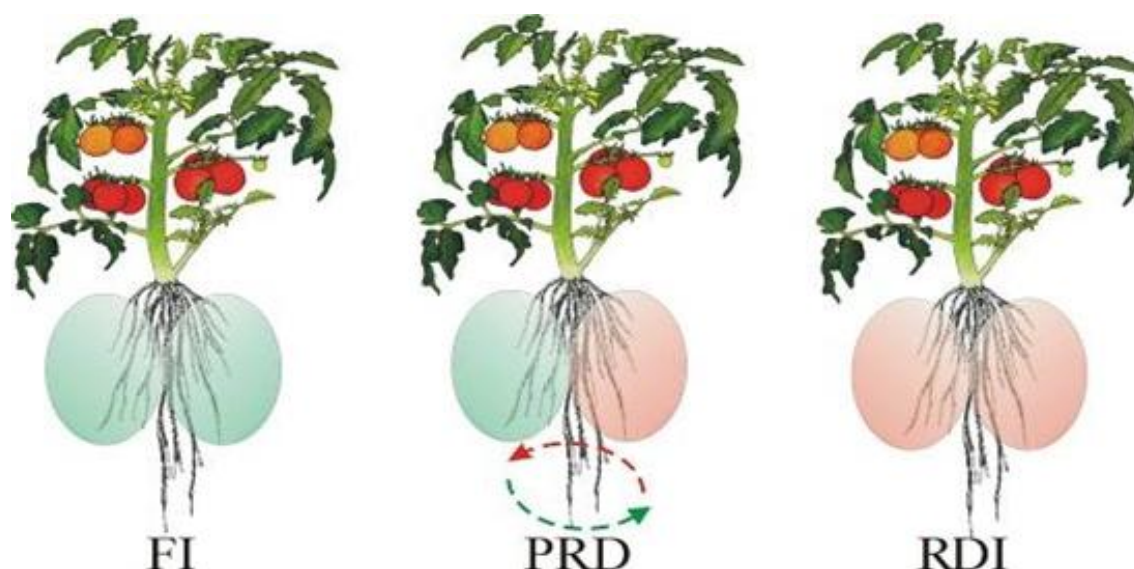
1.6 Metode deficita navodnjavanja - praktična primena fiziologije stresa

Snabdevanje vodom postaje sve veći problem širom sveta (Postel, 1998) i izražena je potreba za pronalaženjem i primenom efikasnijih strategija navodnjavanja. Za navodnjavanje poljoprivrednih zemljišta koristi se 85% vode koju čovečanstvo koristi širom sveta (van Schilgaarde, 1994), pa bi tako čak i mala redukcija vode za navodnjavanje mogla značajno da poveća količinu vode koja ostaje raspoloživa za druge potrebe. Ovo naročito važi za paradajz, jer se gaji na većoj površini od bilo koje druge povrtarske biljke širom sveta (Ho, 1996).

U cilju smanjenja količine vode koja se koristi za navodnjavanje, a na osnovu znanja o mehanizmima transporta signalnih molekula, razvijene su nove tehnike zalivanja biljaka, ne samo da bi se manipulisalo vodnim režimom, već i preraspodelom asimilata i transportom jona koji mogu uticati na kvalitet plodova (Ho, 2005; Kang i Zhang, 2004; Zegbe-Dominguez *i sar.*, 2006). Ove metode su se razvile zahvaljujući teorijskim saznanjima iz oblasti o sintezi hemijskih signala kao adaptivnim reakcijama biljaka na sušu (Jovanović i Stikić, 2012).

U oblastima sa povremenim nedostatkom vode i dugim sušnim periodima, uobičajena je primena tehnike koja se naziva ***kontrolisani deficit navodnjavanja*** (eng. ***“regulated deficit irrigation”, RDI***), koja se tradicionalno preporučuje kako bi se sprečila drastična redukcija prinosa. U takvim uslovima stres suše indukuje hemijske signale iz korena, poput ABA, a biljke reaguju na smanjenu količinu vode smanjenjem transpiracije (zatvaranjem stoma ili smanjenjem površine listova). Kako su fotosinteza i rast plodova, u odnosu na transpiraciju, manje osetljivi na vodni deficit, produkcija biomase se smanjuje bez većeg negativnog uticaja na prinos, zbog preusmeravanja resursa u plodove (Wilkinson i Hartung; 2009, Savić *i sar.* 2009).

Nova tehnika zalivanja, razvijena poslednjih desetak godina kao varijanta RDI, nazvana je *delimično isušivanje korena* (eng. “*partial root-zone drying*”, *PRD*). PRD se bazira na eksperimentima sa podeljenim korenovim sistemom (Gowing *i sar.*, 1990; Dodd *i sar.*, 1996; Dry *i sar.*, 2000; Stoll *i sar.*, 2000; Sobeih *i sar.*, 2004; Stikić *i sar.*, 2011; Jovanović i Stikić, 2012), pri čemu se zaliva samo polovina korenovog sistema, a druga polovina se ne zaliva dok se ne osuši do zadatog nivoa. Strane korena se menjaju periodično (Slika 1.6).



Slika 1.6. Shema optimalnog navodnjavanja (FI), delimičnog isušivanja korenova (PRD) i kontrolisanog deficita navodnjavanja (RDI)

Delimično isušivanje korena je do sada proučavano u mnogim zemljama (Kang i Zhang, 2004) i uspešno je primenjeno kod mnogih vrsta uključujući i povrtarske biljke (Kirda *i sar.*, 2004; Dorji *i sar.*, 2005; Jovanović *i sar.*, 2010; Jovanovic i Stikic, 2012). Istraživanja su pokazala da se biljke sa korenovim sistemom podeljenim na dva dela, naizmenično izloženih ciklusima isušivanja i zalivanja, razvijaju normalno i bez vidljivog vodnog deficita u listovima (Davis i Zhang, 1991). U teoriji, zalivani deo korena omogućava održavanje povoljnog vodnog statusa u nadzemnom delu biljke, dok zasušivani deo korena proizvodi hemijske signale koji se prenose u izdanak sa potencijalnim inhibitornim efektom na rast vegetativnih organa i provodljivost stoma. Pošto je vodni potencijal biljke u ravnoteži sa najvlažnijim delom zemljišta, biljke u PRD tretmanu zadržavaju visok vodni potencijal kao i biljke koje su dobro snabdevene

vodom. Deo korenovog sistema koji je izložen suši proizvodi hemijske signale, koji se ksilemom prenose do izdanka (Dodd, 2007), gde delimično zatvaraju stome smanjujući gubitak vode, u manjoj meri redukuju fotosintezu i ograničavaju rast vegetativnih organa, stimulišući celu biljku da koristi vodu efikasnije (Davis *i sar.*, 2000; de Souza *i sar.*, 2003). Produženo zasušivanje jedne polovine korena smanjuje na kraju efekat hemijskih signala na provodljivost stoma (Stoll *i sar.*, 2000), verovatno, pošto usvajanje vode iz ove polovine korena proporcionalno sve manje doprinosi transpiracionom toku. Primenom znanja o promenljivoj prirodi efekta došlo se do ovog naizmeničnog načina zalivanja koji maksimizira proizvodnju ovih signala, a tako i njihov inhibitorski efekat na transpiraciju i rast. Da bi se održao efekat PRD na stome, neophodno je redovno menjati strane zalivanja (Dry *i sar.*, 2000a), obično u intervalima 10 do 14 dana (Stoll *i sar.*, 2000), odnosno 7 do 14 dana (Kirada *i sar.*, 2004). Ovo je, ujedno, i objašnjenje zašto biljke u RDI tretmanu gube turgor, što negativno utiče na intenzitet fotosinteze, dok biljke u PRD tretmanu nemaju isti mehanizam kontrole stoma i mogu koristiti vodu na štedljiv način bez sušenja listova. PRD tretman redukuje rastenje listova, ali na nivou korena može dovesti do njegovog porasta. Takva reakcija korena se može smatrati adaptivnom reakcijom biljaka na sušu u PRD sistemu (Prokić *i Stikić*, 2011).

Postoji mnogo dokaza o ulozi ABA kao signala (Wilkinson *i Davis*, 2002), mada i druga jedinjenja, uključujući prekursore ABA (Sauter *i sar.*, 2001) i nisku koncentraciju citokinina (Stoll *i sar.*, 2000) ili drugi faktori, kao što su promena mineralnog sastava ili promena pH ksilemskog soka (Prokić *i sar.*, 2006; Jia *i Davis*, 2007), mogu takođe, biti uključeni u regulaciju korišćenja vode na nivou listova.

Prema istraživanjima Stoll *i sar.* (2000), PRD tretman dovodi do povećanja koncentracije ABA u suvoj strani korena, pa se tako koncentracija ABA u nezalivanoj strani korena povećava i do 10 puta. Velike promene u sadržaju ABA u korenu, povezane sa isušivanjem zemljišta, ne moraju, međutim, da znače, istovremenu, ekvivalentnu promenu u sadržaju ABA u listovima, iako je sadržaj u listovima, po pravilu, viši kod biljaka izloženih PRD tretmanu nego kod optimalno zalivanih biljaka (Stoll *i sar.*, 2000; Kirada *i sar.*, 2004). U svakom slučaju, količina ABA akumulirane u listovima ne mora biti od presudnog značaja za determinaciju otvorenosti stoma (Stoll *i sar.*, 2000), već je za funkcionisanje stoma mnogo značajnija koncentracija ABA u ksilemu (Jia *i Zhang*, 1999). Većina eksperimenata sa PRD biljkama je pokazala da one imaju više ABA u ksilemskom soku u poređenju sa biljkama koje su zalivane istom

količinom vode, ali raspoređene na ceo korenov sistem (Rodrigues *i sar.*, 2008; Liu *i sar.*, 2006b; Dodd *i sar.*, 2006; Savić, 2003; Dodd *i sar.*, 2008a). Promena strana u PRD tretmanu povećava transport ABA iz korena (Dodd *i sar.*, 2006b), jer se, prilikom ponovnog zalivanja suve strane, omogućava ovom delu korena da doprinese proporcionalano više ukupnom fluksu i na taj način se u transpiracioni sistem oslobađa ABA akumulirana u korenu u toku isušivanja zemljišta.

Iako se PRD metoda veoma intenzivno proučava, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi regulacije rasteanja biljaka, a koji su fundamentalna osnova ove metode. U literaturi je i ograničen broj podataka o akumulaciji i distribuciji ABA (Dodd *i sar.*, 2006), te su stoga od posebnog značaja ispitivanja reakcija na PRD mutanata koji imaju poremećeni proces sinteze ovog hormona. Takođe, nedostaju i ispitivanja molekularne osnove PRD metode, iako je poznato da su reakcije biljaka na sušu genski kontrolisane (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Za istraživanja u ovoj disertaciji su odabrana 3 gena čija ekspresija može značajno da utiče na reakcije ispitivanih biljaka i to: *NCED*, *TAOI* i *EIL1*.

1.7 Paradajz kao objekat istraživanja

Paradajz (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je višegodišnja biljka, mada se gaji i kao jednogodišnja. Poreklo vodi iz Južne Amerike. Većina istorijskih i etnobotaničkih podataka vezana je za Meksiko, za oblast Vera Cruz-Puebla, kao mesto odakle potiče gajeni paradajz, dok se postojbinom divljeg paradajza smatraju Peru i Ostrva Galapagosa. Dugo vremena u Evropi je gajen samo kao ukrasna biljka zbog straha od toksičnosti, a tek polovinom 18-tog veka paradajz se počeo koristiti kao povrće, najpre u Italiji, Španiji, Portugaliji i Francuskoj. U našim krajevima paradajz je masovno počeo da se gaji tek polovinom 19-tog veka.

Koren kod paradajza je vretenast. Centralni koren u direktnoj setvi dostiže dubinu od 100 do 150 cm i zahvata veliku masu zemljišta. Kada se paradajz gaji preko rasada, glavna masa korena se razvija u površinskom sloju zemljišta (20 do 40 cm). (Marković, 1997; Damjanović *i sar.*, 2001). Stablo paradajza je zeljasto i sočno, sa starenjem donji delovi odrvenjavaju. Okruglo je ili uglasto i njegov prečnik iznosi 3-4 cm, može dostići dužinu i do 3-4 m. Zbog bočnih izdanaka, koji se u proizvodnji zakidaju, biljka ima žbunast izgled. (Marković, 1997; Damjanović *i sar.*, 2001). Stablo ima sposobnost formiranja adventivnih korenova. Cvetovi su sakupljeni u cvasti. Cvast

paradajza može biti prosta i složena. Kod prostih cvasti cvetovi se razvijaju na njenoj osovini, a kod složenih cvasti na bočnim granama. Prva cvast formira se iznad određenog broja listova, što zavisi od sorte i uslova gajenja. Cvetovi paradajza sadrže 5-7 čašičnih i 5-7 kruničnih listića. U većini varijeteta i sorti, cvet ima 6 čašičnih i 6 kruničnih listića. Prašnika je 5 i oni su pričvršćeni za kruničnu cev. Za prašnike je karakteristično da su srasli u vidu konusa koji potpuno obuhvata plodnik i tučak. Zbog toga je paradajz samooplodna biljka (Marković, 1997; Damjanović *i sar.*, 2001). Plod je bobica.

Paradajz može da uspeva u širokom arealu gajenja, ali pošto je to poreklom tropska biljka, ona ima vrlo izražene zahteve u pogledu toplote, svetlosti i vlage. Optimalne temperature vazduha za rastenje biljaka paradajza kreću se između 18.5 °C i 26.5 °C. Na temperaturama ispod 15 °C prestaje cvetanje, a ispod 9 °C zaustavlja se rastenje. Optimalna temperatura zemljišta za razvoj korenovog sistema je 25 °C, temperatura iznad 31 °C usporava porast, a iznad 35 °C zaustavlja rastenje korena (Benton Jones, 1999). Paradajz ima visoke zahteve prema svetlosti, naročito u fazi rasada. U uslovima nedovoljne osvetljenosti naročito se pogoršava kvalitet plodova, posebno u pogledu sadržaja šećera i vitamina C. Paradajz dobro raste pri kontinuiranom osvetljenju između 400 i 500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Benton Jones, 1999). Za paradajz gajen na polju optimalna količina vode je 2000-6600 m^3/ha , a za paradajz gajen u stakleniku to je oko litar vode dnevno po biljci pri optimalnoj temperaturi spoljašnjeg vazduha (Benton Jones, 1999). Donja granica optimalne vlažnosti zemljišta za paradajz u našim klimatskim uslovima smatra se da je 80% od poljskog vodnog kapaciteta (PVK) (Bošnjak i Pejić, 1995). Optimalna relativna vlažnost vazduha za razvoj paradajza kreće se između 50 i 60%.

Paradajz se može gajiti gotovo na svakom tipu zemljišta, počev od aluvijalnih terena, pa do teških smonica. Međutim, najpogodnija su laka, propustljiva za vodu i strukturalna zemljišta, bogata humusnim materijama. Optimalan pH zemljišta kreće se u granicama između 5.8 i 6.8 (Benton Jones, 1999). Paradajz je kultura koja, za uspešan razvoj, iziskuje obilnu i pažljivo izbalansiranu ishranu. Najbolji rezultati postižu se kombinovanim đubrenjem stajnjakom i mineralnim đubrivima (Benton Jones, 1999).

Paradajz je jedna od najčešćih i ekonomski najznačajnijih povrtarskih vrsta koje se gaje na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru (Ho, 1996, Takač *i sar.*, 2007).

Prosečna potrošnja paradajza u svetu iznosi 15 kg po stanovniku (FAO), a u našoj zemlji 16 kg po stanovniku (Takač *i sar.*, 2007).

Suša je, takođe, značajan problem i u proizvodnji paradajza, jer je redukcija rastenja i prinosa jedna od posledica delovanja suše. Za uspešno gajenje paradajza je neophodna optimalna vlažnost i temperatura i to, posebno, u fazi cvetanja i fazi formiranja plodova. Nedostatak vode u ovim fazama razvića paradajza može dovesti do abscisije cvetova i smanjenog formiranja plodova, što za posledicu može imati veliku redukciju prinosa (Benton Jones, 1999). Zbog velike potrebe paradajza za vodom i osetljivosti na sušu, u mnogim zemljama je neophodno dodatno navodnjavanje radi postizanja optimalnih prinosa (Feres i Soriano, 2007). Dosadašnja istraživanja su kod velikog broja poljoprivrednih kultura pokazala da se primenom PRD i RDI metoda navodnjavanja može smanjiti količina vode za navodnjavanje, povećati efikasnost korišćenja vode, a da se pri tome ne umanje ni prinos ni njihov kvalitet. To je od posebnog značaja zbog efekata klimatskih promena i suše na poljoprivrednu proizvodnju u mnogim zemljama, uključujući i našu zemlju (Jovanović i Stikić, 2012). Kako se paradajz gaji na većoj površini od bilo koje druge povrtarske vrste na svetu (Ho, 1996), uspešna primena PRD i RDI tehnike bi mogla značajno da doprinese uštedi vode u proizvodnji ove kulture. To potvrđuje niz rezultata istraživanja, uključujući i ona koja su obavljena na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu (Stikić *i sar.*, 2010).

2 CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je bio karakterizacija fizioloških procesa koji su u osnovi regulacije rastenja i razvića biljaka pod dejstvom delimičnog isušivanja korenova (PRD) i regulisanog deficita navodnjavanja (RDI). Cilj je bio da se u ova istraživanja uključe i molekularna istraživanja, koja bi, uz analizu procesa rastenja i drugih fizioloških procesa (vodnog režima, razmene gasova, akumulacije i distribucije stres hormona ABA, usvajanja i distribucije jona), značajno doprinela razumevanju PRD i RDI efekata na paradajz. Zato je praćena ekspresija gena uključenih u biosintetski put ABA (*TAOI* i *NCED1*) i transdukciju signala etilena (*EIL1*).

Kako u ispitivanim reakcijama biljaka značajnu ulogu, kao hemijski signal suše, ima hormon ABA, ispitivanja sa mutantom *flacca*, koji je deficitaran u sintezi ABA, mogla bi da doprinesu objašnjenju uloge ABA u ispitivanim fiziološkim procesima.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Biljni materijal i postavka eksperimenta

Istraživanja su rađena na paradajzu, *Lycopersicon esculentum* Mill., i to divljem tipu (wt) *Ailsa Craig* i mutantu *flacca* (Slika 3.1). *Flacca* je mutant sa recesivnim tačkastim mutacijama koje su nastale primenom x-zraka. Ovaj mutant se odlikuje smanjenom sposobnošću sinteze hormona ABA tako da se kod njega u nadzemnom delu stabla sintetiše svega 20-26%, a u korenu do 67% ABA u odnosu na divlji tip (Sagi *i sar.*, 1999).



Slika 3.1 Izgled divljeg tipa i mutanta *flacca* paradajza

Eksperiment je izveden u fitotronske komori na Katedri za agrohemiju i fiziologiju biljaka na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. Uslovi gajenja biljaka su bili sledeći: temperatura dan/noć 26/17 °C, relativna vlažnost vazduha 60%, osvetljenost (PAR) 250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ i dužina fotoperioda od 14 h.

Semena paradajza su naklijavana u komercijalnom supstratu (Postground H, Klasmann-Deilmann, Germany) u kontejnerima od stiropora u komori za gajenje biljaka. U fazi drugog lista biljke su pikirane u male saksije prečnika 10 cm gde su

gajene do pojave petog lista. U fazi formiranog sedmog lista, presađene su u velike, posebno dizajnirane saksije (zapremine 10 dm³) koje su podeljene na dve polovine plastičnom pločom. (Slika 3.2) Na vrhu saksije, u sredini ploče, odstranjen je deo plastike, čime je omogućeno razdvajanje korenovog sistema na dve polovine. Nakon odstranjivanja primarnog korena, polovina korena stavljana je u jednu polovinu, a druga polovina korena u drugu polovinu saksije. Na taj način su dobijena dva hidraulično izolovana kompartmenta koja su omogućila manipulaciju vodnim režimom supstrata u kome se razvija koren. Narednih 5 dana, nastavljeno je zalivanje biljaka količinom vode koja odgovara poljskom vodnom kapacitetu supstrata, da bi se izbegli efekti stresa koji je mogao da nastane kao posledica ovakvog načina presađivanja. Stoga su biljke izlagane ispitivanim tretmanima tek po isteku perioda koji je bio neophodan za njihov oporavak. Ogljed je započeo u fazi formirane druge cvetne grane i trajao dva meseca.



Slika 3.2 Izgled saksije dizajnirane za eksperiment

U toku vegetativnog perioda kod biljaka su primenjivana tri različita tretmana zalivanja:

Optimalno navodnjavanje (Full irrigation - FI) - supstrat u celoj rizosferi je svaki dan zalivan do optimalnog vodnog kapaciteta, odnosno sadržaj vode u korišćenom supstratu pri poljskom vodnom kapacitetu je bio 36%.

Delimično isušivanje korenovog sistema (Partial root-zone drying - PRD) - supstrat u polovini korenovog sistema je zalivan do optimalnog vodnog kapaciteta, dok u drugoj polovini nije zalivan sve dok se sadržaj vode u supstratu nije spustio na 18-

20%. Tada je izvršena inverzija tako što se prekidalo sa zalivanjem polovine korenovog sistema koja je do tada zalivana, a početo je sa zalivanjem polovine korenovog sistema koja do tada nije zalivana, i tako naizmenično do kraja vegetativnog perioda

Regulisani deficit navodnjavanja (Regulated deficit irrigation - RDI) - biljke su zalivane do vrednosti vode u supstratu od 18%.

Zalivanje je bilo bazirano na rezultatima merenja količine vode u supstratu.

3.2 Ispitivani parametri i metode

U toku eksperimenta vršena su fiziološka i molekularno - biološka istraživanja. Tokom fizioloških istraživanja praćeni su sledeći parametri:

Sadržaj vode u supstratu za gajenje biljaka

Parametri rastenja (visina biljaka, suva i sveža masa listova, stabla i korena)

Odnos suve mase korena i izdanka

Vodni potencijal listova

Provodljivost stoma

Sadržaj ABA u listovima

Sadržaj mineralnih elemenata u korenu i listovima

Prilikom molekularnih istraživanja praćena je ekspresija *TAOI*, *NCED* i *EIL1* gena .

3.2.1 Fiziološka istraživanja

Količina vode u supstratu je merena pomoću TDR proba (Time domain reflectometer, TRASE, Soil Moisture Equipment Corp., USA). TDR probe dužine 20 cm, bile su instalirane u sredini svakog odeljka saksije i to je omogućilo merenje količine vode u oba hidraulična kompartenta.

Visina biljaka je merena lenjirom, a na kraju ekperimenta izmerena je masa korena, stabla i listova u svežem stanju. Potom je, posle sušenja biljnog materijala na 80 °C u sušnicama, obračunata suva masa korena, stabla, listova i određen odnos suve mase nadzemnog dela (izdanka) i korena.

Ukupni potencijal vode u listu (Ψ_1) meren je u komori pod pritiskom (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA) (Slika 3.3) Metod se zasniva na istiskivanju ksilemskog soka iz listova, pod pritiskom gasa azota. Za merenje ovog potencijala, odsecani su listovi 1-2 cm ispod lisne ploče, provlačeni kroz prorez gumenog zapušača i postavljeni u komoru. Na zasečenoj površini lista praćeno je formiranje inicijalnih kapi ksilemskog soka koji se istiskuje pod pritiskom gasa. Pritisak koji dovodi do pojave prvih kapi predstavlja vrednost ukupnog vodnog potencijala lista i izražava se u MPa. Listovi za merenje vodnog potencijala su uzimani sat vremena pre zalivanja biljaka u danu kada je bio okret (promena strane zalivanja korena) kod PRD biljaka.



Slika 3.3 Komora pod pritiskom za merenje vodnog potencijala (Ψ_1)

Provodljivost stoma je merena na najmlađem, fiziološki razvijenom, listu, aparatom porometrom (AP4, Delta-T, Cambridge, U.K.) (Slika 3.4). Vrednosti na porometru su dobijane u $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Merenja su vršena u danu kada je bio okret kod PRD biljaka. Praćena je dnevna dinamika otvorenosti stoma merenjima na svakih sat vremena tokom celog dana.

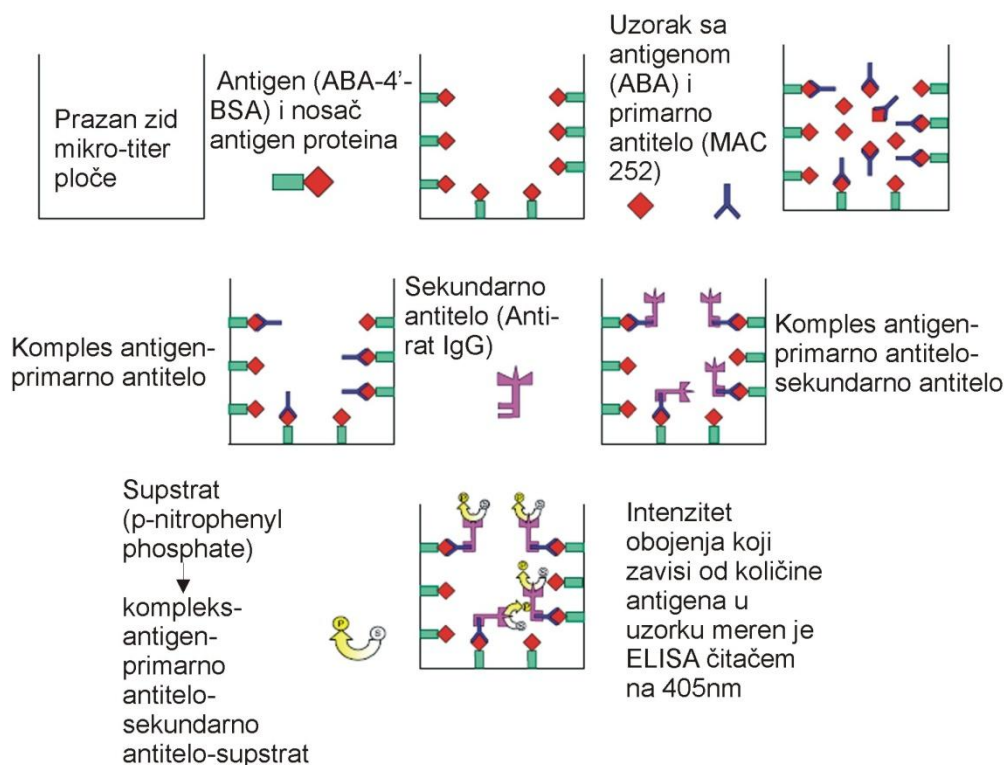


Slika 3.4 Izgled porometra

3.2.1.1 *Određivanje sadržaja abscisinske kiseline*

List za određivanje sadržaja abscisinske kiseline je uziman na kraju ogleđa i čuvan na -80°C do analize. Rezultati su predstavljeni u ng po g sveže mase (ng g FW^{-1})

Sadržaj abscisinske kiseline u listovima je analiziran ELISA testom (Asch, 2000). Princip ELISA testa zasniva se na kompetitivnoj imunološkoj reakciji visoko specifičnog monoklalnog antitela (MAC 252) sa ABA (Sl. 3.5). Pri tome ne dolazi do ukrštene reakcije između antitela i drugih supstanci (Quarrie *i sar.*, 1988). Posle imunološke reakcije, vrši se bojenje rastvora uz dodatak supstrata (p-nitrofenil fosfata), pri čemu se apsorpcija rastvora očitava na ELISA čitaču (Sunrise, Tecan) na 405 nm. Ova očitana vrednost obrnuto je proporcionalna koncentraciji ABA koja se izračunava preko kalibracione krive dobijene sa poznatim koncentracijama standardne (\pm) ABA.



Slika 3.5 Shematski prikaz ELISA testa (Asch, 2000)

Procedura ELISA testa sastojala se u sledećem: 200 μ l ABA-konjugata (ABA-4'-BSA) sa proteinskim nosačima, u mikro-titar ploči, inkubirano je tokom noći na 4 °C. Nakon tri ispiranja puferom 2 za ispiranje (TRIZMA, MgCl i NaCl i BSA – bovine serum albumine rastvoreni u H₂O, pH 7.8) (poslednji put pufer je držan 20 minuta na 37 °C kako bi se neobloženi zidovi saturisali sa BSA), mikro-titar ploča je sušena upijajućim papirom. Posle sušenja, dodato je 100 μ l uzorka i 100 μ l primarnog antitela MAC 252. Mikro-titar ploča je mućkana konstantno 1 minut, a zatim je vršena inkubacija na 4 °C pri čemu je došlo do imunološke reakcije između antigena i antitela. Mikro-titar ploča je, ponovo, ispirana tri puta i sušena upijajućim papirom, nakon čega je dodato 200 μ l sekundarnog antitela, ant-rat IgG, rastvorenog u puferu 1 (TRIZMA, MgCl i NaCl rastvoreni u H₂O, pH 7.8). Mikro-titar ploča je inkubirana 1 sat na 37 °C u vlažnim plastičnim boksevima. U tom periodu došlo je do vezivanja sekundarnog antitela za primarno antitelo. Mikro-titar ploča je, ponovo, ispirana pet puta i sušena upijajućim papirom, a zatim je dodato 200 μ l rastvora supstrata. Rastvor supstrata dobijen je rastvaranjem 20 mg p-nitrofenil fosfata u 20 ml natrijum-hidrogen-karbonata (NaHCO₃). Supstrat je reagovao sa sekundarnim antitelom pri čemu je došlo do bojenja

rastvora. Intenzitet obojenja je bio obrnuto proporcionalan količini antigena (ABA). Apsorpcija je očitavana na ELISA čitaču (Sunrise, Tecan) na 405 nm.

Za određivanje koncentracije ABA bilo je neophodno napraviti (\pm) ABA standarde (4000, 2000, 1000, 500, 250 i 100 pg/100 μ l) razblaživanjem osnovnog (\pm) ABA standarda (80.000 pg/100 μ l) na osnovu kojih je nacrtana kalibraciona kriva uz pomoć koje je očitavan sadržaj ABA. Detaljnija uputstva mogu da se nađu u protokolu Asch-a (2000).

3.2.1.2 Merenje sadržaja mineralnih elemenata u biljnom materijalu

Sadržaj K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn i Cu određivan je iz zajedničkog rastvora atomsko-apsorpcionom spektrofotometrijom ili plamenofotometrijski, dok je sadržaj azota određivan metodom po Kjeldahl-u. Rezultati su predstavljeni u mg po kg suve mase (mg kg DW⁻¹). Uzorci listova i korenova za analizu su uzeti na kraju oglada.

Zajednički rastvor predstavlja rastvor mineralnog dela biljke (pepela) čija je početna masa poznata i služi za određivanje sadržaja elemenata koji čine mineralni deo biljne supstance. Postupak pravljenja zajedničkog rastvora je tekao tako što je prvo izmeren 1g suvog biljnog materijala koji je stavljen u keramički tigl i spaljen na rešou do potpunog ugljenisanja. Zatim je uzorak žaren na 550 °C 6-8 sati. Nakon žarenja, uzorak je ovlažen vodom i dodato mu je 2 ml 5 M HNO₃ da bi se otklonile nečistoće. Uzorak je uparavan do suvog ostatka, a zatim ponovo žaren na 550 °C, 1-2 sata. Posle žarenja, uzorak je ohlađen i pepeo rastvoren u 10 ml HCl, a zatim je prenet u normalni sud od 100 ml. Rastvor je profiltriran u reagens boce u kojima je čuvan do upotrebe (Džamić *i sar.*, 1999). Ovaj rastvor korišćen je za određivanje sadržaja K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu.

Sadržaj Fe, Mn, Zn, Cu je direktno iz zajedničkog rastvora očitavan na atomsko-apsorpcionom spektrofotometru (Spectr AA, 220 FS, Swissland). Sadržaj Mg i Ca je iz zajedničkog rastvora, uz dodatno razblaženje i dodatak LaCl₃ i 5 N HCl (Džamić *i sar.*, 1999), takođe, očitavan direktno na atomsko-apsorpcionom spektrofotometru. Atomsko-apsorpciona spektrofotometrija (AAS) se zasniva na apsorpciji svetlosti karakteristične talasne dužine od strane slobodnih atoma elementa čiji se sadržaj određuje. Zasniva se na Lambert-Beer-vom zakonu:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gde je:

ϵ - apsorpciona konstanta i zavisi od supstance i talasne dužine

c - koncentracija rastvora

l - debljina rastvora

Određivanje sadržaja kalijuma

Sadržaj kalijuma određivan je plamenfotometrijski direktno iz rastvora razorenog uzorka. Plamena fotometrija se zasniva na ekscitaciji atoma ispitivanog elementa u plamenu i merenju intenziteta svetlosti koju emituju tako ekscitovani atomi. Intenzitet emitovanog zračenja direktno je proporcionalan koncentraciji prisutnog elementa u plamenu.

Za plamenfotometrijsko određivanje sadržaja kalijuma neophodno je napraviti osnovni standardni rastvor i seriju standardnih rastvora. Serija standardnih rastvora koncentracija 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 $\mu\text{gK/ml}$ pripremljena je razblaživanjem osnovnog standardnog rastvora koncentracije 1 mgK/ml . Očitavanje količine emitovanog zračenja za standarde i uzorak vršeno je na plamenfotometru (ESSEX-866150, Evans Electroelenium, Ltd, UK).

Na osnovu koncentracije i količine emitovanog zračenja standarda konstruisana je kalibraciona kriva na osnovu koje je očitana koncentracija kalijuma u ispitivanom uzorku. Na osnovu koncentracije kalijuma u uzorku iz formule je izračunat njegov sadržaj u uzorku (Džamić *i sar.*, 1999):

$$\% K = \frac{c \cdot V \cdot R}{m \cdot 10^6} \cdot 100$$

gde je:

c - koncentracija fosfora pročitana sa kalibracione krive,

V - početna zapremina rastvora uzorka u HCl,

R - razblaženje rastvora uzorka,

m - masa suvog uzorka (g),

10^6 - faktor za prevođenje μg u g,

100 - faktor za prevođenje u %.

Određivanje sadržaja azota

Sadržaj azota određivan je modifikovanom metodom po Kjeldahl-u (Allen *i sar.*, 1974). Princip metode je da se pri zagrevanju biljnog materijala (0,2 g) sa koncentrovanom sumpornom kiselinom (5 ml H₂SO₄), u prisustvu katalizatora (korišćen je K₂SO₄:CuSO₄:Se=1:1:0,2), izdvaja amonijak koji se vezuje sa viškom sumporne kiseline, pri čemu se obrazuje amonijum-sulfat (NH₄)₂SO₄. U toku destilacije, kivanjem sa jakim bazom (2 ml 3 % NaOH), oslobađa se amonijak iz amonijum-sulfata, koji se ponovo vezuje za sumpornu kiselinu poznatog normaliteta (0,02N H₂SO₄) obrazujući, ponovo, amonijum-sulfat. Na osnovu utrošene količine kiseline za vezivanje amonijaka (višak kiseline određivan je titracijom sa 0,02 N NaOH uz dodatak 2-3 kapi Taširo indikatora), izračunat je sadržaj azota u biljnom materijalu preko formule (Džamić *i sar.*, 1999):

$$\%N = \frac{(a \cdot N_1 - b \cdot N_2) \cdot 14}{m} \cdot 100$$

gde je:

a - broj ml 0,02 N H₂SO₄ korišćene za vezivanje amonijaka

N₁ - normalitet kiseline

B - broj ml 0,02N H₂SO₄ koji je utrošen za titraciju

N₂ - normalitet baze

14 - 1m.ekv. NaOH veže 14mg N u obliku NH₃

m - masa biljnog materijala (mg),

100 - faktor za prevođenje u %.

3.2.2 Molekularna istraživanja

Pri ispitivanju efekata RDI i PRD tretmana, obavljena su uporedo i istraživanja ekspresije gena, a sa ciljem da se utvrde moguće razlike u reakcijama divljeg tipa i mutanta *flacca* na ove tretmane. Za ispitivanje su odabrani *NCED*, *TAO1* i *EIL*. *TAO1* i *NCED* učestvuju u biosintezi ABA, dok je *EIL1* transkripcioni faktor u signalnom putu etilena.

U skladu sa rezultatima Prokić (2009), ekspresija gena u tkivu četvrtog potpuno razvijenog lista paradajza, praćena je u danu promene strane zalivanja PRD tretmana. Uzorci listova su uzimani 60 min. pre zalivanja biljaka.

Iz ovog materijala prvo je izolovana RNK koja je reverznom transkripcijom prevedena u komplementarnu DNK (cDNK). Za analizu ekspresije kao šablon je korišćena cDNK. Prajmeri su dizajnirani na osnovu poznate primarne strukture ovih gena kod *Lycopersicon esculentum*.

Ekspresija gena

Ekspresija gena je praćena u tkivu listova paradajza koji su odmah po odstranjivanju sa biljaka ubaćeni u tećni azot. Nakon sitnjenja i homogenizacije u tećnom azotu, 70 mg lisnog materijala je odmereno za izolaciju RNK primenom RNA-ase plant mini kit-a (Quiagen, Germany). Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane RNK uraćeno je spektrofotometrijski (merenjem absorbance na 260 nm) i elektroforetskim razdvajanjem na 1% agaroznom gelu bojenim etidijum-bromidom.

Za sintezu cDNK je korišćen First strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Lithuania). Za analiziranje sekvenci gena i dizajn prajmera korišćeni su programi Primer3 i blast u okviru National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence korišćenih prajmera su prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1 Sekvence korišćenih prajmera

prajmer	sekvenca
LeTAO1 F	CCATAAGAGCAGCACGTG
LeTAO1 R	CTTTGGAGAGTCCGAGCA
NCED F	CTGAAATGATCCGTGGAG
NCED R	CTGCTTCTTCCCAAGCAT
LeEIL1 F	CAGCACTGTGATCCTCCTCA
LeEIL1R	ATCACCGCTGTTAGGACACC

Ekspresija gena je praćena primenom Real Time-PCR (SYBR-Green tehnika; RT-PCR 7500, Applied Biosystems, UK). Komplementarna DNK kao i umnoženi produkti na RT-PCR-u su provereni elektroforezom na agaroznom gelu.

3.3 Statistićka analiza podataka

Statistićka obrada rezultata i njihovo grafićko prikazivanje su urađeni primenom programa Sigma Plot 2000 (Jandel Scientific, Erkhart, Germany).

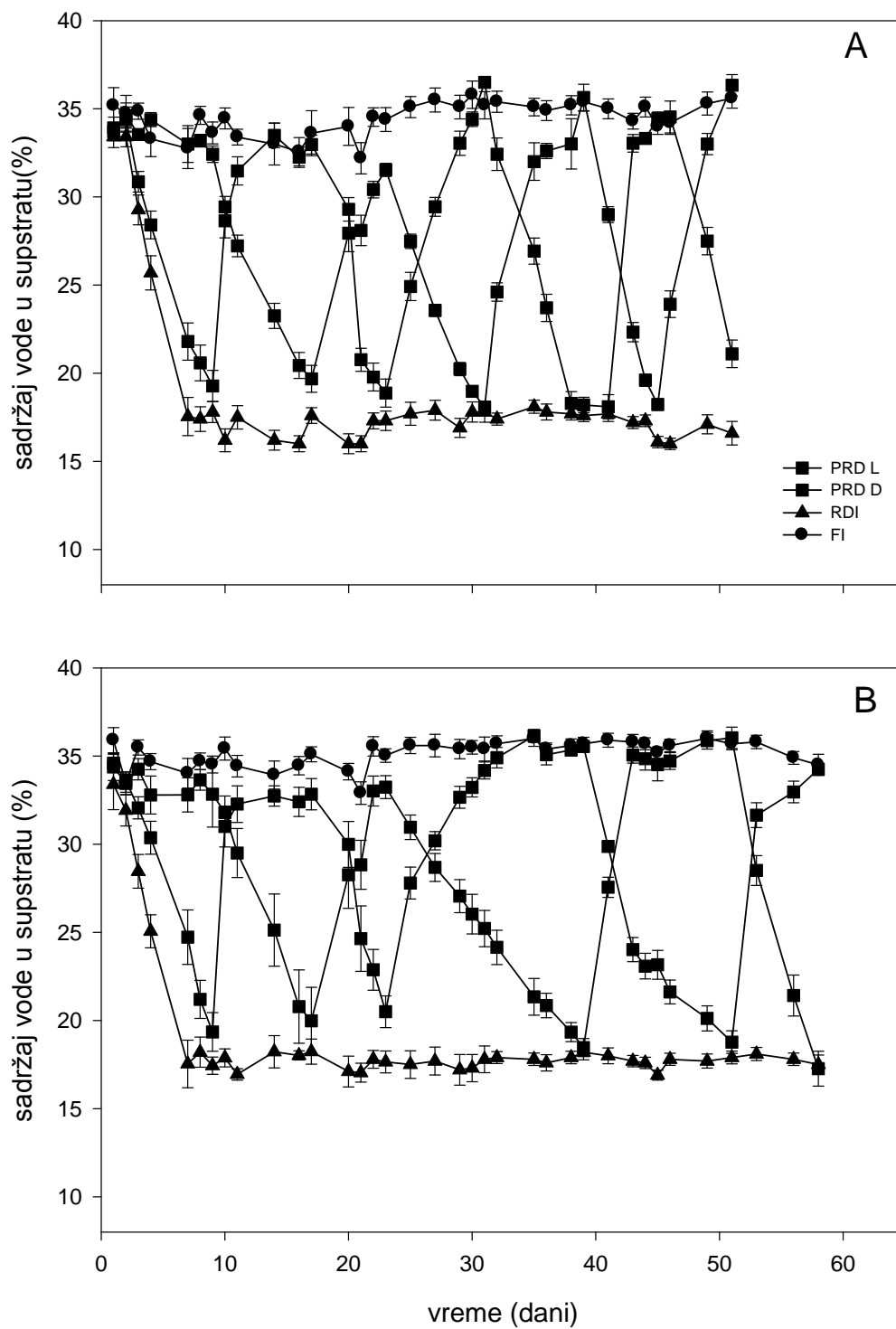
4 REZULTATI

4.1 Fiziološka istraživanja

4.1.1 Sadržaj vode u zemljištu

Merenja količine vode u zemljištu su obavljena sa ciljem kontrole režima navodnjavanja u ispitivanim tretmanima. Kako ovi rezultati mogu indirektno da ukažu i na kapacitet korena za usvajanje vode, oni su korišćeni i sa tog aspekta za analizu uticaja tretmana PRD i RDI kod divljeg tipa i *flacca* mutanta.

Promene u sadržaju vode u supstratu (θ) kod FI, PRD i RDI biljaka, divljeg tipa i *flacca* mutanta u toku eksperimenta prikazane su na Sl. 4.1. Vrednosti sadržaja vode u supstratu su bile statistički značajno niže kod RDI biljaka i u nezalivanoj strani kod PRD biljaka u poređenju sa kontrolnim biljkama. Dnevni sadržaj vode u supstratu kod kontrolnih biljaka posle zalivanja održavao se blizu poljskog vodnog kapaciteta (36%), dok je sadržaj vode kod RDI biljaka konstantno opadao, da bi se nakon 7 dana održavao na nivou između 16 i 18%. Razlike u sadržaju vode u supstratu između zalivane i nezalivane strane kod PRD biljaka su bile statistički značajne tokom celog eksperimenta. Sadržaj vode u zalivanoj strani održavao se između 32 i 36%, dok je u nezalivanoj strani padao sve do vrednosti od oko 18%. Prosečno vreme između dve promene strana zalivanja kod PRD tretmana iznosilo je za divlji tip oko 8 dana, dok je kod *flacca* mutanta bilo potrebno nešto više vremena i iznosilo je oko 10 dana. Sporiye sušenje nezalivane strane u PRD tretmanu, kod *flacca* mutanta, ukazuje na manji utrošak, a verovatno i usvajanje vode, u odnosu na divlji tip.



Slika 4.1 Promene u sadržaju vode u supstratu za FI, PRD i RDI tretmane navodnjavanja u toku eksperimenta kod biljaka paradajza divljeg tipa (A) i *flacca* mutanta (B)

4.1.2 Rastenje biljaka

U okviru eksperimentalnih sistema je praćen efekat tretmana na rastenje biljaka tako što je merena visina biljaka i obrazovanje sveže i suve mase listova, stabla i korena.

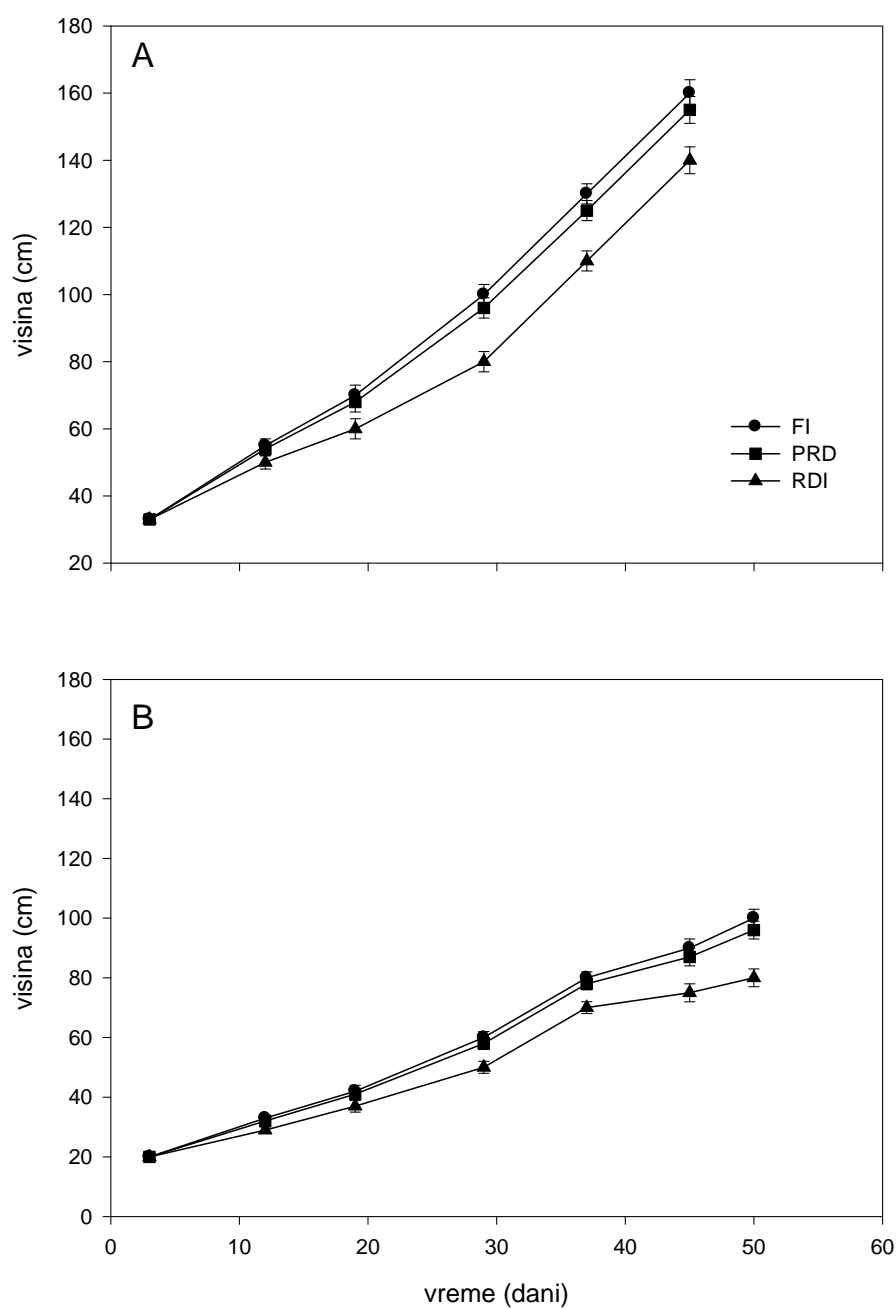
4.1.2.1 Visina

Uticaoj različitih tretmana (FI, PRD i RDI) na visinu biljaka divljeg tipa i mutanata *flacca* prikazan je na Sl. 4.2.

PRD i RDI biljke bile su niže u poređenju sa kontrolnim biljkama i kod divljeg tipa i kod *flacca* mutanta. Na kraju eksperimenta visina FI, PRD i RDI biljaka, kod divljeg tipa, bila je 160 cm, 155 cm i 140 cm (Sl. 4.2-A), tako da su PRD i RDI biljke bile niže za 3.1% i 12.5% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u visini između RDI i PRD biljaka ($P < 0.001$), između RDI i FI biljaka ($P < 0.001$), kao i između PRD i FI biljaka ($P < 0.05$).

Kod *flacca* mutanta, na kraju eksperimenta visina FI, PRD i RDI biljaka je bila 100 cm, 96 cm i 80 cm (Sl. 4.2-B), tako da su PRD i RDI biljke bile niže za 4% i 20% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u visini između RDI i PRD biljaka ($P < 0.001$), između RDI i FI biljaka ($P < 0.001$), kao i između PRD i FI biljaka ($P < 0.05$). Biljke *flacca* mutanta su bile niže u odnosu na divlji tip 37%-43% zavisno od tretmana, tako da je značajan uticaj na visinu biljaka imao genotip ($P < 0.001$).

Dobijeni rezultati su pokazali da su PRD i RDI tretmani doveli do redukcije visine kod oba testirana genotipa, pri čemu je RDI tretman u mnogo većoj meri redukovao visinu u odnosu na PRD tretman i to više kod *flacca* mutanta nego kod divljeg tipa.



Slika 4.2 Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (RDI, PRD i FI) na visinu biljaka paradajza divljeg tipa (A) i *flacca* mutanta (B)

4.1.2.2 Sveža masa stabla, listova i korena

Ukupna sveža masa biljaka divljeg tipa gajenih u PRD (755 g) i RDI tretmanima (625 g) je takođe bila manja od sveže mase u optimalnim uslovima (860 g). Uticaj FI, PRD i RDI na distribuciju sveže mase (u listove, stablo i koren) kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.3 i 4.4.

Sveža masa listova kod PRD i RDI biljaka bila je manja u odnosu na kontrolne biljke kod divljeg tipa. Kod FI, PRD i RDI biljaka sveža masa listova iznosila je 614 g, 523 g i 451 g na kraju eksperimenta (Sl.4.3-A), tako da je kod PRD i RDI biljaka sveža masa listova bila manja za 14.8% i 26.5% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u svežoj masi listova između FI i PRD biljaka ($P<0.05$), odnosno FI i RDI biljaka ($P<0.05$).

Sveža masa stabla kod PRD i RDI biljaka bila je manja u odnosu na kontrolne biljke divljeg tipa. Na kraju eksperimenta ona je kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila 222 g, 209 g i 155 g (Sl.4.3-B), tako da je kod PRD i RDI biljaka sveža masa stabla bila manja za 6% i 30% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u svežoj masi stabla između FI i RDI biljaka ($P<0.01$), kao i između RDI i PRD biljaka ($P<0.05$).

Sveža masa korena kod PRD i RDI biljaka bila je manja u odnosu na kontrolne biljke kod divljeg tipa. Na kraju eksperimenta ona je kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila 24 g, 23 g i 19 g (Sl. 4.3-C), tako da je kod PRD i RDI biljaka došlo do smanjenja sveže mase korena za 4.2% i 20.5% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u svežoj masi korena samo između FI i RDI biljaka ($P<0.05$).

Ukupna sveža masa *flacca* mutanta je, takođe, u tretmanu RDI (199 g) bila manja od FI tretmana (238 g), ali je, za razliku od visine biljaka, došlo do povećanja sveže mase PRD biljaka (267 g) u odnosu na FI. Distribucija sveže mase u ispitivanim organima kod *flacca* mutanta je pokazala da je sveža masa listova kod RDI biljaka bila manja u odnosu na kontrolne biljke, dok je kod PRD biljaka bila veća u odnosu na kontrolne biljke. Na kraju eksperimenta ona je za FI, PRD i RDI biljke iznosila 123 g, 143 g i 95 g (Sl. 4.4-A), tako da je kod PRD biljaka sveža masa listova bila veća za 16.3%, dok je kod RDI biljaka bila manja za 22.% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u svežoj masi listova između FI i RDI biljaka ($P<0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P<0.05$).

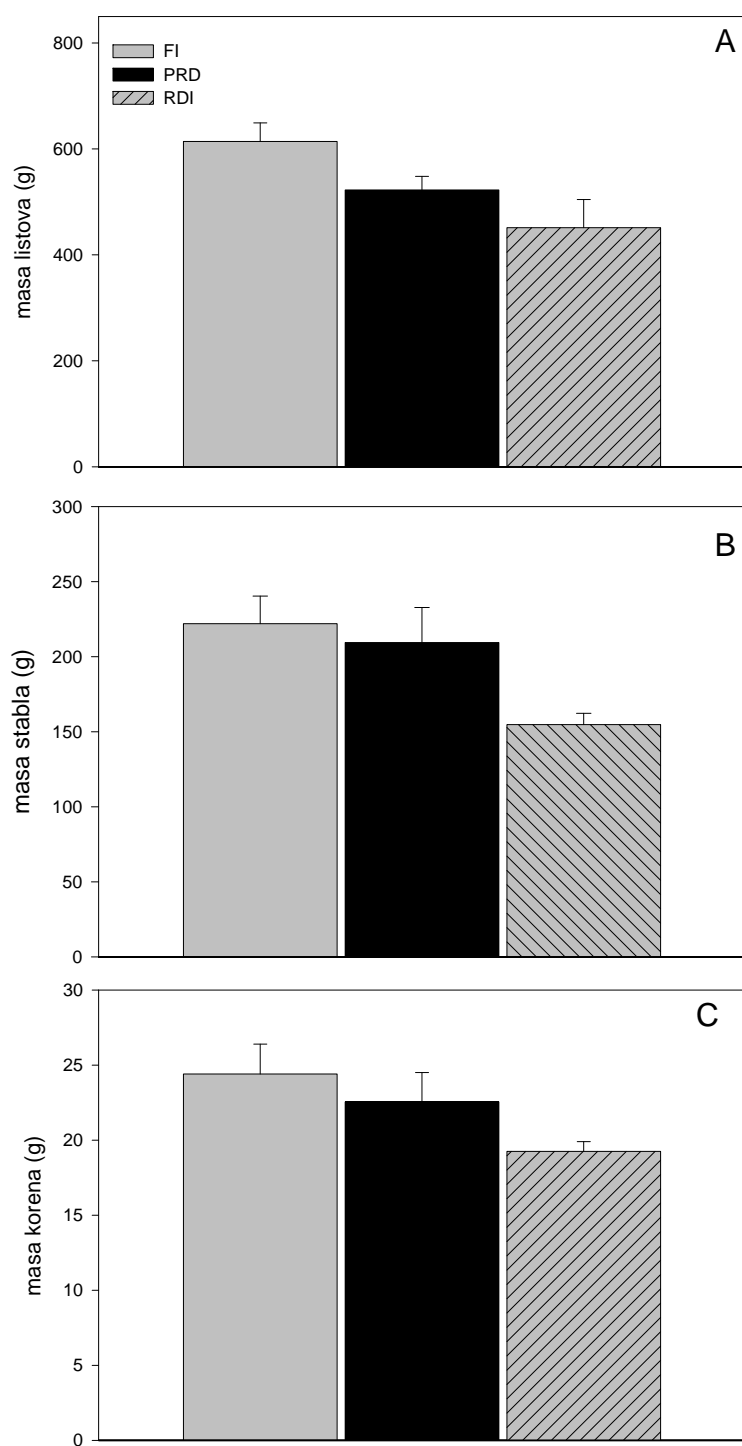
Sveža masa listova kod *flacca* mutanta bila je manja u odnosu na biljke divljeg tipa 3.7-5 puta, zavisno od tretmana, te je utvrđen značajan uticaj genotipa na svežu masu stabla ($P < 0.001$). Dobijeni rezultati su pokazali da su PRD i RDI tretman doveli do redukcije sveže mase listova kod divljeg tipa, dok je kod *flacca* mutanta samo RDI tretman doveo do redukcije.

Kod *flacca* mutanta, sveža masa stabla kod PRD biljaka bila je veća u odnosu na kontrolne biljke, dok je kod RDI biljaka bila manja i na kraju eksperimenta kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila je 106 g, 114 g i 96 g (Sl. 4.4-B), tako da je kod PRD biljaka sveža masa stabla bila veća za 7.5%, dok je kod RDI biljaka bila manja za 9.4% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u svežoj masi stabla samo između PRD i RDI biljaka ($P < 0.05$).

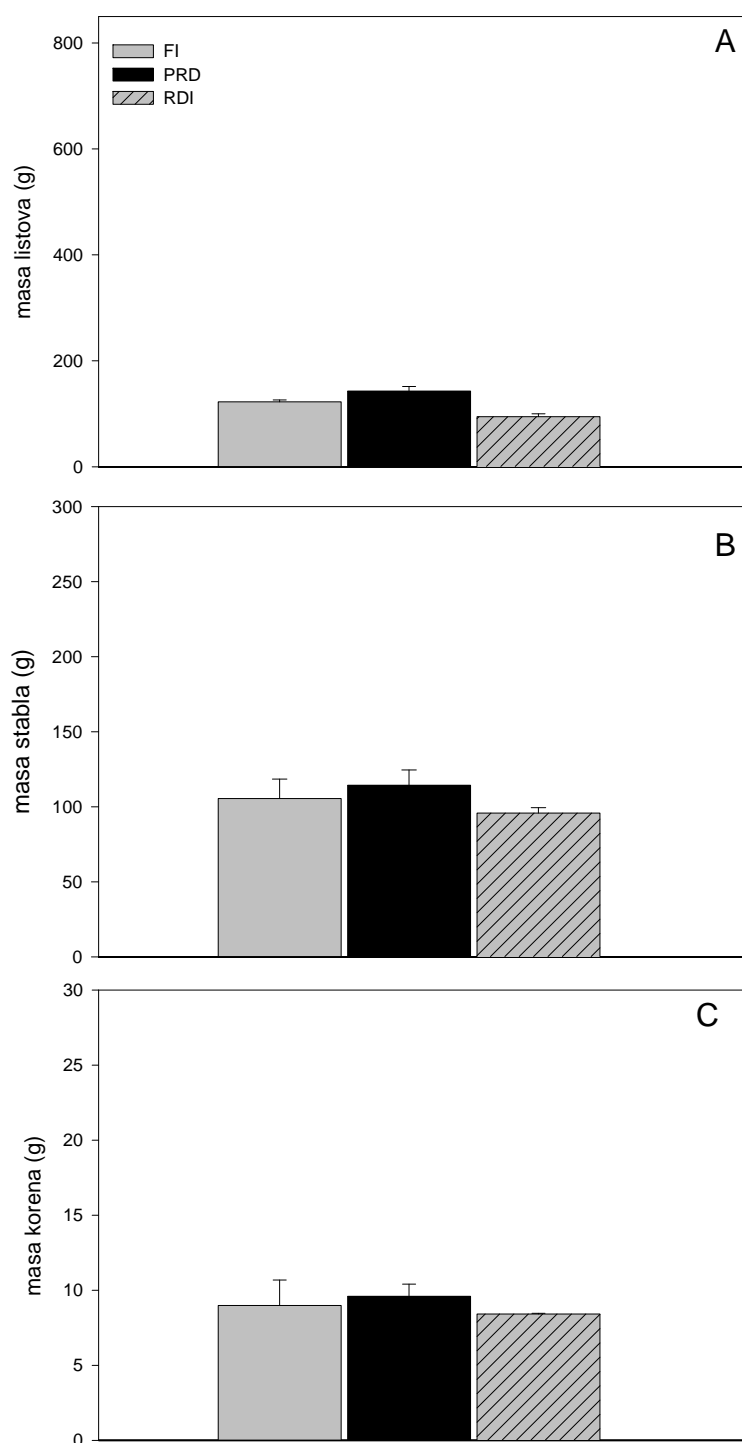
Sveža masa stabla kod *flacca* mutanta je bila manja od sveže mase stabla divljeg tipa 1.8-2.1 puta, zavisno od tretmana, te je utvrđen značajan uticaj genotipa ($P < 0.001$) na svežu masu stabla. Dobijeni rezultati su pokazali da je PRD imao različit uticaj kod različitih genotipova.

Kod *flacca* mutanta, sveža masa korena kod PRD biljaka bila je veća, dok je kod RDI biljaka bila manja u poređenju sa kontrolnim biljkama, tako da je na kraju eksperimenta sveža masa korena kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila 9 g, 10 g i 8 g (Sl. 4.4-C). Kod PRD biljaka sveža masa korena je bila veća za 11%, dok je kod RDI biljaka bila manja za 11% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u svežoj masi korena između FI, PRD i RDI biljaka.

Sveža masa korena *flacca* mutanta biljaka bila je manja u odnosu na biljke divljeg tipa 2.3-2.7 puta, u zavisnosti od tretmana, te je utvrđen značajan uticaj genotipa ($P < 0.001$) na svežu masu korena.



Slika 4.3 Uticaj RDI, PRD i FI tretmana navodnjavanja na svežu masu listova (A), stabla (B) i korena (C) kod biljaka paradajza divljeg tipa



Slika 4.4 Uticaj RDI, PRD i FI tretmana navodnjavanja na svežu masu listova (A), stabla (B) i korena (C) kod biljaka paradajza *flacca* mutanta

4.1.2.3 Suva masa stabla, listova i korena

Promene u suvoj masi su, takođe, potvrdile rezultate sveže mase jer je suva masa optimalno zalivanih biljaka divljeg tipa (103.6 g) bila veća od suve mase u uslovima PRD (79.8 g) i RDI (77.9 g). Distribucija suve mase između listova, stabla i korena u toku eksperimentalnog perioda kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta prikazana je na Sl. 4.5 i 4.6.

Suva masa listova kod PRD i RDI biljaka bila je manja u odnosu na kontrolne biljke kod divljeg tipa. Kod FI, PRD i RDI biljaka suva masa listova iznosila je 73 g, 55 g i 55 g na kraju eksperimenta (Sl.4.5-A), tako da je kod PRD i RDI biljaka suva masa listova bila manja za 24.7% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u suvoj masi listova između FI i PRD biljaka ($P<0.05$), odnosno FI i RDI biljaka ($P<0.05$).

Suva masa stabla kod PRD i RDI biljaka divljeg tipa bila je manja u odnosu na kontrolne biljke. Na kraju eksperimenta ona je kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila 27.7 g, 22.4 g i 20.8 g (Sl. 4.5-B), tako da je kod PRD, odnosno RDI biljaka, suva masa stabla bila manja za 19%, odnosno 25% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u suvoj masi stabla između FI i RDI biljaka ($P<0.01$).

Suva masa korena kod PRD i RDI biljaka bila je manja u odnosu na kontrolne biljke kod divljeg tipa. Na kraju eksperimenta ona je kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila 2.9 g, 2.4 g i 2.1 g (Sl. 4.5-C), tako da je kod PRD i RDI biljaka došlo do smanjenja suve mase korena za 17.2% i 24.1% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u suvoj masi korena između FI, PRD i RDI biljaka.

Ukupna suva masa po biljci je, kod *flacca* mutanta, u FI uslovima bila 33.5 g, u PRD tretmanu je obrazovana ukupna suva masa od 35.1 g, dok je u RDI tretmanu izmereno 31.6 g po biljci. Suva masa listova kod RDI biljaka bila je manja, dok je kod PRD biljaka bila veća u odnosu na kontrolne biljke. Na kraju eksperimenta ona je za FI, PRD i RDI biljke iznosila 20 g, 22 g i 18.8 g (Sl. 4.6-A), tako da je kod PRD biljaka suva masa listova bila veća za 1 %, dok je kod RDI biljaka bila manja za 1 % u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u suvoj masi listova između FI i RDI biljaka ($P<0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P<0.05$).

Suva masa listova kod *flacca* mutanta bila je manja u odnosu na biljke divljeg tipa 2.0-3.65 puta, zavisno od tretmana, te je utvrđen značajan uticaj genotipa na suhu

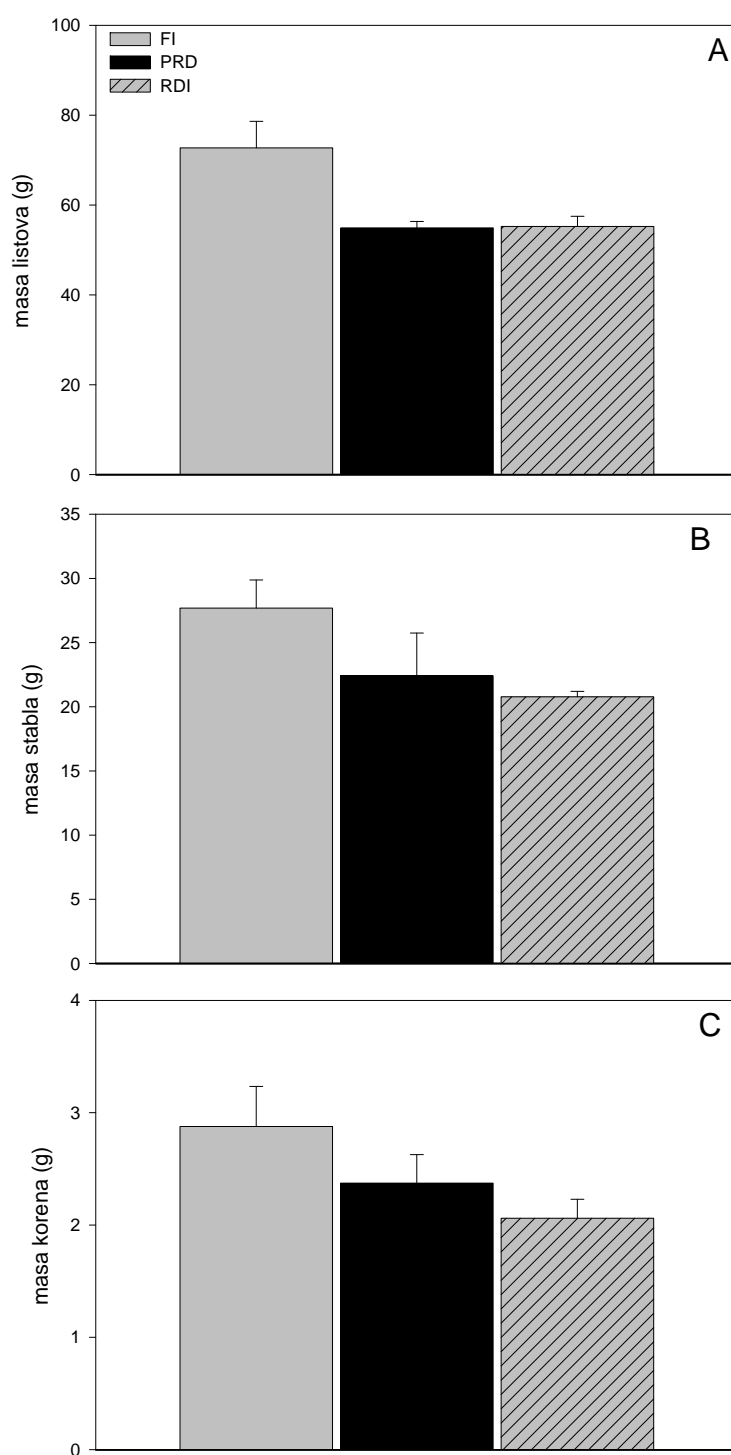
masu listova ($P < 0.001$). Dobijeni rezultati su pokazali da su PRD i RDI tretman doveli do redukcije suve mase listova kod divljeg tipa, dok je kod *flacca* mutanta samo RDI tretman doveo do redukcije.

Kod *flacca* mutanta, suva masa stabla kod PRD i RDI biljaka bila je manja u odnosu na kontrolne biljke i na kraju eksperimenta kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila je 12.4 g, 11.9 g i 11.8 g (Sl. 4.6-B), tako da je kod PRD i RDI biljaka suva masa stabla bila manja za 4% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u suvoj masi stabla između različitih tretmana.

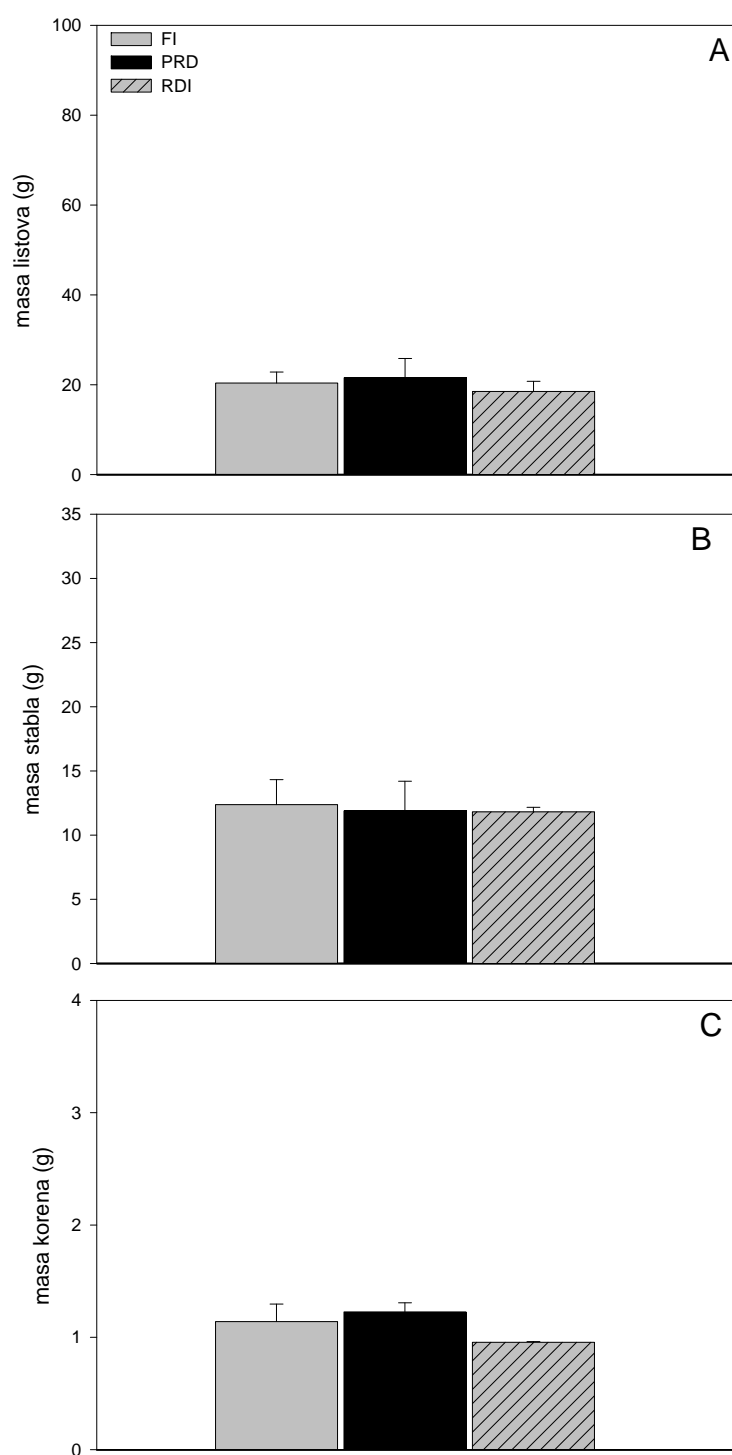
Suva masa stabla kod *flacca* mutanta je bila manja od suve mase stabla biljaka divljeg tipa oko 2 puta, te je utvrđen značajan uticaj genotipa na suhu masu stabla ($P < 0.001$). Dobijeni rezultati su pokazali da su PRD i RDI tretman kod oba genotipa doveli do redukcije suve mase stabla, ali kod *flacca* mutanta ona nije bila statistički značajna, dok je kod divljeg tipa bila statistički značajna samo za RDI.

Kod *flacca* mutanta, suva masa korena kod PRD biljaka bila je veća, dok je kod RDI biljaka bila manja u poređenju sa kontrolnim biljkama, tako da je na kraju eksperimenta suva masa korena kod FI, PRD i RDI biljaka iznosila 1.1 g, 1.2 g i 1.0 g (Sl. 4.6-C). Kod PRD biljaka suva masa korena je bila veća za 9%, dok je kod RDI biljaka bila manja za 9% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika samo u suvoj masi korena između PRD i RDI biljaka ($P < 0.05$).

Suva masa korena *flacca* mutanta biljaka bila je manja u odnosu na biljke divljeg tipa 2 -2.7 puta, u zavisnosti od tretmana, te je utvrđen značajan uticaj genotipa ($P < 0.001$) na suhu masu korena.



Slika 4.5 Uticaj RDI, PRD i FI tretmana navodnjavanja na suhu masu listova (A), stabla (B) i korena (C) kod biljaka paradajza divljeg tipa



Slika 4.6 Uticaj RDI, PRD i FI tretmana navodnjavanja na suhu masu listova (A), stabla (B) i korena (C) kod biljaka paradajza *flacca* mutanta

4.1.3 Odnos suve mase korena i izdanka

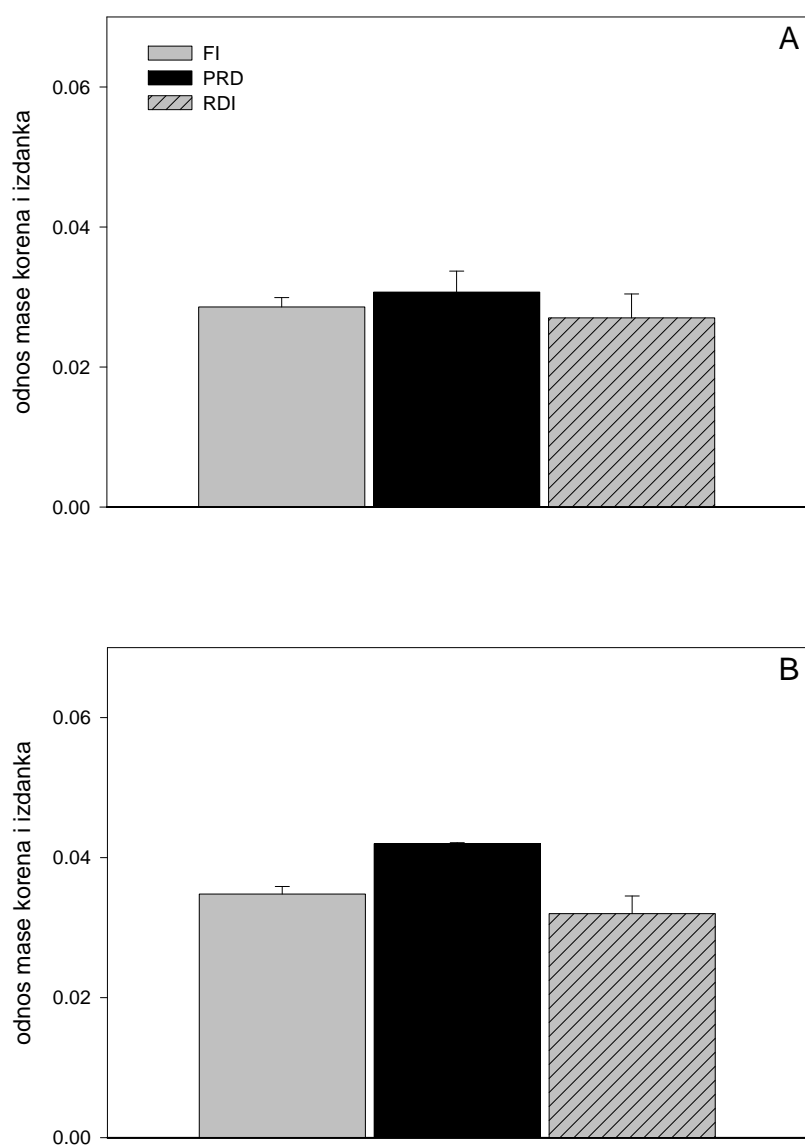
Odnos suve mase korena i izdanka je pokazatelj koji može da ukaže na to da li je tretman uticao više na rast izdanka ili korena, kao i na pravac transporta asimilata. Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na odnos suve mase korena i izdanka kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.7.

Odnos suve mase korena i izdanka kod FI, PRD i RDI biljaka divljeg tipa na kraju eksperimenta bio je 0.0286, 0.0307 i 0.0270 (Sl. 4.7-A). Kod PRD biljaka došlo je do povećanja odnosa suve mase korena i izdanka za 7.3% u odnosu na kontrolne biljke, ali t-testom nije utvrđena značajna razlika u odnosu suve mase korena i izdanka između FI i PRD biljaka.

Odnos suve mase korena i izdanka kod PRD biljaka bio je veći u odnosu na kontrolne biljke, kod *flacca* mutanta, tako da je na kraju eksperimenta kod FI, PRD i RDI biljaka iznosio 0.0348, 0.042 i 0.032 (Sl.4.7-B). Kod PRD biljaka došlo je do povećanja odnosa suve mase korena i izdanka za 20.7% u odnosu na kontrolne biljke, pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u odnosu suve mase korena i izdanka između FI i PRD biljaka ($P<0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P<0.05$).

Odnos suve mase korena i izdanka kod *flacca* mutanta bio je veći u odnosu na kontrolne biljke za 18%-37%, zavisno od tretmana, pri čemu nije utvrđen uticaj genotipa na odnos suve mase korena i izdanka.

Dobijeni rezultati su pokazali da je PRD tretman doveo do značajnog povećanja odnosa suve mase korena i izdanka kod *flacca*.



Slika 4.7 Uticaj RDI, PRD i FI tretmana navodnjavanja na odnos suve mase korena i izdanka kod biljaka paradajza divljeg tipa (A) i *flacca* mutanta (B)

4.1.4 Vodni režim biljaka

Ispitivanja su imala za cilj i da se utvrdi kako tretmani utiču na promene vodnog režima biljaka. Kao pokazatelji vodnog režima biljaka korišćeni su ukupni potencijal vode u listovima i provodljivost stoma.

4.1.4.1 Potencijal vode listova

U Tab. 2 i 3 prikazane su promene u potencijalu vode listova (Ψ_l) biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i mutanta *flacca* u toku eksperimenta, nastale pod uticajem RDI, PRD i FI tretmana navodnjavanja.

Kod biljaka divljeg tipa, vrednosti potencijala vode se nisu značajno razlikovale između FI i PRD tretmana i to, kako apsolutne vrednosti, tako i dinamika njihove promene u toku ispitivanog eksperimentalnog perioda. Ono što se ispoljilo kao razlika je da su RDI biljke imale značajno niži vodni potencijal listova od kontrolnih i PRD biljaka. Na kraju ispitivanog perioda kod FI biljaka su izmerene vrednosti od -0.44 MPa, kod PRD nešto niže (-0.50 MPa), a kod RDI najniže (-0.75 MPa).

Kod *flacca* mutanta, u poslednjem merenju RDI tretmana su izmerene vrednosti od -0.75 MPa koje su bile značajno ($P < 0.05$) niže od vrednosti izmerenih kod FI (-0.57 MPa) i PRD (-0.51 MPa) biljaka. Konačni stepen stresa u listovima RDI *flacca* biljaka se, međutim, nije značajno razlikovao od stepena stresa suše kome su biljke divljeg tipa u RDI tretmanu bile izložene. Ono što se ispoljilo kao razlika između divljeg tipa i *flacca* mutanta su vrednosti potencijala vode u FI tretmanu, koje u toku celog eksperimentalnog perioda ukazuju na veći stepen stresa kod *flacca* mutanta (prosečno -0.65 MPa) u odnosu na divlji tip (prosečno -0.50 MPa). Slične razlike su se ispoljile i u PRD tretmanu gde su u toku oglada izmerene niže prosečne vrednosti kod *flacca* mutanta (-0.63 MPa) u odnosu na divlji tip (-0.52 MPa).

Tab.2 Uticaj ispitivanih tretmana (FI,PRD i RDI) na vrednosti potencijala vode u listovima biljaka divljeg tipa

Dani tretmana	FI (-MPa)	PRD (-MPa)	RDI (-MPa)
1	0.49 ± 0.025	0.55 ± 0.058	0.69 ± 0.10
9	0.58 ± 0.011	0.54 ± 0.022	0.58 ± 0.024
17	0.49 ± 0.048	0.50 ± 0.053	0.72 ± 0.060
23	0.44 ± 0.018	0.50 ± 0.063	0.75 ± 0.060

Tab.3 Uticaj ispitivanih tretmana (FI,PRD i RDI) na vrednosti potencijala vode u listovima biljaka *flacca* mutanta

Dani tretmana	FI (-MPa)	PRD (-MPa)	RDI (-MPa)
1	0.75 ± 0.061	0.72 ± 0.053	0.66 ± 0.031
9	0.56 ± 0.050	0.61 ± 0.030	0.65 ± 0.010
17	0.70 ± 0.083	0.70 ± 0.064	0.67 ± 0.067
23	0.57 ± 0.030	0.49 ± 0.034	0.75 ± 0.010

Dinamika promene potencijala vode u toku ispitivanog perioda pokazuje da se vrednosti potencijala vode u listovima biljaka divljeg tipa izloženih PRD tretmanu povećavaju sa -0,55 do -0.50 MPa, dok je ta promena više izražena kod *flacca* mutanta (od -0.72 do -0.49 MPa). To ukazuje da se u toku trajanja ogleda i ponavljanja PRD ciklusa smanjuje stepen stresa kod ovih biljaka.

4.1.4.2 Provodljivost stoma

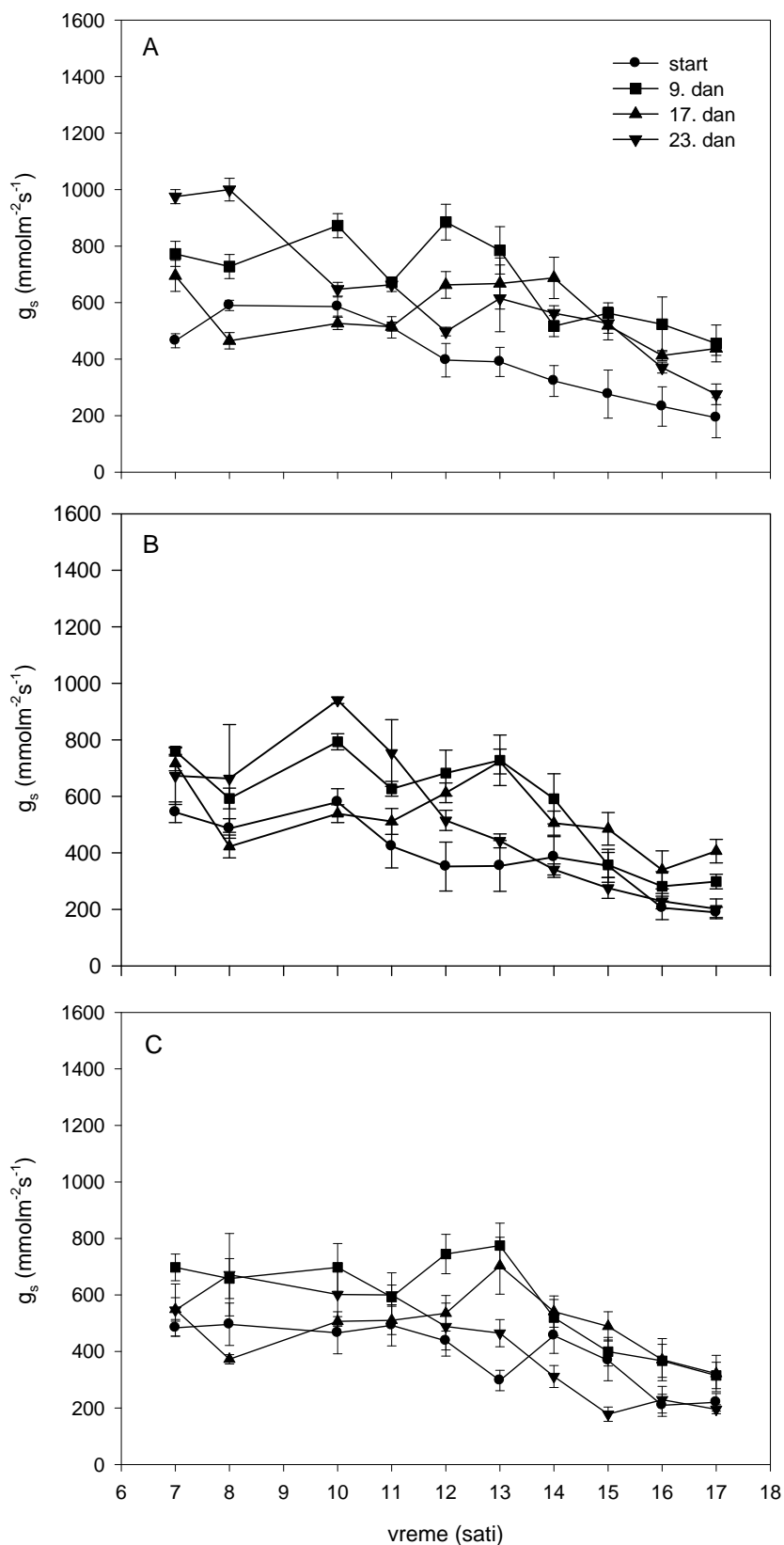
Na Sl. 4.8 i 4.9 prikazane su promene u provodljivosti stoma (g_s) u toku eksperimenta kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta, koje su nastale pod uticajem FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja. Da bi se efekti mogli pravilno tumačiti, bilo je potrebno da se prati dnevna dinamika promene provodljivosti stoma i to na početku eksperimenta, kao i posle prvog, drugog i trećeg okreta strane PRD koja se zaliva/suši. To odgovara 1., 9., 17. i 23. danu tretmana.

Kod biljaka divljeg tipa, PRD i RDI biljke su imale niže vrednosti provodljivosti stoma u odnosu na kontrolne biljke u većini merenja, a naročito prilikom trećeg okreta kod PRD (23. dan) kada su PRD, odnosno RDI biljke imale niže vrednosti od FI u 8, odnosno 10 od 10 merenja (Sl. 4.8). Ono što je, takođe, karakteristično za ogled, a nije neuobičajeno za merenje reakcija stoma, je da je utvrđeno znatno variranje u vrednostima provodljivosti stoma. Tako su se vrednosti provodljivosti stoma kod FI, PRD i RDI biljaka, u danu prve promene strane zalivanja (9. dan) kod PRD, kretale između $455-885 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, $281-793 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, odnosno $315-775 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vrednosti provodljivosti stoma kod PRD, odnosno RDI biljka su bile niže od vrednosti kontrolnih biljaka u 8 od 10 merenja. Prilikom merenja 17-tog dana (drugog okreta PRD) vrednosti provodljivosti stoma su kod FI, PRD i RDI biljaka iznosile $412-695 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, $339-716 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $322-548 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vrednosti provodljivosti stoma kod PRD, odnosno RDI biljka su bile niže od vrednosti kontrolnih biljaka u 6, odnosno, 9 od 10 merenja. Prilikom trećeg okreta kod PRD (23. dan) vrednosti provodljivosti stoma kod FI, PRD i RDI biljaka su iznosile $275-1000 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, $202-940 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $195-761 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Poređenja dnevne dinamike ispitivanih promena provodljivosti stoma pokazuju razlike i to, kako u toku ispitivanog perioda (okreta), tako i između tretmana. Dinamika u FI tretmanima u toku celog perioda ispitivanja pokazuje da je, generalno, veća provodljivost stoma izmerena 23. dana (u danu trećeg okreta PRD) nego na početku ogleda. Ono što je, takođe, karakteristično je da su se vrednosti dinamike dnevne maksimalne otvorenosti stoma razlikovale. Na početku i na kraju ogleda je izmeren maksimum otvorenosti u 8 h (1. i 23. dan), dok se prilikom prvog okreta kod PRD (9. dan) maksimum javlja u 12 h i kasnije, u 12 h i u 14 h (17. dan-drugi okret PRD).

U tretmanu PRD, dinamika promene otvorenosti stoma pokazuje i sličnosti i razlike u toku trajanja ogleđa. Sličnosti se ogledaju u tome što na početku ogleđa, kao i prilikom napredovanja ogleđa (svaki dalji okret PRD), dolazi do brzog delimičnog zatvaranja stoma u 8 h da bi se one potom otvorile u 10 h, a nakon čega sledi sporije zatvaranje stoma. Ono što je, takođe, karakteristično je da je u toj sporijoj fazi najviše izražen efekat zatvaranja na kraju ogleđa (treći okret-23. dan).

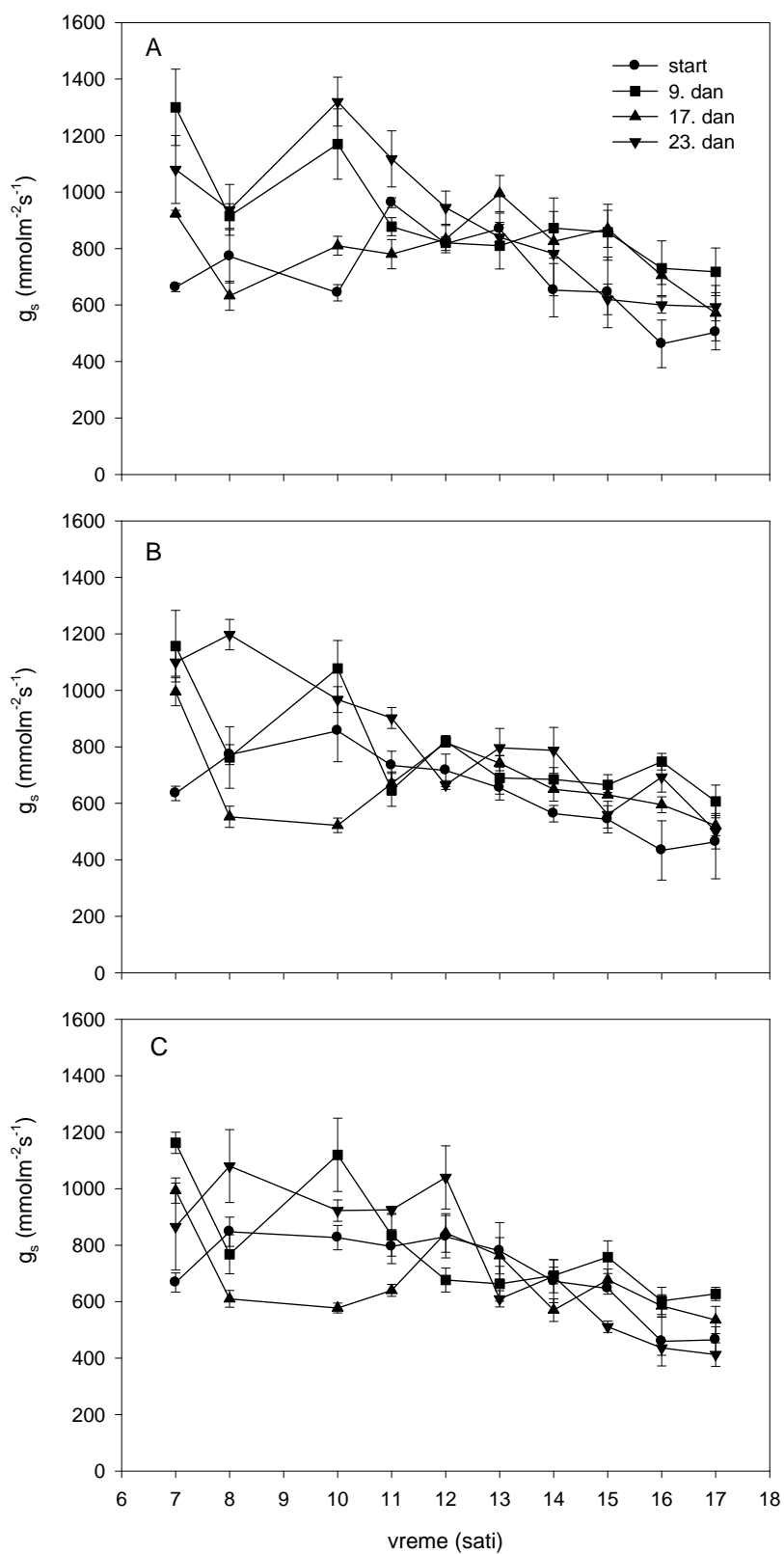
Dinamika promene u tretmanu RDI, takođe, pokazuje da dolazi do inicijalnog zatvaranja stoma, ali da su razlike u vrednostima provodljivosti stoma u toku trajanja ogleđa manje izražene u ranim jutarnjim satima. One su zato bile izražene u 13 h kada su prvi i drugi okret PRD (9. i 17. dan) doveli do povećanja otvorenosti stoma, za razliku od poslednjeg uzorkovanja (23. dan) kod koga od 11 h sledi proces zatvaranja stoma. Takva dinamika zatvaranja stoma sledi sličan trend kao i u PRD tretmanu ali se proces zatvaranja sporije obavlja da bi konačne vrednosti provodljivosti stoma u 17 h bile značajno niže ($195 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) od PRD ($202 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$).



Slika 4.8 Promene u provodljivosti stoma (g_s) u toku eksperimenta kod biljaka divljeg tipa nastale pod uticajem FI (A), PRD (B) i RDI (C) tretmana navodnjavanja

Kod *flacca* mutanta, PRD i RDI biljke su imale niže vrednosti provodljivosti stoma u odnosu na kontrolne biljke u većini merenja (Sl. 4.9). Vrednosti provodljivosti stoma kod FI, PRD i RDI biljaka u toku dana su devetog dana eksperimenta (prilikom prvog okreta kod PRD) iznosile 593-1320 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 501-1197 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, odnosno 412-1080 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vrednosti provodljivosti stoma kod PRD, odnosno RDI biljka su bile niže od vrednosti kontrolnih biljaka u 8, odnosno 10 od 10 merenja. Prilikom drugog okreta (17. dan) vrednosti provodljivosti stoma su kod FI, PRD i RDI biljaka iznosile 571-995 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 521-995 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 535-993 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vrednosti provodljivosti stoma kod PRD i RDI biljka su bile niže od vrednosti kontrolnih biljaka u 8 od 10 merenja. Prilikom trećeg okreta PRD (23. dan), vrednosti provodljivosti stoma kod FI, PRD i RDI biljaka su iznosile 717-1300 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 606-1056 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 602-1162 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vrednosti provodljivosti stoma kod PRD, odnosno RDI biljka su bile niže od vrednosti kontrolnih biljaka u 6, odnosno 8 od 10 merenja.

Generalno, dnevna dinamika promena provodljivosti stoma u listovima *flacca* mutanta se razlikovala u zavisnosti od svih ispitivanih faktora: vremena merenja, broja okreta kod PRD i tretmana. U FI uslovima, rezultati pokazuju da su prvog dana početne vrednosti izmerene u 7 h rasle do 8 h, a potom, nakon još jednog opadanja u 10 h i porasta u 12 h, sledio je trend zatvaranja stoma. U isto vreme merenja za sve druge datume pokazuju suprotan trend. Početne vrednosti izmerene u 7 h su opadale do 8 h, da bi nakon toga vrednosti porasle u 10 h, nakon čega je sledilo konstantno opadanje. Kada se ove reakcije provodljivosti stoma uporede sa reakcijama biljaka divljeg tipa, uočavaju se razlike u vremenskom intervalu do 10 h kada promene kod *flacca* mutanta slede različit trend od divljeg tipa, ali i sa većim vrednostima provodljivosti stoma. Razlike u dnevnoj dinamici su, međutim, bile mnogo manje izražene u poslepodnevnim satima, da bi konačne vrednosti provodljivosti stoma u 17 h bile veće kod *flacca* biljaka ($596 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) od vrednosti za biljke divljeg tipa ($340 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$).



Slika 4.9 Promene u provodljivosti stoma (g_s) u toku eksperimenta kod *flacca* mutanta nastale pod uticajem FI (A), PRD (B) i RDI (C) tretmana navodnjavanja.

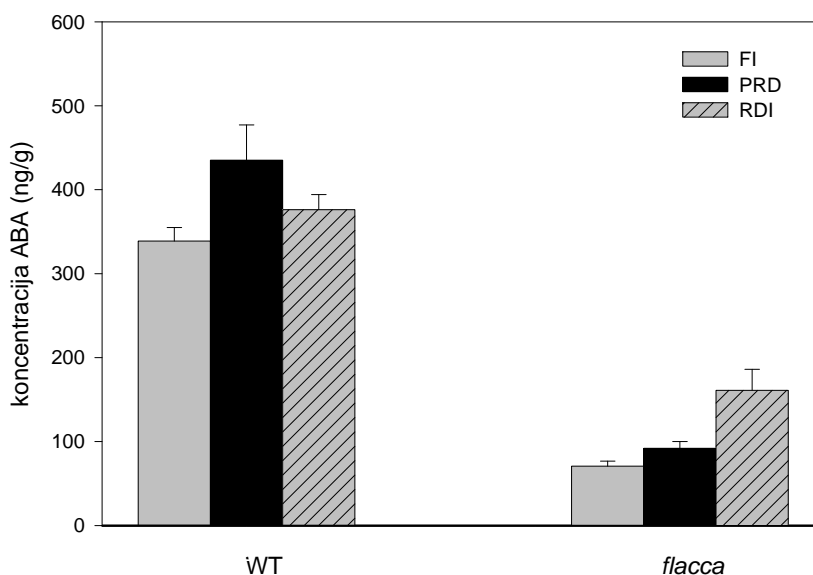
Dnevna dinamika promene provodljivosti stoma u listovima *flacca* mutanta se, takođe, razlikovala u PRD sistemu tokom oglada i to u prepodnevnim merenjima. Inicijalnu otvorenost u 7 h je sledila ili zatvorenost ili otvorenost u zavisnosti od dana merenja, da bi na kraju, prilikom trećeg okreta kod PRD (23. dan), u 8 h započeo postepen i kontinuiran proces zatvaranja stoma. To se razlikuje od dinamike provodljivosti stoma u startnom periodu oglada (1. dan), jer je tamo opadanje započelo tek u 10 h, a devetog i sedamnaestog dana (dan prvog i drugog okreta kod PRD) brzu, inicijalnu, reakciju opadanja provodljivosti stoma (u 8 h) prati porast do 10 h, odnosno 12 h. Posle tog vremena reakcije opadanja provodljivosti stoma se ne razlikuju u ispitivanim vremenskim intervalima. Takav trend u promeni provodljivosti stoma na kraju oglada se razlikuje od trenda provodljivosti stoma kod biljaka divljeg tipa, kod kojih u prepodnevnim satima preovlađuje sledeći sled reakcija: inicijalno brzo opadanje provodljivosti stoma-porast provodljivosti stoma-sporije ponovno opadanje.

U RDI tretmanu, promene dnevne dinamike u toku ispitivanih vremenskih intervala se ne razlikuju među sobom značajno. Jedina značajna razlika se ispoljava u 10 h kada su vrednosti provodljivosti stoma mnogo veće posle prvog i trećeg okreta kod PRD (9. i 23. dan) nego posle drugog (17. dan). Posle tog perioda generalni trend je opadanje provodljivosti stoma koji se u ovom periodu ne razlikuje mnogo od odgovarajućeg trenda za PRD. Vrednosti u 17 h su na kraju oglada nešto više kod PRD ($523 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) nego kod RDI ($510 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) *flacca* biljaka, ili vrednosti provodljivosti stoma za RDI kod biljaka divljeg tipa ($263 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$).

4.1.5 Sadržaj abscisinske kiseline u listovima

U reakcijama biljaka na sušu i PRD, značajnu ulogu igra stres hormon ABA čija je količina merena u listovima. Merenja količine ABA u ksilemu nisu obavljena zbog nemogućnosti dobijanja dovoljne količine ksilemskog soka kod *flacca* mutanta.

Na Sl. 4.10 prikazan je uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj ABA u listovima biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i mutanta *flacca*.



Slika 4.10 Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (Fi, PRD i RDI) na sadržaj abscisinske kiseline (ABA) u listovima kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

Vrednosti sadržaja ABA u listu kod FI, PRD i RDI biljaka divljeg tipa bile su $338.9 \text{ ng g FW}^{-1}$, $435.18 \text{ ng g FW}^{-1}$ i $376.25 \text{ ng g FW}^{-1}$, pri čemu su t-testom utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju ABA u listu između PRD i FI biljaka ($P < 0.05$) i RDI i FI biljaka ($P < 0.05$), dok između PRD i RDI biljaka nije utvrđena statistički značajna razlika. Vrednosti sadržaja ABA u listu kod FI, PRD i RDI biljaka *flacca* mutanta iznosile su $70.76 \text{ ng g FW}^{-1}$, $91.98 \text{ ng g FW}^{-1}$ i $161.04 \text{ ng g FW}^{-1}$, pri čemu su t-testom utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju ABA u listu između PRD i FI biljaka ($P < 0.05$), RDI i FI biljaka ($P < 0.01$) i PRD i RDI ($P < 0.01$). Utvrđeno je da su značajan uticaj na sadržaj ABA u listu imali tretman ($P < 0.01$) i genotip ($P < 0.001$).

4.1.6 Sadržaj biogenih elemenata u različitim organima biljaka paradajza

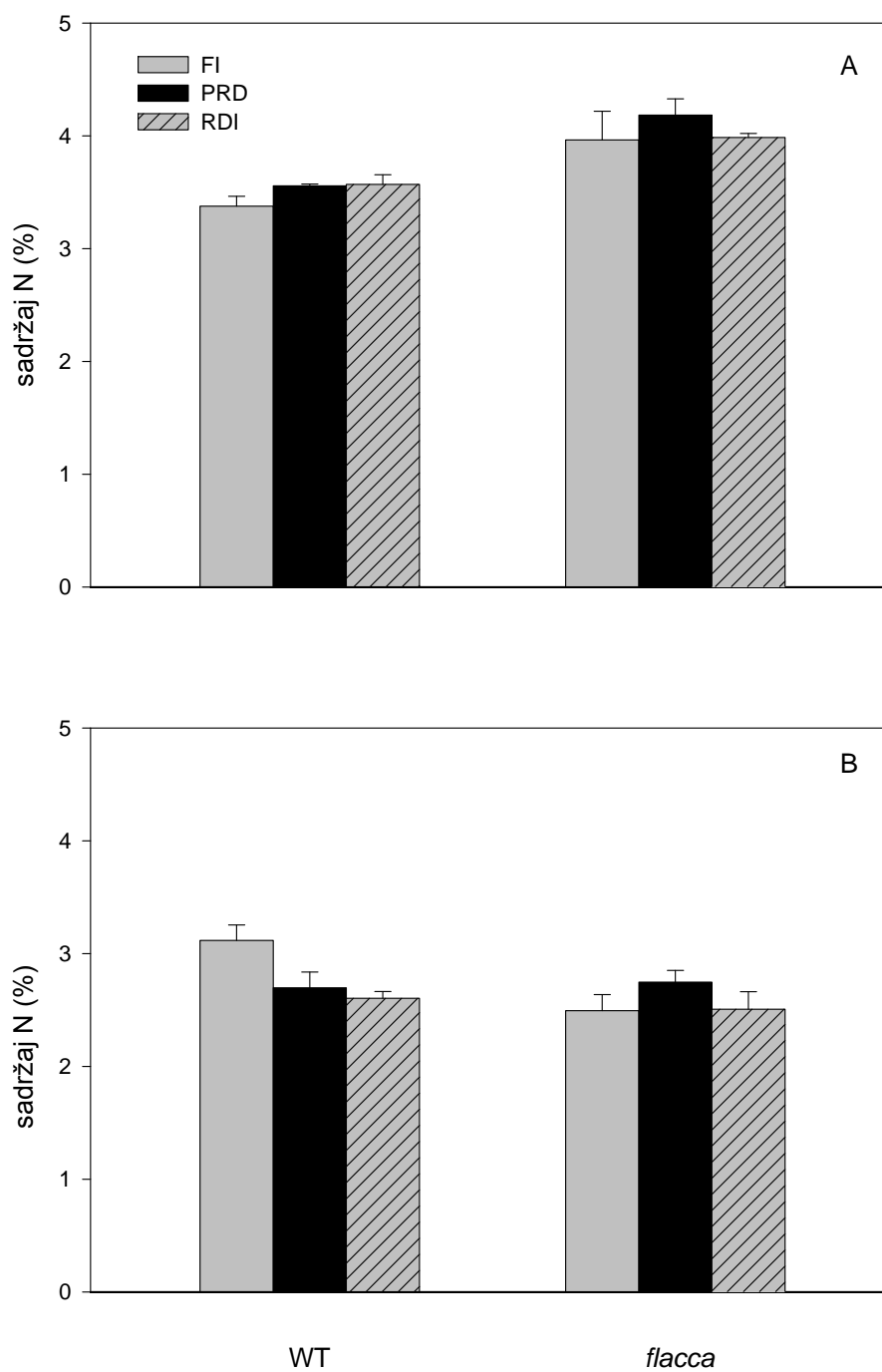
Istraživanja su obuhvatila i merenja količine biogenih makroelemenata (N, K, Ca, Mg), kao i mikroelemenata (Fe, Mn, Cu i Zn) u listovima i korenu. Ova merenja su imala za cilj da indirektno objasne kako ispitivani tretmani utiču na usvajanje i distribuciju ovih elemenata od kojih zavise mnogi fiziološki procesi.

Uticaoj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na sadržaj N u listovima i korenu kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.11.

Kod divljeg tipa, sadržaj azota (N) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 3.38%, 3.56% i 3.57% (Sl. 4.11A), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju N u listovima između FI i PRD biljaka ($P < 0.05$). Sadržaj N u korenu, kod FI, PRD i RDI biljaka, bio je 3.12%, 2.70% i 2.60% (Sl. 4.11B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju N u korenu između FI i PRD biljaka ($P < 0.05$), kao i između FI i RDI biljaka ($P < 0.01$).

Kod *flacca* mutanta, sadržaj N u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 3.96%, 4.18% i 3.99% (Sl. 4.11A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju N u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj N u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 2.49%, 2.75% i 2.51% (Sl. 4.11B), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju N u korenu između biljaka različitih tretmana navodnjavanja.

Rezultati pokazuju veću koncentraciju N u listovima *flacca* mutanta u odnosu na divlji tip u svim tretmanima.



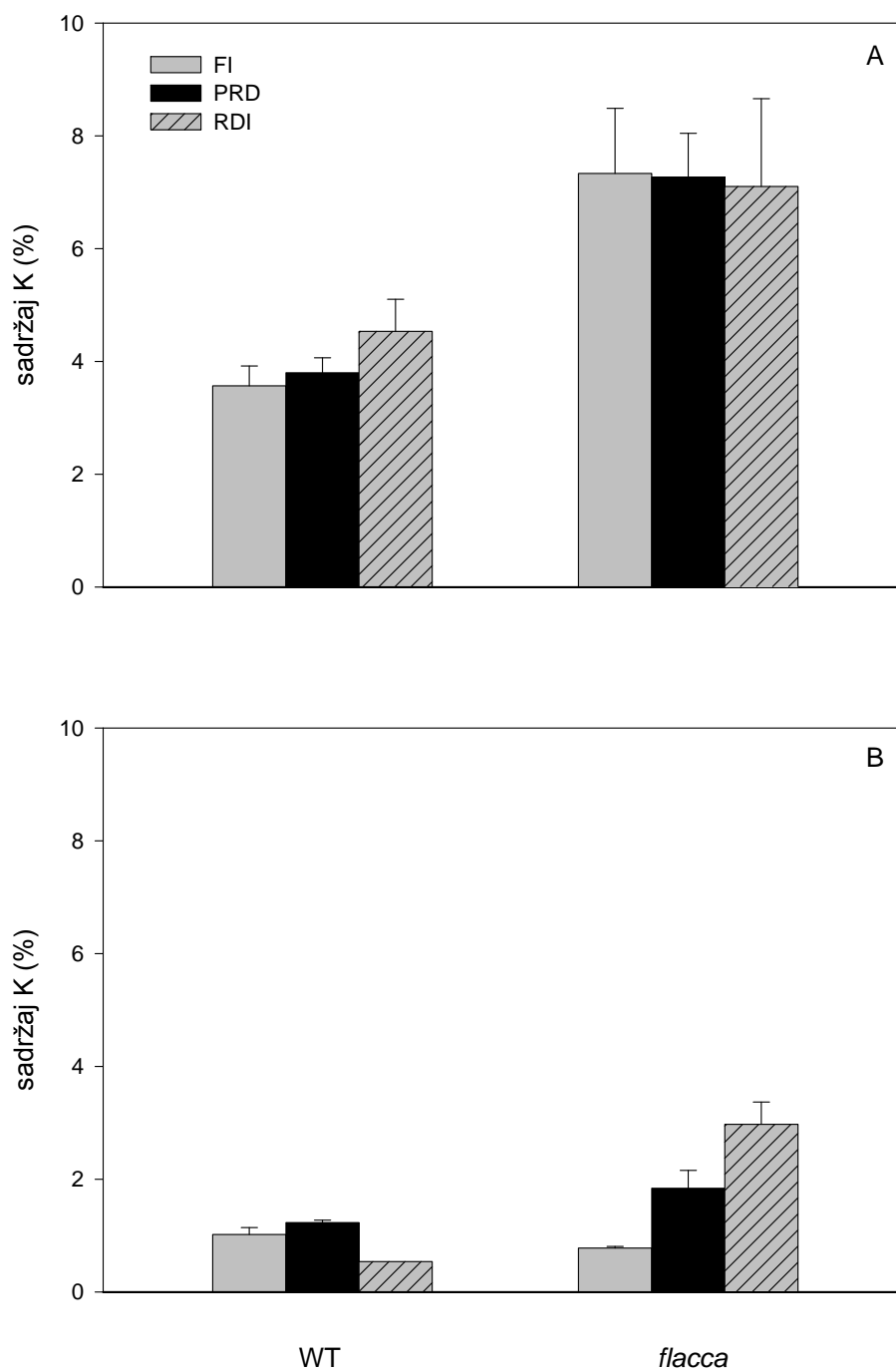
Slika 4.11 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj N u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na sadržaj K u listovima i korenu kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.12.

Kod divljeg tipa, sadržaj kalijuma (K) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 3.57%, 3.80% i 4.53% (Sl. 4.12A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju K u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj K u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 1.02%, 1.23% i 0.54% (Sl. 4.12B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju K u korenu između FI i RDI biljaka ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.01$).

Kod *flacca* mutanta, sadržaj K u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka iznosio je 6.67%, 7.27% i 7.10% (Sl. 4.12A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju K u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj K u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.78%, 1.84% i 2.97% (Sl. 4.12B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju K u korenu između FI i PRD biljaka ($P < 0.01$), između FI i RDI biljaka ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.05$).

Rezultati su pokazali da je sadržaj K u listovima bio veći kod biljaka *flacca* mutanta u odnosu na biljke divljeg tipa.



Slika 4.12 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj K u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

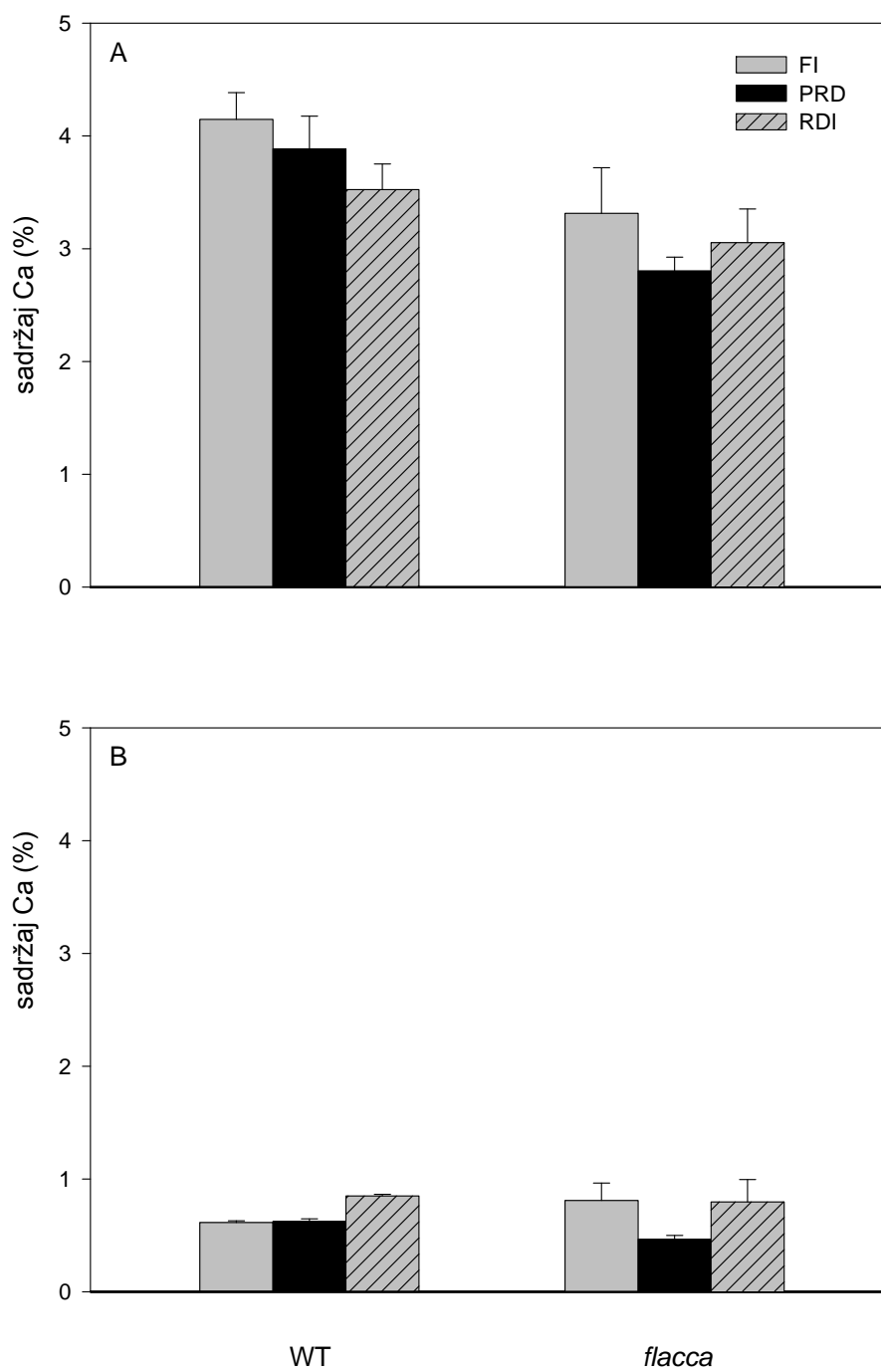
Utjecaj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na sadržaj Ca i Mg u listovima i korenu kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.13 i 4.14.

Kod divljeg tipa, sadržaj kalcijuma (Ca) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 4.15%, 3.89% i 3.52% (Sl. 4.13A), tako da je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Ca u listovima između FI i RDI biljaka ($P < 0.05$). Sadržaj Ca u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.61%, 0.62% i 0.85% (Sl. 4.13B), tako da je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Ca u korenu između FI i RDI biljaka ($P < 0.001$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.001$).

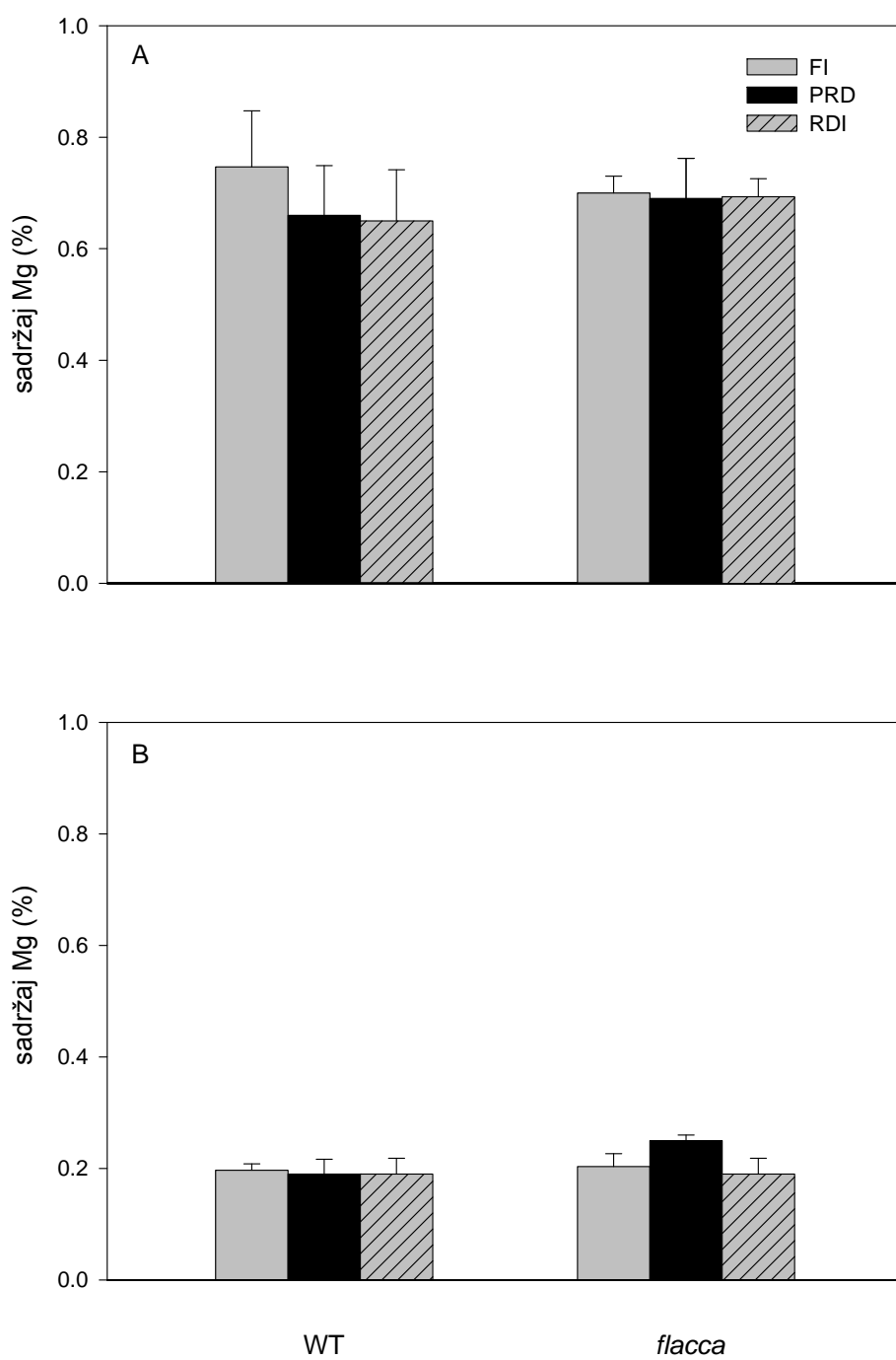
Kod *flacca* mutanta, sadržaj Ca u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 3.31%, 2.80% i 3.05% (Sl. 4.13A), tako da nije bilo statistički značajne razlike u sadržaju Ca u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj Ca u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.81%, 0.47% i 0.80% (Sl. 4.13B), tako da je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Ca u korenu između FI i PRD biljaka ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.05$).

Kod divljeg tipa, sadržaj magnezijuma (Mg) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.75%, 0.66% i 0.65% (Sl. 4.14A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju Mg u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj Mg u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.20%, 0.19% i 0.20% (Sl. 4.14B), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju Mg u korenu između biljaka različitih tretmana navodnjavanja.

Kod *flacca* mutanta, sadržaj Mg u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.70%, 0.69% i 0.69% (Sl. 4.14A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju Mg u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj Mg u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 0.20%, 0.25% i 0.19% (Sl. 4.14B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Mg u korenu između FI i PRD biljaka ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.05$).



Slika 4.13 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj Ca u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

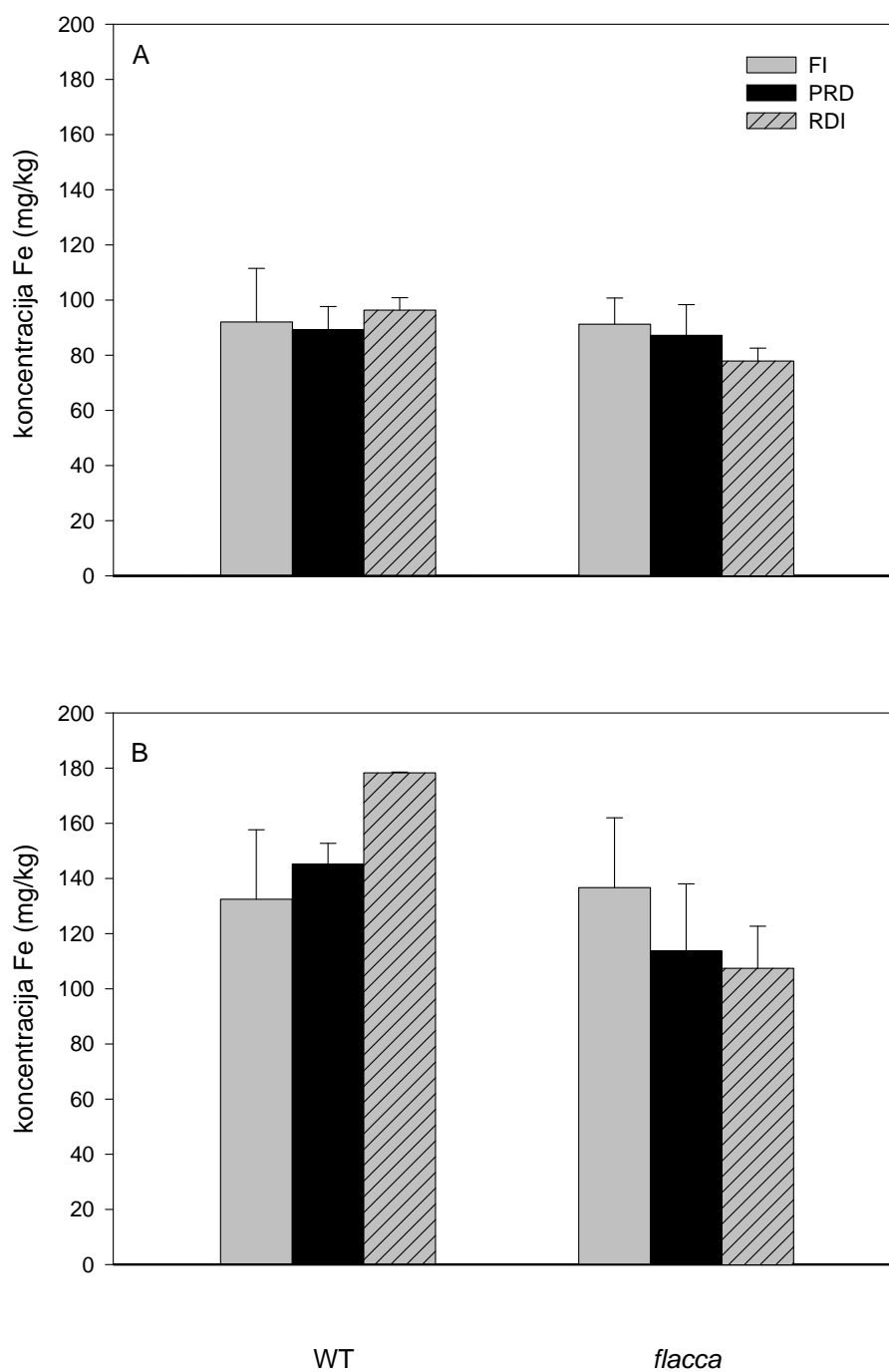


Slika 4.14 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj Mg u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na sadržaj Fe u listovima i korenu kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.15.

Kod divljeg tipa, sadržaj gvožđa (Fe) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 92.1 mg/kg, 89.2 mg/kg i 96.3 mg/kg (Sl. 4.56A), pri čemu t-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju Fe u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj gvožđa (Fe) u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 132.4 mg/kg, 145.2 mg/kg i 178.3 mg/kg (Sl. 4.15B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Fe u korenu između FI i RDI biljaka ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.01$).

Kod *flacca* mutanta, sadržaj gvožđa (Fe) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 91.2 mg/kg, 87.2 mg/kg i 77.8 mg/kg (Sl. 4.15A), pri čemu t-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju Fe u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj gvožđa (Fe) u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 136.7 mg/kg, 113.7 mg/kg i 107.4 mg/kg (Sl. 4.15B), pri čemu t-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju Fe u korenu između biljaka različitih tretmana navodnjavanja.



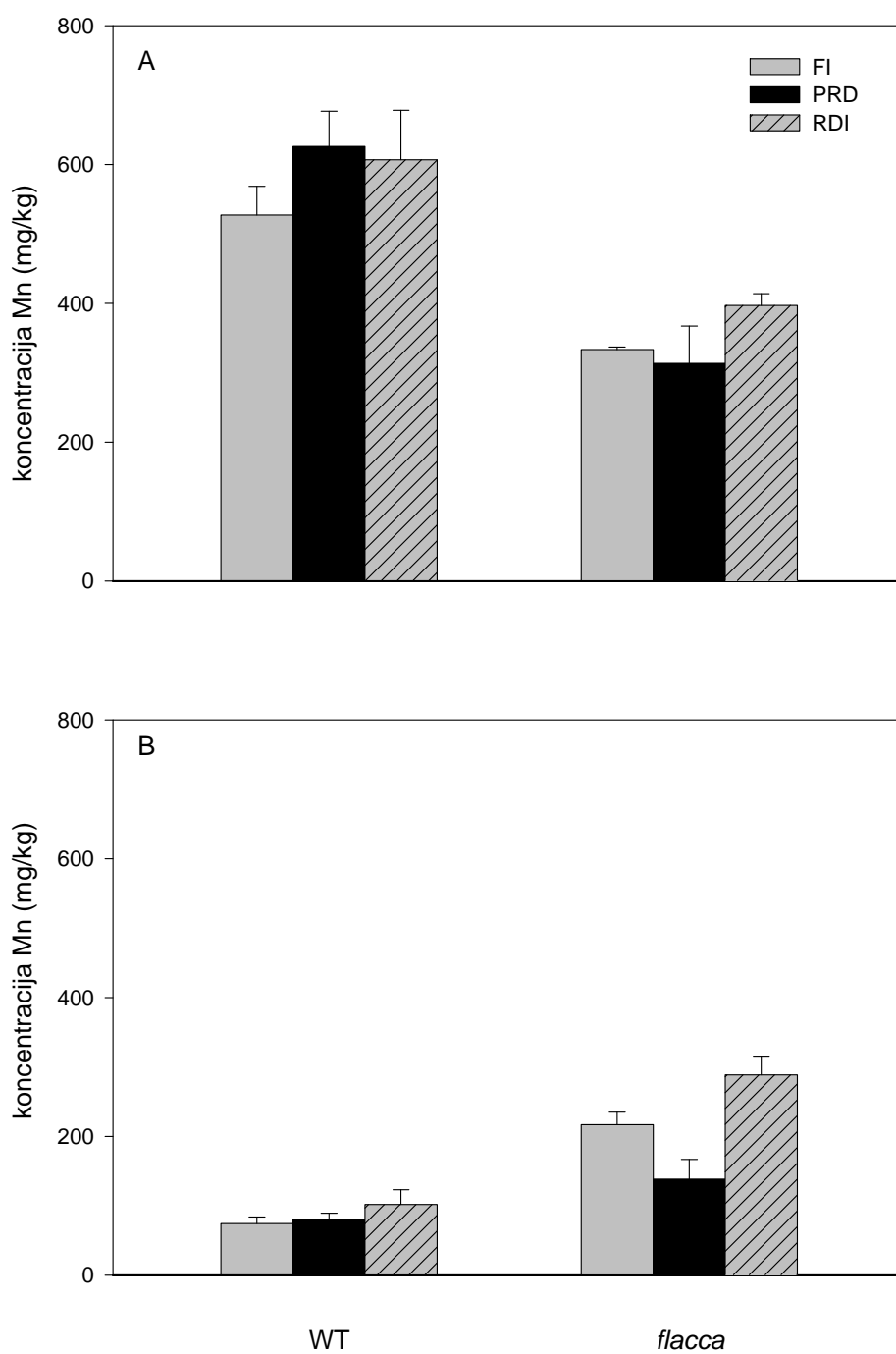
Slika 4.15 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj Fe u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na sadržaj Mn u listovima i korenu kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.16.

Kod divljeg tipa, sadržaj mangana (Mn) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 527.2 mg/kg, 625.8 mg/kg i 606.7 mg/kg (Sl. 4.16A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju mangana u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj mangana (Mn) u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 74.4 mg/kg, 80 mg/kg i 108.3 mg/kg (Sl. 4.16B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju mangana u korenu između FI i RDI biljaka ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.05$). Takođe je u PRD tretmanu utvrđen i brži transport ovog elementa iz korena u listove.

Kod *flacca* mutanta, sadržaj mangana (Mn) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 333.4 mg/kg, 313.5 mg/kg i 397 mg/kg (Sl. 4.16A), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju mangana u listovima između FI i RDI biljaka ($P < 0.01$). Sadržaj mangana (Mn) u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 216.8 mg/kg, 138.4 mg/kg i 288.5 mg/kg (Sl. 4.16B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju mangana u korenu između FI i RDI biljaka ($P < 0.05$), između FI i PRD ($P < 0.05$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.01$).

Rezultati su pokazali da je kod *flacca* mutanta, sadržaj Mn u korenu bio veći, a u listovima manji u odnosu na divlji tip, odnosno da je kod *flacca* mutanta došlo do znatno manje translokacije Mn iz korena u listove.



Slika 4.16 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj Mn u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

Uticaj različitih tretmana navodnjavanja (FI, PRD i RDI) na sadržaj Cu i Zn u listovima i korenu kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta prikazan je na Sl. 4.17 i 4.18.

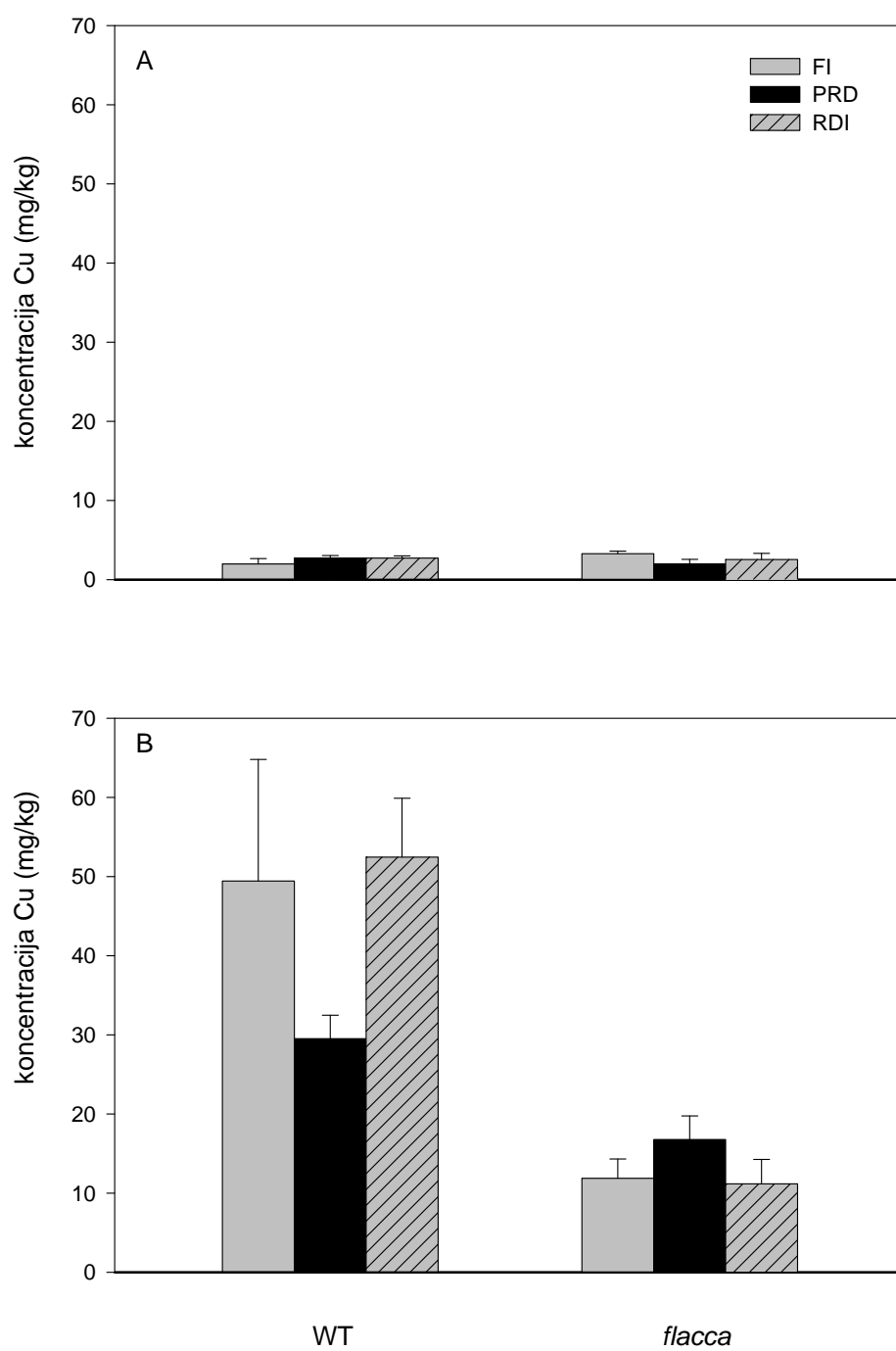
Kod divljeg tipa, sadržaj bakra (Cu) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 1.97 mg/kg, 2.70 mg/kg i 2.71 mg/kg (Sl. 4.17A), tako da nije bilo statistički značajne razlike u sadržaju Cu u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj Cu u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 49.5 mg/kg, 29.5 mg/kg i 52.5 mg/kg (Sl. 4.17B), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Cu u korenu između PRD i RDI biljaka ($P < 0.01$).

Kod *flacca* mutanta, sadržaj Cu u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 3.28 mg/kg, 1.97 mg/kg i 2.53 mg/kg (Sl. 4.17A), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju Cu u listovima između FI i PRD biljaka ($P < 0.05$). Sadržaj Cu u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 11.87 mg/kg, 15.79 mg/kg i 11.17 mg/kg (Sl. 4.17B), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju Cu u korenu između biljaka različitih tretmana navodnjavanja.

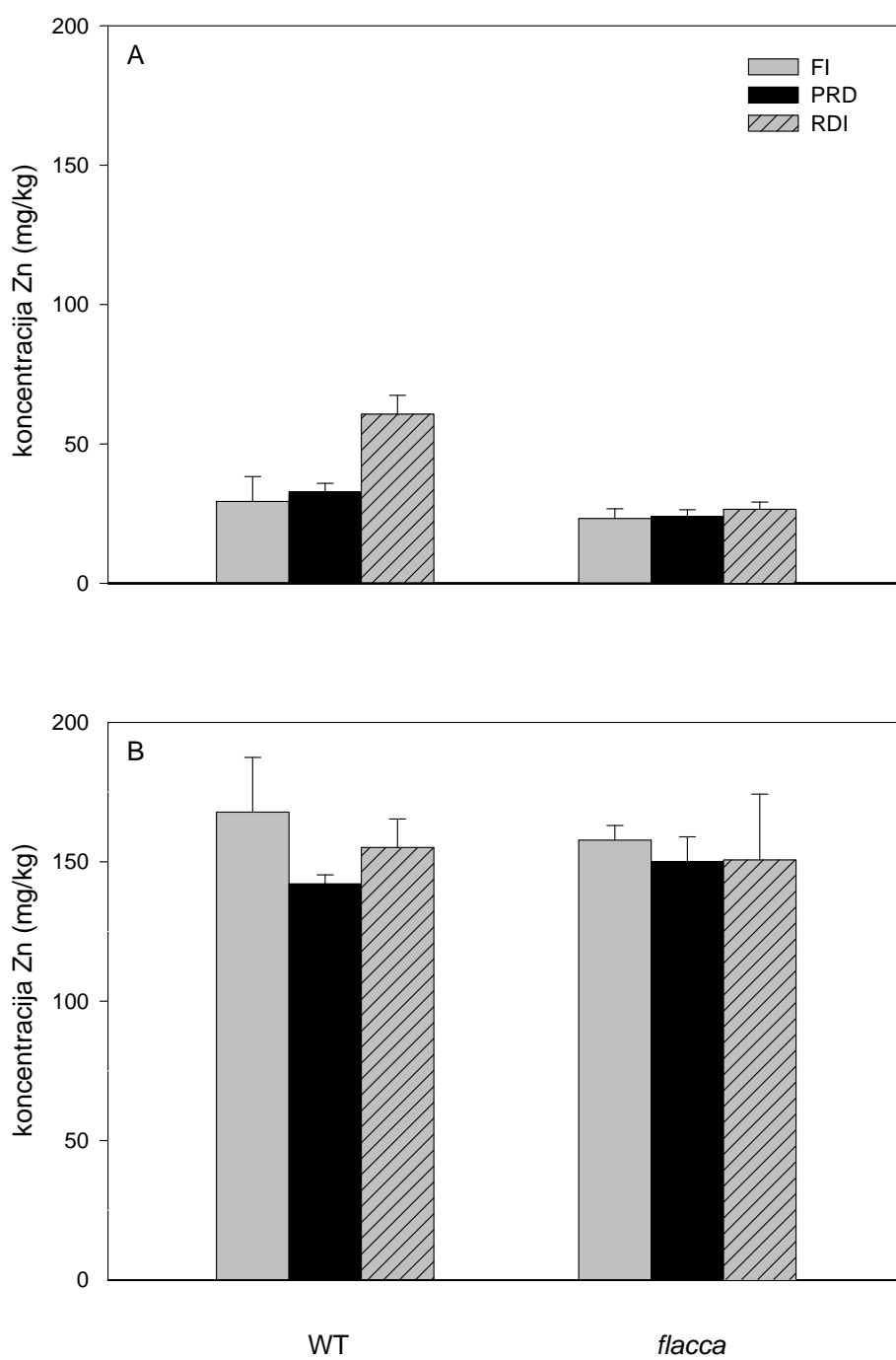
Rezultati su pokazali da je sadržaj Cu u korenu bio veći kod biljaka divljeg tipa u odnosu na biljke *flacca* mutanta.

Kod divljeg tipa, sadržaj cinka (Zn) u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 29.3 mg/kg, 32.7 mg/kg i 60.6 mg/kg (Sl. 4.18A), pri čemu je t-testom utvrđena značajna razlika u sadržaju cinka u listovima između FI i RDI biljaka ($P < 0.01$), kao i između PRD i RDI biljaka ($P < 0.01$). Sadržaj Zn u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 167.8 mg/kg, 142.1 mg/kg i 155.1 mg/kg (Sl. 4.18B), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju cinka u korenu između biljaka različitih tretmana navodnjavanja.

Kod *flacca* mutanta, sadržaj Zn u listovima kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 23.22 mg/kg, 23.85 mg/kg i 26.52 mg/kg (Sl. 4.18A), pri čemu t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju cinka u listovima između biljaka različitih tretmana navodnjavanja. Sadržaj Zn u korenu kod FI, PRD i RDI biljaka bio je 157.7 mg/kg, 150.1 mg/kg i 150.7 mg/kg (Sl. 4.18B), tako da t-testom nije utvrđena značajna razlika u sadržaju cinka u korenu između biljaka različitih tretmana navodnjavanja.



Slika 4.17 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj Cu u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta



Slika 4.18 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na sadržaj Zn u listovima (A) i korenu (B) kod biljaka paradajza divljeg tipa (WT) i *flacca* mutanta

4.2 Molekularna istraživanja

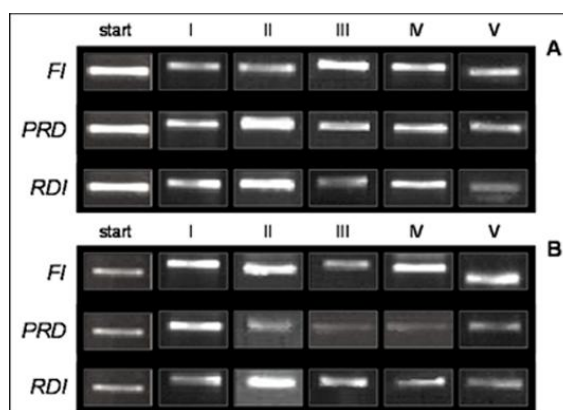
U okviru molekularnih istraživanja praćena je ekspresija 3 gena i to: *NCED*, *TAO1* i *EIL1*. Ekspresija gena je praćena tokom perioda koji odgovara vremenskim intervalima od 5 okreta strane navodnjavanja u PRD tretmanu, odnosno 41 dan za divlji tip i 52 dana kod *flacca* mutanta.

Ekspresija NCED gena

Uticao FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na ekspresiju *NCED* gena kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta u toku eksperimenta prikazan je na Sl. 4.19.

Ekspresija *NCED* gena je, generalno, u svim tretmanima bila izraženija kod biljaka divljeg tipa u odnosu na *flacca* mutanta.

Kod divljeg tipa, ekspresija je bila najizraženija kod PRD tretmana, dok je kod RDI bila slabije izražena. Kod PRD i RDI, ekspresija je bila najizraženija prilikom drugog okreta (17. dan), ali je kod RDI nakon toga došlo do smanjene ekspresije *NCED*, naročito u poslednjem uzorkovanju (41. dan).



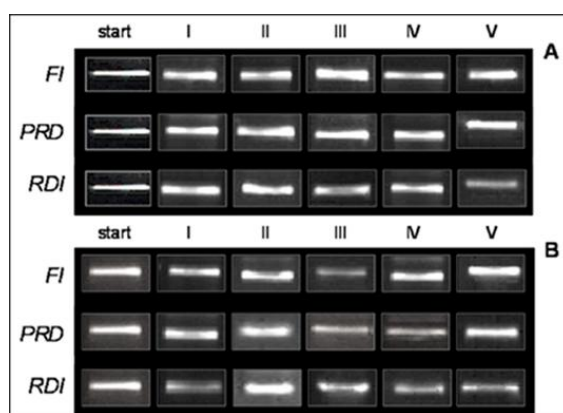
Slika 4.19 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na ekspresiju *NCED* gena kod biljaka paradajza divljeg tipa (A) *flacca* mutanta (B). I, II, III, IV i V označavaju okrete strane zalivanja kod PRD

Kod *flacca* mutanta, ekspresija je bila izraženija kod FI i RDI tretmana (sa maksimalnom ekspresijom prilikom drugog okreta - 17. dan) u odnosu na PRD tretman gde je nakon prvog okreta (9. dan) došlo do znatne redukcije.

Ekspresija TAO1 gena

Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na ekspresiju *TAO1* gena kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta u toku eksperimenta prikazan je na Sl. 4.20.

Rezultati pokazuju da je, kod biljaka divljeg tipa, vremenski obrazac ekspresije bio sličan za PRD i FI tretman sa maksimalnom ekspresijom prilikom drugog (17. dan), odnosno trećeg PRD okreta (23. dan), dok je kod RDI tretmana ekspresija bila slabija, naročito u poslednjem uzorkovanju (41. dan).



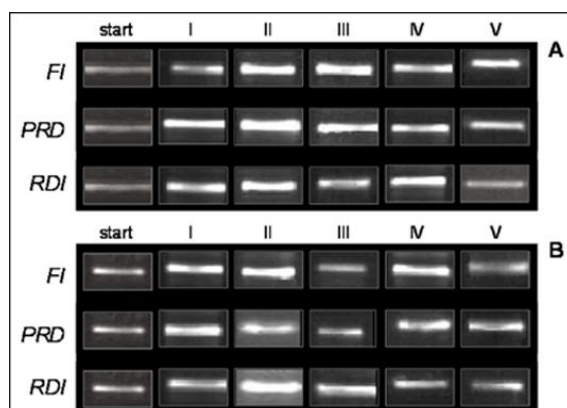
Slika 4.20 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na ekspresiju *TAO1* gena kod biljaka paradajza divljeg tipa (A) *flacca* mutanta (B). I, II, III, IV i V označavaju okrete strane zalivanja kod PRD

Ekspresija *TAO1* u listovima *flacca* mutanta je bila slabija nego kod biljaka divljeg tipa. Upoređivanje tretmana je pokazalo da je ekspresija kod RDI bila slabija nego kod FI i PRD tretmana. Maksimalna ekspresija kod FI tretmana je bila prilikom poslednja dva okreta (32. i 41. dan), dok je kod PRD i RDI bila ranije - 17. dana (prilikom drugog okreta).

Ekspresija EIL1 gena

Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na ekspresiju *EIL1* gena kod biljaka paradajza divljeg tipa i *flacca* mutanta u toku eksperimenta prikazan je na Sl. 4.21.

Rezultati pokazuju da je ekspresija kod oba genotipa bila slična za FI i PRD tretman, dok je kod RDI došlo do smanjene ekspresije u poslednjem uzorkovanju.



Slika 4.21 Uticaj FI, PRD i RDI tretmana navodnjavanja na ekspresiju *EIL1* gena kod biljaka paradajza divljeg tipa (A) *flacca* mutanta (B). I, II, III, IV i V označavaju okrete strane zalivanja kod PRD

Kod biljaka divljeg tipa, maksimalna ekspresija je bila prilikom drugog okreta (17. dan) za PRD i RDI tretman, odnosno trećeg (23. dan) kod FI tretmana.

Kod *flacca* mutanta, maksimalna ekspresija je bila prilikom drugog okreta - 17. dan (FI i RDI), odnosno prvog okreta - 9. dan (PRD).

5 DISKUSIJA

Ispitivanja sadržaja vode u supstratu su, očekivano, pokazala da su vrednosti sadržaja vode u supstratu bile značajno niže kod RDI biljaka i u nezalivanoj strani PRD biljaka u poređenju sa kontrolnim biljkama (Sl. 4.1). Dnevni sadržaj vode kod kontrolnih biljaka posle navodnjavanja održavao se blizu poljskog vodnog kapaciteta (36%), dok je kod RDI biljaka u početnoj fazi eksperimenta sadržaj vode u supstratu opadao, da bi se nakon toga do kraja eksperimenta održavao na nivou od oko 18%. Razlike u sadržaju vode u supstratu između navodnjavane i nenavodnjavane strane kod PRD biljaka značajno su se razlikovale tokom celog eksperimenta. Takođe, iz rezultata može da se vidi da je sadržaj vode u supstratu nenavodnjavane strane kod PRD biljaka bio sličan sadržaju vode u supstratu RDI biljaka. Sadržaj vode u supstratu navodnjavane strane kod PRD biljaka *flacca* mutanta bio je sličan sadržaju vode u supstratu kod kontrolnih biljaka, pogotovo u kasnijim fazama eksperimenta, dok je kod biljaka divljeg tipa bio nešto niži (oko 33%) u odnosu na kontrolne biljke.

Hu *i sar.* (2011) su pokazali da PRD biljke mogu da kompenzuju vodni stres u zasušivanoj strani uzimanjem vode iz zalivanog dela korena, gde je voda dostupna. Iako su zalivana i nezalivana strana korenovog sistema hidraulično izolovane, moguće je da se voda iz relativno vlažnog supstrata u zalivanoj strani kreće ka suvim delovima supstrata preko korenovog sistema biljke. Ova pojava je opisana kao „hidraulični lift“ i predstavlja pasivno kretanje vode iz korena u zemljište sa nižim vodnim potencijalom, dok drugi delovi korenovog sistema, koji se nalaze u vlažnijim delovima zemljišta, apsorbuju vodu (Caldwell *i sar.*, 1998). Pošto usvajanje vode korenovim sistemom zavisi od gradijenta vodnog potencijala između korena i zemljišta (Jensen *i sar.*, 1993), veći gradijent vodnog potencijala između korena i zemljišta u zalivanoj strani bi mogao, donekle, objasniti veću brzinu usvajanja vode iz te strane. Takođe, ukoliko se zemljište isušuje, kretanje vode u zemljištu, zbog povećanja hidraulične otpornosti zemljišta, postaje ograničeno, te stoga, usvajanje vode iz suvog dela zemljišta opada (Green i Clothier, 1995). Veća brzina usvajanja vode mogla bi biti i posledica veće površine korenovog sistema i bolje hidraulične provodljivosti korena posle navodnjavanja suve strane (Kang *i sar.*, 1998; Kang *i sar.*, 2002). Kanali za vodu (koji su izgrađeni od akvaporina) imaju, takođe, značajnu ulogu u usvajanju vode u toku nedostatka vode u

zemljištu (Martre *i sar.*, 2002), zato što mogu delovati na radijalni transport vode u korenovima (Maurel i Chrispeels, 2001; Tyerman *i sar.*, 2002). Na aktivnost ovih kanala utiče veliki broj faktora uključujući pH, osmotski gradijent, vlažnost zemljišta i dostupnost hranljivih materija (Clarkson *i sar.*, 2000).

Međutim, postoje i rezultati za paradajz koji pokazuju da je moguće održavati sadržaj vode u supstratu navodnjavane strane PRD biljaka približno sadržaju vode u supstratu kontrolnih biljaka, u toku celog eksperimenta (Sobeih *i sar.*, 2004), što je kod nas bio slučaj sa *flacca* mutantom. Jedno od objašnjenja ovog neslaganja između različitih istraživanja je u mogućoj različitoj genotipskoj reakciji paradajza na PRD tretman.

U početku, vreme između promene strana zalivanja kod oba genotipa je bilo slično, dok je kasnije došlo do produženja vremena kod *flacca* mutanta. Prosečno vreme između dve promene strana zalivanja kod PRD tretmana iznosilo je, za divlji tip, oko 8 dana, dok je kod *flacca* mutanta bilo potrebno nešto više vremena i iznosilo je oko 10 dana.

Duži PRD ciklus kod *flacca* mutanta, u odnosu na divlji tip, sugeriše da je usvajanje vode, od strane korena, kod biljaka *flacca* mutanta manje u odnosu na biljke divljeg tipa. Veće usvajanje vode od strane biljaka divljeg tipa može biti rezultat porasta veličine korenovog sistema, biomase, što su potvrdili i naši rezultati (Sl. 4.3 i 4.4) ili hidraulične provodljivosti korena. Takođe, pošto su biljke *flacca* mutanta znatno manje (Sl. 4.2, 4.3, 4.4), njihova potreba za vodom je manja.

Dobijeni rezultati su potvrdili da su PRD i RDI tretmani značajano uticali na redukciju rastenja izdanka, pogotovo RDI. Kod oba testirana genotipa, na kraju eksperimenta, visina biljaka je u većoj ili manjoj meri (u zavisnosti od tretmana) bila redukovana, u poređenju sa kontrolnim biljkama. Naši rezultati su u skladu sa drugim rezultatima dobijenim primenom PRD i RDI tretmana na paradajzu (Davies *i sar.*, 2000; Mingo, 2003; Stikić *i sar.*, 2003; Zegbe-Dominguez *i sar.*, 2003).

Naši rezultati su, takođe, pokazali da su biljke *flacca* mutanta bile niže u odnosu na divlji tip za oko 40%, u zavisnosti od tretmana. To je u skladu sa rezultatima Jones *i sar.* (1987) koji su u svojim istraživanjima dobili smanjenje visine *flacca* biljaka za 46% u odnosu na divlji tip.

Efekat ispitivanih tretmana na rasteenje vegetativnih organa je praćen i preko merenja njihove biomase (sveže i suve mase listova, stabla i korena). Ovi rezultati su, slično prethodnim parametrima rasteenja, takođe, pokazali da je, uglavnom, došlo do redukcije, ali da ona u nekim slučajevima nije bila statistički značajna. Tako je kod divljeg tipa, značajno bila redukovana sveža i suva masa listova i suva masa stabla kod PRD biljaka, odnosno sveža i suva masa listova, kao i sveža masa stabla i korena kod RDI biljaka, u odnosu na kontrolne biljke (Sl. 4.3 i 4.5). Kod *flacca* mutanta, značajno je bila redukovana sveža i suva masa listova kod RDI biljaka (Sl. 4.4 i 4.6). Smanjenje rasteenja PRD i RDI biljaka u odnosu na optimalno zalivane biljke su dobili i drugi autori (Mingo, 2003; Chaves *i sar.*, 2007; Kirada *i sar.*, 2004). Poznato je da je rast listova jedan od najosetljivijih procesa u odgovoru na isušvanje zemljišta. Kod listova se, za razliku od korena, osmotska prilagođavanja javljaju sporije tako da vodni deficit dovodi do upadljive inhibicije rasta (Chaves *i sar.*, 2003). Ispitivanja Savić *i sar.* (2009) su pokazala da PRD tretman, menjajući tzv. „source-sink“ odnos asimilata, može da utiče i na njihov transport od listova ka plodovima, što je od posebnog značaja za prinos i kvalitet plodova paradajza.

Redukcija rasteenja izdanka može nastati kao rezultat delovanja hemijskih ili hidrauličnih signala suše, kao i njihove interakcije. Smanjeno usvajanje vode može dovesti do redukcije turgora u ćelijama korena, što u ranim fazama suše predstavlja direktan signal za sintezu različitih metabolita, tzv. hemijskih signala suše (prvenstveno biljnih hormona), koji se ksilemom transportuju ka izdanku gde, kao adaptivne reakcije, mogu da izazovu delimično zatvaranje stoma ili da redukuju rasteenje (Hartung *i sar.*, 1999). Dalje napredovanje suše ima tzv. hidraulični efekat jer se smanjuje turgor u ćelijama korena i količina vode koja se ksilemom transportuje ka izdanku, što za posledicu ima smanjenje turgora u ćelijama listova, potpuno zatvaranja stoma i redukciju drugih metaboličkih procesa (Dodd *i sar.*, 1996).

Najčešće ispitivan hemijski signal je ABA, međutim, redukcija rasteenja može nastati i pri promeni drugih hemijskih signala, kao što je npr. redukcija sadržaja citokinina do koje dolazi pri niskom sadržaju vode (Bano *i sar.*, 1993, 1994; Kudoyarova *i sar.*, 2007). Hemijski signal može biti i promena pH ksilema ili apoplasta koja, takođe, utiče na redukciju provodljivosti stoma (Wilkinson i Davies, 1997; Wilkinson *i sar.*, 1998; Wilkinson, 1999) ili rasteenje ćelija (Bacon *i sar.*, 1998; Davies *i sar.*, 2002).

Rezultati su, takođe, pokazali da je sveža i suva masa izdanka bila značajno manja kod *flacca* mutanta u odnosu na divlji tip. Slične rezultate je dobio i Bradford (1983).

Opšteprihvaćeno je da je ABA inhibitor rasta nadzemnog dela biljke (Trewavas i Jones, 1991), tako da je paradoksalno da su mnogi rezultati potvrdili da su ABA mutanti manjeg rasta i sa manjim listovima od biljaka divljeg tipa. Jedno od objašnjenja za manji rast nadzemnog dela ABA mutanata je njihova veća produkcija etilena, u odnosu na biljke divljeg tipa (Neill *i sar.*, 1986). Prema Sharp-u *i sar.* (2000), uloga ABA je da održava rast limitirajući produkciju etilena. Visoka koncentracija etilena redukuje razvoj ksilema (Zobel i Roberts, 1978) tako što inhibira polarni transport auksina (Beyer i Morgan, 1971), koji su neophodni za rastenje ćelija, ali i ksilemsku diferencijaciju (Sugiyama i Komamine, 1990), a od površine ksilema zavisi transport vode i mineralnih materija.

Merenja sveže i suve mase korena su pokazala da nije došlo do povećanja rastenja korenovog sistema kod PRD i RDI biljaka oba genotipa u odnosu na kontrolne biljke (Sl. 4.3-C, 4.4-C, 4.5-C i 4.6-C). To je u saglasnosti sa rezultatima Davies-a *i sar.* (2000) i Dry-a *i sar.* (2000) koji nisu dobili značajne razlike u biomasi korena između PRD i kontrolnih biljaka kod paradajza i vinove loze, osim što je došlo do promena u distribuciji korena koji je kod PRD biljaka rastao u dubljim slojevima zemljišta. Sa druge strane, Kang-a *i sar.* (1998) su dobili povećanje biomase korena kod kukuruza pod uticajem PRD tretmana, koje je verovatno bilo rezultat pospešivanja rastenja i razvića bočnih korenova (Liang *i sar.*, 1996).

ABA deficitarni mutant *flacca* imao je manju svežu i suhu biomasu korena u odnosu na divlji tip. Slične podatke za smanjenje suve mase korena kod *flacca* mutanta u poređenju sa divljim tipom dobili su i Bradford (1983) i Jones *i sar.* (1987). Poznato je da *flacca* mutant proizvodi više etilena od divljeg tipa (Tal *i sar.*, 1979), pa povećanje etilena, u odnosu na smanjenu koncentraciju ABA u korenu, inhibira rast korena (Chen *i sar.*, 2003). Prema Sharp-u *i sar.* (2000), smanjen rast korena *flacca* mutanta, međutim, samo delimično može biti pripisan etilenu, jer tretman *flacca* biljaka inhibitorima etilena rezultuje samo delimičnim poboljšanjem rasta korena.

Naša istraživanja nisu obuhvatila detaljniju analizu samog procesa rastenja korena. Rezultati Prokić i Stikić (2011) su, kod nešto mlađih biljaka divljeg tipa i *flacca*

mutanta i pri sličnom sistemu PRD, pokazali da je suša indukovala rast korena (dužinu i površinu) u odnosu na optimalne uslove. Oni su ukazali i da se ovakve adaptivne reakcije korena brzo odvijaju i pretpostavka je da se signali za ovakvu adaptaciju, verovatno, javljaju u prvim fazama suše (posle 3 dana) i da, potom, oni veoma brzo rezultiraju promenama na nivou korena (11-tog dana suše). Ovakav pozitivan efekat se u našem eksperimentu ispoljio kod *flacca* mutanta u PRD tretmanu.

Veće smanjenje sveže mase RDI u poređenju sa PRD biljkama, u odnosu na kontrolne, je u skladu sa nižim vrednostima vodnog potencijala listova kod RDI biljaka u odnosu na PRD i FI (Sl. 4.7). To nam ukazuje da je redukcija rasteња RDI biljaka prvenstveno rezultat većeg stepena stresa kome su one bile izložene i, stoga, rezultat dejstva tzv. hidrauličnih signala.

Naša istraživanja su pokazala da je, zbog redukcije rasteња izdanka i pospešivanja rasteња korena, odnos suve mase korena i izdanka bio značajno veći kod PRD biljaka u odnosu na kontrolne biljke, kod *flacca* mutanta (Sl. 4.7-B), dok kod biljaka divljeg tipa nije bilo statistički značajne razlike u odnosu suve mase korena i izdanka između različitih tretmana. Povećanje odnosa koren/izdanak javlja se u uslovima suše, ali i u uslovima nedostatka hranljivih materija i visokih temperatura zemljišta nepovoljnih za optimalno funkcionisanje korena (Poorter i Nagel, 2000).

Istraživanja su imala za cilj i da ukažu da li se u osnovi PRD i RDI efekata na rasteње i vodni režim biljaka nalaze hidraulični ili hemijski signali suše i/ili njihovo interakcijsko dejstvo. Rezultati merenja potencijala vode, u optimalnim uslovima, pokazuju da su biljke *flacca* mutanta bile izložene većem stepenu stresa (prosečno -0.65 MPa), u odnosu na biljke divljeg tipa (prosečno -0.50 MPa). Te razlike se mogu objasniti manjom sposobnošću *flacca* biljaka da zatvore stome i tako spreče dehidraciju listova, u odnosu na divlji tip. To potvrđuju i rezultati merenja provodljivosti stoma, koji su, generalno, bili veći u listovima *flacca* mutanta, u odnosu na divlji tip (Slika 4.8 i 4.9). Vrednosti provodljivosti stoma su se kod *flacca* mutanta kretale do $1320 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, dok je maksimalna vrednost kod divljeg tipa bila $1000 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Minimalne vrednosti provodljivosti stoma su bile $195 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod divljeg tipa, odnosno $412 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod *flacca* mutanta. Razlike u potencijalu vode i provodljivosti stoma između mutanata, deficitarnih u sintezi ABA i divljeg tipa, kod koga se proces odvija nesmetano, su potvrđene i od strane drugih autora i to, ne samo kod paradajza, već i kod drugih biljaka (Bradford KJ, 1983; Burbidge i sar., 1999).

Rezultati Sagi *i sar.* (1999) su pokazali da se kod *flacca* mutanta sintetiše, u nadzemnom delu biljke, svega 20-26% ABA, a u korenu do 67% ABA, u odnosu na divlji tip. Usled toga dolazi i do manjeg stepena zatvaranja stoma.

Dobijeni rezultati potencijala vode su pokazali da su RDI biljke bile izložene većem stepenu stresa, u odnosu na PRD biljke i to kod oba ispitivana genotipa (Tab. 2 i 3). Poredjenje ovih rezultata sa merenjima provodljivosti stoma ukazuje da reakcije zatvaranja stoma u RDI uslovima prate opadanje potencijala vode u listovima (Sl. 4.8 i 4.9). To ukazuje da su ove reakcije stominih ćelija, kod oba genotipa, rezultat dejstva hidrauličnih signala. Isto se može pretpostaviti i za inhibitorni efekat RDI na rastenje biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta. Na osnovu ovih podataka, može se, takođe, pretpostaviti da hidraulični signali imaju veći uticaj na redukciju rasteња kod RDI biljaka u odnosu na PRD biljke. Slične rezultate u ispitivanjima efekata PRD i RDI na biljke paradajza dobili su Topcu *i sar.* (2006) i Savić *i sar.* (2009).

Rezultati analize efekata PRD tretmana na vodni režim biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta su pokazali da se vrednosti potencijala vode nisu značajno razlikovale od FI tretmana, dok su, generalno, vrednosti provodljivosti stoma bile, u proseku, niže od prosečnih vrednosti za FI. To ukazuje da su hemijski signali, a ne hidraulični, bili odgovorni za reakcije stominih ćelija. Rezultati Liu *i sar.* (2006a, 2006b) ukazuju da je, za slične vrednosti vodnog potencijala listova kod PRD i kontrolnih biljaka, neophodno da sadržaj vode u supstratu zalivane strane PRD biljaka bude što je moguće približniji sadržaju vode u supstratu kontrolnih biljaka, što je kod nas i bio slučaj.

Ispitivanja Savić *i sar.* (2009) su pokazala da opadanje provodljivosti stoma kod PRD biljaka paradajza počinje ranije nego kod RDI biljaka i to u periodu kada nisu utvrđene promene u potencijalu vode, što ukazuje na hemijske signale suše. Ovi rezultati su, kao i rezultati koje su dobili Liu *i sar.* (2005), pokazali da u kasnijoj fazi ogleđa dolazi do interakcije hemijskih i hidrauličnih signala. Rezultati Savić *i sar.* (2009) su pokazali i da PRD i RDI tretmani nisu značajno uticali na proces fotosinteze, tako da je došlo do porasta u efikasnosti usvajanja vode (WUE – water use efficiency).

Cilj istraživanja je bio i da se prati dnevna dinamika otvaranja stoma u različitim tretmanima i kod oba ispitivana genotipa. Takva istraživanja se nastavljaju na prethodna ispitivanja Prokić (2009) koja su imala za cilj da objasne ulogu stominih ćelija u adaptivnim reakcijama biljaka na PRD i RDI. Ova istraživanja su obavljena sa sličnim

dizajnom PRD eksperimenata i istim Ailsa Craig i *flacca* genotipovima. Razlike u odnosu na naš eksperiment su bile u tome, što su ispitivanja obavljena, umesto sa RDI, sa klasičnom sušom, zatim, sa mlađim biljkama i kraćim trajanjem eksperimenata (10 dana), kao i kraćim periodom ispitivanja dinamike promene provodljivosti stoma i potencijala vode. Ovi rezultati su ukazali na postojanje dvofaznog (brzog i sporog) odgovora stominih ćelija na ispitivane tretmane. Pri tome se odgovor stoma na PRD tretman može okarakterisati kao brzi, a odgovor na sušu kao spori odgovor. Ovi rezultati su, takođe, ukazali da se reakcije biljaka divljeg tipa na PRD mogu okarakterisati kao rezultat dejstva hemijskih, a *flacca* mutanta kao rezultat dejstva hidrauličnih signala.

Generalno, naša istraživanja dnevne dinamike, u toku trajanja svih tretmana su, takođe, pokazala da postoji različita kinetika u reakcijama stominih ćelija, ali da se to uglavnom javlja samo u toku perioda od 7 h do 14 h. Posle tog perioda su trendovi promena, uglavnom, veoma slični. To ukazuje da se adaptivne reakcije stominih ćelija (zatvaranje ili otvaranje) mogu analizirati samo u prepodnevnom i ranim popodnevnom časovima. Ukoliko se uporede dnevna dinamika merenja na početku eksperimenta sa vrednostima na kraju, kod divljeg tipa, uočavaju se, takođe, razlike između PRD i RDI tretmana. U PRD tretmanu oscilacije provodljivosti stoma su veće i mnogo brže u odnosu na RDI. Tako, kinetika promena provodljivosti stoma u poslednjem merenju PRD tretmana prati trend brzog opadanja provodljivosti stoma u prvih 1 sat, zatim u toku 1 sata sledi porast provodljivosti stoma i potom, opet, počinje naglo opadanje provodljivosti stoma koja se u periodu od 10 do 14 časova smanjila za 64%. Istovremeno, u periodu od 10 do 14 h su se vrednosti provodljivosti stoma kod RDI biljaka smanjile za 48% (Slika 4.8).

Sličan trend, ali sa znatno više variranja, se uočava i kod *flacca* mutanta (Slika 4.9). Na početku PRD tretmana, opadanje provodljivosti stoma kod ovih biljaka započinje tek u 10 h, dok na kraju ispitivanog perioda (treći okret PRD), brzo opadanje provodljivosti stoma započinje mnogo ranije (u 8 h). Ta reakcija se javlja i ranije u odnosu na biljke divljeg tipa (započinje u 10 h), ali su rezultujuće vrednosti provodljivosti stoma na kraju oglada kod *flacca* mutanta više ($501 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) nego kod divljeg tipa ($202 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$). To ukazuje da raniji početak i duži period zatvaranja stoma, zbog manje količine ABA, ne dovodi do većeg zatvaranja stominih ćelija.

Ispitivanja u RDI tretmanu pokazuju znatno veće oscilacije u reakcijama stominih ćelija, ali, generalno, proces opadanja provodljivosti stoma (zatvaranje stoma) je sporiji u odnosu na PRD tretman. Stoga, naša ispitivanja kod oba genotipa potvrđuju rezultate Prokić (2009) po kojima se reakcije na PRD tretman mogu okarakterisati kao reakcije bržeg odgovora, a reakcije na sušu kao reakcije sporijeg odgovora. Sličnosti između naših i rezultata Prokić (2009) se ispoljavaju kod efekta PRD tretmana na biljke divljeg tipa, jer rezultati u oba eksperimentalna sistema ukazuju na kontrolu reakcija hemijskim signalima. Razlike između naših rezultata se ogledaju u tome, što naša ispitivanja ukazuju da su reakcije *flacca* mutanta kod PRD, regulisane tipom odgovora hemijskih signala, dok rezultati Prokić (2009) ukazuju na hidraulične signale. Razlike se, verovatno, mogu pripisati dužem eksperimentalnom periodu u našem ogledu i većem broju obrta u PRD, koji je mogao da indukuje i drugi tip kontrole adaptavnih reakcija kod *flacca* mutanta. Takođe su se razlike ispoljile i u tretmanu RDI i suše, jer naši rezultati ukazuju na hidraulične signale kod oba genotipa, za razliku od rezultata Prokić (2009) koji ukazuju na dejstvo hemijskih signala suše kod *flacca* mutanta.

Sadržaj ABA u listovima kod FI, RDI i PRD biljaka paradajza prikazan je na Sl. 4.10. Sadržaj ABA u listovima kod PRD ($435.18 \text{ ng g FW}^{-1}$) i RDI ($376.25 \text{ ng g FW}^{-1}$) biljaka je bio veći u odnosu na kontrolne FI biljke ($338.90 \text{ ng g FW}^{-1}$) kod divljeg tipa. Slično je bilo i kod *flacca* PRD ($91.98 \text{ ng g FW}^{-1}$) i RDI ($161.08 \text{ ng g FW}^{-1}$) biljaka u odnosu na FI biljke ($70.76 \text{ ng g FW}^{-1}$). Ovi rezultati su za sve tretmane potvrdili da je koncentracija ABA u listovima *flacca* mutanta bila značajno manja od koncentracije u listovima divljeg tipa. Ona se kretala u opsegu od 20% za FI do 42% za RDI tretmane. Koncentraciju ABA u listovima *flacca* mutanta od samo 20% u odnosu na divlji tip su takođe utvrdili Sagi *i sar.* (1999). Njihovi rezultati pokazuju nešto nižu koncentraciju ABA i za divlji tip ($270.8 \text{ ng g FW}^{-1}$) i *flacca* mutanta ($63.2 \text{ ng g FW}^{-1}$), a što se može objasniti razlikama u eksperimentalnim uslovima ovih, u odnosu na naša istraživanja. Rezultati Prokić (2009) pokazuju da su razlike između biljaka *flacca* mutanta i divljeg tipa mnogo više izražene u koncentraciji ABA u listovima nego u korenu.

Kod oba genotipa, ispitivani tretmani su uticali na koncentraciju ABA u listovima. Kod divljeg tipa, veći efekat na povećanje sadržaja ABA u listovima je imao PRD tretman (1.3 puta), dok je kod *flacca* mutanta to bio RDI tretman (2.3 puta). Slično, Dodd *i sar.* (2006) su u svojim eksperimentima došli do rezultata da je, u poređenju sa kontrolnim biljkama, ksilemska ABA bila značajno veća kod PRD biljaka,

čak veća i u poređenju sa RDI biljkama, što se pokazalo i u našim istraživanjima sadržaja ABA u listovima kod divljeg tipa (Sl .4.10).

Prema istraživanjima Stoll-a *i sar.* (2000), PRD tretman dovodi do povećanja koncentracije ABA u suvoj strani korena, pa se tako koncentracija ABA u nezalivanoj strani korena povećava i do 10 puta. Velike promene u sadržaju ABA u korenu, povezane sa isušivanjem zemljišta, ne moraju, međutim, da znače, istovremenu, ekvivalentnu promenu u sadržaju ABA u listovima, iako je sadržaj u listovima, po pravilu, viši kod biljaka izloženih PRD tretmanu nego kod optimalno zalivanih biljaka (Stoll *i sar.*, 2000, Kidra *i sar.*, 2004). Većina eksperimenata sa PRD biljkama je pokazala da one imaju više ABA u ksilemskom soku u poređenju sa biljkama koje su zalivane istom količinom vode, ali raspoređene na ceo korenov sistem (Rodrigues *i sar.*, 2008, Liu *i sar.*, 2006, Dodd *i sar.*, 2006, Savić, 2003, Dodd *i sar.*, 2008a). Promena strana zalivanja u PRD tretmanu povećava transport ABA iz korena (Dodd *i sar.*, 2006b), jer se, prilikom ponovnog zalivanja suve strane, omogućava ovom delu korena da doprinese proporcionalano više ukupnom fluksu i na taj način se u transpiracioni sistem oslobađa ABA akumulirana u korenu u toku isušivanja zemljišta.

U skladu sa hipotezom Sharp-a *i sar.* (2000) o odnosu ABA i etilena, porast koncentracije ABA u PRD tretmanu u listovima *flacca* mutanta, kao i redukcija provodljivosti stoma i održanje viših konačnih vrednosti potencijala vode, mogli bi da objasne veću akumulaciju sveže i suve mase kod ovog tretmana u odnosu na FI ili RDI (Slika 4.4 i 4.6).

Veći porast sadržaja ABA u listovima kod RDI biljaka *flacca* mutanta, u odnosu na PRD biljke, uz istovremeno niže konačne vrednosti potencijala vode, ukazuje da je ova akumulacija bila rezultat većeg stepena stresa kome su biljke bile izložene, u odnosu na PRD biljake. ABA detektovana u listovima može biti poreklom iz korena i transportovana preko ksilema, može biti produkt biosinteze u listovima, ili rezultat recirkulacije između korena i nadzemnog dela biljke (Davies *i sar.*, 2000). U većini PRD eksperimenata postoji generalno slaganje da ksilemska ABA može biti ključni molekul hemijskog signala stresa suše. (Chaves *i sar.*, 2003; Tuteja *i Sopory*, 2008).

Slično povećanje u sadržaju ABA u listovima kod oba genotipa, prilikom PRD uslova, ukazuje da *flacca* mutacija ne pogađa transport ABA iz korena u nadzemni deo kao što je pokazano od strane Sagi *i sar.* (1999). Može se, takođe, prihvatiti i druga

hipoteza Sagi *i sar.* (1999) po kojoj bi obrazovana ABA u suši bila rezultat male promene u biosintetskom putu, pri kojoj se ABA-aldehid preko ABA-alkohola pretvara u ABA. Razlika u našim i Sagi-jevim (1999) rezultatima može biti objašnjena različitim stepenom stresa kod istraživanih mutanata paradajza.

Po rezultatima Topcu *i sar.* (2006), sadržaj ABA u ksilemu PRD i RDI biljaka je dinamičan, pre navodnjavanja je dosta veći u odnosu na period posle navodnjavanja.

Naša istraživanja nisu obuhvatila merenja ksilemske ABA (zbog teškoća u prikupljanju dovoljne količine uzorka za analizu), a merenja ABA u listovima nisu obavljena uporedo sa merenjima provodljivosti stominih ćelija. Stoga, rezultati merenja ABA u listovima mogu samo indirektno da ukažu na hemijski prirodu signala suše kod ispitivanih genotipova i u ispitivanim tretmanima. Rezultati analize korelativnih odnosa ksilemske i ABA u listovima sa reakcijama stominih ćelija biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta (Prokić, 2009), iako dobijeni u mnogo kraćem eksperimentalnom periodu u odnosu na naše uslove, ukazuju da je ABA hemijski signal suše za oba genotipa, ali da je za biljke divljeg tipa mnogo značajnija ksilemska ABA poreklom iz lista, a za biljke *flacca* mutanta, poreklom iz korena.

Na osnovu ovih, ali i drugih podataka iz literature, možemo pretpostaviti da je i sadržaj ABA u listovima kod PRD i RDI biljaka dinamičan, pa rezultati mnogo zavise i od vremena uzimanja uzoraka. Tako da, buduća istraživanja zahtevaju češće uzimanje uzoraka za praćenje dinamike sadržaja ABA u listovima, uz istovremeno praćenje provodljivosti stoma. Niz istraživanja ukazuje i da su ova proučavanja još složenija jer bi uticaj ABA mogao biti regulisan različitim faktorima kao što su npr.: pH, rizobakterije, joni i apoplastične β -glukozidaze u listovima (Wilkinson, 1999; Davies *i sar.*, 2005; Dodd *i sar.*, 2006; Jiang i Hartung, 2007).

Ispitivanja sadržaja biogenih elemenata u listovima i korenu obavljena su sa ciljem da se utvrdi da li PRD i RDI sistemi navodnjavanja mogu da utiču na usvajanje i distribuciju pojedinih elemenata. Međutim, u literaturi ne postoje podaci o uticaju PRD i RDI zalivanja na akumulaciju pojedinih elemenata u biljkama, iako bi oni mogli imati značajnu ulogu u source/sink preraspodeli asimilata (Fujita *i sar.*, 2003)

Literaturni podaci pokazuju da je, u uslovima suše, redukovano usvajanje nutrienata korenom i transport nutrienata iz korena u nadzemni deo biljke, usled

redukovanog intenzitete transpiracije i aktivnog transporta (Viets, 1972; Hsiao, 1973; Kramer i Boyer, 1995).

Naši rezultati merenja koncentracije N su pokazali da je, kod *flacca* mutanta, PRD tretman značajno povećao usvajanje N od strane korena ali i njegovu koncentraciju u listovima (Slika 4.11).

Poredjenja koncentracije N u listovima biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta su pokazala i da je koncentracija ovog elementa u svim tretmanima bila za oko 15% veća kod *flacca* mutanta u odnosu na divlji tip. Pri tome se ove razlike nisu ispoljile na nivou korena. Može se pretpostaviti da je veća koncentracija N u listovima *flacca* mutanta rezultat manjeg učešća ovog elementa u metaboličkim procesima koji su kod *flacca* mutanta, u odnosu na divlji tip, sporiji, a na to ukazuje i manji rast i manja biomasa *flacca* mutanta, u poređenju sa biljkama divljeg tipa.

Rezultati u literaturi za akumulaciju N su različiti. Topcu *i sar.* (2007) nisu dobili razlike između FI, RDI i PRD tretmana kod biljaka paradajza. Slično, Hu *i sar.* (2009) su u svojim istraživanjima dobili da PRD nije povećao usvajanje N kod kukuruza (*Zea mays* L.). Neke studije su pokazale da PRD tretman povećava akumulaciju N kod nekoliko useva (Wang *i sar.*, 2009; Shahnazari *i sar.*, 2008). Wang *i sar.* (2009) su dobili da je, u poređenju sa FI i RDI tretmanom, PRD tretman povećao sadržaj N kod krompira i predložili da je uzrok tome, uglavnom, povećana dostupnost N u zemljištu. Slično, veću akumulaciju azota u krtolama i listovima krompira kod PRD biljaka, u odnosu na kontrolne biljke, dobili su u istraživanjima Shahnazari *i sar.* (2008) i Jovanović *i sar.* (2010). Ovi rezultati, kao i drugi literaturni podaci, ukazuju na značaj PRD metode u povećanju efikasnosti u usvajanju, ne samo vode (WUE), već i nutrienata (NUE-nutrient-use efficiency), posebno azota. Skorašnji rezultati su pokazali da povećana dostupnost N može značajno alkalizovati ksilemski sok kod paradajza, što utiče na senzitivnost odgovora stoma na isušivanje zemljišta, zadržavanjem ABA, poreklom iz korena, u apoplastu (Jia i Davies 2007; Wilkinson *i sar.*, 2007).

Različiti tretmani navodnjavanja nisu doveli do statistički značajne razlike u sadržaju K u listovima, međutim, jesu u korenu i brzini translokacije. Ovi rezultati su ukazali i na razlike u transportu ovog elementa u suši jer je kod divljeg tipa pri RDI tretmanu došlo do povećane translokacije K u listove, a kod *flacca* mutanta je translokacija bila smanjena. Sadržaj K u listovima je bio znatno viši kod *flacca* mutanta,

u odnosu na divlji tip. Kalijum povećava rezistenciju biljaka na sušu kroz svoje funkcije u regulaciji stoma, osmoregulaciji, energetsom statusu, sintezi proteina i homeostazi (Marschner, 1995). Takođe, učestvuje u održavanju turgora (Mengel i Arneke, 1982) i redukciji transpiracije u uslovima suše (Andersen *i sar.*, 1992). Pretpostavka je i da je manji sadržaj slobodnog K u listovima biljaka divljeg tipa rezultat njegove veće mobilizacije u metaboličkim procesima.

Suša je dovela do smanjenja sadržaja Ca u listovima, mada u nekim slučajevima to nije bilo statistički značajno. Smanjenje koncentracije Ca u uslovima suše je objašnjeno smanjenim intenzitetom transpiracije (Llorens *i sar.*, 2004) koja je visoko korelisana sa absorpcijom Ca (Marschner, 1995). Naši rezultati su pokazali da su se razlike u tretmanima ispoljile na nivou translokacije jona. RDI tretman je kod oba genotipa usporio transport ovoga jona ka listovima u odnosu na FI i PRD tretmane. Kod *flacca* mutanta, PRD je imao pozitivan efekat na translokaciju Ca u odnosu na FI ili RDI.

Za razliku od Ca, rezultati za Mg nisu pokazali značajne razlike između ispitivanih tretmana i analiziranih organa. Kod *flacca* mutanta razlike su se ispoljile na nivou korena i translokacije Mg koja je bila najsporija u PRD tretmanu.

Na sadržaj mikroelemenata Fe, Mn i Zn uticaj je imao jedino RDI tretman, tako što je došlo do povećane akumulacije Fe u korenu, odnosno Zn u listovima biljaka divljeg tipa. Akumulacija Mn je bila veća u RDI tretmanu kada su u pitanju sadržaj u korenu kod oba genotipa i sadržaj u listovima kod *flacca* mutanta. Takođe, primetno je da je kod biljaka *flacca* mutanta došlo do slabije translokacije Mn iz korena u listove, u odnosu na biljke divljeg tipa. Kod oba genotipa je PRD tretman ubrzao translokaciju ovog elementa iz korena u listove. To je od posebnog značaja jer, Mn kao značajan antioksidacioni agens, može da smanji oksidacioni stres u suši i tako poveća toleranciju biljaka na sušu (Wang *i sar.*, 2010).

Kao odgovor na vodni deficit i porast sadržaja ABA, dešavaju se mnoge promene u ekspresiji gena (Bray, 2007; Qin *i sar.*, 2011). U literaturi nema mnogo podataka o molekularnoj osnovi efekata deficita navodnjavanja na biljke. Rezultati Prokić (2009) su pokazali da se razlikama u ekspresiji *ABI3* i *RD20* gena mogu objasniti razlike u reakcijama stominih ćelija biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta. Naši rezultati su obuhvatili drugu grupu gena i potvrdili razlike u ekspresiji istraživanih *TAO1*, *NCED*

i *EIL1* gena pri FI, PRD i RDI tretmanu, tokom trajanja eksperimenta, kao i između biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta.

Dobro je poznato da stres (posebno suše) aktivira ABA biosintezu. Pokazano je i da stres suše indukuje ekspresiju *NCED* kod mnogih biljaka, uključujući paradajz (Burbidge *i sar.*, 1999). Izostanak stresa kod biljaka divljeg tipa pri FI tretmanu može da objasni relativno slab porast u ekspresiji *NCED* tokom eksperimentalnog perioda, u poređenju sa PRD i RDI tretmanima (posebno prvi i drugi PRD okret - 9. i 17. dan). U isto vreme, ekspresija *TAOI* gena kod FI biljaka ukazuje da je *TAOI* odgovoran za ABA biosintezu i finalni sadržaj u listovima kod ovog tretmana (Sl. 4.20).

Dobra ekspresija oba gena (*TAOI* tokom celog perioda i *NCED* prilikom prvog PRD okreta - 9. dan) kod *flacca* mutanta pri FI tretmanu ukazuje da su oba gena odgovorna za ABA sadržaj u listovima ovih biljaka (Sl. 4.19 i 4.20).

Rezultati Thompson-a *i sar.* (2000) su pokazali vrlo brzo povećanje *NCED* transkripata u listovima paradajza. Naši rezultati nisu pokazali brz porast u ekspresiji gena (naš eksperiment je dizajniran za duže adaptivne odgovore gena), jer je kod skoro svih tretmana, čak i RDI, do povećanja ekspresije *NCED* došlo kod drugog PRD okreta-17. dan. Razlike između naših i Thompson-ovih (2000) rezultata mogu biti objašnjene različitim stepenom, trajanjem suše, kao i razlikom u tipu suše (PRD i RDI). Thompson-ov (2000) eksperiment je rađen sa izdvojenim listovima i stepen suše je bio veći i u kraćem vremenu nego u našim *in vivo* eksperimentalnim uslovima.

Ekspresija *TAOI* u listovima, kod oba genotipa, je potvrdila ranije pokazanu tkivnu specifičnost ovog gena. Min *i sar.* (2000) su pokazali da se, kod biljaka *flacca* mutanta i divljeg tipa, *TAOI* eksprimira, uglavnom, u vegetativnom tkivu, *TAO2* u vegetativnim i reproduktivnim tkivima, dok ekspresija *TAO3* nije bila registrovana. Rezultati Min *i sar.* (2000) i slično, Seo *i sar.* (2000) za *A. thaliana*, su pokazali ključnu ulogu *AAO3* i *TAO3* u ABA biosintezi. Pošto je kod *flacca* mutanta pokazana ekspresija *TAOI* gena i akumulacija ABA u listovima (Sl. 4.19 i 4.10), naši rezultati pokazuju da drugi gen iz *TAO* familije, a ne *TAOI* (verovatno *TAO3*) kodira enzim abscisinsku aldehidnu oksidazu kod *flacca* mutanta.

Jedan od mogućih mehanizama modulacije tkivno specifičnog odgovora na ABA može biti i regulacija ABA biosinteze i/ili odgovora od strane etilena. Etilen je još

jedan hormon koji reguliše odgovor biljke na vodni deficit, tako što kontroliše vegetativni rast biljke u isušivanom supstratu (Sharp *i sar.*, 2000; Chaves *i sar.*, 2003).

Rezultati Rosado *i sar.* (2006) su demonstrirali da *flacca* mutant proizvodi etilen u značajno višim koncentracijama od divljeg tipa. U našem eksperimentu nije merena koncentracija etilena, ali genetičke analize Tieman-a *i sar.* (2001) su pokazale da je *EIL1* pozitivan regulator odgovora na etilen (uključujući epinastiju listova, abscisiju cvetova, senescenciju i sazrevanje plodova). Ekspresija *EIL1* u poslednjim fazama eksperimenta koincidira sa ubrzanim razvojem i sazrevanjem plodova istraživanih biljaka.

Iako je porast PRD indukovano sadržaja ABA bio sličan u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta (*ca.* 1.3 puta), PRD tretman je imao različit uticaj na ekspresiju ispitivanih ABA biosintetskih gena. Najveći porast ekspresije, kod divljeg tipa, je bio primećen za *NCED*, dok je kod *flacca* mutanta, maksimalna ekspresija bila za *TAOI*. Ovi rezultati ukazuju da *NCED*, odnosno *TAOI* mogu biti odgovorni za ABA biosintezu kod divljeg tipa, odnosno, *flacca* mutanta. Sličan obrazac ekspresije *TAOI*, *NCED* i *EIL1* (maksimum tokom drugog okreta - 17. dan je praćen slabljenjem ekspresije) kod biljaka divljeg tipa pri PRD tretmanu može ukazivati na moguće sinergističko dejstvo signalnih puteva za ABA i etilen. Sličan obrazac nije pronađen kod biljaka *flacca* mutanta pri PRD tretmanu. Redukovana *NCED* i značajna *EIL1* ekspresija (pogotovo nakon drugog okreta - 17. dan), verovatno utiče na porast u produkciji etilena koji utiče na ABA biosintezu.

Kod RDI tretmana, obrazac ekspresije gena u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta je bio sličan što, opet, ukazuje na mogućnost sinergističkog efekta ABA i etilen signalnih puteva. Veliko povećanje u sadržaju ABA kod *flacca* mutanta (2.3 puta) je, verovatno, rezultat velike ekspresije *TAOI* i *NCED* gena.

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvući sledeći zaključci:

1. Ispitivanja efekata metoda deficita navodnjavanja (partial root-zone drying - PRD i regulated deficit irrigation - RDI) na rastenje biljaka paradajza, na osnovu merenja visine, su pokazala da su PRD i RDI uticali na rastenje vegetativnih organa biljaka. Pri tome je RDI kod oba genotipa ispoljio veći efekat na visinu biljaka (smanjenje za 12.5% kod divljeg tipa i za 20% kod *flacca* mutanta) od PRD tretmana (za 3.1% kod divljeg tipa i za 4% kod *flacca* mutanta). To nam ukazuje da su stepen stresa kome su biljke bile izložene, odnosno količina raspoložive vode u supstratu za gajenje biljaka, imali značajnu ulogu u ispoljavanju efekata ovih tretmana.

2. Merenja biomase listova, stabla i korena su, takođe, ukazala na uticaj RDI i PRD tretmana, ali su ovi efekti zavisili, kako od ovih ispitivanih organa, tako i od tretmana i genotipova. RDI je kod oba genotipa doveo do značajne redukcije sveže i suve mase, što je posebno bilo izraženo kod listova. PRD efekat je ispoljio različito dejstvo kod ispitivanih biljaka, tako što je kod divljeg tipa došlo do redukcije, a kod *flacca* mutanta do povećanja biomase u ispitivanim organima. Ovi efekti na ispitivane organe nisu u svim slučajevima bili statistički značajni.

3. Analiza rasta vegetativnih organa je pokazala da su u toku celog ispitivanog perioda i u svim tretmanima biljke *flacca* mutanta bile značajno niže (za *ca* 40%) i sa manjom obrazovanom svežom i suvom masom u odnosu na biljke divljeg tipa.

4. Analiza vodnog režima biljaka, na osnovu rezultata potencijala vode (ψ) u listovima i količine vode u supstratu, je pokazala da su RDI biljke bile izložene većem stepenu stresa u odnosu na PRD biljke, kod oba ispitivana genotipa. Rezultati efekata PRD tretmana su pokazali da se vrednosti potencijala vode, kao i količina vode u zalivanoj strani supstrata, nisu značajno razlikovale od FI tretmana. Sporije sušenje

nezalivane strane u PRD tretmanu kod *flacca* mutanta (10 dana), u odnosu na biljke divljeg tipa (8 dana), ukazuje na manji utrošak, a verovatno i usvajanje vode, kod biljaka *flacca* mutanta koje su i sporije rasle u odnosu na divlji tip.

5. Rezultati merenja potencijala vode, u optimalnim uslovima, pokazuju da su biljke *flacca* mutanta bile izložene većem stepenu stresa, u odnosu na biljke divljeg tipa. Te razlike se mogu objasniti manjom sposobnošću *flacca* mutanta da zatvori stome i tako spreči dehidraciju listova, u odnosu na divlji tip.

6. Naša istraživanja dnevne dinamike provodljivosti stoma (g_s), u toku trajanja svih tretmana, su pokazala da postoji različita kinetika u reakcijama stominih ćelija, ali da se to, uglavnom, javlja samo u toku perioda od 7 h do 14 h. Posle tog perioda su trendovi promena, uglavnom, veoma slični. Kod divljeg tipa, u PRD tretmanu oscilacije provodljivosti stoma su veće i mnogo brže u odnosu na RDI tretman. Kod *flacca* mutanta, ispitivanja u RDI tretmanu pokazuju znatno veće oscilacije u reakcijama stominih ćelija, ali, generalno, proces opadanja provodljivosti stoma (zatvaranje stoma) je sporiji u odnosu na PRD tretman. Ovo ukazuje da se reakcije na PRD tretman mogu okarakterisati kao reakcije bržeg odgovora, a reakcije na RDI kao reakcije sporijeg odgovora stominih ćelija na sušu.

7. Analiza reakcija stominih ćelija, u odnosu na promene potencijala vode u listovima, može da ukaže na tip signalnih reakcija. Rezultati su pokazali da reakcije zatvaranja stoma, u uslovima RDI, prate opadanje potencijala vode u listovima. To ukazuje da su ove reakcije stominih ćelija rezultat dejstva hidrauličnih signala. Rezultati analize efekata PRD tretmana na vodni režim biljaka divljeg tipa i *flacca* mutanta su pokazali da se vrednosti potencijala vode nisu značajno razlikovale od FI tretmana, dok su, generalno, vrednosti provodljivosti stoma bile, u proseku, niže od prosečnih vrednosti za FI. To ukazuje da su hemijski signali, a ne hidraulični, bili odgovorni za reakcije stominih ćelija.

8. Kod oba genotipa ispitivani tretmani su uticali na koncentraciju ABA u listovima, koja je kod *flacca* mutanta u svim tretmanima bila manja (za 75%) u odnosu na biljke divljeg tipa. Rezultati su pokazali da je kod divljeg tipa, veći efekat na povećanje sadržaja ABA u listovima imao PRD tretman, dok je kod *flacca* mutanta to bio RDI tretman. Slično povećanje u sadržaju ABA u listovima kod oba genotipa prilikom PRD tretmana ukazuje da *flacca* mutacija ne pogađa transport ABA iz korena u nadzemni deo.

9. Merenja koncentracije jona u različitim organima paradajza (listovi i koren), uglavnom, nisu pokazala značajan efekat primenjenih sistema deficita navodnjavanja na usvajanje, akumulaciju ili distribuciju jona. Najznačajniji je bio uticaj PRD koji je kod *flacca* mutanta povećao usvajanje i transport azota, a kod oba genotipa ubrzao translokaciju mangana iz korena u listove. Kako je mangan značajan antioksidacioni agens, ta reakcija može biti od značaja, ne samo za adaptivne metaboličke reakcije biljaka na PRD, već i moguće poboljšanje nutritivne vrednosti paradajza.

10. Molekularna ispitivanja ekspresije gena u listovima su pokazala razlike između tretmana, tokom njihovog trajanja, kao i između ispitivanih genotipova. Dobra ekspresija *TAOI*, uz slabiju *NCEDI* gena, kod FI biljaka divljeg tipa, ukazuje da je *TAOI* bio odgovoran za ABA biosintezu i finalni sadržaj u listovima kod ovog tretmana. Dobra ekspresija *TAOI* i *NCED* gena kod *flacca* mutanta pri FI tretmanu ukazuje da su oba gena bila odgovorna za ABA sadržaj u listovima ovih biljaka.

11. Iako je porast PRD indukovanog sadržaja ABA bio sličan u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta (ca. 1.3 puta), PRD tretman je imao različit uticaj na ekspresiju ispitivanih ABA biosintetskih gena. Najveći porast ekspresije, u PRD tretmanu kod divljeg tipa, je bio primećen za *NCED*, dok je kod *flacca* mutanta, maksimalna ekspresija bila za *TAOI*. Ovi rezultati ukazuju da *NCED*, odnosno *TAOI* mogu biti odgovorni za ABA biosintezu kod divljeg tipa, odnosno, *flacca* mutanta.

12. Analiza ekspresije sva 3 gena u toku perioda od 5 uzorkovanja u PRD tretmanu je pokazala genotipske razlike. Sličan obrazac ekspresije *TAOI*, *NCED* i *EIL1* kod biljaka divljeg tipa ukazuje na moguće sinergističko dejstvo signalnih puteva za ABA i etilen. Sličan trend promena nije pronađen kod *flacca* mutanta. Redukovana *NCED* i značajna *EIL1* ekspresija, verovatno, reflektuje porast u produkciji etilena, koji može da utiče i na signale i biosintezu ABA.

13. Kod RDI tretmana, obrazac ekspresije gena u listovima divljeg tipa i *flacca* mutanta je bio sličan što ukazuje na mogućnost sinergističkog efekta signalnih puteva za ABA i etilen. Značajan porast ABA koncentracije kod *flacca* mutanta je verovatno bio rezultat značajne ekspresije *TAOI* i *NCED* gena.

14. Pošto je kod *flacca* mutanta bila izražena ekspresija *TAOI* gena i utvrđena akumulacija ABA u listovima, naši rezultati pokazuju da neki drugi gen iz *TAO* familije, a ne *TAOI* (verovatno *TAO3*) kodira enzim abscisinsku aldehidnu oksidazu kod *flacca* mutanta.

15. Naša istraživanja su pokazala da je PRD tretman ispoljio pozitivno dejstvo na rastenje *flacca* mutanta. Pretpostavka je da se to može pripisati povećanju koncentracije ABA koja je mogla da doprinese zatvaranju stoma i optimizaciji vodnog režima (povećanju ψ), a takođe i smanjenju negativnog dejstva etilena, na čiju povećanu sintezu ukazuju rezultati ekspresije *EIL1* gena.

16. Naši rezultati su ukazali da je neophodno uključiti molekularni aspekt za objašnjenje efekata PRD i RDI tretmana na biljke paradajza. Ispitivanja ekspresije još većeg broja gena, čiji su produkti uključeni u percepciju i transdukciju signala stresa indukovanih PRD ili RDI tretmanom, posebno onih vezanih za etilen, mogla bi još bolje da objasne teorijsku osnovu i fiziološke efekte ovih metoda, a tako i da olakšaju i ubrzaju njihovu praktičnu aplikaciju.

7 LITERATURA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9,1859-1868.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis atMYC2 (bHLH) and atMYB2 (MYB) function as transkriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15,63-78.
- Alexander, L., Grierson, D. (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53, 2039-2055
- Allen, S.E., Grimshaw, H.M., Parkinson, J.A., Qarmby, C. (1974). *Chemical Analysis of Ecological Material*, Ed.Wiley, New York
- Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K., Shimazaki, C.t., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., Tsien, R.Y., Harper, J.F., Chory, J., Schroeder, J.I. (2000). Alternation of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis det3 mutant. *Science* 289: 2338-2342.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284, 2148-2152.
- Andersen, M.N., Jensen, C.R., Losch, R (1992). The interaction effects of potassium and drought in field-grown barley. II. Nutrient relations, tissue water content and morphological development. *Soil Plant Sci.* 42, 45–56.
- Anderson, B.E., Ward, J.M., Schroeder, J.I. (1994). Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiology* 104: 1177-1183.
- Aroca, R., Vernieri, P., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díay, M., Tognoni, F., Pardossi, A., (2003). Involvement of abscisic acid in the leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant science* 165, 671-679.
- Asch, F. (2000). Determination of Abscisic Acid by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Technical Report. Laboratory for*

-
- Agrohydrology and Bioclimatology*, Department of Agricultural Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, Tastrup, Denmark.
- Bacon, M.A., Wilkinson, S., Davies, W.J. (1998). pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiology* 118, 1507-1515.
- Bahrún, A., Jensen, C.R., Asch, F., Mongensen, V.O. (2002). Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 53, 251-263.
- Bano, A., Dörffling, K., Bettin, D., Hahn, H. (1993). Abscisic acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology* 20, 109-115.
- Bano, A., Hensen, H., Dörffling, K., Hahn, H. (1994). Changes in the content of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in the xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *Phytochemistry* 37, 345-347.
- Bartels, D., Sunkars, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 24, 23-58.
- Beyer, E.M., Morgan, P.W. (1971). Abscission: the role of ethylene modification of auxin transport. *Plant Physiology* 48, 208-212.
- Bradford, K.J. (1983). Water Relations and Growth of the *flacca* Tomato Mutant in Relation to Abscisic Acid. *Plant Physiol.* 72, 251-255
- Bray, A. E. (2007). Molecular and physiological responses to water-deficit stress. M.A. Jenks et al. (eds.), *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*, Ed. Springer, 121-140.
- Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R., I. B. Taylor (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *vp14*. *Plant J.* 17, 427-431.
- Benton Jones, Jr. (1999). *Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse, and Home Garden*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- Blackman, P.G., Davies, W.J. (1985). Root and shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *Journal of Experimental Botany* 36: 39-48
- Bošnjak, Đ., Pejić, B. (1995). Turnus kao osnova zalivnog režima paradajza. *Zbornik radova* 23, 369-375. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
-

- Boyer, J.S. (1968). Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiology* 43, 1056-1062.
- Caldwell, M.M, T.E. Dawson J.H Richards (1998). Hydraulic lift: consequences of water efflux from the roots of plants. *Oecologia* 113, 151-161.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J.P., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, C., Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 1-10.
- Chaves, M.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 2003, 30, 239-264
- Chaves, M. M., M. M. Oliveira (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits – prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* **55**, 2365-2384.
- Chaves, M.M., T.P. Santos, C.R. Souza, M.F. Ortuño, M.L. Rodrigues, C.M. Lopes, J.P. Maroco, J.S. Pereira (2007). Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology* 150, 237–252
- Chen, G., Shi, Q., Lips, S.H., Sagi, M. (2003). Comparison of growth of *flacca* and wild-type tomato grown under conditions diminishing their differences in stomatal control. *Plant Science* 164, 753-757.
- Choi, H., Hong, J.H., Ha, J., Kang, J.Y., Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive elements binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275,1723-1730
- Comstock J.P. (2002). Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany* 53: 195-200
- Clarkson, D.T., Carvajal, M., Henzler, T., Waterhouse, R.N., Smyth, A.M., Cooke, D.T., Steudle, E. (2000). Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects on nutrient stress. *Journal of Experimental Botany* 51, 61-70.
- Comstock, J.P. (2002). Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany* 53: 195-200

- Cramer, G.R., Jones, R.L. (1996). Osmotic stress and abscisic acid reduce cytosolic calcium activities in roots *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 19, 1291-1298
- Damjanović, M., Zdravković, J., Stevanović, D., Marković, Ž., Zdravković, M. (2001). *Proizvodnja povrća u plastenicima*. Izd. Prezent, Požarevac
- Davies, W.J., Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 55–76.
- Davies, W. J., Bacon, M. A., Thompson, D. S., Sobeih, W., L. G. Rodriguez (2000). Regulation of leaf and fruit growth in plants in drying soil: exploitation of the plant's chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. *J. Exp. Bot.* **51**, 1617-1626.
- Davies, W.J, Wilkinson, S., Loveys, B.R. (2002). Stomatal control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytol.* 153, 449-460.
- Davies, W.J., Kudoyarova, G., Hartung W. (2005). Long-distance ABA signalling and its relation to other signalling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:285-295.
- de Souza, C.R., Maroco, J.P., dos Santos, T.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., Pereira, J.S., Chaves, M.M. (2003). Partial rootzone drying: regulation of stomatal aperture and assimilation in field-grown grapevines (*Vitis vinifera* cv. Moscatel). *Functional Plant Biology* 30, 653-662.
- Dodd, I.S., Stikić, R., Davies, W.J. (1996). Chemical regulation of gas exchange and growth of plants in drying soil in the field. *Journal of Experimental Botany* 47, 1475-1490
- Dodd, I. C., Stikic, R., Davies, W. J. (1997). Chemical regulation of gas exchange and growth of plants in drying soil in the field (review article). *Journal of Experimental Botany. Environmental Perspectives* 1996/7, 1475-1490.
- Dodd, I.C, Theobald, J.C, Bacon, M.A, Davies, W.J. (2006). Alternation of wet and dry sides during partial rootzone drying irrigation alters root-to-shoot signalling of abscisic acid. *Functional Plant Biology* 33, 1081-1089.

- Dodd, I.C. (2007). Soil moisture heterogeneity during deficit irrigation alters root-to-shoot signalling of abscisic acid. *Functional Plant Biology*, 34, 439–448.
- Dodd I.C., Egea G., Davies W.J. (2008). Accounting for sap from different parts of the root system improves the prediction of xylem ABA concentration in plants grown with heterogeneous soil moisture. *Journal of Experimental Botany* 59: 4083–4093.
- Dodig, D. Quarrie, S.A., Stanković, S., Milijić, S., Denčić, S. (2002). Characterising wheat genetic resources for responses to drought stress. In: *Proceedings of ICID International Conference on Drought Mitigation and Prevention of Land Desertification*, Bled, Slovenia, ch 38.
- Dorji, K., Behboudian, M.H., Zegbe-Dominguez, J.A. (2005). Water relations, growth, yield, and fruit quality of hot pepper under deficit irrigation and partial rootzone drying. *Scientia Horticulturae* 104, 137–149.
- Dragović, (1999). Drought effects on agriculture in Yugoslavia. In: Quarrie, S.A., Pekić, S. eds. *Balkan Drought Workshop Proceedings*, Zaječar, Yugoslavia, September 1998. *Agricultural Research Institute SERBIA*, 171-181.
- Dry, P.R., Loveys, B.R., During, H. (2000). Partial drying of rootzone of grape. I. Transient changes in shoot growth and gas exchange. *Vitis* 39, 3-7.
- Đaković, T., Jovanović, Z. (2003). The role of cell wall peroxidase in the inhibition of leaf and fruit growth. *Bulg. J. of Plant Physiology, Special Issue*, 264-272.
- Džamić, R., Stikić, R., Nikolić, M., Jovanović, Z. (1999). *Praktikum, Fiziologija biljaka*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- FAO . (2002). *Crops and drops: making the best use of water for agriculture*, p. 28. Rome, Italy: FAO. Information brochure.
- Fereres, E., M.A. Soriano (2007). Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *Journal of Experimental Botany*, 58, (2) 147–159.
- Foolad, M.R. (2007). Current Status Of Breeding Tomatoes For Salt And Drought Tolerance. In: *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt tolerance*. (M.A. Jenks et al. eds.) *Crops*, 669–700.
- Fujita, K., Okada, M., Lei, K., Ohkura, K., Adu-Gyamfi, J.J., Mohapatra, P.K. (2003). Effect of P-deficiency on photoassimilate partitioning and rhythmic changes in fruit

-
- and stem diameter of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during fruit growth. *Journal of Experimental Botany* 54, 2519-2528.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* 39: 863-876.
- Gao, D., Knight, M.R., Threwavas, A.J., Sattelmacher, B., Plieth, C. (2004). Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiology* 134: 898-908
- Green, S.R., Clothier, B.E., (1995). Root water uptake by kiwifruit vines following partial wetting of the root zone. *Plant Soil* 173, 317–328.
- Gowing, D.J., Davies, W.J., Jones, H.G. (1990). A root-sourced signal of drying soil in apple (*Malus domestica*) Borkh. In *Importance of Root to Shoot Communication in the Responses to Environmental Stress* (eds W. J. Davies & B. Jeffcoat). BSPGR Monograph 21: 274-277.
- Gumenyuk, I.D., Musatenko, L.I. (2006). The anatomic features of vegetative organs of *Persicaria amphibia* (L.) Delarbre at moderate water deficiency. *Ukr. bot. Zh.* 63, 699-712
- Guo, H., Ecker, J.R. (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of *EIN3* transcription factor. *Cell* 115, 667–677.
- Guo, R., Huang, L. (2008). New insights into the activation mechanism of store-operated calcium channels: roles of STIM and Orai. *Journal of Zhejiang University Science B*.ISSN 1862-1783 (*online*).
- Hartung, W., Peuke, A.D., Davies, W.J. (1999). Abscisic acid-a hormonal long distance stress signal in plants under drought and salt stress. In: *Handbook of Crop Stress* (ed. M. Pessarakali) 2nd edn, pp. 731-747. Marcel Dekker, New York.
- Ho, L.C. (1996) Tomato. In: Zemaski, E., Schaffer, A.A. (Eds.), *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source–Sink Relationships*. Marcel Dekker Publishers, New York, USA, pp. 709–728
-

- Ho, L.C., White, P.J. (2005). A Cellular Hypothesis for the Induction of Blossom-End Rot in Tomato Fruit. *Annals of Botany* 95, 571–581
- Hornberg, C., Weiler, E.W. (1984). High affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cell. *Nature* 310: 321-324.
- Hose, E., Sauter, A., Hartung, W. (2002). Abscisic acid in roots- biochemistry and physiology. In: Waisel, Z., Eshel, A., Kafkafi, U. (ed): *plant Roots. The Hidden Half*. 3rd Ed. pp. 435-448. Marcel Dekker, New York-Basel.
- Hsiao, T.C., (1973). Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 24, 519–570.
- Hsiao, T.C., Xu, L.K. (2000). Sensitivity of growth of rooth versus to leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of experimental Botany*. 51: special issue, 1595-1616.
- Hu, T.T, Kang, S.Z., Li, F.S., Zhang, J.H. (2009). Effect of partial root-zone irrigation on the nitrogen absorption and utilization of maize. *Agricultural Water Management* 96, 208–214.
- Hu, T., Kang, S., Li, F., J. Zhang (2011). Effects of partial root-zone irrigation on hydraulic conductivity in the soil–root system of maize plants. *J. Exp. Bot.* 62, 4163-4172.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.H.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R., Meyerowitz, E.M. (1998). EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10, 1321-1332
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D., Schroeder, J.I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24, 1695–1708.
- Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403
- IPCC (2007). *Climate change 2007: the physical science basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Solomon S.D., Qin M., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M. and Miller H.L.). Cambridge, UK and New York, USA: CambridgeUniversity Press.

-
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.R., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F. (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces *coe* genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280,104-106.
- Jensen, C.R., Svendsen, H., Andersen, M.N., Losch, R., (1993). Use of the root contact concept, an empirical leaf conductance model and pressure-volume curves in simulating crop water relations. *Plant and Soil* 149, 1-26
- Jia, W.S., Davies, W.J. (2007). Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced ABA signals. *Plant Physiology* 143:68-77.
- Jia, W., Zhang, J. (1999). Stomatal closure is induced rather by prevailing xylem abscisic acid than by accumulated amount of xylem-derived abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 106, 268–275
- Jiang, F., Hartung, W. (2007). Long-distance signaling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* 59: 37-43.
- Jones, H.G., Sharp, C.S, Higgs, K.H. (1987). Growth and Water Relations of Wilty Mutants of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Journal of Experimental Botany* 38, (11) 1848-1856.
- Jovanović, Z., Djaković, T., Stikić, R., Prokić, Lj., Hadži-Tašković Šukalović, V. (2004). Effect of N deficiency on leaf growth and cell wall peroxidase activity in contrasting maize genotypes. *Plant and Soil* 265, 201-221.
- Jovanovic, Z., Stikic, R., Vucelic-Radovic, B., Paukovic, M., Brocic, Z., Matovic, G., Rovcanin, S., Mojevic, M. (2010). Partial root zone drying increases WUE, N and antioxidant content in field potatoes. *European Journal of Agronomy*, 33, 124-131.
- Jovanović, Z., Stikić, R. (2012). Strategies for improving water productivity and quality of agricultural crops in an era of climate change. In: *Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments*. Edited by Teang Shui Lee, ISBN 978-953-51-0420-9, Publisher: InTech, pp. 77-102.
- Kang, S., Liang, Z., Hu, W., Zhang, J. (1998). Water use efficiency of controlled root-division alternate irrigation on maize plants. *Agricultural Water Management* 38, 69-76.

-
- Kang, S.Z, Hu, X.T, Goodwin, I., Jerie, P., Zhang, J. (2002). Soil water distribution, water use and yield response to partial rootzone drying under flood-irrigation condition in a pear orchard. *Scientia Horticulturae* 92, 277-291.
- Kang S., Zhang J. (2004). Controlled alternate partial rootzone irrigation: its physiological consequences and impact on water use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55: 2437-2446.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozki, K., Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transkription factor. *Nature Biotechnology* 17, 287-291.
- Katz, R.W., Glantz, M.H. (1977). "Rainfall statistics, drought and desertification in Sahel", in *Desertification in Sahel*, (M.H.Glantz, ed.), pp.80-102. Westview Press, Boulder, Col.
- Kirda, C., Cetin, M., Dasgan, Y., Topcu, S., Kaman, H., Ekici, B., Derici, M.R., Ozguven, A.I. (2004). Yield response of greenhouse - grown tomato to partial root drying and conventional deficit irrigation. *Agricultural Water Management* 69, 191-201.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M. , Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., Koshiha, T. (2004). Tissue-Specific Localization of an Abscisic Acid Biosynthetic Enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1697-1707
- Kramer, P.J., Boyer, J.S., (1995). *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press Inc., San Diego.
- Kudoyarova, G.R., Vysotskaya, L.B., Cherkozyanova, A., Dodd, I.C. (2006). Effects of partial root drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *Journal of Experimental Botany* 58, 161-168.
- Kulkarni, M., Borse, T., Chaphalkar, S. (2007). Anatomical variability in Grape (*Vitis vinifera*) Genotypes in Relation to Water Use Efficiency (WUE). *American J. Plant Physiol.* 2, (1) 36-43.
- Larcher, W. (1995). *Physiological Plant Ecology*, Ed. Springer, Berlin, 148-164
- Liang, J., Zhang, J, M.H. Wong (1996). Effects of air-filled soil porosity and aeration on the initiation and growth of secondary roots of maize (*Zea mays*) *Plant and Soil* 186, (2) 245-254

-
- Liu, F., Jensen, C.R., Andersen, M.N. (2003). Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. *Functional Plant Biology* 30, 65-73.
- Liu, F., Jensen, C.R., Shahnazari, A., Andersen, M.N., Jacobsen, S.E. (2005). ABA regulated stomatal control and photosynthetic Water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. *Plant Science* 168, 831-836.
- Liu, F., Shahnazari, A., Andersen, M.N., Jacobsen, S.E., Jensen, C.R. (2006a). Effects of deficit irrigation (DI) and partial root drying (PRD) on gas exchange, biomass partitioning, and water use efficiency in potato. *Scientia Horticulturae* 109, 113-117.
- Liu, F., Shahnazari, A., Andersen, M.N., Jacobsen, S.E., Jensen, C.R. (2006b). Physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signalling, leaf gas exchange, and water use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 57, 3727-3735.
- Liu, K., Sakuma, J., Abe, H., Kasuga, M., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transkription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidosis. *The Plant Cell* 10, 1491-1506.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W-H., Ma, L. (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315: 1712-1716.
- Llorens, L., J. Pen˜uelas, M. Estiarte, P. Bruna (2004). Contrasting growth changes in two dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to experimental drought and warming, *Ann. Bot. (Lond.)*, 94, 843–853.
- Luković J, I. Maksimović, L. Zorić, N. Nagl, M. Perčić, D. Polić, M. Putnik-Delić (2009). Histological characteristics of sugar beet leaves potentially linked to drought tolerance. *Industrial Crops and Products* 30, 281–286.
- Mansfield, T.A., Hetherington, A.H., Atkinson, C.J. (1990). Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 55-75.
-

-
- Marković, Ž. (1997). Gajenje povrća. Izd. Institut za istraživanja u poljoprivredi SRBIJA, Beograd.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. Academic Press, New York.
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G.B., Nobel, P.S., Chrispeels, M.J. (2002). Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130, 2101-2110.
- Maurel, C., Chrispeels, M.J. (2001). A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* 125, 135-138.
- McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T.A., Hetherington, A.M. (1996). Change in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology* 111: 1031-1042.
- Mengel, K., Arneke, W. (1982). Effect of potassium on the water potential, pressure potential, osmotic potential and cell elongation in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 54, 402-408
- Mengel, K., Kirkby, E.A. (2001). Principles of Plant Nutrition. 5th ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Min, X., Okada, K., Brockmann, B., Koshiba, T., Y. Kamiya (2000). Molecular cloning and expression patterns of three putative functional aldehyde oxidase genes and isolation of two aldehyde oxidase pseudogenes in tomato. *Biochim. Biophys. Acta.* 1493, 337-341.
- Mingo, D.M. (2003). Regulation of vegetative and reproductive growth in plants exposed to partial-root zone drying. PhD thesis, University of Lancaster, UK
- Morison, J.I.L., Baker, N.R., Mullineaux, P.M., Davies, W.J. (2008). Improving water use in crop production. *Philosophical Transaction. The Royal Society B* 363: 639-658.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology.* 31, 203-216.
- Nakashima, K., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1997). A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-

-
- regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 12, 851-8611.
- Nambara, E., Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* Vol. 56: 165-185
- Neill, S. J., McGaw, B. A., R. Horgan (1986). Ethylene and 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid production in *flacca*, a wilted mutant of tomato, subjected to water deficiency and pretreatment with abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 37, 535-541.
- Ori, N., Eshed, Y., Pinto, P., Paran, I., Zamir, D., R. Fluhr (1997). TAO1, a representative of the molybdenum cofactor containing hydroxylases from tomato. *J Biol Chem.* 10, 1019-25.
- Poorter, H., Nagel, O. (2000). The role of biomass allocation in the growth responses of plant to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 595-607.
- Postel, S.L (1998). Water for food production: will there be enough in 2025? *BioScience* 48, 629–637
- Prokic Lj., Jovanovic Z., Stikic R., Vucinic Z. (2005). The Mutual Effect of Extracellular Ca²⁺, Abscisic Acid, and pH on the Rate of Stomatal Closure. *Biophysics from Molecules to Brain. Annal of the New York Academy of Science*, Vol. 1048: 513-516
- Prokic Lj., Jovanovic Z., McAinsh R. M., Vucinic, Z., Stikic R. (2006). Species-dependent changes in stomatal sensitivity to abscisic acid mediated by external pH. *Journal of Experimental Botany* 57: 675-683.
- Prokić Lj. T. (2009). Mehanizmi i reakcije stoma u uslovima dejstva stresnih faktora. Doktorska teza. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu
- Prokic, Lj., Stikic, R. (2011). Effects of different drought treatments on root and shoot development of the tomato wild type and *flacca* mutant. *Archives of Biological Sciences* 63 (4), 1167-1171.
- Qin, F., Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki (2011). Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Phys.* (2011) doi: 10.1093/pcp/pcr106. First published online: August 9, 2011.

-
- Quarrie, S. A., Whitford, P. N., Appleford, N. E., Wang, T. L., Cook, S. K., Henson, I. E., and B. R. Loveys (1988). A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts cereal and lupin leaves. *Planta*, 173, 330-339.
- Rodrigues, M. L., Santos, P.T., Rodrigues, P. A., de Souza, R. C., Lopes, M.C., Maroco, P. J., Pereira, S. J., Chaves, M. M. (2008). Hydraulic and chemical signalling in the regulation of stomatal conductance and plant water use in .eld grapevines growing under de.cit irrigation. *Functional Plant Biology* 35: 565–579
- Roelfsema, M.R.G., Levchenko, V., Hedrich, R. (2004). ABA depolarizes guard cell in intact plants trough a transient activation of R- and S-type anion channels.The *Plant Journal* 37: 578-588.
- Rosado, A., Amaya, I., Valpuesta, V., Cuartero, J., Botella, M. A., and O. Borsani (2006). ABA- and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. *J. Exp. Bot.* 57, 3327-3335.
- Sagi, M., Fluhr, R., Lips, S.H. (1999). Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. *Plant Physiology* 120: 571-577.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q., Chang, C., Medrano, L., Bleecker, A., Meyerowitz, E. (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95, 5812-5817.
- Saliendra, N.Z., Sperry J.S., Comstock J.P. (1995). Influence of leaf water status on stomatal response to humidity, hydraulic conductance, and soil drought in *Betula occidentalis*. *Planta* 196: 357-366.
- Sauter, A., Davies, W.J., Hartung, W. (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany* 52, 1991-1997.
- Savić, S., Stikić, R., Savić, D., Jovanović, Z., Prokić, Lj., Srdić, M. Zdravković, J. (2003): Fiziološki efekti delimičnog sušenja korenova (DSK) na paradajz (*Lycopersicon esculentum* L.). XV Simpozijum Jugoslovenskog društva za fiziologiju biljaka, Vrdnik. Program i izvodi saopštenja, 104.

- Savić, S., Fulai, L., Stikić, R., Jacobsen, S. E., Jensen, C. R., Jovanović, Z. (2009). Comparative effects of partial root-zone drying and deficit irrigation on plant growth and physiology in tomato plants. *Archives of Biological Sciences* 61 (4), 801-810
- Schuppler, U., He, P.H., John, P.C.L., Munns, R. (1998). Effects of water stress on cell division and cell-division-cycle-2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *plant Physiology* 117, 667-678.
- Schwartz, A., Wu, W-H., Tucker, E.B., Assmann S.M. (1994). Inhibition of inward K^+ channels and stomatal response by abscisic acid: An intracellular locus of phytohormone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 4019-4023.
- Seo, M., Peeters, A. J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A., Koornneef, M., Kamiya, Y., T. Koshiba (2000). The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12908-12913.
- Shahnazari, A., Ahmadi, S.H., Laerke, P.E., Liu, F., Plauborg, F., Jacobsen, S.E., Jensen, C.R., Andersen, M.N. (2008). Nitrogen dynamics in the soil-plant system under deficit and partial root-zone drying irrigation strategies in potatoes. *European Journal of Agronomy* 28, 65-73.
- Shang, S.I., Ma, L.G., Zhang, H.L., He, R.R., Wang, X.C., Cui, S.J., Sun, D.Y. (2005). Ca^{2+} influx in to the *Lily* pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channel which can be regulated by extracellular CaM. *Plant Cell Physiology* 46: 598-608.
- Sharp, R.E., Davies, W.J. (1989). Regulation of growth and development of plants growing with a restricted supply of water. In *Plants Under Stress* (eds H.G. Jones, T.L. Flowers and M.B. Jones), pp. 71-93. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sharp, R. E., LeNoble, M., Else, M. A., Thorne, E. T., F. Gherardi (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *J. Exp. Bot.* **51**, 1575-1584.
- Sharp, R.E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ* 25: 211–222

-
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, J.G., Spollen, W.G., Springler, G.K., Bohnert, H.J., Nguyen, H. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55, 2343-2352.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., (2006). Mg-helatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823-826.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 410-417.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 221–227
- Simpson, S.D, Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-shinozaki, K., Shinozaki, K. (2003). Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration and dark-induced senescence. *The plant Journal* 33,259-270
- Sobeih, W.Y., Dodd, I.C., Bacon, M.A., Grierson, D., Davies, W.J. (2004). Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *Journal of Experimental Botany* 55, 2353-2363.
- Spasova, D., Popović, T., Jovanović, O. (1997). Occurrence of semi-arid areas in the territory of FR Yugoslavia as a possible consequence of global climate changes. In: *Proceedings of International Symposium Drought and Plant Production*. (S. Jevtić., S. Pekić, eds.), 2, 111-116.
- Stikić, R., Popović, S., Srdić, M., Savić, D., Jovanović, Z., Prokić, Lj., Zdravković, J. (2003). Partial root drying (PRD): a new technique for growing plants that saves water and improves the quality of fruit. *Bulg. J. of Plant Physiology, Special Issue*, 164-171.
- Stikic, R., Savic, S., Jovanovic, Z., Jacobsen, SE., Liu, F., Jensen, C.R. (2010). Deficit irrigation strategies: use of stress physiology knowledge to increase water use efficiency in tomato and potato. In: *Horticulture in 21st Century*, Series: Botanical Research and Practices. (Eds.) A.N. Sampson, Nova Science, Publishers, NY, USA. ISBN: 978-1-61668-582-9, pp. 161-178.
-

- Stoll, M., Loveys, B., Dry, P. (2000). Hormonal changes induced by partial root zone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 51: 1627-1634
- Sugiyama, M., Komamine, A. (1990). Transdifferentiation of quiescent parenchymatous cells into tracheary elements. *Cell Differentiation and Development* 31, 77-87.
- Tal, M., Imber, D., Erez, A., Epstein, E. (1979). Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in *flacca*, a wilted mutant of tomato. V. Effect of abscisic acid on indoleacetic acid metabolism and ethylene evolution, *Plant Physiol.* 63, 1044-1048.
- Takač, A., Gvozdrenović, Đ., Bugarski, D., Červenski, J. (2007). Savremena proizvodnja paradajza. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 43, (1) 269-281.
- Taylor, I.B., Linforth, R.S.T., Al-Naieb, R.J. Bowman, W.R., Marples, B.A. (1988). The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell and Environment* 11: 739-745.
- Thompson, A. J., Jackson, A. C., Parker, R. A., Morpeth, D. R., Burbidge, A., I. B. Taylor (2000). Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNA by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 42, 833-845.
- Tieman, D. M., Ciardi, J. A., Taylor, M. G., H. J. Klee (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J.* 26, 47–58.
- Topcu, S., Kirda, C., Dasgan, Y., Kaman, H., Cetin, M., Yazici, A., Bacon, M.A. (2006). Yield response and N-fertiliser recovery of tomato grown under deficit irrigation. *Europ. J. Agron.* 26, 64-70.
- Topcu, S., Kirda, C., Dasgan, Y., Kaman, H., Cetin, M., Yazici, A., Bacon, M.A. (2007). Yield response and N-fertiliser recovery of tomato grown under deficit irrigation. *European Journal of Agronomy* 26, 64–70.
- Tran, L.S.P, Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell* 16,2481-2948.

- Trewavas, A. J., H. G. Jones (1991). An assessment of the role of ABA in plant development, In: Abscisic acid: physiology and biochemistry, (Eds. W. J. Davies, and H.G. Jones), 169-188. Bios, Oxford
- Trouverie, J., Thevenot, C., Rocher, J.P., Sotta, B., Prioul, J.L. (2003). The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany* 54, 2177-2186.
- Tuteja, N., Sopory, S.K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 3:8, 525-536
- Tyerman, S.D., Niemetz, C.M., Bramley, H. (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell and Environment* 25, 173-194
- Uno, Y., Furihata T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 97, 11632-11637.
- van Schilfgaarde, J. (1994). Irrigation-a blessing or a curse. *Agric. Water Mgmt.* 25, 203-219.
- Van Volkenburgh, E., Davies, W.J. (1983). Inhibition of light-stimulated leaf expansion by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 34, 835-845.
- Verslues, P.E. Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu J., Zhu J-K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status *The Plant Journal* 45, 523-539
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
- Viets, Jr., F., (1972). Water deficits and nutrient availability. In: Kozlowski, T. (Ed.), *Water Deficits and Plant Growth*. Academic Press, New York.
- Wakabayashi, K., Sakurai, H., Kuraishi, S. (1991). Effects of abscisic acid on the synthesis of cell-wall polysaccharides in segments of etiolated squash hypocotyl. II. Levels of UDP-neutral sugars. *Plant and Cell Physiology* 32, 427-432.

-
- Wang, X-F., Zhang, D-P. (2008). Abscisic acid receptors: multiple signal-perception sites. *Annals of Botany* 101: 311-317
- Wang, H.Q, Liu, F.L, Andersen, M.N, Jensen, C.R. (2009). Comparative effects comparative of partial root-zone drying and deficit irrigation on nitrogen uptake in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) *Irrigation Science* 27, 443–448.
- Wang, Y.S., Liu F.L., de Neergaard, A., Jensen, L.S, Luxhø, J., Jensen, C.R. (2010). Alternate partial root-zone irrigation induced dry/wet cycles of soils stimulate N mineralization and improve N nutrition in tomatoes. *Plant and Soil* 337, 167–177
- Wasilewski, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redob, Y., Jammes, F., Valon, C., Frei dit Frey, N., Leungal, J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Molecular Plant* 1: 198-217.
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (1997). Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell which involves saturable ABA uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology* 117, 703-710.
- Wilkinson, S., Corlett, J.E., Oger, L., Davies, W.J. (1998). Effect of xylem sap on transpiration from wild type and *flacca* tomato leaves: a vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. *Plant Physiology* 117: 703-709.
- Wilkinson, S. (1999). pH as a stress signal. *Journal of Plant Growth Regulation* 29, 87-99
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (2002). ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell and Environment* 25: 195-210.
- Wilkinson, S., Bacon, M.A., Davies, W.J. (2007). Nitrate signaling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. *Journal of Experimental Botany* 58, 1705–1716.
- Wilkinson, S., Hartung, W. (2009). Food production: reducing water consumption by manipulating long-distance chemical signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 60, (7) 1885–1891
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994). A novel *cis*-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salinity stress. *The Plant Cell* 6, 251-264.
-

- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2005). Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10,88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Eksperimental Botany* 58, 221-227.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189
- Zegbe-Domínguez, J.A., Behboudian, M.H., Lang, A., Clothier, B.E. (2003). Deficit irrigation and partial rootzone drying maintain fruit dry mass and enhance fruit quality in “Petopride” processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Scientia Horticulturae* 98, 505-510.
- Zegbe-Domínguez, J.A., Behboudian, M.H., Clothierm B.E. (2006). Responses of “Petopride” processing tomato to partial rootzone drying at different phenological stages. *Irrig. Sci.* 24, 203-210.
- Zhang, J., Davies, W.J (1987). Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. *Journal of Experimentaly Botany* 38: 2015-2023
- Zhang, J., Davies, W.J. (1989). Abscisic acid produced in dehydrating root may enable plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell and Environment* 12: 73-81.
- Zhang, J., Davies, W.J. (1989b). Sequential response of whole plant water relations towards prolonged soil drying and the mediation by xylem sap ABA concentration in the regulation of stomatal behavior of sunflower plants. *New Phytologist* 113: 167-174.
- Zobel, R.W., Roberts, L.W. (1978). Effects of low concentrations of ethylene on cell division and cytodifferentiation in lettuce pith explants. *Canadian Journal of Botany* 56, 987-990.

BIOGRAFIJA

Ana Milosavljević rođena je 22. 06. 1981. godine u Kranju, u Sloveniji. Osnovnu školu završavala je u Kranju, Beogradu, Nišu i Paraćinu. IX Gimnaziju „Mihajlo Petrović-Alas“ upisala je 1996. godine, a završila 2000. godine sa odličnim uspehom. Biološki fakultet u Beogradu upisala je 2000. godine, smer biologija, a diplomirala u roku februara 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.09. Nakon toga, 2006. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu na smeru Eksperimentalna i primenjena botanika, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka. U periodu 2007-2011 godina bila je stipendista Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. Bila je polaznik seminara, a kasnije i saradnik, u istraživačkoj stanici Petnica.

U periodu 2007-2010 je učestvovala u realizaciji međunarodnog projekta EU FP6-2004-INCO-WBC-SSA-3: „A Centre for Sustainable Crop-Water management (CROPWAT)“, u okviru kojeg je bila polaznik PCR kursa u Warrington-u, u januaru 2008, organizovanog od strane Applied Biosystem (UK). Učestvovala je u realizaciji dva nacionalna projekta finansirana od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije i to: 1. TR 21027 - „Multidisciplinarni pristup upravljanja vodom za potrebe proizvodnje zdravstveno-bezbedonosne hrane i ublažavanja efekata suše u poljoprivredi“ (period 2008-2010) i 2. TR 31005 - „Savremeni biotehnološki pristup rešavanja problema suše u poljoprivredi Srbije“ (period 2011-2014).

Dobitnik je nagrade za najbolji poster na IX Simpozijumu društva za fiziologiju biljaka Srbije. Član je društva za fiziologiju biljaka Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Ана Милосављевић

Број индекса ЕА060004

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

«Утицај делимичног исушивања коренова на експресију *NCED*, *TAO1* и *EIL1* гена и растење дивљег типа и *flacca* мутанта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.)»

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 22. 05. 2012.

Ана Милосављевић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора **Ана Милосављевић**

Број индекса **EA060004**

Студијски програм **Физиологија и молекуларна биологија биљака**

Наслов докторске дисертације **«Утицај делимичног исушивања коренова на експресију *NCED*, *TAO1* и *EIL1* гена и растење дивљег типа и *flacca* мутанта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.)»**

Ментори: **др Радмила Стикић и др Анета Сабовљевић**

Потписана **Ана Милосављевић**

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 22. 05. 2012.

Ана Милосављевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

«Утицај делимичног исушивања коренова на експресију *NCED*, *TAO1* и *EIL1* гена и растење дивљег типа и *flacca* мутанта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.)»

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанта

У Београду, 22. 05. 2012.

Ана Миљосављевић

1. Ауторство - Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – дели под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - дели под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.