

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana J. Vuleta

**EVOLUCIONA EKOFIZIOLOGIJA STRESA: ULOGA
ENZIMSKIH I NEENZIMSKIH ANTIOKSIDANATA U
PRIRODNIM POPULACIJAMA *IRIS PUMILA* L.
(IRIDACEAE)**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana J. Vuleta

**EVOLUTIONARY ECOPHYSIOLOGY OF STRESS:
THE ROLE OF ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC
ANTIOXIDANTS IN NATURAL POPULATIONS OF
IRIS PUMILA L. (IRIDACEAE)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

Dr Branka Tucić, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

Dr Aneta Sabovljević, docent
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Sanja Manitašević Jovanović, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u okviru projekata osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Fiziološki i evolucionni aspekti stresnog odgovora u prirodnim i laboratorijskim populacijama“ (br. 143033, rukovodilac dr Jelica Lazarević) i „Evolucija u laboratoriji i adaptacije u prirodi“ (br. 173007, rukovodilac dr Branka Tucić), u okviru Odeljenja za evolucionu biologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru dr Branki Tucić na ukazanom poverenju, velikom razumevanju, stručnim savetima i pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliko hvala mentoru doc. dr Aneti Sabovljević na pregledu ove disertacije i diskusiji prikazanih rezultata.

Najsrdahnije se zahvaljujem članu komisije dr Sanji Manitašević Jovanović na saradnji, pomoći, i sugestijama u svim fazama ovog rada.

Zahvaljujem se od srca svim kolegama i koleginicama sa projekta, kao i iz Odeljenja za evolucionu biologiju koji su mi pružali podršku tokom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem porodici i prijateljima na ogromnoj ljubavi, razumevanju i podršci.

Evolucionarna ekofiziologija stresa: uloga enzimskih i neenzimskih antioksidanata u prirodnim populacijama

***Iris pumila* L. (Iridaceae)**

Rezime

U evolucionoj biologiji sredinski stres se definiše kao mehanizam koji dovodi do adaptacija i evolucije u promenljivoj sredini, i istovremeno uključuje svojstva stresora, kao sredinsku komponentu i stresiranih, kao biološku komponentu. Više biljke, kao modularni i sesilni organizmi, razvile su tokom evolucije veliki broj biohemijskih, fizioloških i anatomsko-morfoloških mehanizama koji im omogućuju povećanje individualne adaptivne vrednosti pod nestabilnim uslovima životne sredine. Kratkoročno, odnosno u ekološkoj vremenskoj skali, biljke se usaglašavaju sa variranjem biotičkih i abiotičkih faktora u svojim staništima fleksibilnošću fenotipa, koja može da obuhvati sve nivoe biološke organizacije - od molekularnog do morfološkog. Za prirodne populacije biljaka, svetlost je jedan od prostorno i vremenski najvarijabilnijih abiotičkih faktora životne sredine i, istovremeno, jedan od najvažnijih sredinskih resursa. U tom kontekstu, od izuzetne važnosti su biohemijski mehanizmi zaštite biljaka od oksidativnog stresa koje čine enzimski i neenzimski antioksidanti.

Ciljevi ove doktorske disertacije su: (I) ispitivanje veličine i obrazaca sezonske fenotipske plastičnosti biohemijskih (specifična aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutaze - SOD, askorbat peroksidaze - APX, katalaze - CAT, glutation reduktaze - GR, peroksidaza III klase - POD; količina neenzimskih antioksidanata, antocijana - Anth i fenola - Phen), morfološko-anatomskih (specifična površina lista - SLA i gustina stoma - SD) i fizioloških osobina lista (sadržaj suve materije u listu - LDMC, sadržaj vode u listu - LWC, relativni sadržaj vode u listu - RWC, sukulentnost - SU, količina fotosintetičkih pigmenata: hlorofila a - Chl a, hlorofila b - Chl b i karotenoida -

Cars) biljaka *I. pumila* iz dve prirodne populacije, od kojih je jedna naseljavala otvoreno (populacija „Dina“), a druga zasenčeno (populacija „Šuma“) stanište u Deliblatskoj peščari; (II) testiranje hipoteze o lokalnim adaptacijama lista *I. pumila* na abiotičke uslove otvorenog i zasenčenog staništa korišćenjem recipročno-transplantacionog eksperimenta u prirodi; (III) utvrđivanje variranja u stepenu (relativna varijansa sopstvene vrednosti, rVE) i obrascima fenotipske integracije (CPC analiza) funkcionalno povezanih osobina lista *I. pumila*, indukovanog heterogenošću životne sredine.

Obrazac sezonskog variranja funkcionalnih osobina lista kod biljaka *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma bio je specifičan za svaku osobinu, kao i za svaku ispitivanu populaciju. Specifične aktivnosti većine antioksidativnih enzima, kao i količina neenzimskih antioksidanata bile su najveće tokom najstresnijeg, letnjeg perioda, koga karakterišu visok intenzitet svetlosti, povišena temperatura vazduha i nedostatak vode u podlozi, u poređenju sa drugim godišnjim dobima kao što su proleće i jesen. Tokom cele vegetacione sezone biljke iz populacije Šuma su imale više aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na biljke iz populacije Dina, dok je suprotan trend utvrđen za neenzimske antioksidante, naročito antocijane, čija je količina po pravilu bila veća u listovima biljaka sa otvorenog staništa. Pored variranja u aktivnosti i količini antioksidanata, u populaciji Dina uočeno je i smanjenje količine hlorofila, kao jedan od mehanizama kojim biljke *I. pumila* sa otvorenog staništa regulišu nastanak reaktivnih vrsta kiseonika u hloroplastima.

Testiranje adaptivnosti ispitivanih biohemijskih, fizioloških i morfološko-anatomskih osobina lista *I. pumila* pokazalo je da se srednje vrednosti većine ovih osobina nisu statistički značajno razlikovale između genotipova iz populacija Dina i Šuma ni na otvorenom kao ni na zasenčenom staništu. Odsustvo statistički značajnih među-populacionih razlika kod *I. pumila* na istom staništu ukazuje da se populacije Dina i Šuma nisu genetički diferencirale pod uticajem lokalne selekcije u njihovim svetlosnim sredinama. Dakle, pošto način variranja testiranih osobina lista (indukovanog različitim

intenzitetima ambijentalne svetlosti) povećava performansu biljaka *I. pumila* pod datim sredinskim uslovima, ovaj tip promene fenotipa mogao bi se definisati kao *adaptivna* plastičnost.

Veličina fenotipske plastičnosti u odnosu na svetlost, procenjena na osnovu indeksa plastičnosti, bila je specifična za svaki tip analiziranih osobina lista. Antioksidanti i fotosintetički pigmenti ispoljavali su veću fenotipsku plastičnost u odnosu na morfološko-anatomske i fiziološke osobine. Nepostojanje statistički značajnih razlika u plastičnosti većine analiziranih osobina lista, između populacija sa otvorenog i zasenčenog staništa, ukazuje da genotipovi *I. pumila* različitog porekla „reaguju“ na variranje intenziteta svetlosti formiranjem sličnih, adaptivnih fenotipova, sprečavajući na taj način delovanje lokalne selekcije na fenotipsku plastičnost ispitivanih osobina.

Poznato je iz literaturnih podataka da porast intenziteta sredinskog stresa može da dovede do povećanja integriteta funkcionalno povezanih osobina ili modula organizama, što je takođe potvrđeno i u slučaju *I. pumila*. Najveći broj korelacija između analiziranih osobina lista konstatovan je u najnepovoljnijem, letnjem periodu kod biljaka iz obe populacije, odnosno pod uslovima povećanog intenziteta abiotičkog stresa. Broj i veličina koeficijenata fenotipskih korelacija, bili su najveći u grupi osobina koje čine antioksidanti, kao i u grupi osobina vezanih za fotosintetičke pigmente, što navodi na zaključak da bi se ove dve grupe osobina mogle tretirati kao posebni funkcionalni moduli unutar lista.

Ključne reči: *Iris pumila*, SOD, CAT, APX, GR, POD, fenolna jedinjenja, sredinski stres, fenotipska plastičnost, recipročno-transplacioni eksperiment.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Evoluciona biologija

UDK: 575.21:577.151(043.3)

581.1:582.579.2(043.3)

**Evolutionary ecophysiology of stress: the role of enzymatic and
non-enzymatic antioxidants in natural populations of
Iris pumila L. (Iridaceae)**

Abstract

In evolutionary biology, environmental stress is defined as a mechanism that leads to adaptation and evolution in a variable environment and includes properties of stress, as an environmental component, and stressed, as the biological component. During the evolution higher plants, as sessile and modular organisms, have developed a number of biochemical, physiological and morpho-anatomical mechanisms that enable them to increase individual fitness under unstable environmental conditions. Short-term, in ecological time scale, plants adjust to varying biotic and abiotic factors in their habitat by phenotype flexibility, which may include all levels of biological organization - from the molecular to the morphological. For natural populations of plants, light is the most heterogeneous abiotic factor, both spatially and temporally, and at the same time, one of the most important environmental resources. In this context, antioxidative enzymes and non-enzymatic antioxidants, as specific biochemical mechanisms, are of great importance for plants protection against oxidative stress.

The aims of this doctoral dissertation were: (I) to investigate the size and patterns of seasonal phenotypic plasticity of biochemical (specific activities of antioxidative enzymes superoxide dismutase - SOD; ascorbate peroxidase - APX, catalase - CAT, glutathione reductase - GR, class III peroxidase - POD; content of non-enzymatic antioxidants, anthocyanins - Anth and phenolics - Phen), morpho-anatomical (specific leaf area - SLA, stomatal density - SD) and physiological leaf traits (leaf dry matter content - LDMC, leaf water content - LWC, relative leaf water content - RWC, succulence - SU, concentration of photosynthetic pigments: chlorophyll a - Chl a, chlorophyll b - Chl b and

carotenoids - Cars) in two *I. pumila* populations, one inhabiting open site ("Dune" population) and the other one from woodland understory ("Wood" population) in Deliblato sand; (II) testing the local adaptation hypothesis of *I. pumila* to abiotic conditions at the open and shaded habitat, using reciprocal transplant experiment in nature (III) to determine the variation of degree (relative variance of eigen-value, rVE) and patterns of phenotypic integration (CPC analysis) of functionally linked traits in the *I. pumila* leaves, induced by heterogeneous environment.

The seasonal variation pattern of functional leaf traits of *I. pumila* from two populations, Dune and Wood, was specific for each trait, as well as for the population tested. Specific activities of antioxidative enzymes and content of non-enzymatic antioxidants were the highest during the most stressful, summer period, with high light intensities, elevated atmospheric temperature and water deficit, in comparison to other seasons, such as spring or autumn. During the whole vegetation period, plants from the Wood population had higher antioxidative enzymes activities than those from the Dune population, while an opposite trend was observed for non-enzymatic antioxidants, especially anthocyanins, whose content was, in general, higher in the leaves of plants from the open habitat. Besides the variation in the activities and contents of antioxidants, a decrease in the chlorophyll concentration was observed in plants from Dune population, which could be a means for regulating reactive oxygen species generation in the chloroplasts of these plants.

Testing the adaptability of the biochemical, physiological and morpho-anatomical leaf traits in the *I. pumila* showed that average values for most of the traits investigated did not differ significantly between the Dune and Wood population, neither in the open nor in the shaded habitat. No statistically significant differences among *I. pumila* populations at the same habitat implicate there was no genetic differentiation between Dune and Wood populations due to local selection in their light environments. Therefore, as the pattern of variation of tested leaf traits (induced by different intensities of

ambient light) increases the performance of *I. pumila* under the given environmental conditions, this type of phenotypic changes could be defined as adaptive plasticity.

The size of light-induced phenotypic plasticity, estimated by the plasticity index, was specific for each type of leaf traits considered. Antioxidants and photosynthetic pigments showed higher phenotypic plasticity compared to morpho-anatomical and physiological traits. The absence of statistical significance in the plasticity of the most of the leaf traits analyzed indicates that *I. pumila* genotypes of different origin respond to light intensity variation by forming similar, adaptive phenotypes, thus preventing the effect of local selection on phenotypic plasticity of the investigated leaf trait.

According to the literature data, increased environmental stress intensity can be followed by an increase in the integrity of functionally related traits or organism modules, which was also confirmed in *I.pumila*. The highest number of correlation between analyzed leaf traits was obtained in the least favourable, summer period in the plants from both populations, that is, under increased intensity of abiotic stress. The size and number of phenotypic correlation coefficients were the highest in the group of antioxidants, as well as in the group of traits related to photosynthetic pigments, leading to the conclusion that these two groups of traits could be treated as separate leaf functional modules.

Key words: *Iris pumila*, SOD, CAT, APX, GR, POD, natural plant populations, environmental stress, phenotypic plasticity, reciprocal-transplant experiment.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Evolutionary Biology

UDC: 575.21:577.151(043.3)

581.1:582.579.2(043.3)

SADRŽAJ:

1	UVOD.....	1
1.1	Svetlosna staništa biljaka.....	2
1.2	Sredinski stres	4
1.2.1	Svetlost kao uzročnik stresa	6
1.3	Odgovor biljaka na sredinski stres.....	8
1.4	Fenotipska plastičnost - usaglašavanje biljaka sa heterogenim uslovima staništa	10
1.4.1	Fenotipska integracija - ekološke i evolucione implikacije	16
1.5	Koncepcija lokalnih adaptacija i način testiranja.....	18
1.6	Mehanizmi antioksidativne zaštite i njihova uloga u odgovoru na stres....	20
1.6.1	Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite: struktura, funkcija, lokalizacija i regulacija.....	23
1.6.2	Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite.....	28
1.7	<i>Iris pumila</i> L. kao model-organizam.....	30
2	CILJEVI RADA	33
3	MATERIJAL I METODE.....	34
3.1	Opis staništa.....	34
3.2	Eksperimentalni dizajn	35
3.2.1	Sezonsko i intraklonalno variranje morfološko-anatomskih i fiziološko-biohemijskih osobina lista <i>I. pumila</i> : in situ eksperimenti	35
3.2.2	Recipročno-transplantacioni eksperiment	37
3.3	Biohemijske metode za analizu biljnog materijala	39
3.3.1	Ekstrakcija solubilnih proteina i određivanje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima	39
3.3.2	Merenje aktivnosti antioksidativnih enzima	40
3.3.3	Nativna elektroforeza: vizuelizacija aktivnosti i određivanje izoformi antioksidativnih enzima	42
3.3.4	Ekstrakcija i određivanje ukupne količine neenzimskih antioksidanata - fenola i antocijana	43
3.3.5	Ekstrakcija i merenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata	44

3.3.6	Određivanje oksidativnog oštećenja membrane merenjem količine malondialdehida	45
3.4	Merenje morfološko-fizioloških osobina lista.....	46
3.4.1	Merenje specifične površine lista (SLA), sadržaja vode u listu (LWC), sadržaja suve mase lista (LDMC), relativnog sadržaja vode (RWC) i sukulenosti (SU).....	46
3.4.2	Određivanje gustine stoma (SD).....	47
3.5	Statističke analize.....	47
3.5.1	Sezonska dinamika morfološko-anatomskih i fiziološko-biohemijskih osobina lista <i>I. pumila</i>	47
3.5.2	Recipročno-transplantacioni eksperiment	48
3.5.3	Indeksi fenotipske plastičnosti i integracije	50
4	REZULTATI.....	52
4.1	Sezonska dinamika osobina lista <i>I. pumila</i> u različitim svetlosnim staništima	52
4.1.1	Sezonska dinamika antioksidanata u različitim svetlosnim staništima	52
4.1.2	Sezonsko variranje morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista u populacijama <i>I. pumila</i> sa otvorenog i zasenčenog staništa.....	69
4.1.3	Kvantifikovanje fenotipske plastičnosti osobina lista <i>I. pumila</i> : unutar-populaciona i među-populaciona sezonska dinamika	77
4.1.4	Fenotipska integracija lista <i>I. pumila</i> : unutar-populaciono i među-populaciono sezonsko variranje	83
4.2	Recipročno-transplantacioni eksperiment.....	87
4.2.1	Testiranje hipoteza o lokalnim adaptacijama <i>I. pumila</i>	87
4.2.2	Fenotipska plastičnost osobina lista <i>I. pumila</i> u dve prirodne populacije sa otvorenog i zasenčenog staništa	97
4.2.3	Fenotipska integracija osobina lista <i>I. pumila</i> u dve prirodne populacije sa otvorenog i zasenčenog staništa	109
5	DISKUSIJA.....	115
5.1	Sezonska dinamika funkcionalnih osobina lista.....	115
5.1.1	Uloga antioksidanata u odgovoru na abiotički stres	115
5.1.2	Variranje morfoloških i fizioloških osobina lista izazvano nestabilnošću svetlosnih uslova staništa.....	125
5.2	Lokalne adaptacije na prostorno variranje ekoloških činilaca staništa	130

5.3 Svetlost i fenotip	134
5.3.1 Fenotipsko variranje osobina lista u odnosu na sezonsku i prostornu fluktuaciju intenziteta svetlosti: adaptivna ili pasivna plastičnost izazvana stresom?	134
5.3.2 Integrisani fenotip - odgovor na sredinski stres.....	139
6 ZAKLJUČCI.....	143
7 LITERATURA	146
8 PRILOZI.....	175

„It is not the strongest of species that survive or the most intelligent but the ones most responsive to change“

Charles R. Darwin (1859)

1 UVOD

Prirodna staništa bioloških vrsta čini veliki broj različitih faktora - fizičkih, hemijskih i bioloških - koji, zbog svoje prostorno-vremenske nestabilnosti i različite stope variranja, indukuju kako kratkoročne ili ekološke, tako i dugoročne ili evolucione odgovore organizama. Za sve organizme u načelu, a posebno za one sa sesilnim stilom života kao što su biljke, uspešno usaglašavanje sa neravnomernom raspodelom osnovnih resursa životne sredine, uključujući svetlost, nutrijente i vodu, ali i različite patogene, jedan je od najvećih ekoloških izazova (Stuefer, 1996; Larcher, 1995).

Heterogenost životne sredine je opšti termin koji objedinjuje veći broj fenomena i koji se opisuje kroz više aspekata, kao što su skala, kontrast, predvidivost promene i prostorno-vremensko variranje (Wiens, 1976; Kotliar i Wiens, 1990; Stuefer, 1996;). *Skala*, sa prostornog aspekta, predstavlja meru veličine površine koju karakterišu sredinski faktori određenog kvaliteta, dok se sa vremenskog aspekta odnosi na trajanje delovanja tih faktora. Skala variranja sredinskih faktora se po pravilu definiše u odnosu na način na koji organizmi koriste određeno stanište. Ukoliko je skala sredinskog variranja velika u odnosu na veličinu i disperzionu sposobnost organizma, tj., ukoliko organizmi provode znatno više vremena u jednom nego u drugim staništima, teorijski se očekuje da će se evolucija u takvim populacijama odvijati formiranjem konstitutivnih ili lokalno adaptiranih fenotipova (Levins, 1963; Banta i sar, 2007; Ghalambor i sar, 2007). Nasuprot tome, ukoliko je skala variranja sredinskih faktora mala, odnosno ako organizmi koriste sredinske resurse proporcionalno njihovoj prostorno-vremenskoj zastupljenosti u datom staništu, očekuje se evolucija adaptivne fenotipske plastičnosti, jer omogućuje fino usklađivanje genotipova

sa promenom u njihovim mikro-sredinama (Stuefer, 1996; Wijesinghe i Hutchings, 1997; Tucić i sar, 1998; Donohue i sar, 2001; Griffith i Sultan, 2004; Benz i sar, 2007). *Vremenska heterogenost* životne sredine može biti unutar-generacijska - kada fluktuacije uslova sredine traju kraće od vremena generacije ili među-generacijska - kada se promene odvijaju u vremenskom periodu dužem od vremena generacije.

Heterogena staništa čine prostori koje karakterišu sredinski faktori različitog kvaliteta. Stepem razlike između ovih površina se naziva *kontrast* (Kotliar i Wiens, 1990). Kontrast koji je neophodan za indukciju fenotipskog odgovora jedinke zavisi, pre svega, od načina na koji jedinka koristi određeni sredinski faktor (Stuefer, 1996; Kotliar i Wiens, 1990). *Predvidivost* je najkompleksniji aspekt heterogenosti životne sredine koja, takođe, igra značajnu ulogu u evoluciji odgovora jedinki na sredinska variranja (Oborny, 1994). Ukoliko je životna sredina varijabilna na predvidiv način, prirodna selekcija će favorizovati adaptivnu fenotipsku plastičnost jedinki date populacije (Scheiner, 1993).

1.1 Svetlosna staništa biljaka

Sunčevo elektromagnetno zračenje je primarni izvor energije koji omogućuje promet organske materije i regulaciju temperature i balansa vode na Zemlji, obezbeđujući tako uslove neophodne za opstanak živih organizama (Larcher, 1995; Valladares, 2003).

Termin „svetlost“ odnosi se na vidljivi deo spektra (380 - 750 nm) elektromagnetnog zračenja, čiji se opseg znatno širi i kreće od gama zraka ($\lambda < 1$ nm) pa sve do radiotalasa ($\lambda > 1$ mm) (Larcher, 1995; Valladares, 2003). Više biljke apsorbuju i za fotosintezu koriste samo uski deo spektra, od 400 do 700 nm, koji se naziva fotosintetički aktivno zračenje, PAR (eng. Photosynthetically Active Radiation). Iako se ne koriste u procesu fotosinteze, od biološkog značaja su i ultraljubičasto (UV, 290 - 380 nm), kao i infracrveno zračenje (750 - 4000 nm). Međutim, dok UV zračenje ima izrazito

fotodestruktivan efekat na organizme, infracrvena i dugotalasna zračenja (4000 - 100000 nm), pored termalnog efekta, regulišu i fotomorfogenetske procese biljaka (Larcher, 1995; McDonald, 2003).

Svetlost je jedan od najvarijabilnijih sredinskih resursa, kako u prostornom tako i u vremenskom smislu (Percy, 1999; Valladares, 2003). Količina sunčevog zračenja na nekom staništu najviše zavisi od njegove geografske širine i nadmorske visine. Najveća količina zračenja koje dopire do zemljine površine nalazi se u blizini ekvatora, dok ka polovima postepeno opada; na velikim nadmorskim visinama zračenje je takođe intenzivnije, zbog proredne atmosfere, u poređenju sa područjima koja se nalaze na malim nadmorskim visinama (Larcher, 1995). Biljke koje naseljavaju velike geografske širine su izložene visokim intenzitetima UV zračenja i drastičnom variranju fotoperioda, u zavisnosti od sezone. Planinske biljke su takođe izložene visokim intenzitetima svetlosti, ali je u njihovim staništima variranje fotoperioda manje izraženo. Šumska senka i vodena staništa karakteristična su po smanjenom intenzitetu i izmenjenom spektralnom sastavu ambijentalne svetlosti (Larcher, 1995; Nilsen i Orcutt, 1996). Postoje staništa koja se odlikuju visokim i relativno uniformnim intenzitetom svetlosti, kao što su pustinje i planinski vrhovi, ali i druga (npr., šumska senka), koje karakterišu nizak intenzitet i izražena promenljivost količine svetlosti. Količina fotosintetički-aktivne svetlosti (PAR) veoma zavisi od strukture biljne zajednice i može da varira između 50-80% od pune sunčeve svetlosti, u listopadnim šumama tokom perioda bez lišća do 10-15%, u četinarskim šumama, pa i manje od 0.1%, u gustim tropskim šumama. (Valladares, 2003). Zbog ovako izraženog variranja intenziteta svetlosti biljke su razvile brojne anatomske, morfološke, fiziološke i biohemijske mehanizme pomoću kojih obezbeđuju dovoljnu količinu svetlosne energije i smanjuju oštećenja do kojih dovodi višak apsorbovane svetlosti (Nilsen i Orcutt, 1996; Valladares, 2003).

1.2 Sredinski stres

U naučnoj literaturi, pojam *stres* (lat. *stringere* – zategnuti, stegnuti, ograničiti) se definiše na različite načine i koristi u različitim kontekstima. Ovo je razumljivo ako se ima u vidu da definisanje ovog pojma zavisi od oblasti istraživanja (fiziologija, ekologija ili evolucionarna biologija), kao i od biološkog nivoa (molekularni, fiziološki, organizamski ili populacioni) na kome se stres istražuje (Bijlsma i Loeschcke, 2005). U ekološkom kontekstu, stres se definiše kao značajno odstupanje sredinskih uslova od optimalnih za život organizama. Ono indukuje promene na svim funkcionalnim nivoima organizma, u početku reverzibilne, dok kasnije mogu postati i trajne (Larcher, 1995; Nilsen i Orcutt, 1996, Lambers, Chapin i Pons, 2008). Pošto se pojam stres koristi za označavanje kako sredinskih faktora - užročnika stresa, tako i stanja organizma uzrokovanog stresom, neophodno je razgraničiti pojam *stresor*, odnosno stimulus koji je izazvao stres od pojma *stresiranost*, tj. odgovor organizma na delovanje određenog stresora (Larcher, 1995).

U fiziologiji pod pojmom stres obuhvaćen je skup sredinskih uslova koji dovode do takvih promena u fiziološkim procesima čiji je rezultat oštećenje biljke. Drugim rečima, stres nastaje kada stresor indukuje dovoljno veliku promenu u fiziološkim procesima koja dovodi do smanjenja rasta, sposobnosti fiziološke aklimatizacije ili prinosa biljaka. Intenzitet stresa nije uvek jednostavno kvantifikovati. Ako je stres niskog intenziteta, čineći uslove životne sredine marginalno suboptimalnim, odgovor biljke može u potpunosti izostati ili će biti neznatan. Međutim, ako stres slabog intenziteta traje duži vremenski period, tj. ako preraste u hroničan stres, promene u fiziologiji biljke biće neizbežne. Stres visokog intenziteta (akutni stres) nastaje usled naglih promena u životnoj sredini, i u kratkom vremenskom periodu može da dovede do dramatičnih fizioloških promena kod biljaka. Zbog različitih efekata koji ispoljava na funkcionisanje biljnog organizma, u fiziologiji stresa primenjuje se koncepcija *doze* (engl. *dose*), koja se definiše kao proizvod intenziteta i trajanja stresa. Tako na primer, odgovor biljaka na hronični stres može biti veoma

različit od odgovora na akutni stres, čak i kada su izložena istoj dozi stresa (Nilsen i Orcutt, 1996; Lambers, Chapin i Pons, 2008).

U evolucionoj biologiji stres se definiše kao mehanizam koji dovodi do adaptacija i evolucije u promenljivoj sredini, i istovremeno obuhvata svojstva stresora (sredinska komponenta) i stresiranih (biološka komponenta). Zbog toga, sredinski stres i njegov nivo mogu biti definisani samo u odnosu na organizam ili populaciju koja je izložena datom sredinskom faktoru. U tom smislu, stresor je sredinski faktor, dovoljnog intenziteta i trajanja, koji dovodi do promene u biološkom sistemu, delujući ograničavajuće na preživljavanje i/ili reprodukciju (Hoffman i Parsons 1991; Bijlsma i Loeschcke, 2005). Pretpostavlja se da su za neku jedinku ili populaciju najmanje stresni oni uslovi životne sredine kojima je najčešće izložena, dok će nivo stresiranosti jedinke ili populacije, odnosno intenzitet stresa, biti najviši u sredini koja im je nova ili strana (Hoffman i Parsons 1991; Bijlsma i Loeschcke, 2005).

Promene u genetičkoj strukturi populacije mogu takođe drastično izmeniti način percepcije sredinskih faktora, dovodeći do tzv. „genetičkog stresa“. Na primer, ukrštanje u srodstvu, u okviru jedne populacije, može dovesti do toga da uobičajena variranja uslova životne sredine postanu stresna za datu populaciju (Bijlsma i sar, 1997; Bijlsma i sar, 2000).

Kod biljaka, veliki broj faktora životne sredine može izazvati stres. Stresori se mogu svrstati u tri grupe: fizičke, koji obuhvataju fizičke karakteristike životne sredine (npr. suša, ekstremne temperature, svetlost, vetar, poplave), hemijske, u koje spadaju sva hemijska jedinjenja koja su neuobičajena za datu sredinu (teški metali, pesticidi) ili se nalaze u relativno visokim koncentracijama (pH zemljišta, salinitet) i biološki stresori, koji obuhvataju različite interakcije između živih organizama (kompeticija, herbivori, različiti patogeni) (Nilsen i Orcutt, 1996; Lambers, Chapin i Pons, 2008).

U prirodi, na biljke retko deluje samo jedan stresor. Uglavnom se javljaju u kombinacijama od dva ili više stresora, koji mogu imati sinergistički,

neutralan ili antagonistički efekat. Na primer, na otvorenim staništima sinergistički deluju visok intenzitet svetlosti, povišena temperatura i suša, dovodeći do pregrevanja listova biljaka. Antagonistički interaguju deficit vode i niske temperature, jer se eksperimentalno pokazalo da biljke izložene suši bolje podnose niske temperature (Nilsen i Orcutt 1996).

1.2.1 Svetlost kao uzročnik stresa

Intenzitet, trajanje i spektralni sastav svetlosti su važni faktori životne sredine biljke. Svetlost utiče na svaki aspekt rasta, razvića, diferencijacije i reprodukcije biljaka. Visoki intenzitet, deficit ili neodgovarajući spektralni sastav svetlosti predstavlja stres za biljku (Larcher, 1995; McDonald, 2003). Na primer, tokom izloženosti visokim intenzitetima svetlosti, višak apsorbirane energije koja ne može da se iskoristi u procesu fotosinteze obično dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), i posledično tome, do oksidativnog stresa. Da bi izbegle fotooksidativna oštećenja biljke su razvile brojne zaštitne mehanizme na svim hijerarhijskim nivoima organizacije (Logan i sar, 1998; Valladares, 2003). Zbog izraženog prostorno-vremenskog variranja svetlosti i velikog značaja koji ima za biljke, aklimatizacija i adaptacija na svetlosne uslove životne sredine su ključni mehanizmi za preživljavanje biljaka u nekom ekosistemu (Larcher, 1995; McDonald, 2003).

Prema prilagođenosti na svetlosni režim staništa, razlikuju se biljke sunca i biljke senke (Givnish, 1988; Valladares i sar, 2005). Biljke sunca rastu na staništima koja se odlikuju visokim intenzitetom svetlosti, dok su biljkama senke za rast i reprodukciju neophodna staništa sa niskim intenzitetom svetlosti. Samo mali broj vrsta su isključivo biljke senke ili sunca i najveći broj biljaka može, u određenoj meri, da se prilagodi alternativnim svetlosnim staništima (McDonald, 2003).

U odnosu na biljke senke, za biljke sunca karakteristične su visoke vrednosti odnosa između korena i stabla, manji i deblji listovi, kao i deblja kutikula (Evans i Poorter, 2001). Manji i deblji listovi omogućavaju smanjenje

energetskog opterećenja izazvanog apsorpcijom prevelike količine svetlosne energije i efikasnije regulisanje temperature lista. Deblja kutikula predstavlja efikasnu zaštitu od UV zračenja i gubitka vode. Takođe, deblji listovi imaju veću površinu mezofila u odnosu na površinu epidermisa, čime se obezbeđuje veći broj hloroplasta po jedinici površine i poboljšava/olakšava difuzija CO₂ do hloroplasta (Anderson i Osmond, 1987; Murchie i Horton, 1997; Chen i sar, 2002). Biljke senke povećavaju površinu lista kako bi apsorbivale dovoljnu količinu svetlosne energije. Odlikuju ih tanki listovi sa manje slojeva palisadnog tkiva i većim intercelularnim prostorom, dok su hloroplasti veći i sa izraženim granumom. Biljke senke imaju visok odnos hlorofila i Rubisco proteina, nizak odnos između hlorofila a i hlorofila b, manju provodljivost stoma, nižu tačku kompenzacije fotosinteze, visoku tačku saturacije fotosinteze i nisku stopu respiracije, u poređenju sa listovima sunca (Anderson i Osmond, 1987; Terashima i Hikosaka, 1995; Chow i sar, 2005; Anderson i sar, 2008).

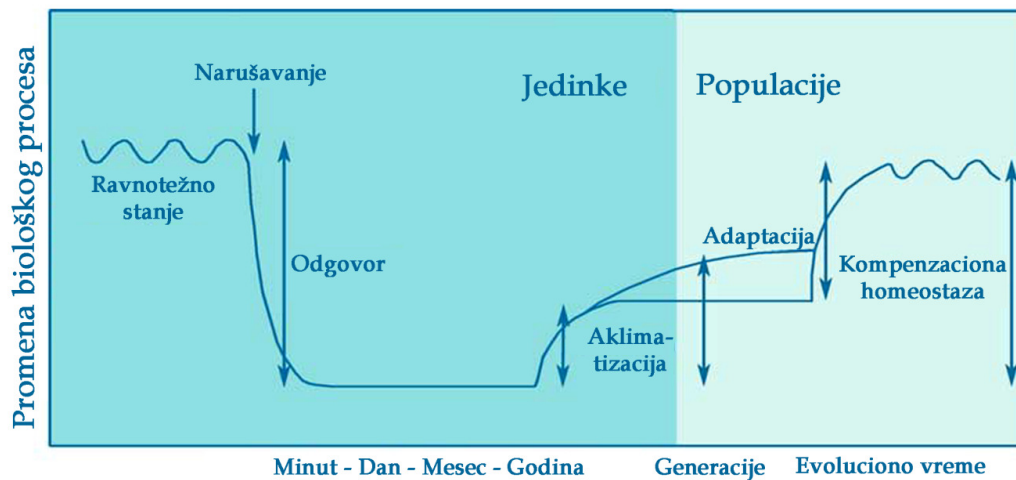
Biljke sunca i biljke senke apsorbovanu svetlost prerađuju na različite načine. Iako imaju isti kvantni prinos fotosinteze (inicijalni nagib krive odgovora fotosinteze u zavisnosti od intenziteta svetlosti), glavna razlika između ove dve grupe biljaka je u kapacitetu sistema za sakupljanje svetlosti i transportu elektrona (Lambers, Chapin i Pons, 2008). Biljke sunca imaju veći kapacitet za fotosintetički transport elektrona jer poseduju veću količinu komponenti lanca za transport elektrona, kao što su citohrom i plastokinon. Takođe, ispoljavaju i veći kapacitet za ATP sintezu po jedinici hlorofila, u poređenju sa biljkama senke (Evans i Poorter, 2001; Lambers, Chapin i Pons, 2008). Biljke senke, s druge strane, proizvode veću količinu hlorofila ali imaju manje vrednosti odnosa hlorofila a i b, što znatno povećava njihov kapacitet za sakupljanje svetlosne energije i njen transfer do reakcionih centara fotosistema (Givnish, 1988; Demmig-Adams i Adams, 1992). Međutim, u uslovima visokih intenziteta svetlosti ograničava ih kapacitet za transport elektrona. Nasuprot njima, biljke sunca su veoma efikasne u transportu elektrona ali u uslovima

senke ne mogu sakupiti dovoljno svetlosne energije (Boardman, 1977; Osmond i Förster, 2006; Lambers, Chapin i Pons, 2008).

1.3 Odgovor biljaka na sredinski stres

U svom životnom okruženju biljke se susreću sa brojnim stresorima, koji mogu delovati pojedinačno ili istovremeno. Na fiziološkom nivou, biljke mogu odgovoriti na stres *tolerancijom* (eng. tolerance) ili *izbegavanjem* (eng. avoidance). U prvom slučaju, biljke imaju razvijene mehanizme pomoću kojih održavaju fiziološke procese na istom nivou kao i u odsustvu stresora ili ih neznatno redukuju, npr. biljke mediteranske vegetacije podnose nizak sadržaj vode u listovima (Osmond i sar. 1987; Lambers, Chapin i Pons, 2008). Mehanizam izbegavanja stresa uključuje i redukciju svih metaboličkih aktivnosti, rezultirajući dormantnim stanjem. Ova dva mehanizma nisu međusobno isključena, i mogu se javiti kod iste biljke u zavisnosti od ekoloških uslova (Nilsen i Orcutt, 1996).

Posmatrano na vremenskoj skali, možemo razlikovati tri načina odgovora biljaka na stresore (Slika 1.3.1.). *Odgovor na stres* (eng. stress response) je trenutni štetni efekat stresora na fiziološke procese biljke, koji se javlja u roku od nekoliko sekundi ili dana, dovodeći do redukcije svih metaboličkih procesa; ukoliko biljka ne poseduje mehanizme tolerancije veoma brzo će doći do akutnih oštećenja i senescencije (Lichtenthaler, 1998). Nakon odgovora na stres, kod biljaka koje poseduju mehanizme tolerancije, dolazi do aklimatizacije. *Aklimatizacija* je skup morfoloških i fizioloških modifikacija kojima biljka kompenzuje negativne efekte nastale tokom inicijalnog odgovora na stres. Do aklimatizacije na novonastale uslove životne sredine dolazi putem promene u aktivnosti ili sintezi novih biohemijskih komponenti, kao što su npr. enzimi. Ove biohemijske promene pokreću prenos signala, dovodeći do promena na svim nivoima, uključujući rast, razviće, kao i fiziologiju i morfologiju cele biljke. Aklimatizacija na stres je proces koji može trajati nekoliko dana ili nedelja, ali se uvek dešava u toku života jedinke, odnosno u ekološkom vremenu. *Adaptacija*



SLIKA 1.3.1. Vremenska skala odgovora biljaka na stres. *Trenutni odgovor na stres* dovodi do redukcije fizioloških procesa. *Aklimatizacijom* biljka uspeva da kompenzuje efekat stresa i fiziološki procesi se vraćaju na normalan nivo. Tokom evolucije, populacije se *adaptiraju* na sredinske stresore, što vraća sve biološke procese na isti nivo kao kod nestresiranih i neadaptiranih biljaka. U prirodnim populacijama, kao posledica aklimatizacije i adaptacije izazvane stresom, dolazi do uspostavljanja kompenzacione homeostaze (prema Lambers, Chapin i Pons, 2008).

je, za razliku od aklimatizacije, „odgovor“ biljke na stresne uslove životne sredine nastao kao rezultat promena u genetičkoj strukturi populacije pod delovanjem prirodne selekcije, i odvija se tokom velikog broja generacija, tj. u evolucionoj vremenskoj skali (Lambers, Chapin i Pons, 2008). Pojam adaptacija ima dvostruko značenje: označava proces pomoću kog nastaju adaptacije organizama, ali i samu osobinu, koja predstavlja proizvod tog procesa (Bijlsma i Loeschcke, 2005; Lambers, Chapin i Pons, 2008; Tucić i sar, 2011). U evolucionoj biologiji, adaptacija se definiše kao proces promene organizma ili grupe organizama, tokom kojeg oni stiču nove karakteristike na nivou morfologije, fiziologije ili ponašanja. Ove promene omogućavaju im bolju usaglašenost sa novim uslovima životne sredine, čime su povećani preživljavanje i reproduktivni uspeh organizama u toj životnoj sredini (Bijlsma i Loeschcke, 2005; Stojković i Tucić, 2012), i stoga se nazivaju *genetičke* ili *evolucione adaptacije*

(David i sar, 2005; Sørensen i sar, 2005). Promene na fenotipskom nivou, mogu da nastanu i kao rezultat sposobnosti jednog genotipa da menja fenotip u zavisnosti od sredinskih uslova, tj. fenotipske plastičnosti, i nazivaju se *adaptivna fenotipska plastičnost* (Andersen i sar, 2005; Gabriel i sar, 2005). Veličina (eng. amount) fenotipske plastičnosti, kao i obrazac (eng. pattern) plastičnosti, su uslovljeni genetičkom osnovom datog organizama. Mogućnost nastanka adaptacija zavisi od veličine genetičke varijabilnosti populacije, a njena brzina od prisustva mutacija, efekta koji te mutacije imaju na adaptivnu vrednost jedinki date populacije, i intenziteta prirodne selekcije (de Visser i Rozen, 2005; Bijlsma i Loeschcke 2005; Stojković i Tucić, 2012).

1.4 Fenotipska plastičnost - usaglašavanje biljaka sa heterogenim uslovima staništa

Jedan od centralnih problema evolucione ekologije je razumevanje evolucije kompleksnih (multivarijantnih) fenotipova u heterogenoj životnoj sredini. Biljke, kao modularni i sesilni organizmi, usaglašavaju se sa variranjem uslova životne sredine pomoću fleksibilnosti odgovora kao što su: praćenje sredinske promene, aklimatizacija i plastičnost (Bazzaz, 1996). Praćenje promene čine kratkotrajne reverzibilne modifikacije koje obezbeđuju usklađivanje fizioloških procesa biljke sa naglim i brzim promenama sredine. Promena provodljivosti stoma izazvana menjanjem raspoložive količine vode, brza aktivacija i deaktivacija Rubisco, u zavisnosti od intenziteta svetlosti, samo su neki od brojnih primera praćenja sredinskih promena (Bazzaz, 1996). Aklimatizacija je sposobnost genotipa da na promene uslova sredine odgovori modifikacijom biohemijskih, fizioloških i morfoloških karakteristika već formiranih modula, dok se plastičnost odnosi na sposobnost jednog genotipa da u različitim sredinama ispolji različite fenotipske vrednosti određene karakteristike (Bazzaz, 1996). Na primer, ako jedan genotip na otvorenom staništu formira listove sunca, a u zasenčenom listove senke, smatra se da je ovaj genotip fenotipski plastičan. Nasuprot tome, ako se listovi neke biljke

razvijaju na otvorenom, ali ih tokom vremena zasenče drugi listovi, i kao posledica toga izmene se njihove fiziološke i morfološke karakteristike, smatra se da je došlo do aklimatizacije.

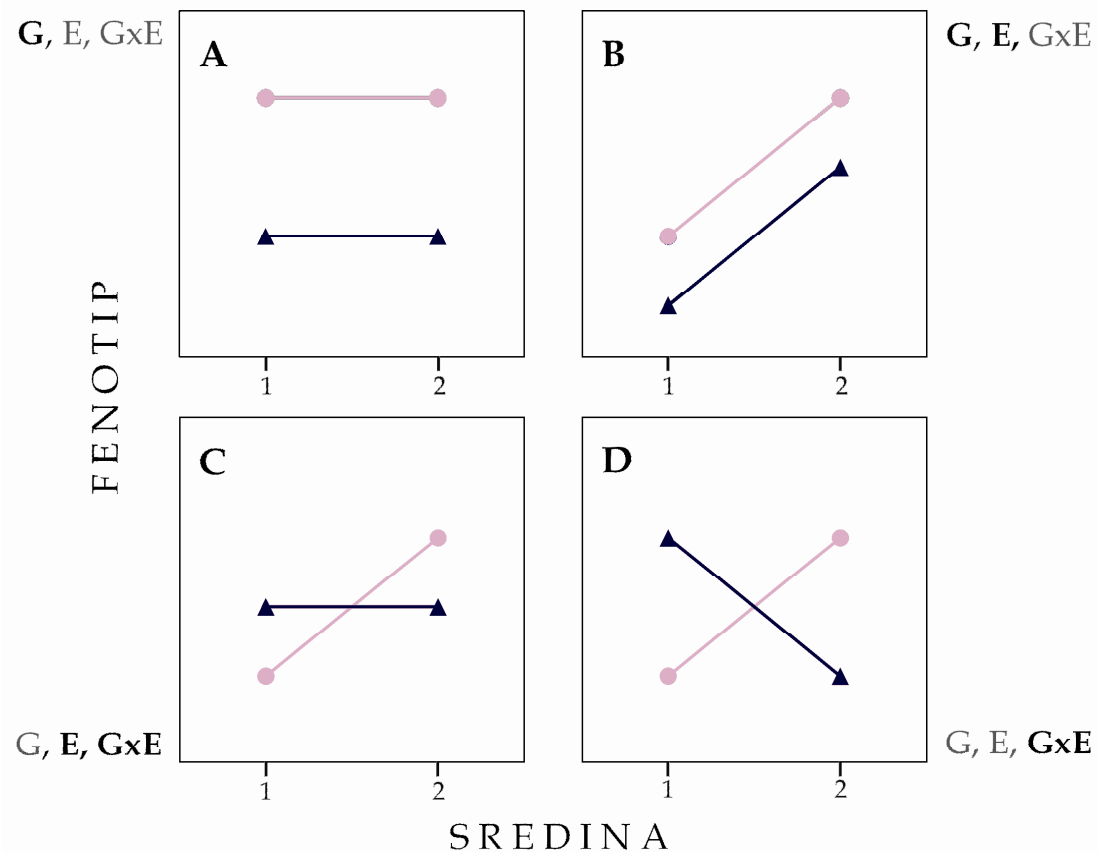
Fenotipska plastičnost je jedan od najvažnijih mehanizama kojim se biljke, kao sesilni organizmi, usaglašavaju sa heterogenošću različitih činilaca životne sredine (Bradshaw, 1965; Schlichting, 1989a; Sultan, 2003). Takođe, fenotipska plastičnost je izvor fenotipske varijabilnosti populacije koja može da dovede do adaptivne divergencije, kao i specijacije biljaka (West-Erberhard, 2003).

Fenomen fenotipske plastičnosti značajniji je i rasprostranjeniji među biljnim nego među životinjskim vrstama (Niklas, 2009). Biljkama ovaj mehanizam doprinosi povećanju adaptivne vrednosti više nego životinjama iz nekoliko razloga. Prvo, biljke su sedentarni organizmi i tokom životnog ciklusa, koji može biti veoma dug, suočavaju se sa promenama sredinskih uslova bez mogućnosti da ih izbegnu promenom svog staništa. Drugo, za razliku od životinja, sve kopnene biljke se odlikuju izrazito „otvorenom“ ontogenijom, tj. modularnošću, što znači da se različiti moduli produkuju sekvencijalno tokom sezona pa mogu iskusiti različite uslove sredine tokom razvića. I kao treće, karakteristika je svih fotoautotrofnih organizama da putem usklađivanja fizioloških procesa sa uslovima sredine obezbeđuju esencijalne nutrijente i svetlosnu energiju (Niklas, 2009).

Biljke pokazuju plastičnost za veliki broj ekološki važnih osobina, uključujući morfološke, fiziološke i anatomske karakteristike, vreme reprodukcije, sistem razmnožavanja i razvojne obrasce potomaka (Sultan, 2000). Plastičnost se može ispoljiti na biohemijskom, fiziološkom, morfološkom, razvojnom ili bihejvioralnom nivou. Svi ovi različiti oblici plastičnosti značajno se razlikuju na osnovu stepena reverzibilnosti. Biohemijski i fiziološki odgovori često nastaju u relativno kratkom vremenskom periodu i reverzibilni su, za razliku od razvojne plastičnosti koja je uglavnom ireverzibilna i za njenu reverzibilnost je potreban znatno duži vremenski period (Pigliucci i sar, 2006).

Međutim, nije svaka uočena fenotipska plastičnost adaptivna, tj. ne omogućava nužno povećanje adaptivne vrednosti i reproduktivnog uspeha biljke (van Kleunen i Fischer, 2005), a postoje i primeri maladaptivne plastičnosti (Sánchez-Gómez i sar, 2006; Ghalambor i sar, 2007). Neke osobine su plastične usled neizbežnih ograničenja nametnutih biohemijskom, fiziološkom ili razvojnom biologijom samog organizma (Sultan, 1995) ili su genetički korelisane sa drugim osobinama koje podležu selekciji (Pigliucci i sar, 2006). I pored brojnih primera neadaptivne plastičnosti, rezultati većine recipročno-transplantacionih i „common garden“ eksperimenata pokazuju da su promene osobina biljaka jedne vrste izazvane sredinskim uslovima mnogo češće posledica plastičnosti nego genetičke diferencijacije, što potvrđuje značaj fenotipske varijabilnosti (Niklas, 2009).

Evolutivni značaj fenotipske plastičnosti proizilazi iz načina na koji plastičnost može da modulira efekte prirodne selekcije (Sultan, 1987). Fenotipska plastičnost može da onemogući genetičku diferencijaciju populacije na lokalne uslove sredine omogućavanjem adaptivne diverzifikacije fenotipova pojedinačnih genotipova. Takođe, plastičnost održava genetičku varijabilnost pod uslovima uniformnog selekcionog pritiska, tako što omogućava različitim genotipovima da konvergiraju u isti adaptivni fenotip. Adaptivna fenotipska plastičnost je specifičan tip interakcije genotipa i sredine koji smanjuje precizno podudaranje genotipova i sredinskih uslova, a prikazuje se pomoću normi reakcije (Sultan i Bazzaz, 1993; DeWitt i Scheiner, 2004). Za bilo koju fenotipsku osobinu, svaki genotip ispoljava karakterističan odgovor u različitim sredinama, što se ogleda u različitim normama reakcija (Schmalhausen, 1949; DeWitt i Scheiner, 2004). Na Slici 1.4.1. prikazani su različiti obrasci normi reakcija dva genotipa analizirana u dve sredine. Odsustvo nagiba normi reakcije ukazuje na nepostojanje plastičnosti (Slika 1.4.1, A). Paralelne norme reakcija, sa izraženim nagibom (Slika 1.4.1, B) ukazuju na postojanje plastičnosti i genetičke varijabilnosti za posmatranu osobinu, ali bez interakcije između genotipa i sredine. Različiti nagibi normi reakcije (Slika 1.4.1, C)



SLIKA 1.4.1. Različiti obrasci normi reakcija. Prikazane su srednje vrednosti fenotipskih osobina dva genotipa u dve različite sredine, 1 i 2. Na panelima A - D masnim slovima su označene G - genetička i E - sredinska varijansa, kao i GxE - varijansa zbog interakcije između genotipa i sredine (prema DeWitt i Scheiner, 2004).

ukazuju na genetičku varijabilnost za plastičnost, tj. postojanje interakcije između genotipa i sredine, kao i na uticaj sredine na fenotipsku vrednost date osobine. Slika 1.4.1, D ilustruje primer kada genotipovi imaju različite odgovore na sredinske uslove iako se prosečne vrednosti osobine između populacija ne razlikuju. U ovom slučaju postoji značajna interakcija između genotipa i sredine ali ne i efekat genotipa na srednju vrednost date osobine. Pošto se jedinke populacije genetički razlikuju u stepenu plastičnosti ovakav obrazac normi

reakcija može dovesti do evolucije plastičnosti, tj. diferencijacije populacije između različitih staništa koja je izazvana selekcijom, ali pod uslovom da odsustvuje protok gena (Sultan, 2007; DeWitt i Scheiner, 2004).

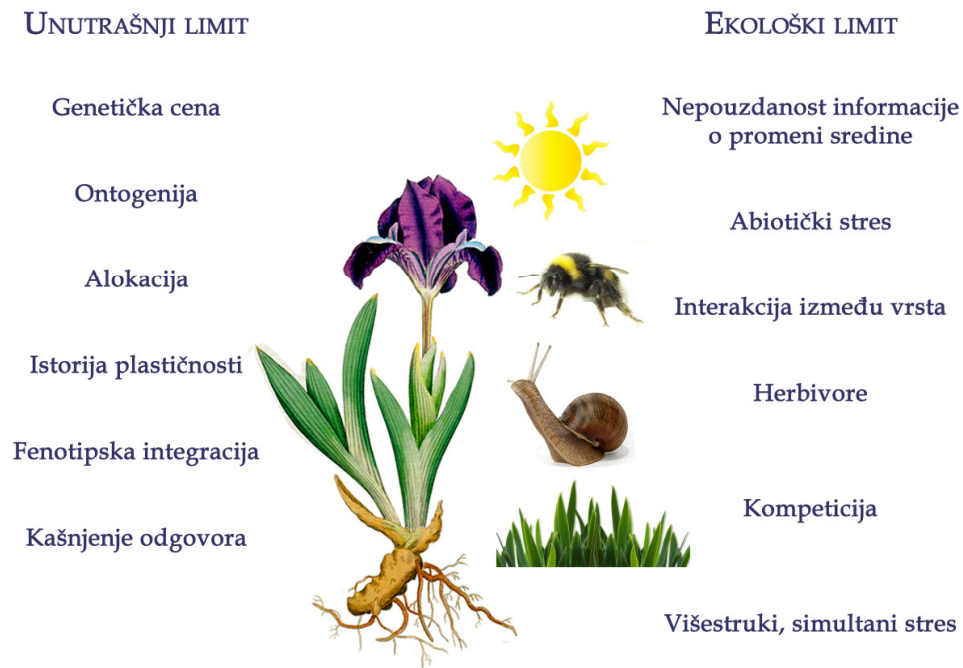
Populacije biljnih vrsta mogu da ispolje velike razlike u sposobnosti plastičnog odgovora na promenu uslova životne sredine. Ove razlike u plastičnosti su posledica *ekološkog* i *unutrašnjeg limita* (Slika 1.4.2.). Termin limit obuhvata *ograničenja* koja onemogućavaju maksimalnu plastičnost, i *cenu plastičnosti*, koja se odnosi na takve vrednosti fenotipskih odgovora koji ne doprinose ili čak imaju negativne efekte na adaptivnu vrednost datog organizma (DeWitt i sar, 1998; van Kleunen i Fischer, 2005; Valladares i sar, 2007). Razlika između ograničenja i cene plastičnosti najlakše se uočava na primeru poređenja fenotipa dva biljna organizma i njihove adaptivne vrednosti, u slučaju kada je genotip jednog od njih plastičan, a drugog fiksiran, odnosno kada se odlikuje kanalisanim razvićem. O ceni plastičnosti govorimo kada oba biljna organizma formiraju listove iste debljine i veličine u posmatranoj svetlosnoj sredini, ali onaj koji plastično odgovara na različite sredine, ima nižu stopu reprodukcije u posmatranoj sredini. Ograničenjem plastičnosti se smatra pojava da fenotipski plastični biljni organizam, u posmatranoj svetlosnoj sredini, ne dostiže favorizovanu veličinu i debljinu lista, za razliku od onog sa kanalisanim razvićem (DeWitt i sar, 1998; Valladares i sar, 2007).

Cena plastičnosti je najčešće posledica cene proizvodnje i održavanja fenotipskih karakteristika nastalih pod uticajem sredine, cene pribavljanja informacija o promenama sredinskih faktora, razvojne nestabilnost fenotipskih osobina nastale usled delovanja sredine i genetičke cene. Genetička cena može biti izazvana vezanošću gena, tj. tendencijom gena da se nasleđuju zajedno zbog iste lokacije na hromozomu (npr. geni koji doprinose plastičnosti mogu biti povezani sa genima koji u datoj sredini dovode do redukcije adaptivne vrednosti), plejotropijom, jer jedan gen ima uticaja na nekoliko nepovezanih aspekata fenotipa (geni koji doprinose plastičnosti mogu negativno delovati na

neke druge osobine) ili epistazom, koja dovodi do maskiranja fenotipskog efekta jednog alela dejstvom drugog alela (DeWitt i sar, 1998; Valladares i sar, 2007).

U ograničenja plastičnosti spadaju: niska pouzdanost informacije o promenama u sredini, period koji je neophodan da se nakon percepcije promene formira fenotipska osobina i ograničenje raspona razvića, tj. sposobnost fiksnog genotipa da proizvede ekstremne fenotipe. Cena i ograničenja plastičnosti variraju u intenzitetu u zavisnosti od uslova sredine, ali imaju većeg uticaja u stresnom okruženju organizma (DeWitt i sar, 1998; Steinger i sar, 2003; Valladares i sar, 2007).

OGRANIČENJA FENOTIPSKU PLASTIČNOSTI



SLIKA 1.4.2. Unutrašnji i spoljašnji (ekološki) faktori koji utiču na kapacitet biljke da odgovori plastično na neki od sredinskih faktora (prema Valladares i sar, 2007).

1.4.1 Fenotipska integracija - ekološke i evolucione implikacije

U poslednje vreme postoji saglasnost među evolucionim biologima u odnosu na koncepciju fenotipske integracije i koncepciju modularnog variranja oblika organizma, ali takođe i o modularnosti, za koju se smatra da je preduslov evolucije složenih adaptacija (Mitteroecker i Bookstein, 2007). Do nedavno se čak smatralo da su ove dve koncepcije međusobno ekvivalentne, pošto oba fenomena utiču na obrazac variranja i kovariranja pojedinačnih osobina određenog organizma (Armbruster i sar, 2004; Klingenberg, 2008). Međutim, detaljnim razmatranjem oba fenomena otkriveno je da se *modularnost* odnosi na sposobnost (eksperimentalnog) razdvajanja (eng. dissociability) ontogenetskih, funkcionalnih i evolucionih procesa, dok bi *fenotipska integracija* označavala „razgradnju (eng. decomposition) morfoloških osobina u zavisnosti od njihove (fenotipske) kovarijanse, koje bi se zatim poredile između adultnih jedinki određenog taksona ili između više različitih taksona“ (Mitteroecker i Bookstein, 2007). Prema datoj definiciji, *biološki modul* bio bi određeni biološki entitet (struktura, proces, ili put) unutar koga su osobine snažno integrisane, a koji je relativno nezavisan od sličnih entiteta istog organizma (Bolker, 2000; Magwene, 2006; Klingenberg, 2008).

Osobine se, na osnovu funkcionalne grupisanosti, mogu posmatrati kao integrisane ili neintegrisane (Wagner, 2001; Pigliucci i Preston, 2004). Integrisane osobine su uzajamno visoko korelisane usled zajedničke genetičke osnove, razvojnog puta i/ili slične funkcije (Pigliucci, 2003). Nasuprot tome, neintegrisane osobine su funkcionalno i razvojno nezavisne jedne od drugih (Wagner, 2001). Interakcija između osobina može se menjati tokom razvića i u zavisnosti od sredinskih faktora (Murren, 2002). Fenotipsku integraciju određuju intenzitet i obrazac korelacija između fenotipskih osobina (Schlichting i Pigliucci, 1998; Pigliucci i Preston, 2004; Pavlicev i sar, 2009). Ova koncepcija se zasniva na ideji da u okviru skupa fenotipskih osobina postoje podskupovi osobina koji se odlikuju visokim stepenom fenotipskih korelacija, dok je korelisanost između karaktera različitih podskupova nizak (Mitteroecker i

Bookstein, 2007). Integracija se uvek meri na nivou funkcionalnih grupa osobina ili modula jednog organizma (a ne na nivou organizma), pri čemu su neke grupe osobina manje ili više integrisane (Pigliucci, 2003).

Stepen u kom osobine čine integrisanu jedinicu može imati dve implikacije na evoluciju i adaptacije kompleksnog fenotipa. Kao prvo, delovanje stabilizacione selekcije na integrisane osobine olakšaće razvijanje genetičkih korelacija, konzistentnih sa njihovom već postojećom funkcionalnom povezanošću. Ovo omogućava da se na osnovu obrazaca fenotipske integracije može ustanoviti koji tip selekcije je oblikovao fenotip. Kao drugo, poznavanje integracije osobina omogućava predviđanje kapaciteta kompleksnog fenotipa da se prilagodi uslovima nove sredine (Lande i Arnold, 1983; Wagner, 2001; Pigliucci i Preston, 2004; Mallit i sar, 2010). Fenotipska integracija može biti rezultat adaptivnih procesa jer umanjuje sredinsku varijansu, odnosno smanjuje uticaj sredine na grupe osobina složenog fenotipa. Međutim, integrisanost osobina koja je posledica stabilnih razvojnih procesa, značajno umanjuje raspoloživu genetičku varijansu i tako ograničava kapacitet kompleksne strukture organizma da odgovori na selekciju (Arnold, 1992; Mallit i sar, 2010).

1.5 Konceptija lokalnih adaptacija i način testiranja

Biljke koje naseljavaju prostorno heterogena staništa često se nalaze pod različitim selekcionim pritiskom koji, ukoliko dovoljno dugo traje, može dovesti do nastanka adaptacija na lokalne uslove staništa, tj. do diferenciranja različitih ekotipova (Kawecki i Ebert, 2004; Ramírez-Valiente i sar, 2010). U odsustvu drugih evolucionih mehanizama, ovakva *divergentna selekcija* dovodi do evolucije funkcionalnih osobina kod svake lokalne populacije (deme) koja im obezbeđuje prednost pod lokalnim ekološkim uslovima, bez obzira na posledice koje izmenjene osobine mogu imati na adaptivnu vrednost populacije u drugim staništima. Kao rezultat ovog procesa koji se naziva *lokalna adaptacija*, genotipovi svake deme imaju veće adaptivne vrednosti na lokalnom staništu, u poređenju sa genotipovima iz drugih staništa (Williams, 1966; Kawecki i Ebert, 2004). Prema Kawecki i Ebert (2004) termin „lokalna adaptacija“ obuhvata obrazac i proces adaptacija koji se odvijaju u okviru populacija između kojih postoji protok gena, što kod biljaka prevashodno obuhvata disperziju polena i semena, čime se ističe istovremeno delovanje dva suprotna evolucionarna mehanizma: divergentne selekcije i protoka gena.

Lokalne adaptacije nisu nužno odgovor populacija na varijabilne uslove staništa jer mogu biti ograničene ili sprečene delovanjem drugih evolucionih mehanizama, kao što su: protok gena, genetički drift, nedostatak genetičke varijabilnosti ili genetičkom osnovom funkcionalnih osobina. Preduslov za nastanak lokalnih adaptacija je postojanje interakcije između genotipa i sredine u odnosu na adaptivnu vrednost i dovoljno velika genetička varijabilnost na koju prirodna selekcija može da deluje (Kawecki i Ebert, 2004; Dorman i sar, 2009). Osim toga, prostorno variranje intenziteta selekcije mora biti veće od vremenskog variranja i u skladu sa tom tvrdnjom brojni teorijski i eksperimentalni podaci su pokazali da vremensko variranje u intenzitetu selekcije favorizuje fenotipski plastične genotipove, generaliste (Gillespie, 1974; Kassen, 2002; Dorman i sar, 2009). Kada je plastičnost adaptivna, ona doprinosi održavanju visoke adaptivne vrednosti genotipova pod različitim ekološkim

uslovima i time onemogućava genetičku diferencijaciju populacija. Međutim, ukoliko je fenotipska plastičnost ograničena ili je cena plastičnosti visoka, u sredinama koje favorizuju alternativne fenotipove doći će do diferencijacije na lokalno specijalizovane ekotipove (Sultan i Spencer, 2002).

Postojanje lokalnih adaptacija se može utvrditi poređenjem normi reakcije za funkcionalne osobine ili komponente adaptivne vrednosti istih genotipova u više sredina (Pigliucci, 2001). Za detektovanje lokalnih adaptacija koriste se dva tipa eksperimenata: recipročno-transplantacioni i „common-garden“ eksperiment (Kawecki i Ebert, 2004). U recipročno-transplantacionom eksperimentu testiraju se performanse genotipova u svojim prirodnim staništima i staništima nativnim za druge genotipove, odnosno između nativnih i transplantiranih genotipova u istom staništu. Pošto se izvodi u prirodi, ovaj tip eksperimenta je najpogodniji za testiranje lokalnih adaptacija jer su svi ekološki činioci različitih staništa neizmenjeni. Glavni nedostatak recipročno-transplantacionog eksperimenta je njegova neizvodljivost iz praktičnih razloga (Kawecki i Ebert, 2004; Dorman i sar, 2009). Alternativno rešenje predstavlja „common-garden“ eksperiment, u kome se najvažnija svojstva različitih staništa rekonstruišu u laboratorijskim uslovima i zatim se svi genotipovi testiraju pod različitim tretmanima ispitivanog faktora staništa. Pored praktičnosti ovakvog pristupa, prednost „common-garden“ eksperimenta je što omogućava direktno ispitivanje uloge određenog faktora sredine kao uzročnika divergentne selekcije koja dovodi do nastanka lokalnih adaptacija. Međutim, ukoliko se testira hipoteza o uticaju samo jednog faktora staništa ili se izostavi neki važan aspekt sredine, rezultati eksperimenta neće dati realnu sliku o procesu adaptacija koji se odvija u prirodi (Kawecki i Ebert, 2004; Dorman i sar, 2009). Na primer, jedan genotip može imati veću adaptivnu vrednost u svim tretmanima, u poređenju sa drugim genotipovima, jer je bolje prilagođen laboratorijskim uslovima; ili biljke sa staništa sa višom temperaturom, koje više resursa ulažu u odbranu od herbivora, mogu imati

manji broj semena na svim temperaturama, ukoliko se eksperiment izvodi u odsustvu herbivora (Kawecki i Ebert, 2004).

1.6 Mehanizmi antioksidativne zaštite i njihova uloga u odgovoru na stres

Reaktivne vrste kiseonika (ROS - eng. Reactive Oxygen Species) su delimično redukovane forme atmosferskog kiseonika. Formiraju se ili ekscitacijom O_2 , pri čemu nastaje singletni kiseonik (1O_2), ili sukcesivnim monovalentnim redukcijama tokom kojih nastaju superoksid ($\cdot O_2$), hidrogen peroksid (H_2O_2), i hidroksil radikal (OH \cdot). Za razliku od atmosferskog kiseonika, ROS mogu nerestriktivno oksidovati različite biomolekule i tako izazvati oštećenje ćelije (Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004). Zbog velike reaktivnosti prema svim ćelijskim komponentama, ROS se, generalno, smatraju štetnim sporednim produktima aerobnog metabolizma, čija produkcija bi trebalo da se po svaku cenu umanjuje ili onemogućuje. Međutim, danas je poznato da su ROS veoma moćni signalni molekuli koji regulišu brojne biološke procese kao što su rast, ćelijski ciklus, ćelijska programirana smrt i aklimatizacioni odgovor na abiotički i biotički stres (Dat i sar, 2000; Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Desikan i sar, 2005; Gechev i sar, 2006; Foyer i Shigeoka, 2011). Naročito je važna produkcija ROS indukovana svetlošću, jer obezbeđuje biljnoj ćeliji esencijalnu informaciju o neravnoteži između procesa proizvodnje i procesa potrošnje energije (Foyer i Shigeoka, 2011).

Zbog dvostruke uloge koju ROS imaju u biljnoj ćeliji, kao veoma reaktivne toksične vrste i kao signalni molekuli, neophodna je precizna regulacija njihovog nastanka i razgradnje (Tabela 1.6.1.). Mehanizmi koji omogućavaju smanjenje proizvodnje ROS tokom stresa uključuju: anatomske adaptacije (pokreti listova, različite zaštitne epidermalne strukture ili zaštita stoma u specifičnim strukturama), fiziološke adaptacije (C4 i CAM metabolizam) i molekularne mehanizme koji omogućavaju reorganizaciju fotosintetskog aparata u skladu sa dostupnom količinom svetlosti ili potpunu

supresiju fotosinteze (Mooney i sar, 1977; Coupe i sar, 2006; Mittler, 2006; Miyazawa i sar, 2006; Lambers, Chapin i Pons, 2008). Mehanizmi koji omogućavaju aktivno uklanjanje ROS sastoji se iz enzimske i neenzimske komponente (Mittler, 2002; Mittler, 2006). U enzimske mehanizme spadaju: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), glutation reduktaza (GR), peroksidaze III klase (POD), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), glutation peroksidaza (GPX) i glutation S-transferaza. Neenzimsku komponentu čine: askorbat, glutation, α -tokoferol, karotenoidi i fenolna jedinjenja (Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Grace, 2005).

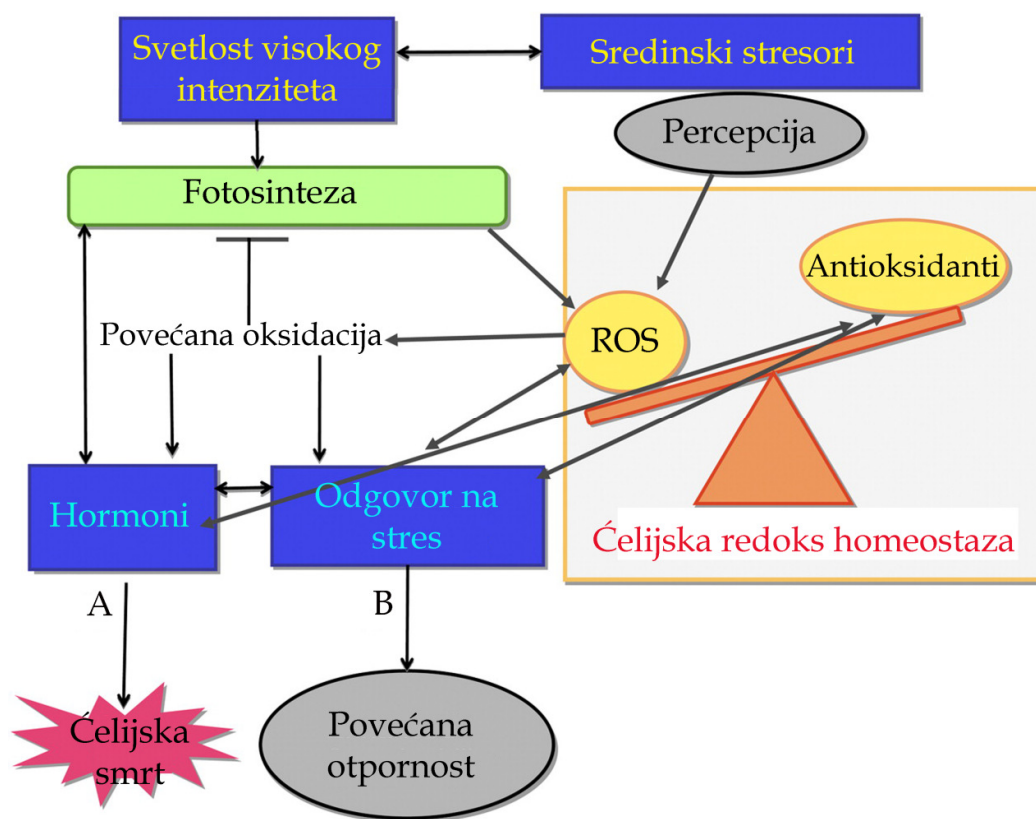
TABELA 1.6.1. Mehanizmi proizvodnje, uklanjanja i izbegavanja ROS kod biljaka (prema Mittler, 2002).

Mehanizam	Lokacija	ROS
Proizvodnja		
Fotosintetski ET, PSI, PSII	Chl	$\cdot\text{O}_2^-$
Ekscitovani hlorofil	Chl	$^1\text{O}_2$
Mitohondrijski ET	Mit	$\cdot\text{O}_2^-$
Glikolat oksidaza	Per	H_2O_2
NADPH oksidaza	Chl	$\cdot\text{O}_2^-$
β -oksidacije masnih kiselina	Per	H_2O_2
Oksalat oksidaza	Apo	H_2O_2
Xantin oksidaza	Per	$\cdot\text{O}_2^-$
Peroksidaze III klase	CW	$\text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
Amin oksidaza	Apo	H_2O_2
Uklanjanje		
Superoksid dismutaza	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$\cdot\text{O}_2^-$
Askorbat peroksidaza	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Katalaza	Per	H_2O_2
Glutation peroksidaza	Cyt	$\text{H}_2\text{O}_2, \text{ROOH}$
Peroksidaze III klase	CW, Cyt, Mit	H_2O_2
Tioredoksin peroksidaza	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2
Askorbinska kiselina	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$\text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
Glutation	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
α -tokoferol	Membrane	$\text{ROOH}, ^1\text{O}_2$
Karotenoidi	Chl	$^1\text{O}_2$
Izbegavanje		
Anatomske adaptacije	List, epidermis	$^1\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
C_4 ili CAM metabolizam	Chl, Cyt, Vac	$\text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
Pokreti hloroplasta	Cyt	$^1\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
Supresija fotosinteze	Chl	$\text{H}_2\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
Modifikacije PS	Chl	$^1\text{O}_2, \cdot\text{O}_2^-$
Alternativne oksidaze	Chl, Mit	$\cdot\text{O}_2^-$

Skraćenice: Apo, apoplast; Chl, hloroplast; CW, ćelijski zid; Cyt, citoplazma, ET, transport elektrona; Mit, mitohondrije; Per, peroksidom; PM, plazma membrana; PS, fotosistem; Vac, vakuola.

1.6.1 Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite: struktura, funkcija, lokalizacija i regulacija

Biljke aktivno proizvode ROS kao signalne molekule koji učestvuju u regulaciji odgovora na abiotički stres, programiranu ćelijsku smrt i odbranu od patogenih. Kako bi održale delikatanu ravnotežu u produkciji ROS, koji imaju signalnu ulogu, i uklanjanju viška ROS, koji nastaju kao posledica oksidativnog stresa, biljke su razvile složenu mrežu antioksidativnih enzima (Slika 1.6.1). Najznačajniji antioksidativni enzimi su: SOD, CAT, APX, GR i POD (Mittler, 2002; Suzuki i Mittler, 2006; Foyer i Shigeoka, 2011).

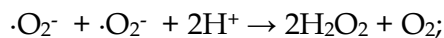


SLIKA 1.6.1. Uloga ROS i antioksidanata u regulaciji redoks-homeostaze ćelije tokom odgovora na stres. Povećana oksidacija dovodi do programirane ćelijske smrti (A) ili povećane otpornosti na stres (B), u zavisnosti od intenziteta signala i prirode signalnog puta koji se aktivira (prema Foyer i Shigeoka, 2011).

Tokom delovanaj abiotičkog i biotičkog stresa dolazi do akumulacije ROS, ali se ćelijski odeljci u kojima se formiraju ROS, kao i dinamika nastanka i razgradnje ROS veoma razlikuju. U toku trajanja stresa, povećana količina ROS u ćeliji ne mora biti samo simptom disfunkcionalnosti ćelije, već predstavlja signal koji pokreće odgovor na stres i prilagođava ćelisku mašineriju na izmenjene uslove staništa. ROS moduliraju brojne puteve prenosa signala, kao što su kaskadna transdukcija signala regulisana proteinskim kinazama koje aktivira mitogen i aktivnost transkripcionih faktora (Suzuki i Mittler, 2006; Jaspers i Kangasjärvi, 2010; Foyer i Shigeoka, 2011).

1.6.1.1 Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je metaloenzim koji predstavlja prvu liniju odbrane od toksičnih efekata povišenog nivoa ROS (Scandalios, 1993). SOD katalizuje dismutaciju $\cdot\text{O}_2^-$ pri čemu nastaju H_2O_2 i O_2 :



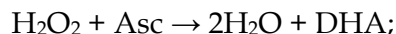
Uklanjanjem $\cdot\text{O}_2^-$ SOD umanjuje mogućnost nastanka $\cdot\text{OH}$ putem Haber-Weiss reakcije koja je katalizovana metalima. Na osnovu metala koji sadrži kofaktor SOD se dele na tri forme: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD i Mn-SOD. Kod viših biljaka Cu/Zn-SOD i Fe-SOD su dimeri, dok je Mn-SOD tetramer (Bowler i sar, 1994; Alscher i sar, 2002). Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama i peroksizomima, Cu/Zn-SOD je karakteristična za citoplazmu i hloroplaste, dok se Fe-SOD nalazi u hloroplastima ali nije univerzalno prisutan kod svih viših biljaka. Sva tri tipa SOD su proteini kodirani jedarnim genima i mogu se identifikovati na osnovu osetljivosti prema inhibitorima KCN i H_2O_2 . Mn-SOD je otporan na oba inhibitora, Cu/Zn-SOD je osetljiv na oba inhibitora, dok je Fe-SOD osetljiv na H_2O_2 i otporan na KCN. Zastupljenost SOD u skoro svim ćelijskim odeljcima je neophodna zbog nepropustljivosti fosfolipidnih membrana za superoksid (Takahashi i Asada, 1983). SOD je prisutna kod svih aerobnih organizama i smatra se da ima centralnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa (Scandalios, 1993; Bowler i sar, 1994; Alscher i sar, 2002). Na

osnovu poređenja sekvenci aminokiselina, smatra se da Mn-SOD i Fe-SOD imaju slično poreklo i da su nastale mnogo pre Cu/Zn-SOD, koja je evoluirala nezavisno kod eukariota (Kanematsu i Asada, 1990). Do danas, brojne studije su pokazale da se aktivnost SOD povećava kao odgovor na različite stresore (visok intenzitet svetlosti, suša, parakvat, teški metali).

1.6.1.2 Askorbat peroksidaza

Superfamilija peroksidaza deli se na tri klase. Zajedničko za sve tri klase je postojanje hem grupe koju čine protoporfirin IX i Fe³⁺, kao i slična trodimenzionalna struktura (Welinder i sar, 2002). Peroksidaze klase I, u koje spada i askorbat peroksidaza, prisutne su kod svih organizama izuzev životinja, i njihova osnovna uloga je detoksifikacija H₂O₂ (Passardi i sar, 2007). Klasa II peroksidaza karakteristična je za gljive. Peroksidaze III klase (POD, EC 1.11.1.7), glikoproteini koji sadrže hem grupu, prisutne su kao velike multigenske familije kod svih terestričnih biljaka.

Askorbat peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11) ima ključnu ulogu u finoj modulaciji količine H₂O₂ kod biljaka, za razliku od katalaze koja uklanja višak H₂O₂ tokom stresa (Mittler, 2002). Ova peroksidaza uklanja H₂O₂ koristeći askorbat (Asc) kao donor elektrona, pri čemu nastaje dehidroaskorbat (DHA):

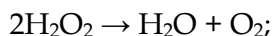


Askorbat peroksidaza je veoma osetljiva na smanjenu koncentraciju Asc. Na primer, ukoliko je koncentracija askorbata manja od 20 µM izoforme APX karakteristične za hloroplaste brzo gube aktivnost (Mittler i Zilinskas, 1993; Shigeoka i sar, 2002; Foyer i Shigeoka, 2011). Postoji najmanje pet izoformi APX koje se nalaze u različitim ćelijskim odeljcima, citoplazmi, membrani tilakoida, stromi hloroplasta i membrani peroksizoma (Scandalios, 1993; Asada, 1999; Logan i sar, 2006). Izoforme APX razlikuju se po molekularnoj težini, optimalnoj pH, stabilnosti i specifičnosti za supstrate. Do povećane ekspresije gena koji kodiraju askorbat peroksidaze dolazi u uslovima stresa kao što su mehaničke

povrede, patogeni, zračenje, vodni deficit, atmosfersko zagađenje i toksični efekti metala (Mittler i Poulos, 2005; Logan i sar, 2006).

1.6.1.3 Katalaza

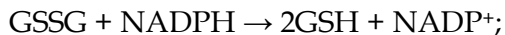
Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je tetramerni enzim koji sadrži hem kao kofaktor i vrši uklanjanje H₂O₂ iz ćelije:



Ovaj enzim predominantno se nalazi u peroksizomima i učestvuje u razgradnji H₂O₂ koji nastaje tokom glioksalatnog ciklusa fotorespiracije, katabolizma purina i kao posledica aktivnosti oksidaza uključenih u β-oksidaciju masnih kiselina (Willekens i sar, 1997; Feierabend, 2005; Engel i sar, 2006). CAT ima veoma nizak afinitet prema H₂O₂ (u mM opsegu) i veliku brzinu reakcije (Mittler, 2002; Engel i sar, 2006). CAT je veoma fotosenzitivan enzim i ima visoku stopu sinteze i razgradnje slično kao i D1 protein fotosistema II (Hertwig i sar, 1992; Feierabend, 2005). Zbog toga stresni uslovi koji dovode do smanjene sinteze proteina kao što su osmotski stres, visoke i niske temperature dovode do smanjenja aktivnosti CAT. Dosadašnja istraživanja su utvrdila postojanje tri klase CAT, koje su kodirane različitim genima kod viših biljaka. Prema podeli koju su predložili Willekens i sar (1995) klasu I čine katalaze koje se eksprimiraju u fotosintetičkim tkivima, CAT klase II su aktivne u vaskularnim tkivima, dok su CAT klase III specifične za reproduktivna tkiva i semena (Mhamdi i sar, 2010; Hu i sar, 2010).

1.6.1.4 Glutation reduktaza

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je po strukturi homodimerni flavoprotein. Ova oksidoreduktaza zastupljena je i kod prokariota i eukariota (Edwards i sar, 1990; Lascano i sar, 2003). Spada u enzime askorbat-glutation ciklusa. Ima ključnu ulogu u održavanju količine redukovanog glutaciona (GSH) i na taj način reguliše redoks status ćelije. GR katalizuje redukciju oksidovanog glutaciona zavisnu od NADPH:



Ovaj enzim se predominantno nalazi u hloroplastima ali su poznate i mitohondrijalne i citosolne izoforme (Creissen i sar, 1995; Chew i sar, 2003; Lascano i sar, 2003).

1.6.1.5 Peroksidaze III klase

Peroksidaze III klase (POD, EC 1.11.1.7) su glikoproteini koji kod terestričnih biljaka čine veliku multigensku familiju. Smatra se da su imale važnu ulogu u kolonizaciji kopnenih staništa, preko formiranja rigidnih potpornih struktura, i u adaptaciji na sredinu obogaćenu kiseonikom (Passardi i sar, 2004; Cosio i Dunand, 2009). Nalaze se u vakuolama, ćelijskom zidu i endoplazmatičnom retikulumu i odlikuje ih visoka termalna stabilnost (Takahama i Egashira, 1991; Passardi i sar, 2005). Peroksidaze klase III katalizuju redukciju H_2O_2 , a kao donore elektrona mogu da koriste različite supstrate, kao što su fenolna jedinjenja, prekursori lignina i auksin (Takahama i Oniki, 1997; Hiraga i sar, 2001; De Gara, 2004; Passardi i sar, 2005). Takođe, dovode i do produkcije H_2O_2 putem oksidacije NADH tokom oksidativnog praska i izduživanja ćelije (Otter i Polle, 1997; Passardi i sar, 2005; Cosio i Dunand, 2009).

Kod viših biljaka POD imaju višestruku ulogu. Učestvuju u metabolizmu ćelijskog zida, rastu ćelija, detoksifikaciji H_2O_2 , katabolizmu auksina, oksidaciji toksičnih jedinjenja, zaštiti od patogena, mehaničkih povreda i oksidativnog stresa, simbiozi i senescenciji (Passardi i sar, 2005; Cosio i Dunand, 2009). Raznovrsnost procesa koje katalizuju peroksidaze III klase kao i veliki broj gena koji ih kodira ukazuju na postojanje funkcionalne specijalizacije ovog enzima, što potvrđuje činjenica da sekvence peroksidaza imaju i konzervativne i varijabilne regione (Welinder i sar, 2002; Cosio i Dunand, 2009).

1.6.2 Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Oksidacione reakcije su osnova metaboličkih procesa ali istovremeno mogu dovesti do oštećenja ćelija, zbog čega su biljke razvile veliki broj različitih neenzimskih antioksidanata koji se još nazivaju i antioksidanti male molekulske mase. Neenzimski antioksidanti se dele na dve grupe: hidrofilne i hidrofobne. Hidrofilni antioksidanti (glutation, askorbinska kiselina i fenolna jedinjenja) su rastvorljivi u vodi i omogućavaju uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika u citosolu biljne ćelije. Hidrofobni antioksidanti (tokoferoli i karotenoidi) su rastvorljivi u lipidima i štite ćelijske membrane od oksidativnih oštećenja (Noctor i Foyer, 1998; Dias i sar, 2011; Foyer i Shigeoka, 2011).

Biljke proizvode veliki broj organskih jedinjenja, tzv. sekundarnih metabolita, koja ne učestvuju direktno u rastu i razviću, ali posreduju u interakcijama između biljaka i njihove životne sredine i značajno doprinose otpornosti biljaka na nepovoljne sredinske uslove. Takođe, utvrđeno je da neka od ovih jedinjenja imaju antioksidativna svojstva, tj. mogu učestvovati, direktno ili posredno, u zaštiti biljaka od reaktivnih vrsta kiseonika. Na osnovu biosintetskog puta, sekundarni metaboliti se dele na: alkaloidne, terpenoide i fenolna jedinjenja. Glavne grupe fenolnih jedinjenja su: hidroksicinamične kiseline, flavonoidi, antocijani i tanini. Najveći procenat fenolnih jedinjenja čine strukturni polimeri, kao što su lignin i suberin, koji obezbeđuju mehaničku potporu biljkama. Funkcija nesrukturnih fenolnih jedinjenja je manje očigledna, ali sve je više studija koje ukazuju na njihovu važnu ulogu u aklimatizaciji biljaka na stresne uslove sredine (Sakihama i sar, 2002; Grace, 2005; Li i sar, 2006).

1.6.2.1 Fenolna jedinjenja kao antioksidanti

Terminom *fenolna jedinjenja* (eng. phenolics, polyphenols, phenolic compounds) označavaju se sva hemijska jedinjenja koja sadrže najmanje jedan aromatični ugljovodonični prsten za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa (Sakihama i sar, 2002). Kod biljaka, solubilna fenolna jedinjenja su jedna

od najzastupljenijih i najraznovrsnijih grupa supstanci koja po strukturi variraju od malih, relativno jednostavnih molekula (npr. salicilna kiselina) do složenih polimera kao što su suberin i lignin (Sakihama i sar, 2002; Grace, 2005; Li i sar, 2006). Spadaju u neenzimske antioksidante i veoma su važni za očuvanje fizioloških funkcija biljke tokom stresnih ekoloških uslova sredine (Grace, 2005). Poznato je da fenolna jedinjenja predstavljaju glavnu zaštitu biljaka od patogena, ali su novija istraživanja pokazala da imaju podjednako važnu ulogu i u sprečavanju štetnih posledica oksidativnog stresa. Fenoli su veoma efikasni u apsorpciji viška svetlosne energije, naročito u UV delu spektra, čime ublažavanju negativne posledice oksidativnog stresa (Grace i sar, 1998; Grace, 2005; Neill i Gould, 2003). Takođe, fenolna jedinjenja mogu uklanjati ROS direktno, delujući kao antioksidanti, ili indirektno, kao supstrati antioksidativnih enzima (Sakihama i sar, 2002; Grace, 2005).

Antocijani su grupa pigmenata flavonoida rastvorljivih u vodi koji, zavisno od pH, mogu biti crvene, ljubičaste ili plave boje (Harborne, 1988). Mogu se naći u svim tkivima viših biljaka, uključujući cvetove, plodove, listove, izdanke i korenove. Sintetišu se u citoplazmi, a zatim se akumuliraju u vakuolama (Conn i sar, 2003). Antocijani daju karakterističnu boju cvetovima i plodovima, čime doprinose privlačenju životinja koje su vektori za oprašivanje i rasejavanje semena. Ekološka i fiziološka funkcija antocijana u vegetativnim strukturama je manje poznata (Gould i sar, 2002; Steyn i sar, 2002; Close i Beadle, 2003; Hughes i Smith, 2007; Hatier i Gould, 2008). Ekspresija antocijana u vegetativnim strukturama varira u zavisnosti od biljne vrste. Kod nekih vrsta su stalno prisutni, dok se kod drugih sintetišu samo u određenim ontogenetskim fazama listova, ili u uslovima stresa (Chalker-Scott, 1999; Steyn i sar, 2002; Merzlyak i sar, 2008). Generalno, antocijani se akumuliraju u fotosintetskim tkivima izloženim visokim intenzitetima svetlosti, kao što su adaksijalni sloj epidermisa i gornji slojevi mezofila listova (Neill i Gould, 2003; Hughes i Smith, 2007). Sve je više studija koje ukazuju da antocijani imaju važnu funkciju u zaštiti biljnih ćelija od brojnih abiotičkih stresora (visoki

intenzitet svetlosti, UV radijacija, ekstremne temperature, deficit vode i teški metali) koji dovode do oksidativnog stresa (Chalker-Scott 1999, Neill i Gould, 2003; Steyn i sar, 2002; Hughes i Smith, 2007). Antocijani ublažavaju oksidativni stres na dva načina: direktno uklanjaju ROS, delujući kao antioksidanti ili apsorpcijom svetlosti štite biljaku od štetnih efekata visokih intenziteta vidljive i UV svetlosti (Neill i Gould, 2003; Petrini i sar, 2002).

1.7 *Iris pumila* L. kao model-organizam

Patuljasta bradata perunika *Iris pumila* L. je monokotiledona višegodišnja, klonalna biljka iz porodice Iridaceae (Slika 1.7.1.). Prirodna staništa ove biljke su livadsko-stepski predeli centralne i jugoistočne Evrope. U Srbiji se može naći u severnim i istočnim oblasima, a naročito je brojna u Deliblatskoj peščari, sistemu peščanih dina koji se nalazi u južnom Banatu. Ova biljka u prirodi formira klonove karakterističnog kružnog oblika koji mogu imati u prečniku i više od 1 m. Specifičan kružni oblik klonova je posledica rasta rizoma koji se bočno granaju u odnosu na roditeljski izdanak. Na osnovu prečnika klona može se proceniti njegova starost, imajući u vidu da je godišnji prirast klona oko 50 mm (Tucić i sar, 1989).

U Deliblatskoj peščari, prirodne populacije *I. pumila* naseljavaju dva tipa staništa koja se karakterišu različitim intenzitetom i kvalitetom svetlosti. Dinske populacije naseljava otvorene površine, obrasle jednogodišnjim i višegodišnjim zelastim biljkama i niskim žbunjem. Šumske populacije se mogu naći u delovima peščare koji su pošumljeni bagremom (*Robinia pseudoacacia*), belim borom (*Pinus silvestris*) i crnim borom (*Pinus nigra*). Sezonsko variranje intenziteta i kvaliteta ambijentalne svetlosti, kao i temperature lista u prirodnim staništima *I. pumila* prikazani su u Tabeli 1.7.1.

Klonalne biljke se odlikuju sposobnošću aseksualnog razmnožavanja putem vegetativne reprodukcije organa, kao što su rizomi i stolone. Nova jedinica nastala vegetativnim putem, koja se naziva ramet, u početku je morfološki i fiziološki vezana za materinski klon, ali posle izvesnog vremena

(par godina) može prekinuti vezu sa biljkom od koje je nastala i nastaviti da postoji kao nezavisna, ali genetički identična biljka. Klonalne biljke zapravo postoje kao skup genetički identičnih jedinica, koje su potpuno ili delimično autonomne. U zavisnosti od starosti, jedan klon ili genet može da se sastoji od velikog broja rameta. Dok jedan ramet može nastati i uginuti za relativnokratko vreme, genet (klonalni genotip) može opstajati veoma dugo (Stuefer i Huber, 1998; Stuefer i sar, 2004; Gómez i sar, 2007). Zbog mogućnosti dobijanja velikog broja genetički identičnih jedinki, klonalne biljke su veoma pogodni model-organizmi za ekološko-evoluciono istraživanja.



SLIKA 1.7.1. Izgled jednog rameta *Iris pumila*.

TABELA 1.7.1. Temperatura lista, intenzitet fotosintetički aktivne radijacije (PAR) i odnos crvene i dalekocrvene svetlosti (R:FR) mereni u nivou lista klonova *I. pumila* 2004. godine u Deliblatskoj peščari, tokom tri godišnje sezone.

	OTVORENO STANIŠTE			ZASENČENO STANIŠTE		
	Proleće	Leto	Jesen	Proleće	Leto	Jesen
Intenzitet PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1797 ± 16	1378 ± 44	654 ± 20	132 ± 1.8	45 ± 3.1	69 ± 5.9
R:FR odnos	1.06 ± 0.01	0.94 ± 0.01	1.08 ± 0.02	0.96 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.63 ± 0.01
Temperatura lista (°C)	14.6 ± 0.3	42.9 ± 0.9	18.0 ± 0.2	17.5 ± 0.5	20.2 ± 0.4	18.2 ± 0.2

2 CILJEVI RADA

- Utvrđivanje kvantitativnih vrednosti i obrazaca sezonskog variranja aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, APX, CAT, GR, POD) i neenzimskih antioksidanata (fenolnih jedinjenja i antocijana) u prirodnim populacijama *Iris pumila* koje naseljavaju alternativna svetlosna staništa, otvoreno i zasenčeno.

- Utvrđivanje razlika u aktivnosti izoformi izabranih antioksidativnih enzima (SOD, APX, CAT) u listovima istih genotipova poreklom iz ovih populacija, recipročno transplantiranih u suprotna svetlosna staništa, kao i između domaćih i stranih (transplantiranih) genotipova unutar oba staništa.

- Utvrđivanje sezonskih promena fenotipskih vrednosti morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista kod genetički različitih klonova *I. pumila*, samoniklih na eksponiranim i zasenčenim staništima u prirodi.

- Procena veličine i obrazaca fenotipske plastičnosti biohemijskih, morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista na sezonsku promenljivost uslova životne sredine kod biljaka *I. pumila* iz dve prirodne populacije sa suprotnih svetlosnih staništa.

- Testiranje hipoteze o lokalnim adaptacijama lista *I. pumila* na morfološko-anatomskom, fiziološkom i biohemijskom nivou korišćenjem recipročno-transplantacionog eksperimenta u prirodi.

- Utvrđivanje uticaja variranja abiotičkih faktora životne sredine na stepen i obrazac fenotipske integracije funkcionalno povezanih osobina lista u prirodnim populacijama *I. pumila*: *in situ* eksperiment.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Opis staništa

Deliblatska peščara je izolovani kompleks peščanih dina koji se nalazi u južnom Banatu, između Dunava i zapadnih padina Karpata. Ovo područje pruža se u pravcu jugoistok-severozapad između 44° 48' i 45° 12' severne geografske širine i 38° 16' i 38° 58' istočne geografske dužine i zahvata površinu od oko 300 km². Reljef karakterišu peščane dine žutog i sivog peska koje su eolskog porekla. Pošumljavanjem Deliblatske peščare tokom poslednjih dve stotine godina mase živog peska danas su, uglavnom, vezane vegetacijom.

Deliblatska peščara ima stepsku, umereno-kontinentalnu klimu. Peščaru karakterišu velike dnevne i sezonske amplitude temperature vazduha i površine zemljišta kao i rani jesenji i pozni prolećni mrazevi. Fizičke osobine peščane podloge uslovljavaju specifičnu hidrologiju i mezoklimu ovog područja, tako da površinskih vodotokova nema, a vodonosni horizonti se nalaze na većim dubinama (100 - 400 m), uz tri stalne prirodne bare u manjim depresijama jugoistočnog dela. Zbog velike propustljivosti tla, atmosferske vode brzo poniru u niže slojeve, pa površinski slojevi ostaju bez dovoljno vlage. Pesak se tokom leta dodatno isušuje usled duvanja košave, a njegova prosečna vlažnost na 0.5 m dubine iznosi oko 4% (Ducić i Milovanović, 2004; Ducić i Radovanović, 2005). Izrazito sušni period tokom leta i jeseni i intenzivna sunčeva radijacija su najizraženije karakteristike ovog područja. Dominantan vetar je košava koji često duva ogromnom brzinom (do 180 km/h). Prosečna godišnja insolacija u peščari iznosi 2150 časova, uz smanjenu oblačnost u odnosu na okolinu. Prosečna godišnja temperatura vazduha iznosi 11°C. Najhladniji mesec je januar, sa prosečnom dnevnom temperaturom ispod -1.0°C, a najtopliji jul sa prosečnom dnevnom temperaturom oko 22°C. Temperatura vazduha se kreće od -25°C pa do +40°C, tako da apsolutna amplituda iznosi punih 65°C. Jedna od odlika Deliblatske peščare su velike dnevne temperaturne amplitude, kada se u jutarnjim časovima temperatura

spušta i do 0°C a u toku dana dostiže preko 20°C. Pluviometrijski režim Deliblatske peščare ima sve karakteristike kontinentalnog srednje-evropskog, sa godišnjom količinom padavina od 663 mm. Februar je mesec sa najmanjom količinom padavina, a maj je mesec sa najvećom količinom padavina (Ducić i Milovanović, 2004; Ducić i Radovanović, 2005).

Specifični i ekstremni ekološki uslovi koji vladaju u Deliblatskoj peščari oblikovali su mozaik travnatih, žbunastih i šumskih staništa koje nastanjuje specifičan živi svet sa dominantnom zastupljenošću stepskih i peščarskih vrsta. U cilju zaštite ovog specifičnog područja, Deliblatska peščara je proglašena za Specijalni rezervat prirode, a od 2002. godine nalazi se na preliminarnoj listi Unesco kao područje izuzetnih prirodnih vrednosti.

3.2 Eksperimentalni dizajn

3.2.1 Sezonsko i intraklonalno variranje morfološko-anatomskih i fiziološko-biohemijskih osobina lista *I. pumila*: *in situ* eksperimenti

I EKSPERIMENT. Sezonsko variranje morfološko-anatomskih i fiziološko-biohemijskih osobina lista *I. pumila* praćeno je u dve prirodne populacije koje naseljavaju različita svetlosna staništa u Deliblatskoj peščari. Opis skraćenica ispitivanih osobina lista prikazan je u Tabeli 3.2.1. Jedna od populacija, nazvana „Dina-Sasa“, raste na otvorenom staništu, vrhu i padini jedne relativno veće dine površine oko 5 ha, dok druga populacija nazvana „Šuma“, površine oko 3 ha, nastanjuje sastojinu belog bora, *Pinus sylvestris* (Slika 3.2.1.). Rastojanje između ova dva staništa iznosi ~ 2.5 km.

Tokom sezone cvetanja, u aprilu 2003. godine, odabrano je na osnovu boje cveta (genetički marker za klonove *I. pumila*; Tucić i sar, 1988) i označeno drvenim kočicama sa identifikacionim brojem (radi bolje vidljivosti i očuvanja genetičkog identiteta) 17 klonova dinske populacije i 14 klonova šumske populacije. Sa ovih klonova uzimani su uzorci listova tokom 2007. godine, jedanput u svakoj od sledećih sezona: proleće (15. i 16. april), leto (1. i 2. juli) i

TABELA 3.2.1 Opis skraćenica korišćenih u ovoj studiji.

SKRAĆENICA	PUN NAZIV SKRAĆENICE (JEDINICA MERE)
SOD	Superoksid dismutaza (U mg ⁻¹ prot)
APX	Askorbat peroksidaza (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
CAT	Katalaza (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
GR	Glutation reduktaza (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
POD	Peroksidaze III klase (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
PHEN	Fenolna jedinjenja (mg g ⁻¹)
ANTH	Antocijani (μg g ⁻¹)
OSI	Indeks oksidativnog stresa
MDA	Malondialdehid (nmol g ⁻¹)
SLA	Specifična površina lista (cm ² g ⁻¹)
SD	Gustina stoma (#/mm ²)
LDMC	Sadržaj suve mase lista (g g ⁻¹)
RWC	Relativni sadržaj vode lista (%)
SU	Sukulentnost (g ¹ cm ⁻²)
LWC	Sadržaj vode lista (g g ⁻¹)
Chl a	Hlorofil a (μg cm ⁻²)
Chl b	Hlorofil b (μg cm ⁻²)
Chl ukupni	Ukupni hlorofil (μg cm ⁻²)
Chl a:b	Odnos hlorofila a i b
Cars	Karotenoidi (μg cm ⁻²)

jesen (29. i 30. septembar). Kao eksperimentalni materijal korišćeni su prvi potpuno razvijeni listovi *I. pumila*. Listovi su odmah nakon odsecanja zamrzavani i transportovani u tečnom azotu do laboratorije, gde su čuvani na temperaturi od -70°C do pripreme ekstrakta za biohemijske analize.

II EKSPERIMENT. Istraživanje uticaja smanjenog intenziteta svetlosti, bez promene kvaliteta, tj. bez izmenjenog R:FR odnosa, na funkcionalne osobine lista *I. pumila* vršeno je na 6 odabranih dinskih klonova. U aprilu 2007. godine polovina svakog klona je pokrivena neutralnom PVC mrežom koja propušta oko 35% od pune sunčeve svetlosti. U julu 2007. godine, sa svakog klona prikupljeni su uzorci prva dva potpuno formirana lista sa otvorene i sa zasenčene polovine.



SLIKA 3.2.1. Klonovi *I. pumila* u prirodnom staništu. Izgled otvorenog, dinskog staništa i šumskog, zasenčenog staništa u Deliblatskoj peščari.

3.2.2 Recipročno-transplantacioni eksperiment

Za ovaj eksperiment su takođe korišćene dve lokalne populacije *I. pumila*, jedna iz otvorenog i druga iz zasenčenog staništa. Dinska populacija, koju smo nazvali Dina-Cveta, bila je izložena punom intenzitetu sunčeve svetlosti i prostirala se vrhom i jugoistočnom padinom jedne relativno veće dine. Šumski klonovi korišćeni u ovom eksperimentu potiču iz iste populacije, dakle populacije Šuma, kao i oni iz prethodnog eksperimenta, što znači da su naseljavali vegetacionu senku sastojine belog bora, *Pinus sylvestris*. Ove dve populacije bile su međusobno udaljene oko 3.5 km. Prosečan intenzitet svetlosti (PAR) i odnos crvene prema tamno-crvenoj svetlosti (R:FR), izmereni 24. septembra 1998. godine između 10 i 12 h po potpuno vedrom vremenu, iznosili su $505.06 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i 1.076 na otvorenom i $55.45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i 0.686 u zasenčenom staništu (Tucić i sar, 1998).

Transplantacioni eksperiment započet je 1998., a postavljen 2001. godine. U aprilu 1998. godine, tokom maksimuma cvetanja *I. pumila*, izabrano je po principu slučajnosti u odnosu na boju cveta 12 klonova (genotipova) iz populacije Dina-Cveta i 12 klonova iz populacije Šuma, koji su zatim obeleženi drvenim kočićima sa identifikacionim brojem. Sa svakog od ovih klonova uzeta

su po 24 vegetativnih rameta. U laboratoriji, delovi rizoma su podeljeni na jednu do dve falange (u zavisnosti od veličine), oprani česmenskom vodom, sterilisani 10% rastvorom varikine i posađeni u 0.5 l plastične čaše sa mešavinom supstrata za biljke i peska u odnosu 2 : 1. Biljke su u čašama gajene u sobi za rast od maja 1998. do marta 2001. godine. Raspored čaša sa biljkama na pregradama polica bio je slučajan. Biljke su gajene pod kontrolisanim ambijentalnim uslovima: dužina fotoperioda iznosila je 16 h, a temperatura vazduha se kretala od 21°C do 15°C (dan/noć). Osvetljavanje biljaka vršeno je setom od četiri neonske cevi (Philips TLD 36-W/33), tako da je intenzitet PAR iznad biljaka iznosio $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a odnos R/RFR je bio 8.2. Biljke su zalivane svakih 10 dana 0,5% rastvorom Floravit-a (N:P:K, 12:6:6, sa mikroelementima Fe, B, Cu, Mn Co, Mo; Credocommerce, Novi Sad). Čaše sa biljkama su rotirane jednom nedeljno da bi se smanjila korelacija između genotipa i sredine.

U martu 2001. godine, u svakom od staništa koje naseljavaju populacije Dina-Cveta i Šuma izabrane su po 3 površine (bloka) dužine 3 m i širine 1.5 m i svaki blok je očišćen od samoniklih irisa. Na svaki blok postavljena je mreža od kanapa čija su okca iznosila 30 cm i u sredinu svakog drugog okca mreže posađena je, po principu slučajnosti, jedna replika svakog od 24 (12 dinskih i 12 šumskih) genotipova *I. pumila*. Biljke su presađene u čašama, sa supstratom u kome su rasle, kojima je predhodno odstranjeno dno, kako bi se smanjio transplantacioni šok. Blokovi su sa sve četiri strane imali po jedan zaštitni rubni red u koji su takođe posađene replike eksperimentalnih genotipova. U vreme transplantacije pojedinačne biljke su imale razvijena dva do tri rameta. Preživljavanje genotipova je bilo relativno uspešno, iako je rast transplantiranih biljaka bio prilično usporen u prirodnim staništima, a posebno na otvorenom staništu, u odnosu na sobu za gajenje. U periodu od 2001. do 2007. godine, eksperimentalne površine su obilažene 2-3 puta godišnje, plevljene od samoniklih irisa, a uginule eksperimentalne biljke sukcesivno zamenjivane replikama istih genotipova iz rubnih redova. U leto 2008. godine, u vreme

uzimanja uzoraka listova za morfološko-anatomske i biohemijske analize, u transplantacionom eksperimentu je preživelo 10 dinskih i 10 šumskih genotipova. Uzorci listova iz ovog eksperimenta uzimani su na isti način kao i u prethodnom eksperimentu, u kome je analizirano sezonsko variranje navedenih osobina (Tabela 3.2.1.).

3.3 Biohemijske metode za analizu biljnog materijala

3.3.1 Ekstrakcija solubilnih proteina i određivanje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima

Za određivanje specifične aktivnosti solubilnih antioksidativnih enzima superoksid dismutaze - SOD; katalaze - CAT; askorbat peroksidaze - APX; glutation reduktaze - GR i peroksidaza III klase - POD) zamrznuti listovi su homogenizovani do praha sa tečnim azotom u avanu, a zatim ekstrahovani u 100 mM K-fosfatom puferu pH 6.5 sa 2% polivinil pirolidonom (PVP), 0.1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100 i 2 mM fenilmetilsulfonil fluoridom (PMSF). Odnos biljnog tkiva i pufera za ekstrakciju je bio 1:7. Za određivanje aktivnosti APX, u prethodno navedeni pufer za ekstrakciju dodat je još i 5 mM askorbat. Sonifikacija homogenata je vršena pri amplitudi od 20 MHz, dva puta po 15 sekundi, sa pauzama od 30 sekundi, korišćenjem ultrasoničnog procesora (UP 100H, Hielscher Inc, SAD). Nakon dva centrifugiranja homogenata od po 15 min na 10 000 x g, na 4°C, supernatant je alikvotiran i čuvan u zamrzivaču do korišćen za merenje količine solubilnih proteina, specifične aktivnosti i nativnu elektroforezu PAGE antioksidativnih enzima.

Količina ukupnih solubilnih proteina u ekstraktima lista određivana je metodom po Bradford (1976) modifikovanoj za merenje u mikrotitar pločama. Za dobijanje standardne krive korišćen je goveđi serum albumin (BSA) u opsegu koncentracija 50 - 500 µg ml⁻¹, a odnos uzorak : boja bio je 10 : 200. Absorbanca je merena na talasnoj dužini od 595 nm u mikrotitar pločama od 96 mesta, upotrebom spektrofotometra Multiskan Spectrum (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

3.3.2 Merenje aktivnosti antioksidativnih enzima

Specifične aktivnosti svih antioksidativnih enzima u ekstraktima lista *I. pumila*, osim SOD merene su spektrofotometrijski na UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan), na 30°C. Aktivnost SOD je merena upotrebom spektrofotometra Multiskan Spectrum (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

Specifična aktivnost SOD je merena metodom po Beyer i Fridovich (1987) modifikovanom za merenje u mikrotitar pločama. Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je 100 mM K-fosfatni pufer pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 12 mM L-metionin, 75 μ M nitroblu tetrazolijum hlorid (NBT), 2 μ M riboflavin i 0, 1, 3, 5, 10, 15 i 25 μ l uzorka. Ovako pripremljene reakcione smeše razlivene su u bunarčice mikrotitar ploče i osvetljavane 15 min na 20°C. Blank smeše su bile istog sastava kao i reakcione smeše ali su držane u mraku. Mera aktivnost SOD je kapacitet određenog ekstrakta da inhibira fotohemijску redukciju NBT u formazan, koji je plave boje. Intenzitet boje, koji je inverzno proporcionalan aktivnosti SOD uzorka, je meren kao povećanje apsorbance na 540 nm. Jedna SOD jedinica se definiše kao količina ekstrakta koja dovodi do 50% inhibicije fotohemijske redukcije NBT u poređenju sa osvetljavanom smešom bez ekstrakta. Specifična aktivnost SOD je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti (U) po mg^{-1} solubilnih proteina.

Specifična APX aktivnost je određivana metodom koju su opisali Miyake i Asada (1992). Reakciona smeša zapremin 1 ml sadržala je 50 mM K-fosfatni pufer pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1 mM H_2O_2 , 0.5 mM askorbat ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i 20 μ l ekstrakt lista. H_2O_2 -zavisna oksidacija askorbata je praćena kao smanjenje apsorbance na 290 nm. Specifična aktivnost APX je izražena u μmol askorbata $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ solubilnih proteina.

Specifična CAT aktivnost je merena kao smanjenje apsorbance na 240 nm usled razgradnje H_2O_2 (Aebi, 1984). Promena apsorbance je praćena 3 min u reakcionoj smeši koja je sadržala 100 mM K-fosfatni pufer pH 7.5, 30 mM H_2O_2

($\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i 5 μl ekstrakt lista. Specifična CAT aktivnost je izražena u $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ solubilnih proteina.

Specifična aktivnosti POD merena je kao porast apsorbance na 430 nm. Reakciona smeša u kiveti od 1 ml je bila sledećeg sastava: 100 mM K-fosfatni pufer pH 6.5, 10 mM pirogalol kao elektron donor ($\epsilon = 2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 10 mM H_2O_2 i 10 μl ekstrakt lista. Specifična POD aktivnost je izražena u $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ solubilnih proteina.

Aktivnost GR određivana je metodom koju su opisali Foyer i Halliwell (1976). Jedan mililitar reakciona smeše sastojao se od 50 mM K-fosfatnog pufera (pH 7.5), 1 mM oksidovanog glutationa (GSSG), 1 mM EDTA, 0.1 mM NADPH i ekstrakt lista. Praćeno je smanjenje apsorbance na 340 nm usled oksidacije NADPH ($\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Specifična GR aktivnost je izražena u $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ solubilnih proteina.

Da bi se utvrdilo da li se uticaj temperature na aktivnost antioksidativnih enzima razlikuje između populacija, specifična aktivnost SOD, CAT i POD je merena na različitim temperaturama: 15, 20, 30, 40 i 50°C. U ovom eksperimentu korišćene su smeše koje su činili listovi 15 genotipova (pet genotipova po sezoni) za svaku populaciju koji su sakupljeni tokom 2004. godine. Smeše listova homogenizovane u tečnom azotu ekstrahovane su u 100 mM K-fosfatom puferu pH 6.5 sa 5% PVP i 2 mM PMSF. Odnos biljnog tkiva i pufera za ekstrakciju je bio 1:20. Nakon sonifikacije, ekstrakti su centrifugirani 15 min na $10\,000 \times g$, na 4°C. Supernatant je alikvotiran i čuvan u zamrzivaču do korišćenja za merenje količine solubilnih proteina i specifične aktivnosti enzima. Energija aktivacije (E_a) je računata prema Arenijusovoj jednačini:

$$\ln(k) = (-E_a/R \times T^{-1}) + \ln(A),$$

pri čemu je k brzina reakcije, A predeksponencijalni faktor, R je univerzalna gasna konstanta i iznosi $8.314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, a T je temperatura (K) (McMurry i Fay, 2003).

3.3.3 *Nativna elektroforeza: vizuelizacija aktivnosti i određivanje izoformi antioksidativnih enzima*

Razdvajanje različitih izoformi SOD, APX i CAT enzima rađeno je nativnom elektroforezom na diskontinuiranim poliakrilamid gelovima (PAGE) (Laemmli, 1970) korišćenjem Mini-Protean Tetra Cell sistema (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Pre nanošenja na gel uzorci su pomešani sa puferom za uzorke (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% glicerol, 0.01% bromfenol plavo) u odnosu 2:1. Proteini su razdvajani na gelovima debljine 0.75 mm, korišćenjem elektrodnog pufera: 0.025 M Tris-HCl (H 8.3) i 0.192 M glicin, pri konstantnoj struji od 10 mA po gelu, na 4°C. Izoforme SOD su razdvajane na 10% gelu za razdvajanje sa 5% gelom za koncentrovanje (Tabela 3.3.1.). Vizuelizacija aktivnosti izoformi SOD na gelu vršena je prema radu Beauchamp i Fridovich (1971). Po završetku elektroforeze, gelovi su inkubirani u rastvoru za bojenje koji je sadržao: 50 mM K-fosfatni pufer pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.1 mM NBT i 0.05 mM riboflavin, u trajanju od 30 min u mraku. Nakon kratkog ispiranja destilovanom vodom, gelovi su osvetljavani do pojave bezbojnih SOD traka na plavo-ljubičastoj pozadini. Različite izoforme SOD su identifikovane nakon inkubiranja gela 15 min u rastvoru specifičnih inhibitora: 5 mM H₂O₂ koji inhibira Fe-SOD i Cu/Zn-SOD, i 2 mM KCN koji je inhibitor Cu/Zn-SOD.

Izoforme CAT su razdvajane 4h na 9% gelu za razdvajanje sa 5% gelom za koncentrovanje. Nakon elektroforeze, gelovi su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi u 3.27 mM H₂O₂ u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 7.5. Posle kratkog ispiranja destilovanom vodom, gelovi su bojani rastvorom koji je sadržao 1% kalijum fericijanid (K₃Fe(CN)₆) i 1% hlorid gvožđa (FeCl₃) (Woodbury, 1971).

Izoforme APX su razdvajane na 10% gelu za razdvajanje sa 5% gelom za koncentrovanje, , uz dodavanje 2 mM askorbata u elektrodni pufer. Po završetku elektroforeze, gelovi su inkubirani 20 min u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 7.0 koji je sadržao 4 mM askorbat, a zatim još 20 min u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 7.0 sa 4 mM askorbatom i 2 mM H₂O₂. Nakon kratkog

ispiranja, gelovi su bojenu 10 min u rastvoru 50 mM K-fosfatnog pufera pH 7.8 sa 14 mM TEMED i 0.245 mM NBT (Mittler i Zilinskas, 1993, modifikovano). Reakcija je zaustavljena kratkim ispiranjem destilovanom vodom.

TABELA 3.3.1. Formulacija poliakrilamidnih gelova različite gustine.

Gustina gela	DDI H ₂ O (ml)	30% Akrlamid (ml)	Pufer* (ml)	Glicerol (ml)	10% APS (μ l)	TEMED (μ l)
5%	5.8	1.7	2.5	0.0	50.0	10.0
9%	2.5	3.0	2.5	2.0	50.0	5.0
10%	2.2	3.3	2.5	2.0	50.0	5.0

*Gel za razdvajanje - 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

*Gel za koncentrovanje - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Nakon bojenja, gelovi su skenirani (CanoScan 8800F), a intenziteti izoformi (traka) antioksidativnih enzima određivani su densitometrijski pomoću programa ImageJ 1.43u (National Institutes of Health, USA). Da bi se izbegao uticaj varijabilnosti same tehnike bojenja na kvantitativnu analizu i da bi se omogućilo poređenje intenziteta izoenzimskih traka između različitih gelova, interni referentni uzorak (smeša svih uzoraka) je nanošen na svaki gel. Aktivnosti izoformi su standardizovane referentnim uzorkom kako bi se dobile njihove relativne vrednosti koje su izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).

3.3.4 Ekstrakcija i određivanje ukupne količine neenzimskih antioksidanata - fenola i antocijana

Ukupni sadržaj fenola određivan je kolorimetrijskom metodom (Singleton i Rossi, 1965). Biljni materijal je usitnjen do praha u avanu, a zatim ekstrahovan u 80% metanolu (FW:V = 1:15) u trajanju od 1 h. Nakon 20 min centrifugiranja na 10 000 \times g, supernatant je odvojen, a talog je reekstrahovan u 80% metanolu (FW:V = 1:7) još 1 h. Nakon centrifugiranja, supernatanti su spojeni i korišćeni u daljoj analizi. Ekstrakt lista (50 μ l) je pomešan sa 475 μ l 0.25 N Folin-Ciocalteu reagensom, a posle 3 min je dodato 475 μ l 1 M NaCO₃. Apsorbanca reakcione smeše je merena nakon 1 h inkubacije na 30°C na 724 nm.

Standardna kriva je konstruisana na osnovu različitih koncentracija galne kiseline (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 i 0.5 mg ml⁻¹) rastvorene u 80% metanolu. Ukupni sadržaj fenola je izražen u ekvivalentima galne kiseline po gramu sveže mase.

Ukupni sadržaj antocijana je određivan metodom opisanom u radu Mancinelli i sar, (1975). Nakon homogenizacije tečnim azotom u avanu, antocijani su ekstrahovani u kiselom metanolu (1% HCl) 48 h na 5°C, uz kontinuirano mešanje. Apsorbanca supernatanta je merena spektrofotometrijski u mikrotitar pločama na 530 i 653 nm. Apsorbance antocijana su korigovane $A_{530} - 0.24 A_{653}$ prema Murray i Hackett (1991) zbog prisustva ugljenih hidrata. Sadržaj antocijana je izražen u ekvivalentima cijanidin-3-glukozid g⁻¹ sveže mase. Ekstinkcioni koeficient cijanidin-3-glukozida na 530 nm iznosi 26 900 L mol⁻¹ cm⁻¹, a molekulska masa iznosi 445.

3.3.5 Ekstrakcija i merenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata

Za određivanje koncentracija hlorofila a, hlorofila b, ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida listovi su, nakon zamrzavanja u tečnom azotu, homogenizovani do praha u avanu, a zatim ekstrahovani u DMSO u odnosu 1:30 (FW:V). Homogenati su 6 h inkubirani na 60°C u termo bloku. Posle centrifugiranja (20 min na 10 000 x g) merena je apsorbanca supernatanta u mikrotitar pločama, na 665, 649 i 480 nm. Koncentracije fotosintetičkih pigmenata su računane prema sledećim formulama (Wellburn, 1994) i izražene u µg cm⁻²:

$$\text{Hlorofil a} = (12.47 \times A_{665}) - (3.62 \times A_{649})$$

$$\text{Hlorofil b} = (25.06 \times A_{649}) - (6.50 \times A_{665})$$

$$\text{Ukupni hlorofil} = \text{Hlorofil a} + \text{Hlorofil b}$$

$$\text{Karotenoidi} = (1000A_{480} - 1.12 \times \text{Hlorofil a} - 53.78 \times \text{Hlorofil b})/220$$

3.3.6 *Određivanje oksidativnog oštećenja membrane merenjem količine malondialdehida*

Lipidna peroksidacija, koja se meri kao količina MDA, i koja predstavlja pokazatelj oštećenja membrana određivana je modifikovanom TBA-MDA metodom po Hodges i sar (1999). Tkivo lista je homogenizovano u 80% etanol (FW:V = 1:15), a zatim centrifugirano na 3 000 x g, 10 min na 4°C. Supernatant (1 ml) je pomešan sa 1 ml 20% TCA ili 1 ml 0.65% TBA rastvorenom u 20% TCA i potom zagrevan 25 min na 95°C. Nakon hlađenja na ledu, tube sa reakcionom smešom su centrifugirane 10 min na 3 000 x g, na 4°C. Apsorbanca je merena u mikrotitar pločama na 440, 532 i 600 nm. Količina MDA ekvivalenta je izračunata prema sledećim formulama (Hodges i sar, 1999):

$$A = [(A_{532+TBA}) - (A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})]$$

$$B = [(A_{440+TBA} - A_{600+TBA}) 0.0571]$$

$$\text{MDA ekvivalenti (nmol mL}^{-1}\text{)} = (A - B/157000) \times 10^6$$

Indeks oksidativnog stresa (OSI) računat je kao količnik geometrijske sredine svih antioksidanata i količine MDA.

3.4 Merenje morfološko-fizioloških osobina lista

3.4.1 Merenje specifične površine lista (SLA), sadržaja vode u listu (LWC), sadržaja suve mase lista (LDMC), relativnog sadržaja vode (RWC) i sukulentnosti (SU)

Za merenje morfološko-fizioloških osobina lista korišćeni su zdravi prvi i drugi potpuno formiran zdrav listovi. Površina lista (LA, eng. Leaf Area) je merena pomoću programa Image Tool, na osnovu digitalni prikazi svežih listova dobijenih skeniranjem (CanoScan 5600F). Nakon merenja sveže mase (LFM, eng. Leaf Fresh Mass) i skeniranja, listovi su inkubirani u fiolama sa destilovanom vodom 12 h, radi utvrđivanja turgidne mase (LTM, eng. Leaf Turgid Mass), a zatim su sušeni do konstantne mase u sušnici (na 60°C). Na kraju je izmerena suva masa (LDM, eng. Leaf Dry Mass) svakog pojedinačnog lista.

Specifična površina lista, SLA (eng. Specific Leaf Area) je izračunata kao količnik projektovane površine svežeg lista i njegove suve mase, izražene u $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$:

$$\text{SLA} = \text{LA}/\text{LDM}.$$

Sadržaj suve mase lista, LDMC (eng. Leaf Dry Mass Content) je određivan kao količnik suve i turgidne mase lista (Shipley i sar, 2005) i izražena u g g^{-1} :

$$\text{LDMC} = \text{LDM}/\text{LFM}.$$

Sadržaj vode u listu, LWC (eng. Leaf Water Content) je izračunat prema formuli (Garnier i Laurent, 1994) i izražen u g g^{-1} :

$$\text{LWC} = 1 - \text{LDM}/\text{LFM}.$$

Relativni sadržaj vode lista, RWC (eng. Relative Water Content) predstavlja procenat trenutnog sadržaja vode u listu u odnosu na njegovu potpunu zasićenost vodom. Izračunava se prema formuli:

$$\text{RWC} = [(\text{LFM} - \text{LDM})/(\text{LTM} - \text{LDM})] \times 100.$$

Sukulentnost, SU (eng. Succulence) je određivan prema sledećoj formuli:

$$\text{SU} = (\text{LFM} - \text{LDM})/\text{LA}.$$

3.4.2 *Određivanje gustine stoma (SD)*

Gustina stoma, SD (eng. Stomatal Density) određivana je mikro-reljefnom metodom, kao što je opisano u radu Pazourek (1970). Srednji deo adaksijalne površine drugog potpuno formiranog lista je premazan bezbojnim lakom za nokte. Osušeni otisak je skinut sa lista selotejpom i zalepljen na mikroskopsku pločicu. Broj stoma je određivan na 20 slučajno izabranih mikroskopskih polja, pri čemu su uključene stome koje su bile potpuno vidljive. Površina polja iznosila je 0.196 mm² pri uveličanju od 40 x. Gustina stoma je izražena kao broj stoma po mm².

3.5 Statističke analize

3.5.1 *Sezonska dinamika morfološko-anatomske i fiziološko-biohemijske osobine lista I. pumila*

Osnovni parametri deskriptivne statistike (srednja vrednost, standardna greška, koeficijent varijacije) različitih osobina unutar svake populacije, za svaku sezonu, određeni su korišćenjem PROC MEANS procedure SAS statističkog softverskog paketa (SAS Institute, verzija 9.3, 2012).

Zavisne varijable korišćene za statističke analize su bile pojedinačne vrednosti različitih osobina lista *I. pumila*, dobijene merenjem na istim genotipovima kroz tri godišnje sezone (proleće, leto i jesen). Prosečne vrednosti svih izmerenih osobina za svaku populaciju, po sezonama, prikazane su grafički kao histogrami. Dinamika promene praćenih osobina je analizirana multivarijantnom analizom varijanse sa ponovljenim merenjima (eng. MANOVA) (von Ende, 2001). Ovaj model uključivao je sledeće izvore variranja: između subjekata (eng. *between-subjects effect*), unutar subjekta (eng. *within-subject effect*) – stanište i sezona, kao i interakcija između sezone i staništa. Za izračunavanje je korišćena REPEATED/PROFILE opcija GLM procedure koja ponovljena merenja osobina transformiše u set „kontrasta“ koji se potom testiraju jednofaktorskim analizama varijanse (ANOVA). Analiza profila omogućava testiranje tri hipoteze: o „nivou“, „paralelizmu“ i

„jednoličnosti“ prosečne krive odgovora. Hipoteza o „nivou“ testira da li srednje vrednosti varijabli variraju u svakom posmatrnoj jedinici vremena (npr. Da li se razlikuju srednje vrednosti osobina dinske i šumske populacije *I. pumila* u svakoj od posmatranih sezona?). Hipoteza o „jednoličnosti“ testira da li ima značajnih razlika u srednjim vrednostima merenih varijabli u odnosu na prosek tretmana (npr. Da li postoji variranje srednjih vrednosti osobina u okviru svake od populacije *I. pumila* tokom posmatrana tri godišnja doba?). Hipoteza o „paralelizmu“ ispituje da li su promene srednjih vrednosti varijabli iste kod svih posmatranih grupa tokom vremena (npr. Da li je oblik krive odgovora isti kroz vreme za obe populacije *I. pumila*?).

Korelacije između praćenih osobina lista *I. pumila*, u okviru populacije, u svakoj sezoni, procenjene su pomoću Pearson-ovog korelacionog koeficijenta (r) korišćenjem PROC CORR procedure SAS programa. Variranja obrasca korelacija između populacija u svakoj sezoni, kao i u okviru iste populacije između sezona, analizirano je pomoću Mantel testa (Pop tools, Microsoft Office Excel 2003), koji utvrđuje homogenost korelacionih matrica.

3.5.2 Recipročno-transplantacioni eksperiment

Kao ulazni podaci za sve statističke analize korišćeno je 20 genotipova *I. pumila*: 10 genotipova iz populacije Dina-Cveta i 10 genotipova iz populacije Šuma. Osnovni parametri deskriptivne statistike (srednja vrednost, standardna greška, koeficijent varijacije) različitih osobina unutar svake populacije određeni su korišćenjem PROC MEANS procedure statističkog programskog paketa SAS.

Za svaku osobinu pojedinačno konstruisane su norme reakcija između svetlosnih sredina na osnovu individualnih vrednosti genotipova. Pošto su sve osobine merene u dve različite svetlosne sredine, norme reakcija su imale linearni oblik.

Da bi se ispitao uticaj sredinskih činilaca na srednje vrednosti osobina biljaka u dve prirodne populacije *I. pumila* korišćena je jednofaktorska ANOVA. Ovim modelom procenjen je značaj staništa kao izvora fenotipskog variranja.

Testiranje značajnosti genetičkog variranja između populacija na srednje vrednost analiziranih osobina lista unutar istog staništa takođe je izvršeno jednofaktorskom analizom varijanse. Ovaj model uključivao je populaciju kao izvor variranja.

Korelacije između praćenih osobina lista *I. pumila*, u okviru populacije na svakom od dva posmatrana staništa, utvrđene su pomoću Pearson-ovog korelacionog koeficijenta (PROC CORR procedura iz SAS programa). Razlike u korelacionom obrascu određene su između populacija na istom staništu, kao i u okviru iste populacije između dva različita staništa. Svaka korelaciona matrica ima dva svojstva: veličinu (stepen, jačinu) korelacija i njihov obrazac. Veličina korelacija ukazuje na jačinu korelisanosti osobina, dok obrazac ukazuje na raspored korelacija fenotipskih osobina u korelacionoj matrici. Strukture korelacionih matrica funkcionalno povezanih fenotipskih karakteristika (biohemijske i fiziološke) genotipova *I. pumila*, poreklom iz dve populacije sa alternativnih svetlosnih staništa, poređene su hijerarhijski pomoću CPC testa (eng. Common Principal Component Analysis; Flury, 1988; Phillips i Arnold, 1999) koji omogućava detaljniju analizu nivoa sličnosti matrica, osim podudarnosti i nepodudarnosti. Ova statistička analiza je rađena korišćenjem CPC softvera koji je napisao Phillips (1998). Hijerarhija poređenja matrica se zasniva na testiranju hipoteze o nepodudarnosti struktura matrica, zatim sledi testiranje niza hipoteza o parcijalnom preklapanju (PCPC, matrice dele $p-2$ zajedničkih sopstvenih vektora, gde je p broj osobina). Sledeći nivo u hijerarhiji je CPC (sopstvene vrednosti se razlikuju, ali se ne može isključiti postojanje zajedničkih sopstvenih vektora), zatim sledi proporcionalnost struktura matrica (matrice se značajno razlikuju ali su proporcionalne, tj. sopstvenih vrednosti su pomnožene konstantom) i na kraju hijerarhijskog poređenja je jednakost matrica. Za interpretaciju rezultata korišćen je „step-up“ pristup koji započinje hipotezom o nepostojanju sličnosti između matrica, a zatim prelazi na ostale hijerarhijske nivoe (CPC1, CPC2, CPC _{$p-2$} CPC, proporcionalnost i jednakost), pri čemu se kao nulta hipoteza koristi niži model za koji se utvrdi da je

ispravan. Kao parametar za evaluaciju modela koji najbolje opisuje odnos korelacionih matrica korišćen je AIC (Akaike Information Criterion), gde je najpodesniji model onaj koji ima najnižu AIC vrednost (Philips i Arnold, 1999).

3.5.3 Indeksi fenotipske plastičnosti i integracije

Fenotipska plastičnost svakog klona (genotipa) morfološko-anatomskih i fiziološko-biohemijskih osobina indukovana variranjem ekoloških uslova na istom staništu zbog smene godišnjih doba ili različitim svetlosnim režimima koji su vladali na otvorenom i zasenčenom staništu u različitim godišnjim dobima izmerena je korišćenjem indeksa plastičnosti (eng. Plasticity Index), PI_v (Valldares i sar, 2006):

$$PI_v = (X_1 - X_2) / X_1;$$

u kome su X_1 i X_2 vrednosti osobine istog genotipa koji je rastao u dve različite svetlosne sredine ili između različitih godišnjih doba (tj. između proleća i leta i između leta i jeseni). Statistička značajnost unutar-populacionih razlika između sezonskih vrednosti indeksa plastičnosti, PI analizirana je neparametarskim Wilcoxon-ovim testom rangova (eng. Wilcoxon signed-rank test), dok je za ispitivanje statističke značajnosti među-populacionih razlika u vrednostima indeksa plastičnosti korišćen Wilcoxon Mann Whitney test (eng. Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) ili Wilcoxon rank-sum test).

Kao mera fenotipske integracije funkcionalno povezanih osobina lista analiziranih *I. pumila* genotipova, iz dve prirodne populacije koje naseljavaju staništa sa različitim svetlosnim režimom, korišćena je relativna varijansa sopstvenih vrednosti (eng. eigenvalue), rVE (Pavlicev i sar, 2009). Sopstvene vrednosti su izračunate na osnovu rezultata analize glavnih komponenti (PCA), korišćenjem korelacionih matrica pojedinačnih osobina lista *I. pumila*. Relativna varijansa sopstvenih vrednosti je procenjena kao odnos između sopstvenih vrednosti i maksimalne moguće varijanse:

$$rVE = VE / \max VE.$$

Maksimalna varijansa sopstvenih vrednosti za korelacione matrice iznosi (N-1), tako da je relativna varijansa sopstvenih vrednosti jednaka:

$$r_{VE} = VE / (N - 1),$$

gde simbol N predstavlja veličinu matrice, tj. broj posmatranih osobina.

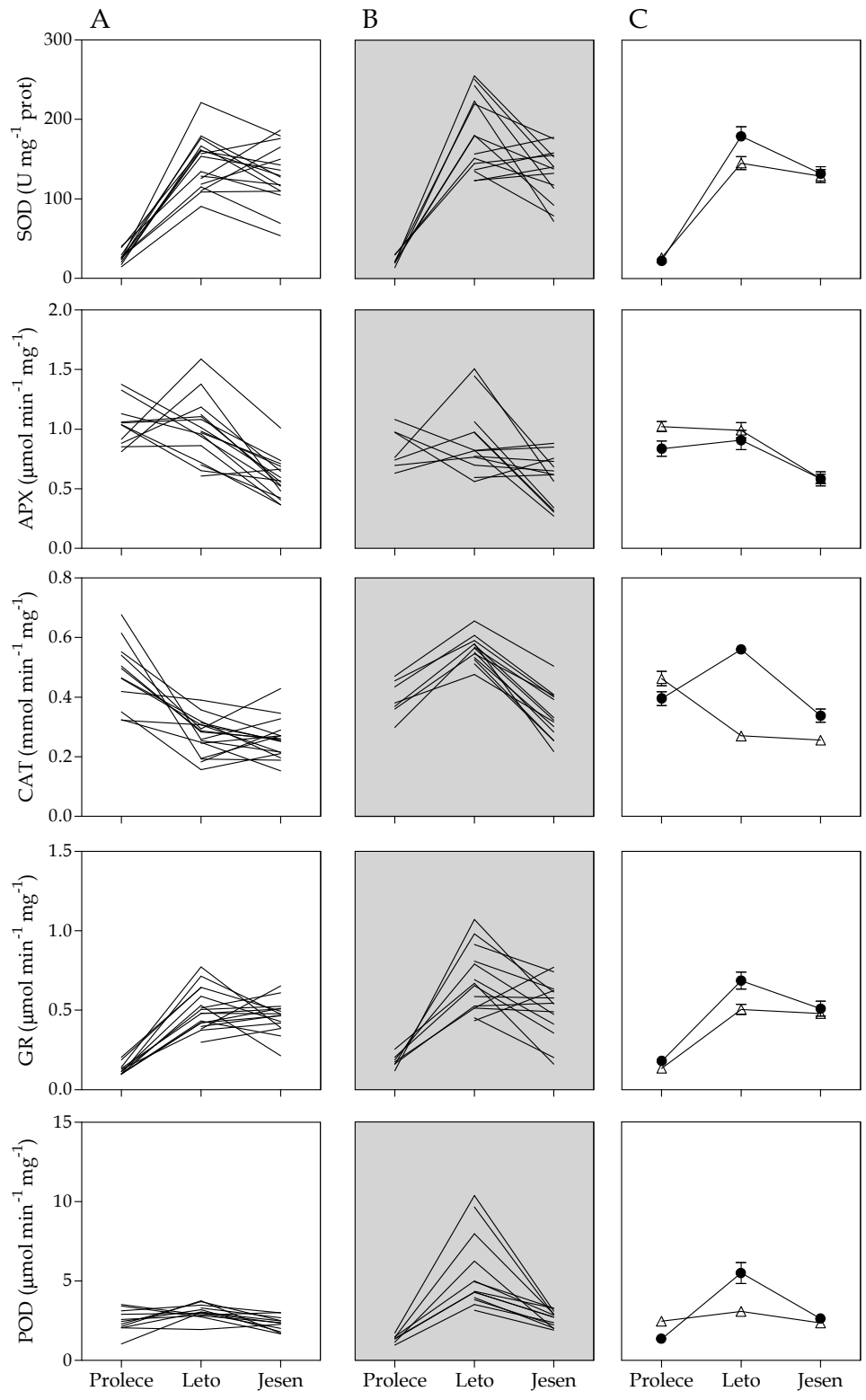
4 REZULTATI

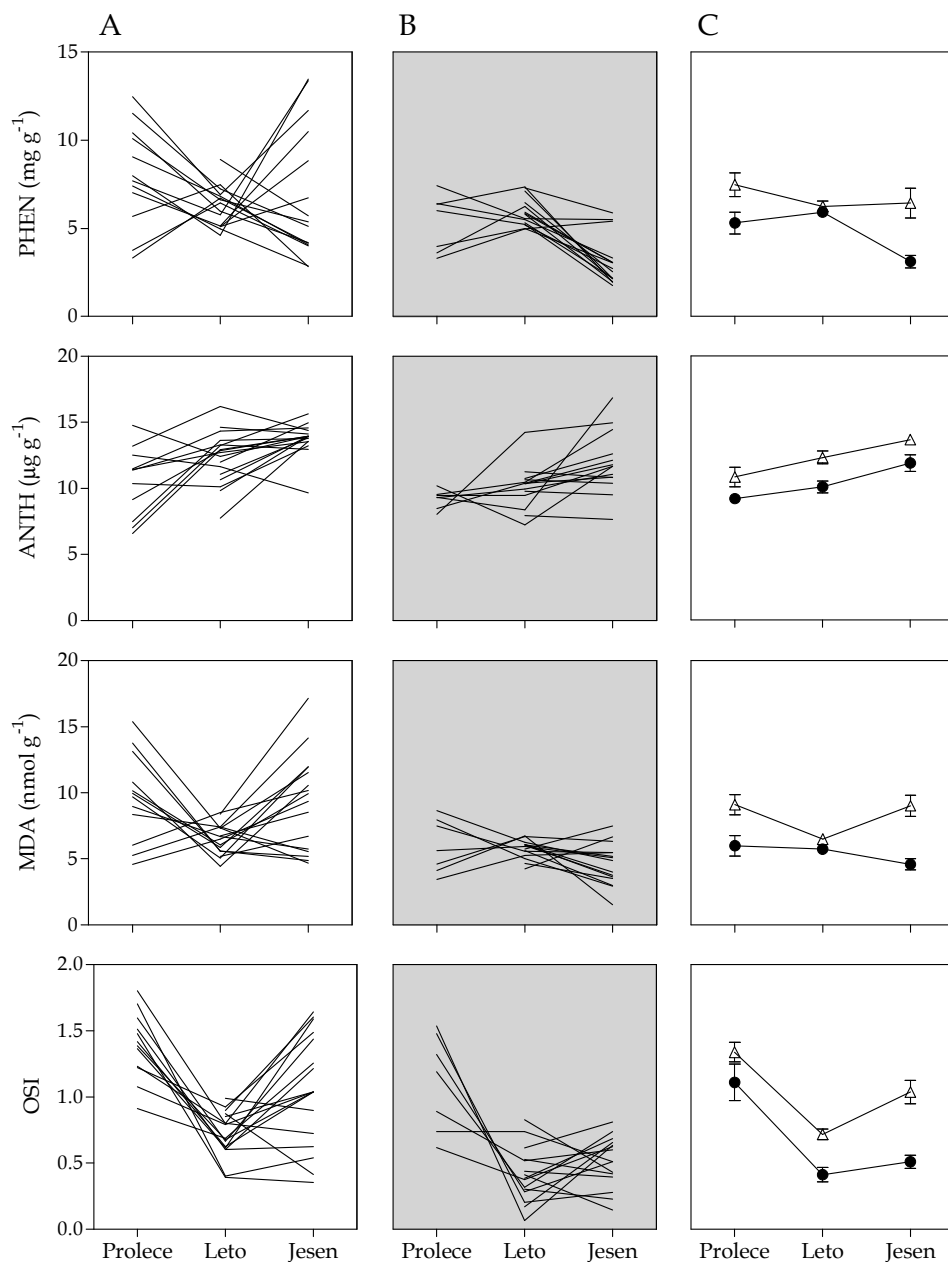
4.1 Sezonska dinamika osobina lista *I. pumila* u različitim svetlosnim staništima

4.1.1 Sezonska dinamika antioksidanata u različitim svetlosnim staništima

Sezonsko variranje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima tokom jedne vegetacione sezone (proleće, leto i jesen), analizirano je enzimskim esejima ukupnih ćelijskih ekstrakata lista kod različitih klonova *I. pumila* iz dve prirodne populacije koje nastanjuju različita svetlosna staništa. Na Slici 4.1.1. su prikazane norme reakcije antioksidativnih enzima, neenzimskih antioksidanata i indikatora oksidativnog stresa pojedinačnih genotipova *I. pumila* tokom tri godišnja doba u populacijama Dina i Šuma, dok su njihove srednje vrednosti, standardne devijacije i koeficienti varijacije date u Tabelama 4.1.1. A i B. Na osnovu Slike 4.1.1. može se zaključiti da je obrazac sezonskog variranja aktivnosti antioksidativnih enzima bio specifičan za svaki enzim, kao i za svaku ispitivanu populaciju. Srednje vrednosti specifične aktivnosti većine enzima bile su najviše u letnjem periodu u obe populacije, sa izuzetkom specifičnih aktivnosti APX i CAT, kao i količine solubilnih fenola u populaciji sa otvorenog staništa, čiji su maksimumi utvrđeni u proleće, a zatim su opadale tokom leta, dostižući svoj minimum u jesen (Slika 4.1.1.). Generalno, u letnjem periodu, srednje vrednosti specifične aktivnosti antioksidativnih enzima, osim APX, u listu *I. pumila* bile su veće kod klonova sa zasenčenog, šumskog staništa, u odnosu na klonove sa otvorenog, dinskog staništa. Nasuprot tome, prosečne količine neenzimskih antioksidanata su bile veće tokom cele sezone u listovima biljaka iz populacije Dina, u poređenju sa vrednostima izmerenim kod biljaka iz populacije Šuma.

Sezonska dinamika indeksa oksidativnog stresa, OSI bila je slična kod genotipova obe populacije – najviše vrednosti izmerene su u proleće, a najniže u letnjem periodu. Količina indikatora oksidativnih oštećenja, MDA, zavisila je od





SLIKA 4.1.1. Norme reakcije za specifične aktivnosti enzimskih antioksidanata i količine neenzimskih antioksidanata u listu biljaka *I. pumila* iz populacija Dina (A) i Šuma (B) i njihove prosečne vrednosti sa standardnim greškama (C). Objašnjenje simbola: Δ - populacija Dina, ● - populacija Šuma. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

TABELA 4.1.1. A. Sezonsko variranje specifične aktivnosti enzimskih i količine neenzimskih antioksidanata u listu biljaka *I. pumila* iz populacije Dina. n = veličina uzorka, \bar{X} = srednje vrednosti, SD = standradna devijacija i CV = koeficijent varijacije (%). Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PROLEĆE ($n = 17$)			LETO ($n = 17$)			JESEN ($n = 22$)		
	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV
SOD	26.30	6.41	24.4	145.36	32.86	22.6	136.46	41.01	30.1
APX	1.02	0.18	17.2	0.97	0.27	28.2	0.58	0.19	32.2
CAT	0.46	0.10	21.2	0.27	0.06	23.4	0.26	0.07	26.1
GR	0.13	0.03	25.6	0.51	0.13	25.6	0.49	0.13	27.0
POD	2.57	0.78	30.5	3.32	0.67	20.1	3.04	1.54	50.5
PHEN	7.48	2.72	36.4	6.44	1.24	19.3	6.36	3.59	56.5
ANTH	11.41	3.51	30.8	12.43	2.30	18.5	13.94	1.97	14.1
OSI	1.34	0.30	22.3	0.68	0.24	35.5	1.04	0.42	40.3
MDA	9.11	3.18	34.9	6.66	1.29	19.4	8.95	3.62	40.4

TABELA 4.1.1. B. Sezonsko variranje specifične aktivnosti enzimskih i količine neenzimskih antioksidanata u listu biljaka *I. pumila* iz populacije Šuma. n = veličina uzorka, \bar{X} = srednje vrednosti, SD = standradna devijacija i CV = koeficijent varijacije (%). Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PROLEĆE ($n = 9$)			LETO ($n = 15$)			JESEN ($n = 15$)		
	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV
SOD	21.87	5.18	23.7	179.12	47.32	26.4	138.88	41.52	29.9
APX	0.84	0.17	20.5	0.92	0.34	36.6	0.68	0.31	46.2
CAT	0.43	0.08	19.8	0.52	0.13	24.5	0.33	0.08	24.6
GR	0.19	0.04	21.1	0.66	0.22	33.0	0.51	0.17	34.1
POD	1.38	0.23	16.6	5.20	2.36	45.4	2.94	0.91	30.9
PHEN	5.69	1.75	30.7	5.92	0.81	13.7	3.11	1.37	44.0
ANTH	9.37	0.73	7.7	10.40	1.99	19.2	11.68	2.39	20.4
OSI	1.16	0.34	29.5	0.41	0.21	50.5	0.51	0.19	37.9
MDA	6.48	2.17	33.5	5.74	0.70	12.3	4.61	1.60	34.7

svetlosnog staništa biljaka. Dok su kod biljaka iz populacije Dina u proleće i jesen izmerene slične prosečne vrednosti količine MDA, sa najnižim vrednostima u najstresnijem letnjem periodu, kod biljaka iz populacije Šuma uočava se blagi pad količine MDA tokom vegetacione sezone (Slika 4.1.1. i Tabela 4.1.1. A i B).

Tabele 4.1.2. A prikazuje rezultate analize profila MANOVAR enzimskih i neenzimskih antioksidanata tokom proleća, leta i jeseni u listu *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma. Testiranje hipoteze o „nivou“, koja uključuje kao izvor variranja stanište („between-subject“ efekat), pokazalo je da su prosečne vrednosti specifičnih aktivnosti APX, CAT, GR i količine antocijana i solubilnih, nestrukturnih fenola bile tokom cele vegetacione sezone statistički značajno različite između populacija Dina i Šuma. Tokom cele vegetacione sezone, specifična aktivnost APX je u proseku imala višu vrednost kod biljaka iz populacije Dina u odnosu na populaciju Šuma, dok je prosečna vrednost specifične aktivnosti GR bila veća kod biljaka koje naseljavaju šumsku senku u odnosu na biljke sa otvorenog staništa. Srednje vrednosti specifične aktivnosti CAT su tokom leta i jeseni bile veće kod biljaka iz šumske senke u odnosu na one sa otvorenog staništa, za razliku od proleća kada su veće prosečne vrednosti specifične aktivnosti ovog enzima utvrđene kod biljaka iz populacije Dina u odnosu na populaciju Šuma.

Količina neenzimskih antioksidanata, fenola i antocijana, bila je statistički značajno veća kod biljaka *I. pumila* koje rastu na otvorenom staništu, u poređenju sa biljkama koje su rasle u šumskoj senci. Međutim, u obe populacije je količina antocijana bila najmanja u proleće, a maksimalnu vrednost je dostizala u jesen. Za razliku od srednjih vrednosti antocijana, koje su imale isti trend u obe populacije, količina solubilnih fenola u biljkama iz populacije Šuma dostizala je maksimum u letnjem periodu, dok je kod biljaka sa otvorenog staništa najveća vrednost izmerena u proleće.

TABELA 4.1.2. A. Multivarijantna analiza varijanse sa ponavljanjima (analiza profila) za specifičnu aktivnosti enzimskih i količinu neenzimskih antioksidanata tokom proleća, leta i jeseni u listu biljaka *I. pumila* koje naseljavaju otvoreno i zasenčeno stanište. Testiranje statističke značajnosti izvora variranja između subjekta. df = stepeni slobode, MS = prosek kvadrata odstupanja, *F* = F-odnos, *P* = statistička značajnost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

IZMEĐU SUBJEKATA	IZVOR VARIRANJA	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
SOD	Populacija	1	0.01	0.10	0.7525
	Greška	19	0.13		
APX	Populacija	1	0.21	4.91	0.0390
	Greška	19	0.04		
CAT	Populacija	1	1.37	14.73	0.0011
	Greška	19	0.09		
GR	Populacija	1	0.13	6.53	0.0193
	Greška	19	0.02		
POD	Populacija	1	0.02	0.15	0.7041
	Greška	19	0.11		
PHEN	Populacija	1	1.62	8.90	0.0077
	Greška	19	0.18		
ANTH	Populacija	1	0.40	8.68	0.0100
	Greška	19	0.05		
OSI	Populacija	1	2.03	22.91	0.0002
	Greška	15	0.09		
MDA	Populacija	1	122.97	27.84	0.0001
	Greška	19	4.42		

Oba parametra za procenu intenziteta oksidativnog stresa, OSI i količina MDA, značajno su se statistički razlikovala između populacija sa alternativnih svetlosnih staništa tokom vegetacione sezone, a njihove prosečne vrednosti su uvek bile veće u listovima biljaka sa otvorenog staništa, u poređenju sa biljkama koje su rasle u šumskoj senci.

Verovatnoće *F* vrednosti Wilks-ovog testa λ za procenu efekta sezone (test jednoličnosti krive odgovora) multivarijantnom analizom varijanse

(„within subject“) bile su manje od 0.05 (Tabela 4.1.2. B), što ukazuje da se oblik krivih za posmatrane enzimske i neenzimske antioksidante u listu biljaka *I. pumila* menjao tokom cele vegetacione sezone, na oba svetlosna staništa. Test paralelizma, koji omogućava procenu efekta interakcije između staništa i sezone (Tabela 4.1.2. B), ukazuje na statistički značajanu razliku u obliku kriva antioksidativnih enzima CAT i POD između alternativnih staništa, dok je obrazac sezonskog variranja ostalih antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidanata bio sličan u obe populacije.

TABELA 4.1.2. B. Multivarijantna analiza varijanse sa ponavljanjima (analiza profila) za specifičnu aktivnosti enzimskih i količinu neenzimskih antioksidanata tokom proleća, leta i jeseni u listu biljaka *I. pumila* koje naseljavaju otvoreno i zasenčeno stanište. Testiranje statističke značajnosti izvora variranja unutar subjekta. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

UNUTAR SUBJEKTA	SEZONA × POPULACIJA				SEZONA			
	Wilks λ	Brojilac/ Imenilac df			Wilks λ	Brojilac/ Imenilac df		
		F	P			F	P	
SOD	0.742	2/18	3.14	0.0678	0.032	2/18	275	0.0001
APX	0.952	2/18	0.45	0.6417	0.304	2/18	20.60	0.0001
CAT	0.333	2/18	18.00	0.0001	0.260	2/18	25.60	0.0001
GR	0.804	2/18	2.20	0.1398	0.067	2/18	125	0.0001
POD	0.236	2/18	29.10	0.0001	0.148	2/18	52.00	0.0001
PHEN	0.779	2/18	2.56	0.1054	0.645	2/18	4.95	0.0194
ANTH	0.792	2/14	1.84	0.1953	0.564	2/14	5.42	0.0181
OSI	0.774	2/14	2.05	0.1656	0.213	2/14	25.80	0.0001
MDA	0.558	2/18	7.12	0.0053	0.723	2/18	3.45	0.0539

Da bi se utvrdilo između kojih sezona se populacije *I. pumila* razlikuju u aktivnosti i količini antioksidanata, urađene su pojedinačne ANOVA-e između kontrasta proleće-letno i leto-jesen (Tabela 4.1.3). Na osnovu rezultata ovih analiza zaključeno je da su se prosečne specifične aktivnosti SOD, APX, GR i POD povećavale između proleća i leta, a smanjivala između leta i jeseni, kod biljaka iz obe populacije. Statistički značajna razlika između populacija Dina i

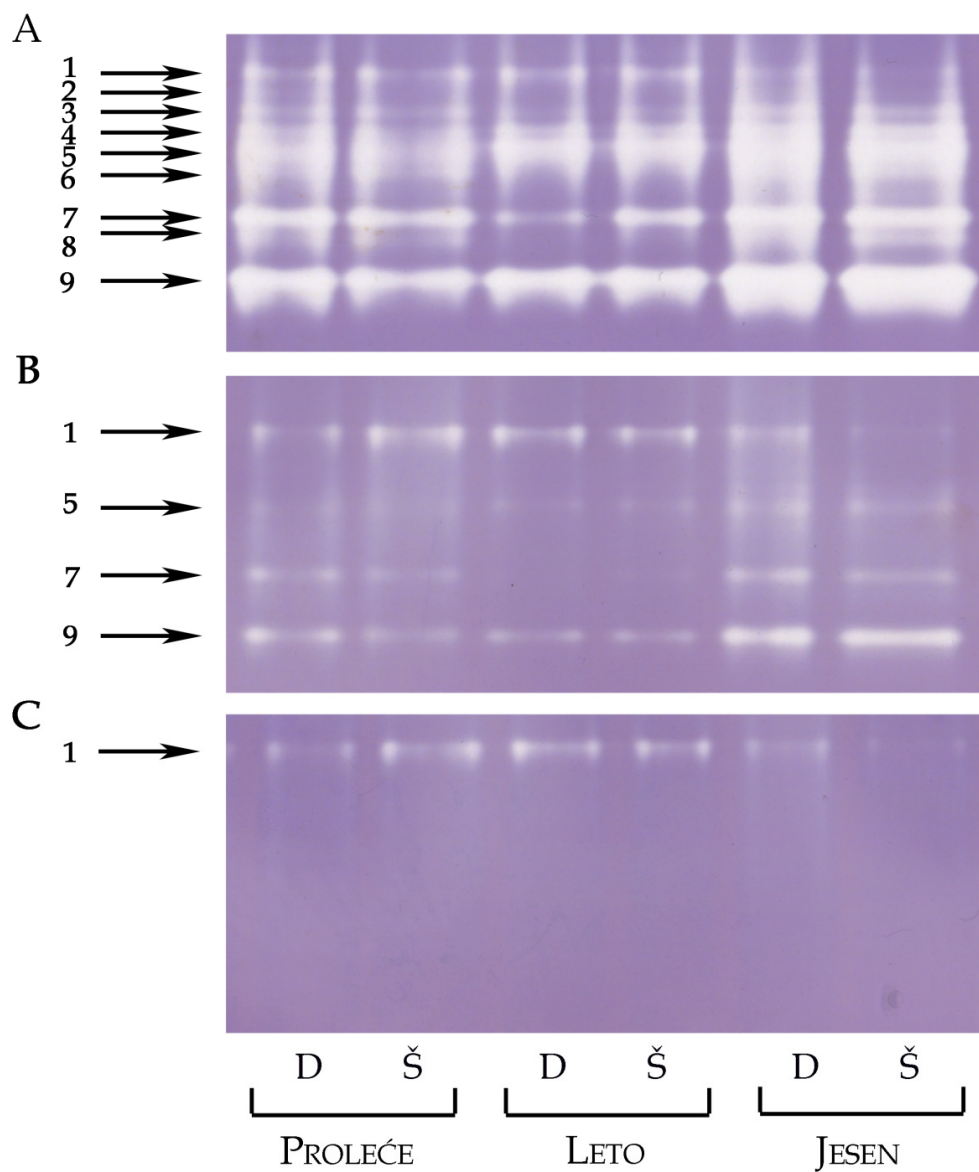
Šuma u nagibima kriva odgovora ovih enzima utvrđena je za POD i CAT tokom cele vegetacione sezone (proleće-letno: $P \leq 0.0001$; leto-jesen: $P \leq 0.0106$ za POD, i proleće-letno: $P \leq 0.0001$; leto-jesen: $P \leq 0.0033$ za CAT), za SOD samo između proleća i leta ($P \leq 0.0240$), i za GR samo između leta i jeseni ($P \leq 0.0443$), dok se nagibi kriva za APX nisu razlikovali ($P \geq 0.05$).

Prosečna količina antocijana u listu *I. pumila* statistički se značajno povećavala u obe populacije (Tabela 4.1.3), ali samo između proleća i leta ($P \leq 0.0039$), dok je između leta i jeseni ostala na istom nivou ($P = 0.4609$), koji je bio sličan između populacija ($P = 0.0660$). Nasuprot antocijanima, količina fenola nije se menjala između proleća i leta ni u populaciji Dina niti u populaciji Šuma ($P \geq 0.05$), već razlike između populacija uočene su samo između leta i jeseni ($P \leq 0.0437$).

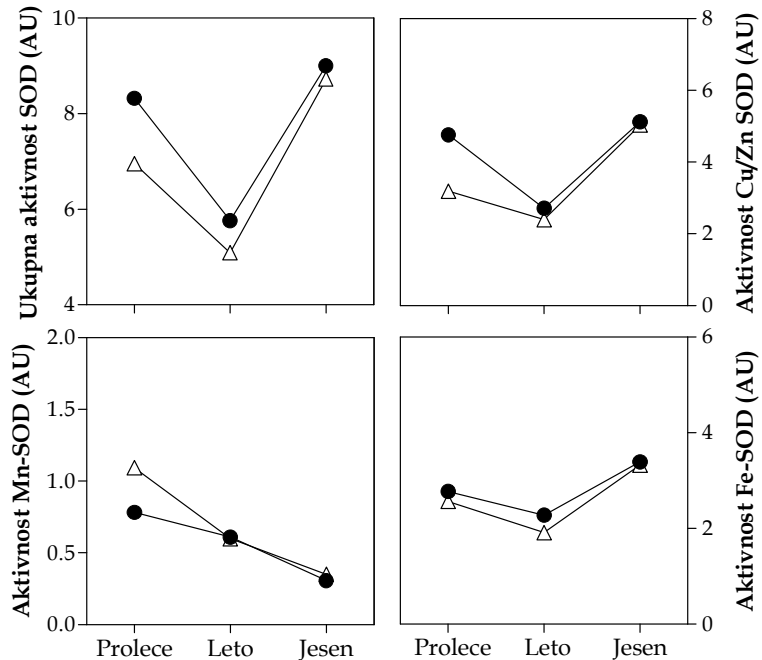
Radi utvrđivanja broja i aktivnosti različitih izoformi antioksidativnih enzima SOD, APX i CAT, ukupni ćelijski ekstrakti smeše listova različitih genotipova iz svake od analiziranih populacija razdvajani su nativnom PAGE elektroforezom. Vizuelno-različite izoforme SOD, APX i CAT dobijene su specifičnim bojenjem nativnih poliakrilamid gelova. Bojenjem gelova bojama specifičnim za aktivnost SOD, detektovano je 9 različitih traka, od kojih je izoforma 1 imala najveću molekulsku masu, a izoforma 9 najmanju (Slika 4.1.2.). Izoforma 1 je na osnovu neosetljivosti na inhibitore KCN i H_2O_2 identifikovana kao Mn-SOD. Pošto su izoforme 2, 3, 4, 6 i 8 bile osetljive na oba inhibitora, utvrđeno je da spadaju u Cu/Zn-SOD. Na osnovu osetljivosti na H_2O_2 trake 5, 7 i 9 identifikovane su kao Fe-SOD. Aktivnost sve tri forme enzima SOD bila je veća u listu genotipova iz populacije Šuma u poređenju sa genotipovima iz populacije Dina (Slika 4.1.3.). Procentualno najveći udeo u ukupnoj aktivnosti SOD imala je Cu/Zn-SOD, dok je udeo aktivnosti Mn-SOD bio najmanji (Slika 4.1.4.). Utvrđeno je da se procentualna zastupljenost Cu/Zn-SOD i Mn-SOD u ukupnoj aktivnosti enzima SOD menjala u zavisnosti od sezone i populacije. Nasuprot tome, procentualni udeo aktivnosti forme

TABELA 4.1.3. Analiza varijanse kojom je testirana statistička značajnost uticaja sredinskih faktora tokom različitih sezona na specifičnu aktivnost enzimskih i količinu neenzimskih antioksidanata u listu biljaka *I. pumila* iz populacija koje naseljavaju različita svetlosna staništa. df = stepeni slobode, MS = prosek kvadrata, F = F-odnos, P = statistička značajnost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

IZVOR VARIRANJA		VARIJABLA KONTRASTA							
		PROLEĆE - LETO				LETO - JESEN			
		df	MS	F	P	df	MS	F	P
SOD	Srednja vrednost	1	80.17	555	0.0001	1	2.46	31.40	0.0001
	Populacija	1	0.87	6.02	0.0240	1	0.24	3.11	0.0941
	Greška	19	0.14			19	0.08		
APX	Srednja vrednost	1	1.48	32.20	0.0001	1	0.68	7.31	0.0141
	Populacija	1	0.04	0.80	0.3821	1	0.02	0.25	0.6242
	Greška	19	0.05			19	0.09		
CAT	Srednja vrednost	1	0.30	3.41	0.0805	1	1.63	20.30	0.0002
	Populacija	1	3.32	37.80	0.0001	1	0.91	11.30	0.0033
	Greška	19	0.09			19	0.08		
GR	Srednja vrednost	1	1.03	101	0.0001	1	1.42	90.00	0.0001
	Populacija	1	3x10 ⁻³	0.32	0.5804	1	0.07	4.64	0.0443
	Greška	19	0.01			19	0.02		
POD	Srednja vrednost	1	12.98	109	0.0001	1	4.42	46.80	0.0001
	Populacija	1	6.76	56.91	0.0001	1	0.76	8.04	0.0106
	Greška	19	0.12			19	0.09		
PHEN	Srednja vrednost	1	0.05	0.38	0.5468	1	2.59	6.87	0.0168
	Populacija	1	0.42	2.83	0.1087	1	1.76	4.67	0.0437
	Greška	19	0.15			19	0.38		
ANTH	Srednja vrednost	1	0.70	11.60	0.0039	1	0.01	0.57	0.4609
	Populacija	1	0.02	0.27	0.6139	1	0.07	3.93	0.0660
	Greška	19	0.06			19	0.02		
OSI	Srednja vrednost	1	1.87	14.40	0.0017	1	3.43	47.6	0.0001
	Populacija	1	0.28	2.20	0.1589	1	0.11	1.54	0.2339
	Greška	15	0.13			15	0.07		
MDA	Srednja vrednost	1	15.40	1.90	0.1845	1	23.88	6.63	0.0185
	Populacija	1	6.58	0.81	0.3793	1	43.19	12.00	0.0026
	Greška	19	8.12			19	3.60		

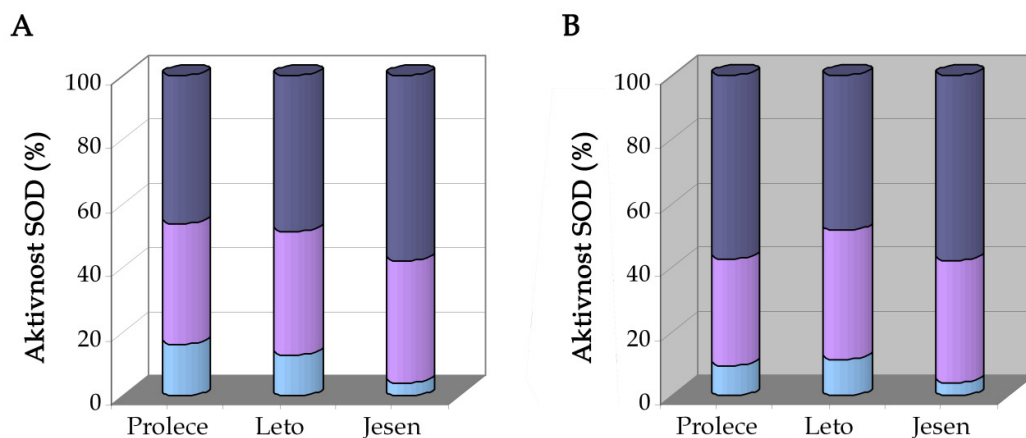


SLIKA 4.1.2. Sezonsko variranje izoformi SOD kod biljaka *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma. A. Izoenzimi svih formi SOD; B. Gel bojen nakon inhibicije Cu/Zn-SOD pomoću 5 mM KCN; C. Gel bojen nakon inhibicije 5 mM H₂O₂, radi identifikacije Mn-SOD. Legenda: D - smeša ekstrakata lista 10 genotipova iz populacije Dina, Š - smeša ekstrakata lista 10 genotipova iz populacije Šuma. Izoforma 1 ima najveću molekulsku masu, a izoforma 9 najmanju.



SLIKA 4.1.3. Grafički prikaz sezonske dinamike aktivnosti različitih formi enzima SOD kod genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma nakon kvantifikacije sa nativnih PAGE gelova. Objašnjenje simbola: Δ - populacija Dina, \bullet - populacija Šuma. Vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).

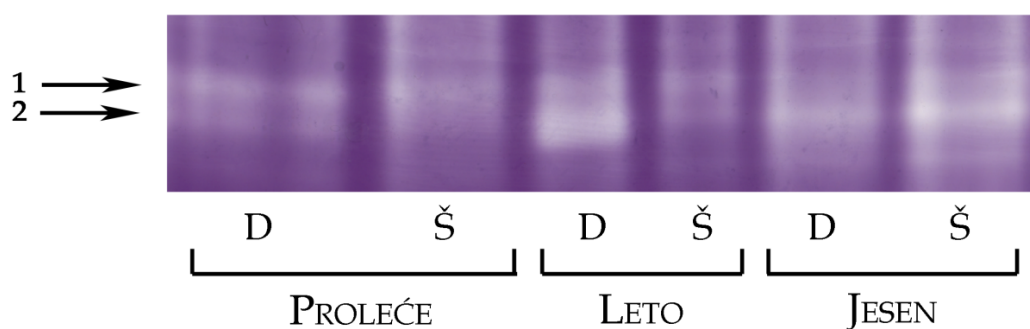
Fe-SOD bio je relativno konstantan u obe analizirane populacije. Biljke, za razliku od drugih organizama, imaju brojne forme enzima SOD, i svaka forma može imati više izoformi sa različitim stopama migracije na gelu tokom elektroforeze (Bowler i sar, 1992; Pokora i sar, 2011). U ovim istraživanjima utvrdili smo da se sezonska dinamika aktivnosti SOD na gelu (Slika 4.1.3.) nije podudarala sa promenama aktivnosti utvrđenim enzimskim esejima. U literaturi postoje dva objašnjenja za ovu nepodudarnost: (1) aktivnost SOD na gelu može biti nedovoljno osetljiva i precizna u odnosu na esej i (2) grubi ekstrakt lista sadrži jedinjenja koja uklanjaju superoksid i tako interferiraju sa aktivnošću SOD tokom eseja (Alscher i sar, 2002; Chagas i sar, 2008).



SLIKA 4.1.4. Sezonsko variranje procentualnog udela aktivnosti različitih formi enzima SOD u listu genotipova *I. pumila* iz populacija Dina (A) i Šuma (B). Legenda:

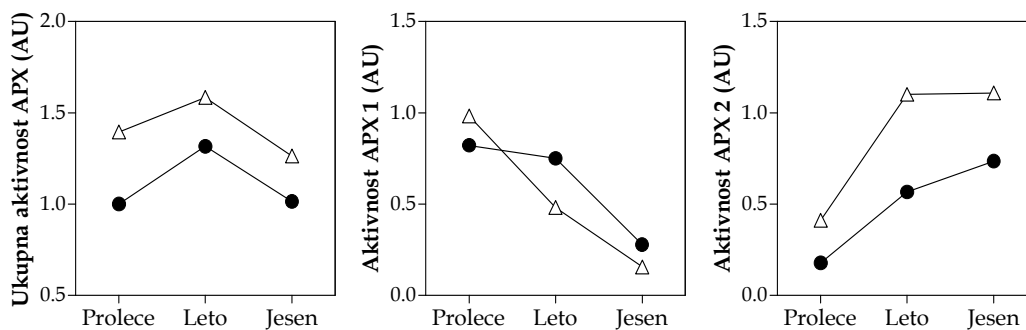
■ - Mn-SOD, ■ - Fe-SOD, ■ - Cu/Zn-SOD.

Nakon razdvajanja proteina ukupnog ćelijskog ekstrakta lista *I. pumila* nativnom PAGE, izoforme APX su vizuelizovane na gelovima bojenjem specifičnim za aktivnost APX. Detektovane su dve izoforme ovog antioksidativnog enzima, izoforma 1 i izoforma 2 (Slika 4.1.5.). Kvantifikacijom dobijenih traka utvrđeno je da izoforma manje molekulske mase (izoforma 1)

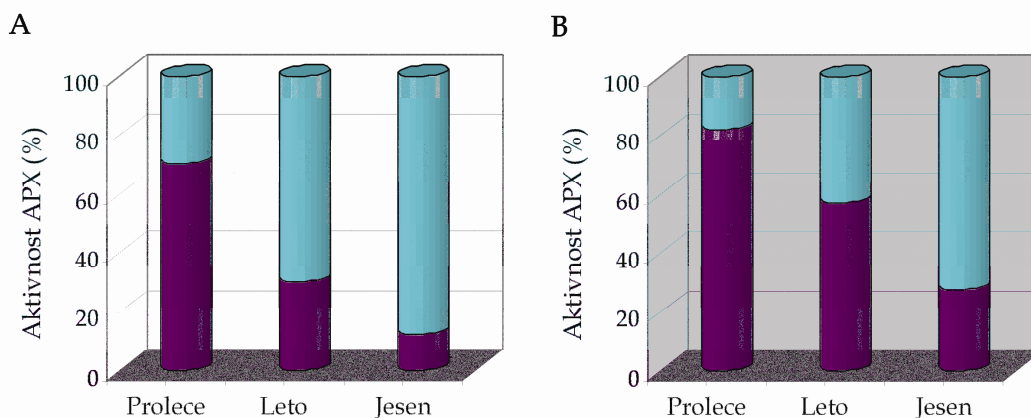


SLIKA 4.1.5. Sezonsko variranje izoformi APX u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma. Legenda: D - smeša 10 genotipova iz populacije Dina, Š - smeša 10 genotipova iz populacije Šuma. Izoforma 1 je veće molekulske mase, u odnosu na izoformu 2.

ima drugačiji obrazac promene kod biljaka sa različitih svetlosnih staništa, iako se sezonska dinamika ukupne aktivnosti APX na gelu poklapa sa rezultatima dobijenim merenjem specifične aktivnosti APX (Slika 4.1.6.). Osim u prolećnom periodu, izoforma 1 imala je veću aktivnost u listu biljaka iz populacije Šuma, u odnosu na biljke iz populacije Dina. U obe populacije maksimalnu vrednost



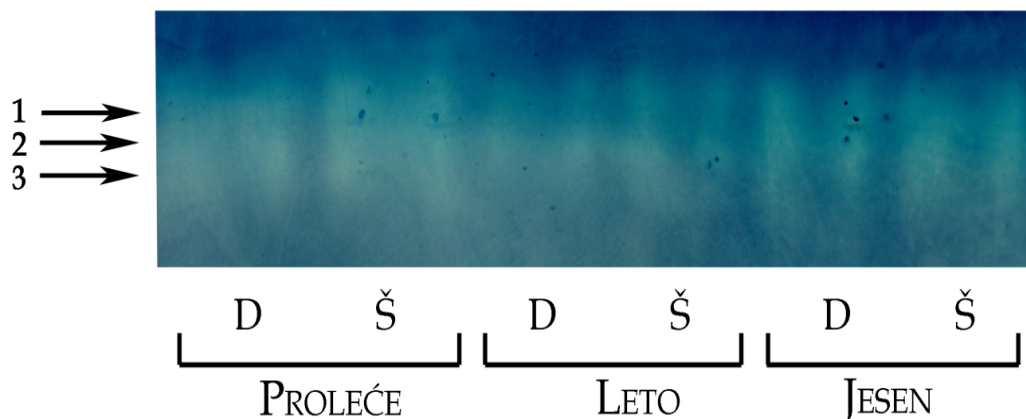
SLIKA 4.1.6. Grafički prikaz sezonske dinamike aktivnosti izoformi APX u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista genotipova *I. pumila* iz populacija Dina (Δ) i Šuma (●). Vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).



SLIKA 4.1.7. Sezonsko variranje procentualnog udela aktivnosti izoformi APX u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista *I. pumila* iz populacije Dina (A) i Šuma (B). Legenda: ■ - APX izoforma 1, ■ - APX izoforma 2.

ova izoforma dostizala je u prolećnom periodu, aktivnost je zatim opadala tokom leta, da bi u jesen dostigla minimum. Nasuprot izoformi 1, aktivnost izoforme 2 bila je veća u populaciji Dina nego u populaciji Šuma. U obe populacije najniža aktivnost ovog enzima detektovana je u proleće, da bi u populaciji sa otvorenog staništa dostigla svoj maksimum u leto i ostala na tom nivou to jeseni, dok se u populaciji, koja je rasla u šumskoj senci, kontinuirano povećavala od proleća do jeseni (Slika 4.1.6.).

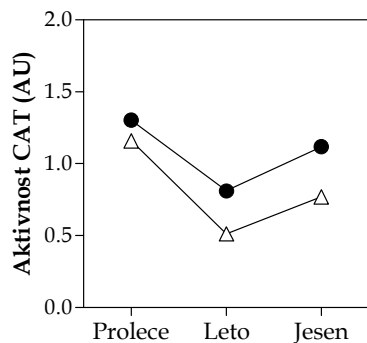
Na nativnim PAGE gelovima identifikovane su tri izoforme antioksidativniog enzima katalaze (CAT) u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista *I. pumila* (Slika 4.1.8.). Zbog nedovoljno jasnog razdvajanja izoformi, kvantifikovana je samo ukupna aktivnost ovog enzima. U sva tri godišnja doba, aktivnost katalaze je uvek bila veća u listu *I. pumila* iz populacije Šuma u odnosu na biljke iz populacije Dina (Slika 4.1.9.).



SLIKA 4.1.8. Sezonsko variranje izoformi CAT u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma. Legenda: D - smeša 10 genotipova iz populacije Dina, Š - smeša 10 genotipova iz populacije Šuma. Izoforma 1 je veće molekulske mase, u odnosu na izoforme 2 i 3.

Merenjem specifične aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, CAT i POD na različitim temperaturama (15, 20, 30, 40, 50°C) omogućilo je utvrđivanje uticaja temperature na aktivnost ovih enzima u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista biljaka populacija Dina i Šuma (Slika 4.1.10.). Pokazalo se da je aktivnost SOD i CAT na svim temperaturama bila veća kod biljaka koje nastanjuju zasenčeno stanište nego kod onih sa otvorenog staništa. Suprotno tome, aktivnost POD je bila veća u listu biljaka iz populacije Dina u poređenju sa populacijom Šuma. Temperaturni optimum ovih enzima je bio sličan kod biljaka iz obe populacije i iznosio 40°C za SOD i 30°C za CAT. Temperaturni optimum za aktivnost POD nije utvrđen jer je aktivnost ovog enzima rasla sa porastom temperature kod biljaka iz oba svetlosna staništa (Slika 4.1.10.).

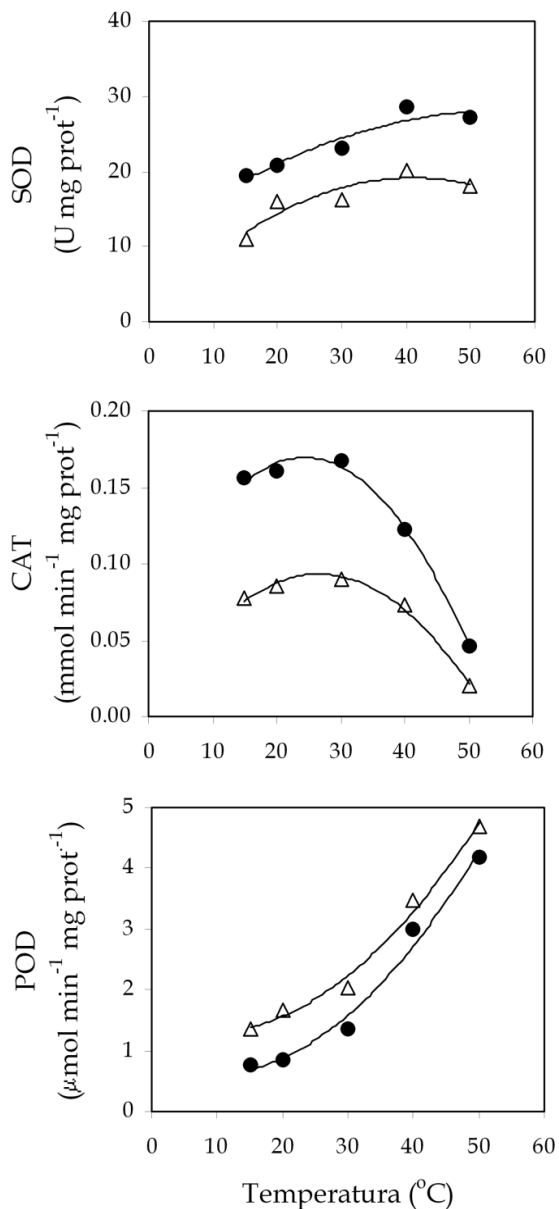
Aktivaciona energija SOD je bila neznatno veća kod biljaka iz populacije Dina u poređenju sa biljkama populacije Šuma ($E_a = 14.9$ kJ vs. 11.4 kJ), dok je aktivaciona energija CAT imala dvostruko veću vrednost kod biljaka iz dinske populacije u poređenju sa onim iz šumske ($E_a = 6.8$ kJ vs. 3.2 kJ, Dina vs. Šuma). Pošto je brzina hemijske reakcije obrnuto proporcionalna veličini aktivacione



SLIKA 4.1.9. Grafički prikaz sezonske dinamike aktivnosti CAT u listu *I. pumila* iz populacija Dina (Δ) i Šuma (●) nakon kvantifikacije sa nativnih PAGE gelova. Vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).

energije - E_a , niska aktivaciona energija CAT u listovima koji su rasli u senci ukazuje na veliku brzinu katalitičke reakcije ovog enzima kod šumskih klonova (Lehninger, 1982; Hochachka i Somero, 2002). Nasuprot katalazi, aktivaciona energija POD bila je znatno veća kod biljaka koje naseljavaju šumsku senku u poređenju sa biljkama sa otvorenog staništa ($E_a = 40.6$ kJ vs. 27.6 kJ, Dina vs. Šuma). Visoka E_a , mala brzina katalitičke reakcije i zadržavanje aktivnosti i na visokim temperaturama, omogućavaju ovom enzimu aktivnost u

širokom temperaturnom opsegu (Trasar-Cepeda i sar, 2007). Nivo temperaturnih krivih enzima SOD i CAT bio je viši kod biljaka sa zasenčenog staništa nego kod biljaka koje su rasle na otvorenom. Multivarijantnom



SLIKA 4.1.10. Krive temperaturne zavisnosti specifične aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, CAT i POD u listu *I. pumila* poreklom iz populacije Dina (Δ) i Šuma (●) (Vuleta i Tucić, 2009).

analizom varijanse sa ponavljanjem utvrđeno je da su se krive odgovora CAT razlikovale u nivou („between subjects“ efekat - populacija: $F = 165.8$, $df = 1$, $P = 0.006$) između populacija Dina i Šuma, dok im je oblik bio sličan („within subject“ efekat - temperatura x populacija: $F = 2.16$, $df = 4$, $P = 0.165$). Krive temperaturnog odgovora POD razlikovale su se i u nivou („between subjects“ efekat - populacija: $F = 365.9$, $df = 1$, $P = 0.0027$) i u obliku („within subject“ efekat - temperatura x populacija: $F = 76.8$, $df = 4$, $P < 0.0001$) između biljaka iz dinske i šumske populacije. Analizom aktivnosti ovih enzima u listu biljaka *I. pumila* poreklom iz dve prirodne populacije sa alternativnih svetlosnih staništa, koje su gajene u sredinski kontrolisanim uslovima sobe za rast biljaka, nisu detektovane razlike u nivoima aktivnosti

između populacija, što ukazuje da su značajno različiti nivoi termalnih krivih utvrđenih kod biljaka u njihovim prirodnim životnim sredinama posledica aklimatizacije biljaka na nestabilnost ekoloških uslova, karakterističnu za prirodna staništa (Vuleta i Tucić, 2009). Dakle, u slučaju *I. pumila* proces aklimatizacije se odvijao povećanjem količine enzima SOD, CAT, i POD u ćelijama, a ne promenom njihovih kinetičkih svojstava (Hull i sar, 1997; Hochachka i Somero, 2002; Peltzer i sar, 2002).

4.1.2 Sezonsko variranje morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista u populacijama *I. pumila* sa otvorenog i zasenčenog staništa

U Tabelama 4.1.4. A i B prikazane su srednje vrednosti, standardne devijacije i koeficijenti varijacije morfoloških, anatomskih i fizioloških osobina lista u populacijama *I. pumila* sa otvorenog i zasenčenog staništa. Tokom cele vegetacione sezone, srednje vrednosti SLA su bile veće kod biljaka koje su rasle u šumi, u poređenju sa biljkama sa otvorenog staništa, dok je suprotan trend uočen za količinu suve materije u listu, LDMC. Količina vode u listu -LWC bila je nešto viša kod biljaka iz populacije Šuma nego kod biljaka iz populacije Dina. U obe populacije najveće vrednosti za LWC utvrđene su u jesen, u poređenju sa druga dva godišnja doba (Tabele 4.1.4. A i B). Kao i apsolutni sadržaj vode u listu, relativni sadržaj vode – RWC bio je nešto viši kod klonova *I. pumila* koji su rasli u vegetacionoj senci, osim u jesen, kada je bio viši u listovima biljaka sa otvorenog staništa. U leto, RWC je imao minimalnu vrednost u populaciji Dina, a maksimalnu u populaciji Šuma (Tabele 4.1.4. A i B).

TABELA 4.1.4. A. Sezonsko variranje osobina lista *I. pumila* kod biljaka iz populacije Dina. n = veličina uzorka, \bar{X} = srednje vrednosti, SD = standardna devijacija i CV = koeficijent varijacije (%). Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PROLEĆE ($n = 17$)			LETO ($n = 17$)			JESEN ($n = 22$)		
	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV
SLA	164.12	13.51	8.2	160.15	11.87	7.4	193.46	19.92	10.3
SD	67.98	8.66	12.7	81.67	8.08	9.9	91.60	15.90	17.4
LDMC	0.20	0.02	9.8	0.19	0.01	7.0	0.18	0.02	9.3
RWC	86.0	5.59	6.5	83.78	3.11	3.7	89.60	4.27	4.8
SU	0.02	2×10^{-3}	8.8	0.03	4×10^{-3}	14.9	0.02	2×10^{-3}	9.4
LWC	0.80	0.02	2.5	0.81	0.01	1.6	0.82	0.02	2.1
Chl a	17.22	4.64	26.9	10.83	2.52	23.3	17.73	2.87	16.2
Chl b	5.70	2.37	41.6	4.10	0.88	21.3	6.09	1.56	25.6
Chl ukupni	22.92	6.90	30.0	14.94	3.39	22.7	23.82	4.41	18.5
Chl a:b	3.14	0.40	12.6	2.63	0.10	3.7	2.98	0.31	10.3
Cars	4.47	1.36	30.5	3.25	0.69	21.1	3.96	0.76	19.2

TABELA 4.1.4. B. Sezonsko variranje osobina lista *I. pumila* kod biljaka iz populacije Šuma. n = veličina uzorka, \bar{X} = srednje vrednosti, SD = standardna devijacija i CV = koeficijent varijacije (%). Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PROLEĆE ($n=9$)			LETO ($n=15$)			JESEN ($n=15$)		
	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV
SLA	212.43	15.88	7.5	244.45	25.90	10.6	241.88	24.78	10.3
SD	69.56	9.75	14.0	73.32	10.62	14.5	78.33	19.44	24.8
LDMC	0.17	0.02	10.9	0.17	0.01	7.4	0.15	0.01	6.6
RWC	84.69	6.09	7.2	86.58	4.13	4.8	85.30	2.50	2.9
SU	0.02	2×10^{-3}	11.9	0.02	2×10^{-3}	9.5	0.02	1×10^{-3}	6.7
LWC	0.83	0.02	2.2	0.83	0.01	1.5	0.85	0.01	1.1
Chl a	10.47	3.10	29.6	11.40	1.73	15.2	13.35	2.48	18.5
Chl b	3.08	0.86	28.1	4.16	0.65	15.6	4.17	0.93	22.3
Chl ukupni	13.54	3.95	29.2	15.56	2.37	15.2	17.52	3.38	19.3
Chl a:b	3.39	0.20	5.9	2.74	0.09	3.2	3.23	0.23	22.1
Cars	2.17	0.65	29.8	2.60	0.42	16.0	2.79	0.62	23.6

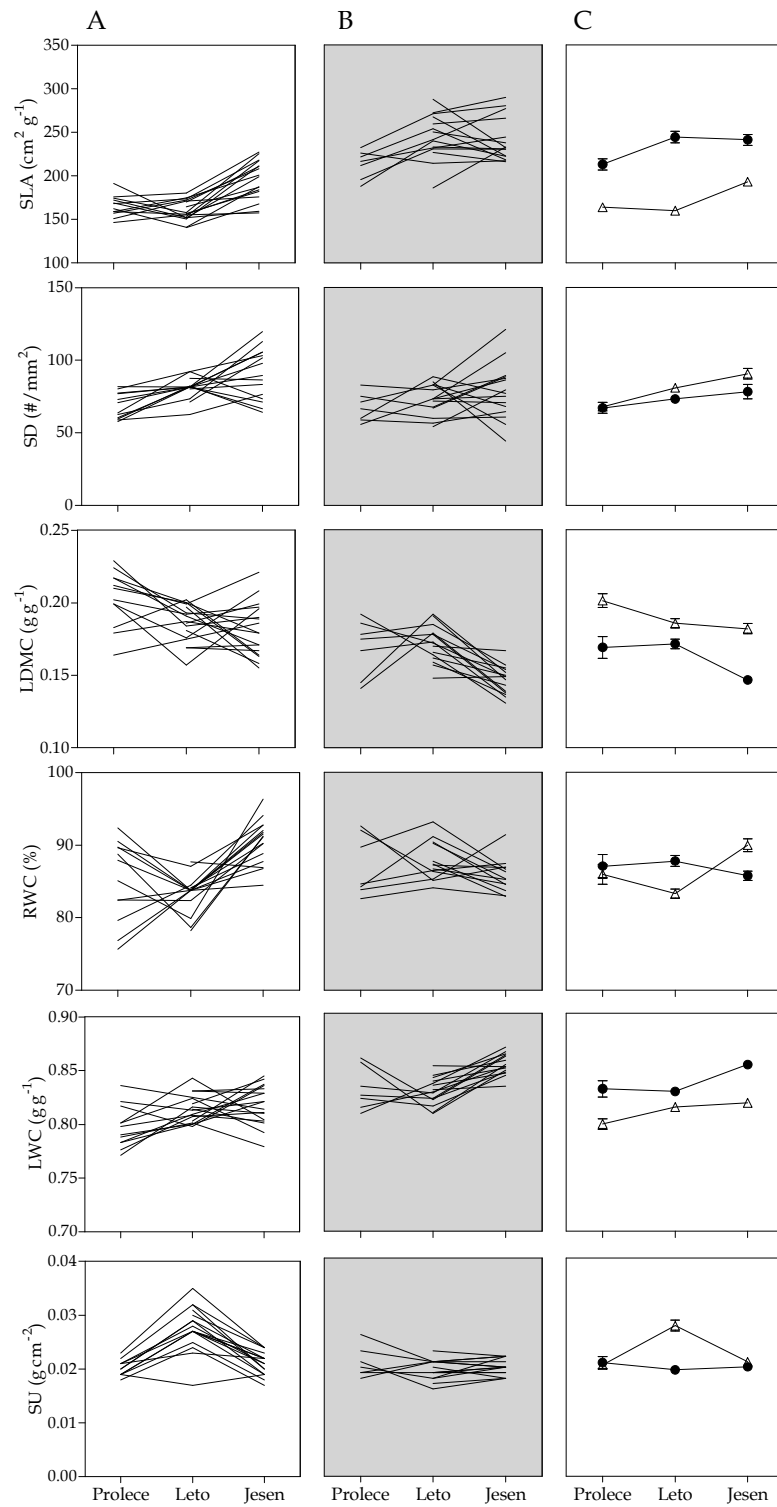
Tokom vegetacione sezone sukulentnost lista - SU bila je relativno slična u obe populacije, sa izuzetkom leta, kada je u populaciji sa otvorenog staništa dostigla maksimalnu vrednost od 0.028, dok je u šumskoj pala na minimum ($SU = 0.019$). Gustina stoma - SD kontinuirano se povećavala od proleća do jeseni, pri čemu je njihov broj po jedinici površine bio viši, sa izuzetkom proleća, u dinskoj u poređenju sa šumskom populacijom (Tabele 4.1.4. A i B).

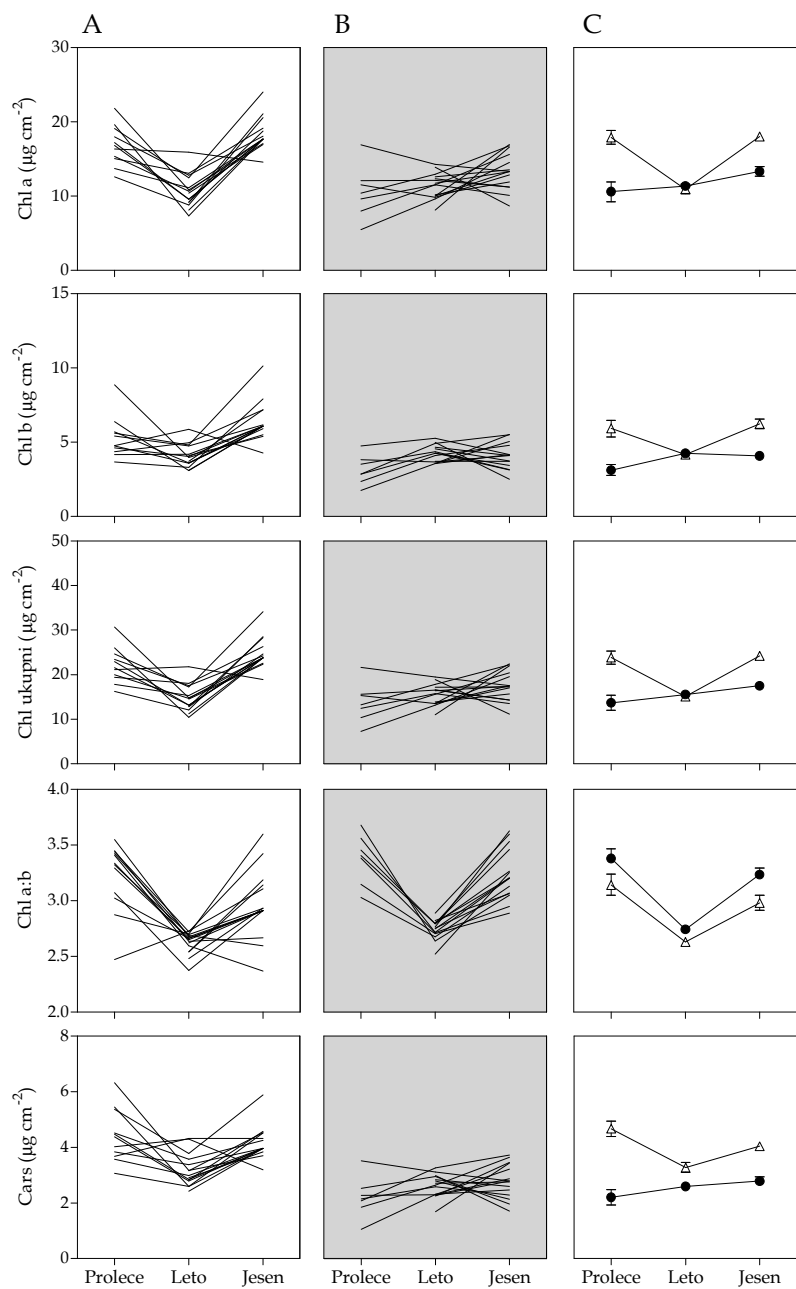
Obrazac sezonskih promena fizioloških osobina, Chl a, Chl b i Cars, se takođe razlikovao između populacija Dina i Šuma tokom vegetacione sezone (Tabele 4.1.4. A i B). U listovima dinskih klonova, prosečne vrednosti količine fotosintetičkih pigmenata su bile slične u proleće i jesen, dok je tokom leta došlo do značajnog smanjenja njihovih vrednosti. Međutim, u listovima biljaka šumske populacije prosečne vrednosti količine fotosintetičkih pigmenata kontinuirano su se povećavale od proleća do jeseni, sa izuzetkom odnosa između hlorofila a i hlorofila b, koji je u toku leta bio na minimumu (Tabela 4.1.4. B; Slika 4.1.11.). Utvrđeno je da su individualne razlike između klonova ($CV\%$) bile uočljivo veće za fiziološke osobine u odnosu na morfološke i anatomske, dok je individualno variranje tokom vegetacione sezone bilo

izrazitije u proleće i jesen u poređenju sa letom, u obe populacije (Tabele 4.1.4. A i B; Slika 4.1.11.).

Rezultati analize MANOVAR (analiza profila) morfoloških, anatomskih i fizioloških osobina lista *I. pumila* kod klonova dve prirodne populacije, Dina i Šuma, dati su u Tabelama 4.1.5. i 4.1.6. Testiranje hipoteze o „nivou“ („between subjects“ efekat: populacija) je pokazalo da su se tokom cele vegetacione sezone srednje vrednosti većine analiziranih osobina (SLA, LDMC, LWC, SU, Chl a, Chl b, Chl ukupni i Cars) statistički značajno razlikovale između populacija sa otvorenog i zasenčenog staništa, dok za srednje vrednosti RWC, SD i Chl a:b nisu uočene statistički značajne razlike (Tabela 4.1.5. A). Test „jednoličnosti“ („within subject“ efekat), ukazuje da se oblik krivih za sve posmatrane osobine lista *I. pumila* statistički značajno menjao tokom cele vegetacione sezone (efekat sezone) u oba svetlosna staništa (Tabela 4.1.5. B), ali i da je bio statistički značajno različit između populacija Dina i Šuma za većinu analiziranih osobina, sa izuzetkom gustine stoma - SD i sukulenosti - SU (Test „paralelizma“: efekat interakcije populacija x sezona; Tabela 4.1.5. B).

Testiranje kontrasta pojedinačnim analizama varijansi (Tabela 4.1.6) pokazalo je da se prosečne vrednosti hlorofila a, ukupnog hlorofila, SLA i SU statistički značajno razlikuju kako između sezona, tako i između dve posmatrane prirodne populacije *I. pumila*. Između proleća i leta, prosečne vrednosti SD, LDMC i RWC se značajno menjaju, a krive odgovora su paralelne između biljaka iz populacije Dina i Šuma; između leta i jeseni se ne uočava promena u prosečnim vrednostima ovih osobina iako postoji među-populaciona razlika. U okviru obe populacije, u periodu između proleća i leta, prosečne vrednosti LWC, količine Chl b i Cars se nisu razlikovale, dok su se između leta i jeseni značajno promenile. Nagibi krivih odgovora ovih osobina su se razlikovali između populacija sa otvorenog i zasenčenog staništa tokom cele vegetacione sezone.





SLIKA 4.1.11. Norme reakcije za funkcionalne osobine lista *I. pumila* iz populacija Dina (A) i Šuma (B) i njihove prosečne vrednosti sa standardnim greškama (C). Objašnjenje simbola: Δ - populacija Dina, \bullet - populacija Šuma. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

TABELA 4.1.5. A. Multivarijantna analiza varijanse sa ponavljanjima (analiza profila) morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista biljaka *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma tokom proleća, leta i jeseni. Testiranje statističke značajnosti izvora variranja između subjekta. df = stepeni slobode, MS = prosek kvadrata, F = F-odnos, P = statistička značajnost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

IZMEĐU					
SUBJEKATA	IZVOR VARIRANJA	df	MS	F	P
SLA	Populacija	1	1.27	90.80	0.0001
	Greška	18	0.01		
SD	Populacija	1	0.01	0.25	0.6251
	Greška	12	0.05		
LDMC	Populacija	1	0.01	54.20	0.0001
	Greška	18	2×10 ⁻⁴		
RWC	Populacija	1	2.79	0.21	0.6514
	Greška	12	12.99		
SU	Populacija	1	7×10 ⁻⁵	6.05	0.0243
	Greška	18	1×10 ⁻⁵		
LWC	Populacija	1	0.01	56.70	0.0001
	Greška	19	2×10 ⁻⁴		
Chl a	Populacija	1	200.90	25.90	0.0001
	Greška	19	7.76		
Chl b	Populacija	1	25.21	11.40	0.0031
	Greška	19	2.20		
Chl ukupni	Populacija	1	335.60	17.70	0.0005
	Greška	19	18.99		
Chl a:b	Populacija	1	0.01	0.02	0.8775
	Greška	19	0.41		
Cars	Populacija	1	26.08	35.30	0.0001
	Greška	19	0.74		

TABELA 4.1.5. B. Multivarijantna analiza varijanse sa ponavljanjima (analiza profila) morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista tokom proleća, leta i jeseni kod biljaka *I. pumila* koje naseljavaju otvoreno i zasenčeno stanište. Testiranje statističke značajnosti izvora variranja unutar subjekta. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

UNUTAR SUBJEKTA	SEZONA × POPULACIJA				SEZONA			
	Brojilac/				Brojilac/			
	<i>Wilks</i> λ	Imenilac df	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>Wilks</i> λ	Imenilac df	<i>F</i>	<i>P</i>
SLA	0.514	2/17	8.02	0.0035	0.329	2/17	17.40	0.0001
SD	0.834	2/11	1.10	0.3678	0.546	2/11	4.58	0.0358
LDMC	0.583	2/17	6.08	0.0102	0.489	2/17	8.88	0.0023
RWC	0.305	2/11	12.50	0.0015	0.358	2/11	9.85	0.0035
SU	0.415	2/17	12.00	0.0006	0.522	2/17	7.77	0.0040
LWC	0.534	2/18	7.85	0.0035	0.391	2/18	14.00	0.0002
Chl a	0.382	2/18	14.60	0.0002	0.353	2/18	16.50	0.0001
Chl b	0.598	2/18	6.05	0.0098	0.677	2/18	4.30	0.0298
Chl ukupni	0.455	2/18	10.80	0.0008	0.420	2/18	12.40	0.0004
Chl a:b	0.920	2/18	0.78	0.4722	0.363	2/18	15.80	0.0001
Cars	0.567	2/18	6.88	0.0060	0.737	2/18	3.21	0.0644

TABELA 4.1.6. Analiza varijanse za svaki kontrast izvora variranja unutar subjekta u populacijama *I. pumila* koje naseljavaju različita svetlosna staništa. df = stepeni slobode, MS = prosek kvadrata, F = F-odnos, P = statistička značajnost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

		VARIJABLA KONTRASTA							
		PROLEĆE - LETO				LETO - JESEN			
IZVOR	VARIRANJA	df	MS	F	P	df	MS	F	P
SLA	Srednja vrednost	1	0.05	4.32	0.0521	1	0.18	16.10	0.0008
	Populacija	1	0.11	9.87	0.0056	1	0.17	14.80	0.0012
	Greška	18	0.01			18	0.01		
SD	Srednja vrednost	1	0.23	7.19	0.0200	1	0.01	0.33	0.5761
	Populacija	1	0.04	1.15	0.3039	1	0.02	0.41	0.5322
	Greška	12	0.03			12	0.04		
LDMC	Srednja vrednost	1	4x10 ⁻³	14.60	0.0012	1	6x10 ⁻⁴	2.73	0.1161
	Populacija	1	2x10 ⁻⁴	0.76	0.3944	1	2x10 ⁻³	11.40	0.0034
	Greška	18	3x10 ⁻⁴			18	2x10 ⁻⁴		
RWC	Srednja vrednost	1	149.20	7.80	0.0163	1	42.18	2.95	0.1117
	Populacija	1	56.55	2.96	0.1112	1	158.60	11.10	0.0060
	Greška	12	19.13			12	14.31		
SU	Srednja vrednost	1	2x10 ⁻⁴	12.90	0.0021	1	2x10 ⁻⁴	16.20	0.0008
	Populacija	1	3x10 ⁻⁴	21.90	0.0002	1	2x10 ⁻⁴	24.20	0.0001
	Greška	18	1x10 ⁻⁵			18	1x10 ⁻⁵		
LWC	Srednja vrednost	1	4x10 ⁻⁴	1.03	0.3218	1	0.01	22.90	0.0001
	Populacija	1	2x10 ⁻³	4.76	0.0420	1	5x10 ⁻³	15.50	0.0009
	Greška	19	4x10 ⁻⁴			19	3x10 ⁻⁴		
Chl a	Srednja vrednost	1	91.35	7.51	0.0130	1	450.20	33.80	0.0001
	Populacija	1	354.40	29.10	0.0001	1	105.20	7.89	0.0112
	Greška	19	12.17			19	13.33		
Chl b	Srednja vrednost	1	0.01	0.00	0.9575	1	27.20	8.86	0.0078
	Populacija	1	27.91	9.36	0.0064	1	16.98	5.53	0.0296
	Greška	19	2.98			19	3.07		
Chl ukupni									
	Srednja vrednost	1	151.30	5.83	0.0260	1	698.70	24.30	0.0001
	Populacija	1	510.30	19.7	0.0003	1	206.70	7.20	0.0147
	Greška	19	25.94			19	28.72		
Chl a:b	Srednja vrednost	1	0.75	1.96	0.1779	1	3.86	20.90	0.0002
	Populacija	1	0.60	1.57	0.2249	1	0.12	0.66	0.4276
	Greška	19	0.38			19	0.18		
Cars	Srednja vrednost	1	2.48	2.36	0.1411	1	5.32	6.15	0.0227
	Populacija	1	15.27	14.50	0.0012	1	1.10	1.27	0.2734
	Greška	19	1.05			19	0.87		

4.1.3 *Kvantifikovanje fenotipske plastičnosti osobina lista I. pumila: unutar-populaciona i među-populaciona sezonska dinamika*

Ukupnost fenotipova koje može ostvariti jedan genotip pod različitim uslovima životne sredine označava se kao norma reakcije (Schmalhausen, 1949, Sultan, 1987; DeWitt i Scheiner, 2004). Veličina fenotipske promene koja je ostvarena kod pojedinačnih karakteristika određenog genotipa, a koja je nastala kao odgovor na promenu ekoloških uslova, predstavlja meru plastičnosti date osobine (Bradshaw, 1965). Konceptija fenotipske plastičnosti u različitim oblastima biologije razmatra se na različite načine. Iako se naučnici u načelu slažu da je fenotipska plastičnost jedan od načina na koji se organizmi usaglašavaju sa promenom ekoloških uslova u njihovim životnim sredinama, evolucionari biologije fenotipsku plastičnost posmatraju kroz uticaj koji ona ima na genetičku varijabilnost i individualnu adaptivnu vrednost unutar populacija, ekofiziolozi se bave aspektom koji se odnosi na toleranciju stresa (tj. sub- ili supra-optimalnih uslova životne sredine), dok je za razvojne biologe fenotipska plastičnost posledica uticaja različitih činilaca životne sredine na razviće (osobina) organizama (Dudley, 2004).

Na Slikama 4.1.1. i 4.1.11. prikazane su norme reakcije osobina lista pojedinačnih genotipova iz populacija Dina i Šuma *I. pumila* tokom jedne vegetacione sezone. Jasno se može uočiti da je sezonska dinamika obrazaca svih ispitivanih osobina specifična za svaku posmatranu osobinu, kao i za svaku posmatranu populaciju. Složen obrazac sezonskog variranja za većinu osobina lista, sa ukrštenim normama reakcije i velikom varijansom, ukazuje na genetičku varijabilnost za plastičnost i evolucionari potencijal plastičnog odgovora biljaka obe populacije na sezonske promene u staništu. Relativno paralelne norme reakcija utvrđene su za aktivnost antioksidativnih enzima i neke fiziološke osobine (SU i fotosintetičke pigmente) kod biljaka obe populacije. Smatra se da se uniformne i konvergentne norme reakcije javljaju za

osobine koje direktno doprinose prilagođavanju na ograničavajuće faktore sredine (Sultan i Bazzaz, 1993; Pemac i Tucić, 1998).

U ekološkom kontekstu, veoma je značajan način kvantitativne procene fenotipske promene izazvane sredinskim uslovima, jer od toga zavise ekološke i evolucione implikacije fenotipske plastičnosti (Valladares i sar, 2006). U našoj studiji koristili smo indeks plastičnosti, PI_v , po Valladares i saradnicima (2006), koji se pokazao kao najpodesniji za poređenje plastičnosti kako između funkcionalnih osobina, tako i između grupa funkcionalno povezanih osobina. Pošto se fenotipske osobine mogu razlikovati ne samo usled dejstva različitih ekoloških faktora životne sredine, već mogu biti i posledica različite ontogenetske faze u kojoj se biljka nalazi (Evans, 1972; Valladares i sar, 2007), za kvantifikovanje fenotipske plastičnosti tokom tri godišnja doba (proleća, leta i jeseni) u jednoj populaciji *I. pumila* sa otvorenog i drugoj populaciji sa zasenčenog staništa koristili smo poslednji i pretposlednji potpuno razvijen list sa svakog od analiziranih klonova. Radi utvrđivanja uticaja sezone na dinamiku fenotipske plastičnosti, određeni su indeksi fenotipske plastičnosti, PI , između proleća i leta (PI_{P-L}), kao i između leta i jeseni (PI_{L-J}).

Tabele 4.1.7. A i B prikazuju srednje vrednosti i koeficijente varijacije indeksa plastičnosti morfološko-anatomske (SLA, LDMC, SD), fiziološke (fotosintetički pigmenti, RWC, LWC, SU) i biohemijske (enzimski i neenzimski antioksidanti) osobina lista biljaka *I. pumila* iz populacije Dina i populacije Šuma, između sukcesivnih godišnjih doba. Zapaženo je da su svetlosni uslovi staništa uticali na fenotipsku ekspresiju svih karakteristika lista u obe prirodne populacije *I. pumila*. Prosečan nivo fenotipske plastičnosti zavisio je kako od ekoloških karakteristika staništa, tako i od analizirane osobine. Generalno, listovi klonova sa otvorenog staništa imali su veće vrednost PI , u odnosu na listove šumskih klonova. Ovaj rezultat je posledica znatno veće amplitude variranja sredinskih uslova između sezona na otvorenom, u odnosu na šumsko stanište. Najveće vrednosti indeksa plastičnosti detektovane su za antioksidativne enzime između proleća i leta u obe populacije (Tabele 4.1.7.

A i B). Manje prosečne vrednosti plastičnosti izmerene su za neenzimske antioksidante i fotosintetičke pigmente, a najmanje plastičan odgovor uočen je za morfološko-anatomske i fiziološke osobine lista kod biljaka sa oba staništa. Unutar-populacione razlike između PI_{P-L} i PI_{L-J} utvrđene su Wilcoxon-ovim

TABELA 4.1.7. A. Indeksi fenotipske plastičnosti između sezona, PI_{P-L} (proleće - leto) i PI_{L-J} (leto - jesen), prosečna plastičnost tokom cele vegetacione sezone, PI_P , i njihovi koficijenti varijacije (CV%) za morfološke, fiziološke i biohemijske osobine lista *I. pumila* kod biljaka iz populacije Dina. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PI_{P-L}	CV_{P-L}	PI_{L-J}	CV_{L-J}	PI_P	CV_P
SOD	0.820	7.5	0.256	38.7	0.538	74.1
APX	0.293	39.5	0.474	19.8	0.384	33.4
CAT	0.438	29.4	0.251	35.9	0.345	38.4
GR	0.760	7.9	0.169	51.7	0.465	90.0
POD	0.196	65.2	0.220	55.6	0.208	8.2
PHEN	0.342	22.4	0.449	26.3	0.396	19.1
ANTH	0.249	57.1	0.068	73.5	0.159	80.7
OSI	0.509	37.8	0.403	52.7	0.456	16.4
MDA	0.427	29.4	0.353	45.6	0.390	13.4
SLA	0.079	49.3	0.182	47.2	0.131	55.8
SD	0.217	36.3	0.240	27.2	0.229	7.1
LDMC	0.082	38.5	0.102	65.3	0.092	15.4
RWC	0.065	47.3	0.112	38.4	0.089	37.6
SU	0.275	12.5	0.251	29.5	0.263	6.5
LWC	0.023	51.5	0.025	66.1	0.024	5.9
Chl a	0.372	40.1	0.409	29.8	0.391	6.7
Chl b	0.281	65.3	0.388	32.2	0.335	22.6
Chl ukupni	0.341	48.5	0.390	35.0	0.366	9.5
Chl a:b	0.201	20.3	0.145	53.5	0.173	22.9
Cars	0.291	52.2	0.260	42.2	0.276	8.0

TABELA 4.1.7. B. Indeksi fenotipske plastičnosti između sezona, PI_{P-L} (proleće - leto) i PI_{L-J} (leto - jesen), prosečna plastičnost tokom cele vegetacione sezone, PI_P , i njihovi koficijenti varijacije ($CV\%$) za morfološke, fiziološke i biohemijske osobine lista *I. pumila* kod biljaka iz populacije Šuma. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PI_{P-L}	CV_{P-L}	PI_{L-J}	CV_{L-J}	PI_P	CV_P
SOD	0.877	6.0	0.307	44.9	0.592	68.1
APX	0.229	47.7	0.489	51.0	0.359	51.2
CAT	0.265	55.1	0.401	27.3	0.333	28.9
GR	0.731	9.7	0.348	65.3	0.540	50.2
POD	0.734	10.9	0.454	37.6	0.594	33.3
PHEN	0.190	38.4	0.477	48.8	0.334	60.9
ANTH	0.130	60.1	0.074	71.4	0.102	38.8
OSI	0.675	31.9	0.507	51.1	0.591	20.1
MDA	0.277	49.0	0.153	77.4	0.215	40.8
SLA	0.110	32.7	0.048	75.6	0.079	55.5
SD	0.202	45.4	0.164	55.6	0.183	14.7
LDMC	0.125	58.1	0.192	21.5	0.159	29.9
RWC	0.043	52.7	0.034	58.4	0.039	16.5
SU	0.112	34.4	0.060	62.8	0.086	42.8
LWC	0.024	81.3	0.040	24.3	0.032	35.4
Chl a	0.202	41.4	0.202	37.8	0.202	0.1
Chl b	0.311	41.1	0.217	40.8	0.264	25.2
Chl ukupni	0.169	52.8	0.168	24.2	0.169	0.4
Chl a:b	0.172	28.2	0.130	39.5	0.151	19.7
Cars	0.204	44.7	0.223	43.0	0.214	6.3

testom rangova (Tabela 4.1.8). Statistički značajna razlika između PI_{P-L} i PI_{L-J} uočena je kod svih antioksidativnih enzima, kod biljaka obe populacije, izuzev za POD kod biljaka iz populacije Dina. Plastični odgovori neenzimskih antioksidanata na sezonske promene uslova sredine takođe su se razlikovali kod biljaka obe populacije, izuzev količine antocijana kod biljaka iz populacije Šuma. Za većinu morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista, kod biljaka

iz populacije Dina nije uočena statistički značajna razlika u plastičnosti između sezona, osim za SLA. Nasuprot tome, kod biljaka iz populacije Šuma statistički značajna razlika između PI_{P-L} i PI_{L-J} uočena je kod većeg broja morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista, uključujući količinu fenola, SLA, LDMC, LWC i SU. Razlike u plastičnosti osobina na među-populacionom nivou

TABELA 4.1.8. Statistička značajnost razlika u veličini indeksa plastičnosti PI_{P-L} (proleće - leto), PI_{L-J} (leto - jesen) i PI_P (prosečna plastičnost tokom cele sezone) između populacija Dina i Šuma, kao i značajnosti među-populacionih razlika u indeksima plastičnosti tokom istih sezona. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ms = $0.05 < P < 0.10$ (marginalna značajnost), ns = neznačajno. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	PI_{P-L} vs. PI_{L-J}		DINA vs. ŠUMA		
	DINA	ŠUMA	PI_{P-L}	PI_{L-J}	PI_P
SOD	**	**	*	ns	ns
APX	**	*	ms	ns	ns
CAT	**	ms	*	**	ns
GR	***	**	ns	*	ns
POD	ns	**	***	**	***
PHEN	ms	*	***	ns	ns
ANTH	*	ns	*	ns	ms
OSI	ns	ns	ms	ns	*
MDA	ns	ms	*	*	**
SLA	**	**	ms	**	*
SD	ns	ns	ns	ns	ms
LDMC	ns	*	ns	**	**
RWC	ms	ns	ns	**	**
SU	ns	*	***	***	***
LWC	ns	*	ns	*	ns
Chl a	ns	ns	*	***	***
Chl b	ns	ns	ns	**	ns
Chl ukupni	ns	ns	*	***	***
Chl a:b	ms	ns	ns	ns	ns
Cars	ns	ns	ns	ns	ns

testirane su Wilcoxon Mann Whitney-jevim testom (Tabela 4.1.8). Poređenjem indeksa plastičnosti PI_{P-L} fenotipskih osobina između populacija Dina i Šuma utvrđena je statistički značajna razlika za sve antioksidante (osim enzima GR), količinu ukupnog hlorofila i SU, dok za morfološke i anatomske osobine nije utvrđena razlika u nivou plastičnih odgovora. Testiranje razlika PI_{L-J} između dinskih i šumskih klonova pokazalo je da se značajne razlike javljaju za CAT, GR i POD, količinu fotosintetičkih pigmenata, ali ne i za neenzimske antioksidanate. Takođe, značajna razlika je

utvrđena za sve morfološke i fiziološke osobine (osim Cars i Chl a:b; Tabela 4.1.8).

Plastičnost osobina lista odabranih dinskih klonova, izazvana smanjenjem kvantiteta svetlosti, ali neizmenjenog odnosa R/FR, ispitivana je za: specifičnu aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, APX, CAT, GR, POD), količinu neenzimskih antioksidanata (antocijana i fenola) i morfološko-anatomske osobine (SLA i SD). Indeksi plastičnosti i koeficijenti varijacije plastičnosti analiziranih osobina lista su prikazani u Tabeli 4.1.9 (Vuleta i sar, 2011). Najviše vrednosti indeksa plastičnosti, PI , i najveće individualne razlike, CV_{PL} , antioksidativnih enzima utvrđene su za

TABELA 4.1.9. Prosečne vrednosti indeksa plastičnosti PI_{o-s} (otvoreno - senka) i koeficijenti varijacije ($CV\%$) osobina lista *I. pumila* utvrđenih između rameta istog klona formiranih pod punim i smanjenim intenzitetom svetlosti (ispod PVC mreže) na otvorenom staništu u Deliblatskoj peščari.

	PI_{o-s}	CV
SOD	0.195	43.3
APX	0.317	18.4
CAT	0.172	38.4
GR	0.152	36.8
POD	0.693	77.8
PHEN	0.189	65.2
ANTH	0.604	8.3
SLA	0.219	77.7
SD	0.189	72.6

peroksidaze III klase, dok su najniža plastičnost i umerene individualne razlike između plastičnih odgovora detektovane za superoksid dismutazu, katalazu i glutation reduktazu. Neenzimski antioksidanti, fenoli i antocijani, ispoljavali su inverzan odnos između veličine plastičnosti i CV_{PL} . Dok je procenjena prosečna vrednost PI za fenole bila niska, a CV_{PL} visok, količina antocijana je bila vrlo plastična između sezona, sa izrazito niskim individualnim razlikama (Tabeli 4.1.9.). Prosečna plastičnost morfološko-anatomske osobina, PI , bila je relativno niska, dok su individualne razlike u plastičnosti, CV_{PL} , ispoljavale vrlo visoku vrednosti.

4.1.4 Fenotipska integracija lista I. pumila: unutar-populaciono i među-populaciono sezonsko variranje

Koncepcija fenotipske integracije se zasniva na činjenici da su fenotipske osobine koje čine deo određene funkcionalne celine (ili modula) nekog organizma uzajamno korelisane. Kao kvantitativna mera integrisanosti fenotipskih modula koriste se različiti koeficijenti, čije je izračunavanje bazirano na kovarijacionim ili korelacionim matricama. Veći broj korelacija ukazuje na veći stepen integrisanosti fenotipa ili modula u okviru fenotipa.

U ovoj studiji stepen fenotipskih asocijacija između parova osobina lista unutar populacije Dina i populacije Šuma procenjen je na osnovu veličine Pearson-ovog koeficijent korelacije (Prilog 1). Veličina, znak (pozitivan ili negativan) i broj statistički značajnih korelacija fenotipskih osobina bio je specifičan za svaku sezonu i populaciju. Tokom proleća, broj fenotipskih korelacija zavisio je od svetlosnog staništa biljaka. Kod biljaka iz dinske populacije utvrđeno je više korelacija (ukupno 17: 12 pozitivnih i 5 negativnih) nego kod biljaka iz šumske populacije (ukupno 10: 6 pozitivnih i 4 negativne). U letnjem periodu došlo je do porasta broja značajnih fenotipskih korelacija na 24 (16 pozitivnih i 8 negativnih), kod klonova populacije Dina i 20 (15 pozitivnih i 5 negativnih), kod klonova iz populacije Šuma. U jesenjem periodu ponovo je došlo do smanjenja broja statistički značajnih korelacija na 16 (10 pozitivnih i 6 negativnih), kod biljaka iz populacije Dina i 11 (9 pozitivnih i 2 negativne), kod biljaka iz populacije Šuma. Tokom proleća i leta, najveći stepen integracije u okviru posmatranih grupa osobina, odnosno veći broj korelacija, uočen je za enzimske i neenzimske antioksidante u obe populacije. Manji broj korelacija utvrđen je za fiziološke osobine, a najmanji nivo integracije pokazale su morfološko-anatomske osobine lista kod biljaka iz obe populacije. Tokom sva tri godišnja doba, kod biljaka iz populacije Dina uočen je veći stepen integracija između antioksidanata i fizioloških osobina lista, što je naročito izraženo tokom najstresnijeg, letnjeg perioda.

Tokom vegetacione sezone menjao se ne samo broj fenotipskih korelacija, već i njihov obrazac. Podudarnost parova korelacionih matrica funkcionalno povezanih osobina lista određivana je Mantel-ovim testom unutar svake populacije između sezona, kao i između populacija, u okviru svake sezone. Korelacione matrice fotosintetičkih pigmenata unutar populacije sa otvorenog staništa bile su nepodudarne tokom cele sezone, što ukazuje na različite obrasce korelacija ove grupe fizioloških osobina (Dina: $r_{\text{proleće-let}} = -0.634$, $P = 0.830$ i $r_{\text{leto-jesen}} = 0.163$, $P = 0.493$). Obrasci sezonskih promena morfološko-anatomskih osobina (SLA, LDMC i SD) lista dinskih klonova takođe su bili različiti (Dina: $r_{\text{proleće-let}} = -0.133$, $P = 0.331$ i $r_{\text{leto-jesen}} = -0.554$, $P = 0.667$). Nasuprot tome, sezonski obrasci korelacionih matrica fizioloških osobina (LWC, SU i RWC) biljaka sa otvorenog staništa su bili visoko podudarni (Dina: $r_{\text{proleće-let}} = 0.888$, $P = 0.0001$ i $r_{\text{leto-jesen}} = 0.968$, $P = 0.0001$). Kod biljaka iz populacije Dina, korelacione matrice antioksidanata bile su nepodudarne između proleća i leta, dok su između leta i jeseni njihovi obrasci bili slični (Dina: $r_{\text{proleće-let}} = 0.253$, $P = 0.123$ i $r_{\text{leto-jesen}} = 0.414$, $P = 0.040$). Biljke iz populacije Šuma ispoljile su slične trendove podudarnost korelacionih matrica kao i biljke sa otvorenog staništa. Poređenje matrica svih funkcionalno-povezanih grupa fenotipskih osobina pokazalo je da su podudarne samo matrice fizioloških osobina (Šuma: $r_{\text{proleće-let}} = 0.979$, $P < 0.0001$) između proleća i leta, kao i matrice antioksidanata poređene između leta i jeseni (Šuma: $r_{\text{leto-jesen}} = 0.529$, $P = 0.012$). Slično kao i kod biljaka iz populacije Dina, sve ostale funkcionalno povezane grupe osobina šumskih klonova imale su statistički različite obrasce korelacija. Dobijeni rezultati ukazuju da je mehanizam odgovora na sezonske promene uslova životne sredine kod biljaka *I. pumila* iz obe ispitivane populacije vrlo kompleksan, i obuhvata sve nivoe organizacije lista.

Poređenjem korelacionih matrica funkcionalnih grupa fenotipskih osobina lista između dinske i šumske populacije u okviru svake sezone, korišćenjem Mantel testa, utvrđena je podudarnost između matrica antioksidanata ($r_{\text{dina-šuma}} = 0.600$, $P = 0.009$) i matrica fizioloških osobina

($r_{\text{dina-šuma}} = 0.997, P < 0.0001$) u prolećnom periodu, matrica fizioloških osobina u leto ($r_{\text{dina-šuma}} = 0.823, P < 0.0001$) i strukturnih osobina u jesen ($r_{\text{dina-šuma}} = 0.748, P < 0.0001$). *P*-vrednosti koeficijenta korelacije Mantel testa veće od 0.05 za ostale funkcionalno-povezane grupe osobina između populacija *I. pumila* iz različitih svetlosnih staništa ukazuju na statistički značajno različite obrasce njihovih korelacionih matrica. U prolećnom periodu, kada su uslovi staništa najpovoljniji za rast i cvetanje *I. pumila* matrice antioksidanata bile su podudarne između biljaka iz populacije Dina i Šuma. Podudarnost korelacionih matrica osobina koje su pokazatelji vodnog statusa biljke tokom cele vegetacione sezone ukazuju da se biljke obe populacije i u povoljnom - prolećnom periodu, kao i tokom stresnog - letnjeg perioda na sličan način usaglašavaju sa temporalnom dinamikom ovog resursa.

Kao pokazatelj integrisanosti funkcionalno-povezanih fenotipski osobina korišćena je relativna varijansa sopstvenih vrednosti - *rVE* (Tabela 4.1.10. A i B). U obe populacije *I. pumila* izrazito visok stepen integracije je uočen između osobina fotosintetičkih pigmenata, dok je nivo integrisanosti morfološko-anatomskih, fizioloških i biohemijskih grupa osobina lista *I. pumila* bio nizak i nije zavisio od svetlosnih uslova njihovih staništa. Odsustvo sezonskog variranja u obrascima integracije i nizak stepen fenotipske asocijacije unutar funkcionalno-povezanih grupa osobina lista kod biljaka iz populacija Dina i Šuma ukazuju na različitost fenotipske ekspresije ovih osobina pri istim sezonskim promenama ekoloških uslova staništa.

TABELA 4.1.10. A. Relativni indeksi fenotipske integracije (rVE) sa intervalima poverenja (dati u zagradama) za grupe funkcionalno povezanih osobina lista tokom proleća, leta i jeseni kod biljaka *I. pumila* iz populacije Dina.

	POPULACIJA DINA		
	PROLEĆE	LETO	JESEN
Antioksidanti	0.142 (0.090 - 0.219)	0.160 (0.079 - 0.293)	0.100 (0.061 - 0.156)
Morfološke osobine lista	0.154 (0.019 - 0.357)	0.093 (0.093 - 0.267)	0.134 (0.026 - 0.290)
Fiziološke osobine lista	0.225 (0.054 - 0.485)	0.183 (0.083 - 0.306)	0.148 (0.048 - 0.283)
Fotosintetički pigmenti	0.901 (0.848 - 0.951)	0.931 (0.851 - 0.972)	0.939 (0.858 - 0.977)

TABELA 4.1.10. B. Relativni indeksi fenotipske integracije (rVE) sa intervalima poverenja (dati u zagradama) za grupe funkcionalno povezanih osobina lista tokom proleća, leta i jeseni kod biljaka *I. pumila* iz populacije Šuma.

	POPULACIJA ŠUMA		
	PROLEĆE	LETO	JESEN
Antioksidanti	0.266 (0.170 - 0.431)	0.235 (0.116 - 0.393)	0.128 (0.081 - 0.203)
Morfološke osobine lista	0.216 (0.074 - 0.483)	0.231 (0.070 - 0.482)	0.136 (0.015 - 0.348)
Fiziološke osobine lista	0.311 (0.056 - 0.677)	0.198 (0.069 - 0.383)	0.140 (0.025 - 0.306)
Fotosintetički pigmenti	0.937 (0.788 - 0.995)	0.921 (0.830 - 0.970)	0.925 (0.857 - 0.970)

4.2 Recipročno-transplantacioni eksperiment

4.2.1 Testiranje hipoteza o lokalnim adaptacijama *I. pumila*

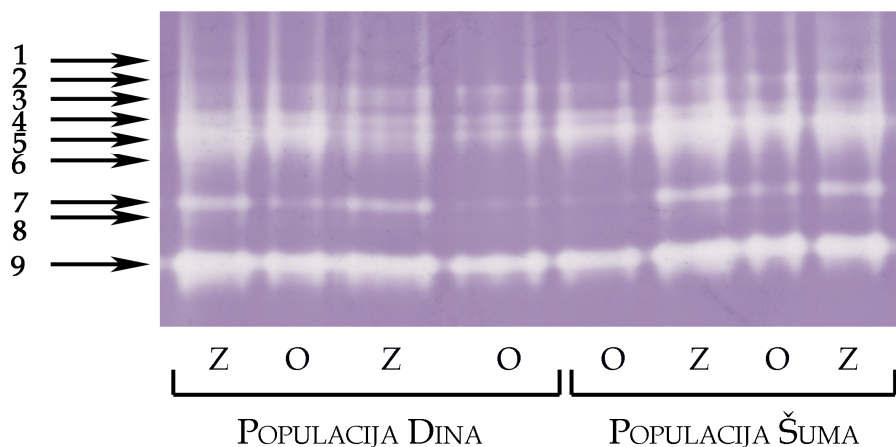
Testiranje adaptiranosti populacija na lokalne uslove staništa uobičajeno se vrši korišćenjem recipročno-transplantacionog eksperimenata. Ovaj eksperimentalni dizajn zasniva se na recipročnom transplantiranju jedinki dve ili više populacija između njihovih prirodnih staništa, u okviru jedne generacije, i poređenju performansi genotipova „domaće“ i „strane“ populacije pod istim sredinskim uslovima („domaći vs. strani“), ili istih genotipova u svom staništu i staništima drugih populacija („kod kuće vs. van kuće“) (Kawecki i Ebert, 2004).

Tabela 4.2.1. prikazuje srednje vrednosti, standardne devijacije i koeficijente varijacije biohemijskih (SOD, APX, CAT, POD, GR, PHEN i ANTH), morfološko-anatomskih (SLA i LDMC) i fizioloških osobina (fotosintetički pigmenti, SU i LWC) lista *I. pumila* iz dve prirodne populacije, Dina i Šuma, sa otvorenog i zasenčenog staništa u Deliblatskoj peščari. Vrednosti ispitivanih fenotipskih osobina su se menjale kako u zavisnosti od staništa za istu populaciju, tako i između različitih populacija u istom staništu. Na otvorenom staništu, lokalnom za genotipove iz populacije Dina, prosečne vrednosti specifične aktivnosti antioksidativnih enzima i količine neenzimskih antioksidanata (antocijana), kao i SLA bile su veće u listovima stranih genotipova, poreklom iz populacije Šuma, u poređenju sa domaćim. Suprotan trend uočen je za sve fotosintetičke pigmente i indikatore oksidativnog stresa (OSI i MDA), čije su srednje vrednosti na otvorenom staništu bile veće kod lokalnih genotipova (Tabela 4.2.1.). Nasuprot tome, fiziološke osobine vezane za količinu vode (LWC, SU) imale su sličnu vrednost u obe populacije (Tabela 4.2.1.). Sličan obrazac fenotipske espresije svih navedenih osobina detektovan je između genotipova iz populacija Dina i Šuma u zasenčenom staništu (Tabela 4.2.1.).

TABELA 4.2.1. Srednja vrednost (\bar{X}), standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije ($CV\%$) za morfološke, fiziološke i biohemijske osobine lista ispoljene tokom leta kod biljaka *I. pumila* poreklom iz populacija Dina i Šuma koje naseljavaju otvorena i zasenčena prirodna staništa u Deliblatskoj peščari. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

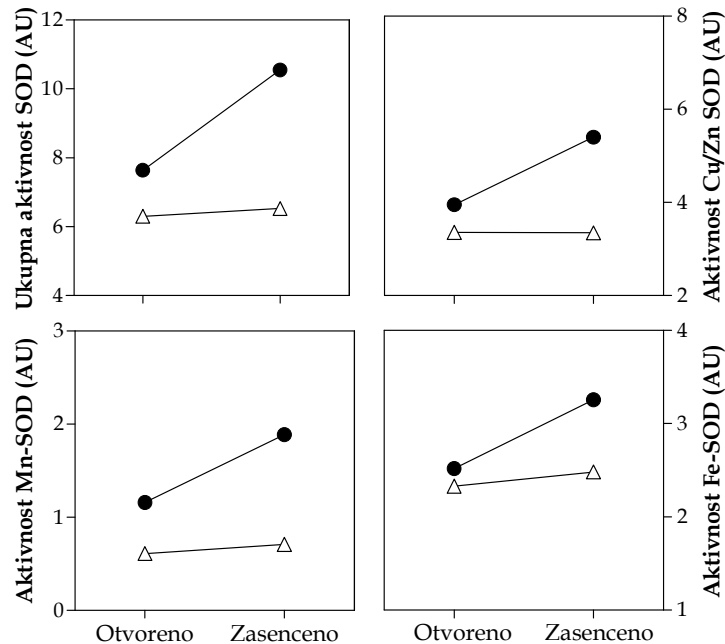
	OTVORENO STANIŠTE						ZASENČENO STANIŠTE					
	POPULACIJA DINA			POPULACIJA ŠUMA			POPULACIJA DINA			POPULACIJA ŠUMA		
	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV
SOD	144.51	53.73	37.2	153.42	70.67	46.1	118.83	36.62	30.8	155.43	28.03	18.0
APX	1.58	0.23	14.5	2.16	0.71	32.9	0.75	0.22	29.5	0.82	0.15	18.6
CAT	0.19	0.05	25.8	0.25	0.12	47.5	0.31	0.04	12.6	0.34	0.06	17.3
GR	0.43	0.08	19.7	0.54	0.21	39.7	0.31	0.09	29.4	0.39	0.04	11.0
POD	3.08	1.24	40.2	3.66	1.47	40.1	2.06	0.66	32.3	2.34	0.80	34.1
ANTH	14.67	1.36	9.3	15.70	1.57	10.0	11.80	1.78	15.1	15.44	2.80	18.1
PHEN	5.69	0.75	13.1	5.57	0.56	10.0	5.38	0.98	18.2	5.22	0.71	13.6
OSI	0.84	0.24	28.4	0.23	0.28	122.4	0.87	0.25	28.6	0.27	0.23	84.8
MDA	7.73	1.64	21.2	4.39	1.20	27.3	6.39	0.97	15.1	3.94	1.12	28.4
SLA	180.63	16.31	9.03	183.11	22.35	12.2	232.51	21.17	9.1	250.02	28.46	11.4
LDMC	0.20	0.01	4.9	0.20	0.02	7.6	0.18	0.02	8.1	0.17	0.01	6.7
SU	0.02	3x10 ⁻³	11.9	0.02	4x10 ⁻³	18.6	0.02	3x10 ⁻³	13.8	0.02	2x10 ⁻³	12.3
LWC	0.80	0.01	1.2	0.80	0.02	1.9	0.82	0.02	1.8	0.83	0.01	50.0
Chl a	8.32	3.22	38.7	6.93	1.72	24.8	11.67	2.16	18.5	10.26	3.89	37.9
Chl b	3.45	1.15	33.3	2.96	0.64	21.5	4.59	0.94	20.5	3.89	1.40	36.0
Chl ukupni	11.77	4.37	37.1	9.97	2.46	24.7	16.26	3.09	19.0	14.16	5.32	37.5
Chl a:b	2.37	0.14	5.7	2.33	0.17	7.3	2.55	0.09	3.5	2.62	0.13	4.9
Cars	2.60	0.91	34.9	2.32	0.55	23.8	2.85	0.57	20.1	2.47	0.89	36.0

Analiza zimograma i aktivnosti izoformi antioksidativnih enzima SOD (Slika 4.2.1.), APX (Slika 4.2.4.), i CAT (Slika 4.2.7.), iz populacija Dina i Šuma pokazala je postojanje razlika u aktivnosti, ali ne u broju i migracionoj distanci izoformi ovih antioksidativnih enzima. Sve tri forme SOD enzima imale su veće aktivnosti kod genotipova iz populacije Šuma u odnosu na genotipove iz



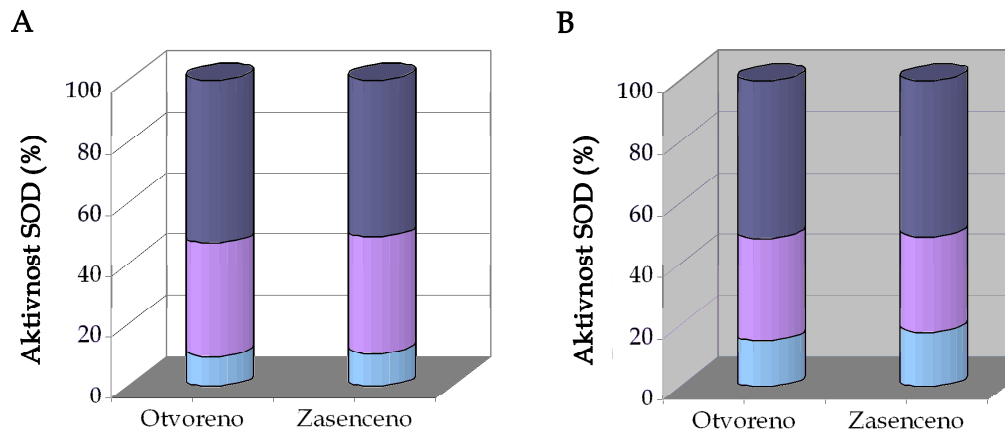
SLIKA 4.2.1. Vizuelizacija SOD formi ukupnog ćelijskog ekstrakta lista pojedinačnih genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na staništima sa različitim svetlosnim uslovima tokom leta, u Deliblatskoj peščari. Z - genotip koji je rastao na zasečenom staništu, O - genotip koji je rastao na otvorenom staništu.

populacije Dina, u oba posmatrana staništa (Slika 4.2.2.). U listu genotipova iz populacije Šuma aktivnost sva tri tipa SOD enzima je bila veća na zasečenom - domaćem staništu nego na stranom - otvorenom staništu. U listu genotipova *I. pumila* iz populacije Dina aktivnost SOD nije bila pod uticajem svetlosnih uslova staništa (Slika 4.2.2.). Procentualna zastupljenost pojedinačnih formi SOD iz populacija Dina i Šuma u otvorenom i zasečenom staništu prikazana je na Slici 4.2.3. Bez obzira na populaciju i stanište, udeo Cu/Zn-SOD bio je veći od Fe-SOD, a naročito od Mn-SOD.



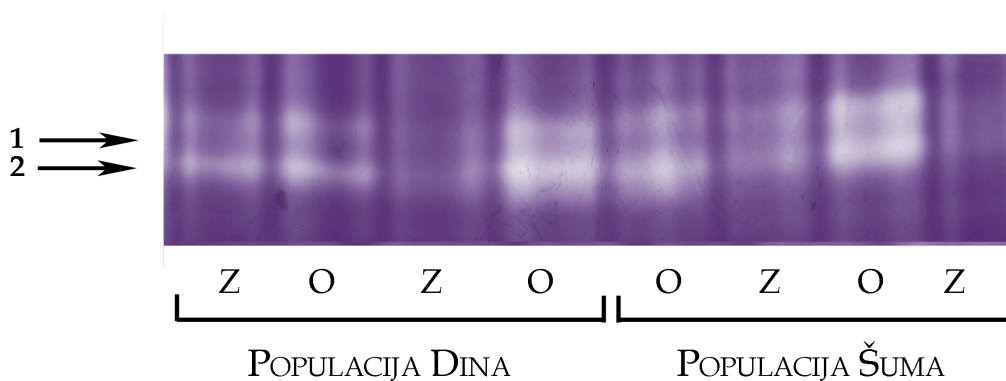
SLIKA 4.2.2. Grafički prikaz prosečnih aktivnosti formi SOD enzima u listu genotipova *I. pumila* porklom iz populacija Dina (Δ) i Šuma (●) kvantifikovanih sa nativnih PAGE gelova. Aktivnosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).

Kod svih klonova identifikovane su dve izoforme APX, koje su pokazale sličan obrazac aktivnosti. Prosečne vrednosti ukupne aktivnosti APX su bile veće na otvorenom staništu, kod genotipova obe populacije, u odnosu na zasenčeno stanište (Slika 4.2.5.). Izoforma 1 je imala veće prosečne vrednosti aktivnosti kod genotipova iz populacije Dina, naročito na lokalnom staništu. Izoforma 2 imala je veće prosečne vrednosti u listovima genotipova iz populacije Šuma, na oba posmatrana staništa. Procentualni udeo aktivnosti izoforme 2 bio je znatno veći u odnosu na izoformu 1 kod biljaka obe populacije, na oba ispitivana staništa (Slika 4.2.6.).

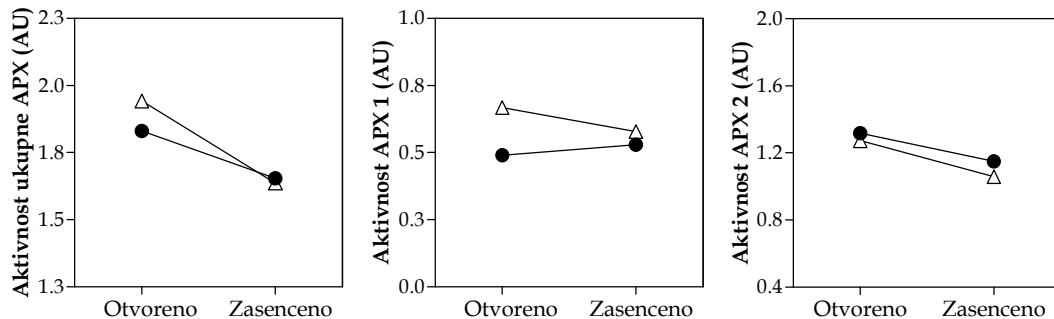


SLIKA 4.2.3. Variranje procentualnog udela aktivnosti različitih formi SOD u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista genotipova *I. pumila* iz populacija Dina (A) i Šuma (B) koji su rasli na staništima sa različitim svetlosnim uslovima tokom leta, u Deliblatskoj peščari.

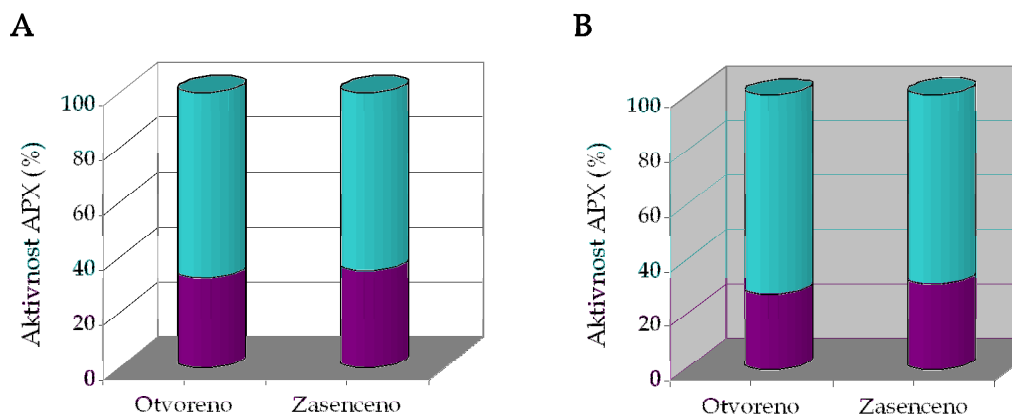
Legenda: ■ - Mn-SOD, ■ - Fe-SOD, ■ - Cu/Zn-SOD.



SLIKA 4.2.4. Vizuelizacija izoformi APX u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista genotipova *I.pumila* iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na različitim svetlosnim staništima tokom leta, u Deliblatskoj peščari. Z - genotip koji je rastao na zasenčenom staništu, O - genotip koji je rastao na otvorenom staništu.

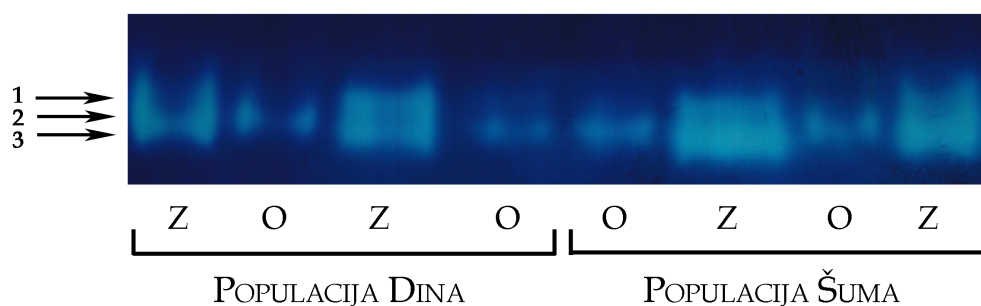


SLIKA 4.2.5. Grafički prikaz prosečnih aktivnosti izoformi APX u ukupnom ćelijskom ekstraktu lista *I. pumila* iz populacije Dina (Δ) i Šuma (●) koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu tokom leta, u Deliblatskoj peščari. Aktivnost je kvantifikovana sa nativnih PAGE gelova i vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).



SLIKA 4.2.6. Variranje procentualnog udela aktivnosti izoformi APX u listu genotipova *I. pumila* iz populacija Dina (A) i Šuma (B) koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu, tokom leta, u Deliblatskoj peščari. Legenda: ■ - APX izoforma 1, ■ - APX izoforma 2.

Suprotno od zimograma SOD i APX, zimogrami CAT (Slika 4.2.7.) biljaka sa otvorenog i zasenčenog staništa su bili različiti. Na otvorenom staništu, kod genotipova obe populacije detektovana je aktivnost samo izoforme 2, dok su na zasenčenom staništu, kod svih genotipova, identifikovane dve izoforme katalaze (izoforme 1 i 3). Ukupna aktivnost svih izoformi je bila veća u listu genotipova *I. pumila* iz populacije Šuma, u oba staništa, u odnosu na genotipove iz populacije Dina. U zasenčenom staništu, procentualna zastupljenost CAT izoforme 2 je bila oko 50% veća od izoforme 1.



SLIKA 4.2.7. Vizuelizacija izoformi CAT genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu tokom leta, u Deliblatskoj peščari. Z - genotip koji je rastao na zasenčenom staništu, O - genotip koji je rastao na otvorenom staništu.

Za ispitivanje „kod kuće vs. van kuće“ hipoteze, tj. utvrđivanje uticaja svetlosnih uslova staništa na osobine lista iz dve prirodne populacije *I. pumila*, korišćena je jednofaktorska ANOVA. Efekat staništa na osobine lista genotipova iz populacije Dina je bio statistički značajan za sve antioksidante i indikatore stresa (osim specifične aktivnosti SOD, količine fenola i indeksa oksidativnog stresa - OSI), morfološko-anatomske osobine (SLA, LDMC), fotosintetičke pigmente (izuzev količine karotenoida), sadržaj vode u listu (LWC), ali ne i sukulenost (SU) (Tabela 4.2.2., Slika 4.2.8.). Na otvorenom staništu, tj. „kod kuće“, genotipovi *I. pumila* ove populacije imali su veću vrednost za specifičnu aktivnost superoksid dismutaze (SOD), askorbat peroksidaze (APX), glutation reduktaze (GR) i peroksidaza III klase (POD), količinu antocijana (ANTH) i

MDA, kao i sadržaj suve materije u listu (LDMC) u poređenju sa njihovim replikama koje su rasle na staništa na osobine lista genotipova iz pulacije Šuma je bio statistički značajan za prosečne vrednosti specifične aktivnosti antioksidativnih enzima askorbat peroksidaze, glutation reduktaze, i peroksidaze III klase, za sve morfološko-fiziološke osobine (SLA, LDMC, LWC, SU), kao i za većinu fotosintetičkih pigmenata (Chl a, ukupni Chl i Chl a : b) (Tabela 4.2.2.). Na zasenčenom staništu, prosečne vrednosti specifične aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i CAT, količine fotosintetičkih

TABELA 4.2.2. Testiranje hipoteze o lokalnim adaptacijama „kod kuće - van kuće“. Rezultati analize varijanse kojom je ispitan uticaj staništa na osobine lista kod genotipova *I. pumila* poreklom iz populacija Dina i Šuma, koji su rasli na istim (otvorenom i zasenčenom) staništima u Deliblatskoj peščari. df = stepeni slobode, MS = prosek kvadrata, F = F-odnos, P = statistička značajnost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	POPULACIJA DINA				POPULACIJA ŠUMA			
	df	MS	F	P	df	MS	F	P
SOD	1	3292	1.56	0.2280	1	19.22	0.01	0.9360
APX	1	3.41	67.30	0.0001	1	9.01	34.10	0.0001
CAT	1	0.08	38.30	0.0001	1	0.03	3.82	0.0670
GR	1	0.08	9.51	0.0060	1	0.11	4.81	0.0420
POD	1	5.18	5.26	0.0340	1	8.75	6.26	0.0220
PHEN	1	0.49	0.65	0.4310	1	0.64	1.57	0.2260
ANTH	1	41.14	16.40	0.0010	1	0.33	0.06	0.8030
OSI	1	4x10 ⁻³	0.06	0.8050	1	0.01	0.09	0.7620
MDA	1	9.03	4.96	0.0390	1	1.03	0.76	0.3940
SLA	1	13423	37.60	0.0001	1	22427	34.20	0.0001
LDMC	1	2x10 ⁻³	12.20	0.0030	1	3x10 ⁻³	17.00	0.0010
SU	1	2x10 ⁻⁵	2.45	0.1350	1	1x10 ⁻⁴	4.90	0.0400
LWC	1	2x10 ⁻³	12.20	0.0020	1	3x10 ⁻³	17.00	0.0006
Chl a	1	56.36	7.50	0.0135	1	55.64	6.15	0.0232
Chl b	1	6.46	5.84	0.0265	1	4.32	3.65	0.0720
Chl ukupni	1	100.90	7.05	0.0161	1	87.92	5.13	0.0361
Chl a:b	1	0.16	12.20	0.0026	1	0.44	19.30	0.0004
Cars	1	0.29	0.51	0.4859	1	0.11	0.20	0.6568

pigmenata, kao i SLA kod šumskih genotipova bile su više "kod kuće" nego na otvorenom staništu, tj. „van kuće“ (Tabela 4.2.1.). Sve ostale osobine genotipova iz populacije Šuma imale su veću vrednost u otvorenom staništu u poređenju sa zasenčenim (Tabela 4.2.1.).Efekat genetičkog variranja između populacija na istom staništu („domaći vs. strani“ hipoteza) takođe je analiziran jednofaktorskom analizom varijanse. Poređenjem srednjih vrednosti posmatranih fenotipskih osobina lista kod biljaka poreklom iz dinske i šumske populacije na otvorenom staništu, statistički značajne razlike utvrđene su samo za specifičnu aktivnost askorbat peroksidaze (APX) i indikatore oksidativnog stresa (OSI i MDA) (Tabela 4.2.3.; Slika 4.2.9.). Srednje vrednosti specifične aktivnosti APX bile su veće kod genotipova iz populacije Šuma u odnosu na one iz populacije Dina, nasuprot srednjim vrednostima indikatora oksidativnog stresa koje su bile veće kod dinskih u odnosu na šumske genotipove. Na zasenčenom staništu, statistički značajne razlike između genotipova iz populacija Dina i Šuma uočene su za specifičnu aktivnosti enzima SOD i GR, količinu antocijana i indikatore oksidativnog stresa, OSI i MDA (Tabela 4.2.3.). Prosečne vrednosti ovih enzima, kao i količina antocijana bile su veće kod genotipova iz populacije Šuma, dok su vrednosti indikatora oksidativnog stresa bile značajno veće kod genotipova poreklom iz populacije Dina (Tabela 4.2.1.).

TABELA 4.2.3. Testiranje hipoteze o lokalnim adaptacijama “domaći vs. strani”. Rezultati analize varijanse kojom je ispitivan uticaj porekla populacije na osobine lista kod genotipova *I. pumila* poreklom iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu u Deliblatskoj peščari. df = stepeni slobode, MS = prosek kvadrata odstupanja od srednje vrednosti ispitivanih osobina, *F* = F-odnos, *P* = statistička značajnost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	OTVORENO STANIŠTE				ZASENČENO STANIŠTE			
	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i>	df	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
SOD	1	394.8	0.10	0.7553	1	6663	6.27	0.0222
APX	1	1.69	6.06	0.0319	1	0.02	0.58	0.4565
CAT	1	0.02	2.43	0.1367	1	3x10 ⁻³	1.16	0.2953
GR	1	0.05	2.06	0.1770	1	0.03	5.60	0.0350
POD	1	1.72	0.93	0.3472	1	0.39	0.73	0.4041
PHEN	1	0.07	0.17	0.6879	1	0.13	0.18	0.6750
ANTH	1	5.35	2.47	0.1332	1	66.45	12.1	0.0027
OSI	1	1.86	26.72	0.0001	1	1.81	31.8	0.0001
MDA	1	55.73	26.91	0.0001	1	29.97	27.4	0.0001
SLA	1	29.47	0.08	0.7846	1	1546	2.46	0.1343
LDMC	1	5x10 ⁻⁶	0.03	0.8678	1	2x10 ⁻⁴	1.21	0.2862
SU	1	2x10 ⁻⁶	0.14	0.7129	1	4x10 ⁻⁶	0.60	0.4472
LWC	1	5x10 ⁻⁶	0.03	0.8680	1	2x10 ⁻⁴	1.21	0.2860
Chl a	1	9.68	1.45	0.2437	1	9.98	1.01	0.3284
Chl b	1	1.22	1.41	0.2498	1	2.46	1.74	0.2042
Chl ukupni	1	16.18	1.29	0.2714	1	22.04	1.17	0.2944
Chl a:b	1	0.01	0.49	0.4943	1	0.02	2.01	0.1732
Cars	1	0.39	0.69	0.4163	1	0.69	1.23	0.2813

4.2.2 Fenotipska plastičnost osobina lista *I. pumila* u dve prirodne populacije sa otvorenog i zasenčenog staništa

Grafički prikaz normi reakcija svih fenotipskih osobina lista kod pojedinačnih genotipova, po 10 iz populacija Dina i Šuma, ispoljenih na otvorenom i zasenčenom staništu tokom leta, i populacione (prosečne) norme reakcije date su na Slikama 4.2.8. i 4.2.9. Nagibi normi reakcije pojedinačnih genotipova kod svih analiziranih osobina, osim kod LWC, ukazuju na načelnu sposobnost ovih genotipova da plastično reaguju na promenu ambijentalne svetlosti, dok su njihovi obrasci bili specifični kako za genotip tako i za svaku osobinu. Šta više, različiti nagibi pojedinačnih genotipova i njihovo ukrštanje, odnosno promena ranga, ukazuje na postojanje genetičkog variranja za fenotipsku plastičnost svih analiziranih osobina u obe populacije *I. pumila*. Norme reakcije enzimskih antioksidanata kod šumskih genotipova imale su uočljivo veću varijansu na otvorenom u odnosu na zasenčeno stanište, dok je kod dinskih genotipova to bio slučaj za neenzimske antioksidante i morfološke osobine u otvorenom staništu (Slika 4.2.9.). Sa izuzetkom specifične aktivnosti tri antioksidativna enzima (SOD, APX i CAT), kao i količine antocijana, populacione norme reakcije svih ostalih osobina lista bile su paralelne između otvorenog i zasenčenog staništa, što ukazuje na sličnu plastičnost populacija Dina i Šuma u odnosu na date osobine (Slika 4.2.9.).

Kvantitativne vrednosti plastičnosti ispitivanih fenotipskih osobina genotipova *I. pumila*, poreklom iz dve populacije, između dve različite svetlosne sredine prikazane su u Tabeli 4.2.4. Plastičnost odgovora na svetlosne uslove staništa zavisila je od analizirane osobine, dok je uticaj populacije bio zanemarljiv. Najplastičniji odgovor na svetlosne uslove utvrđen je za APX, CAT, POD i fotosintetičke pigmente. Prosečne vrednosti indeksa plastičnosti neenzimskih antioksidanata bile su znatno manje. Izrazito niske prosečne vrednosti indeksa plastičnosti utvrđene su za LDMA i LWC. Rezultati analize razlika u srednjim vrednostima indeksa plastičnosti između genotipova dinske

i šumske populacije, korišćenjem Wilcoxon-ovog testa, ukazali su na sličnu veličinu plastičnosti analiziranih osobina lista, osim u slučaju količine solubilnih fenola i količine suve materijeu listu, LDMC (Tabela 4.2.4); indeks plastičnosti količine fenola imao je veće vrednosti kod genotipova iz populacije

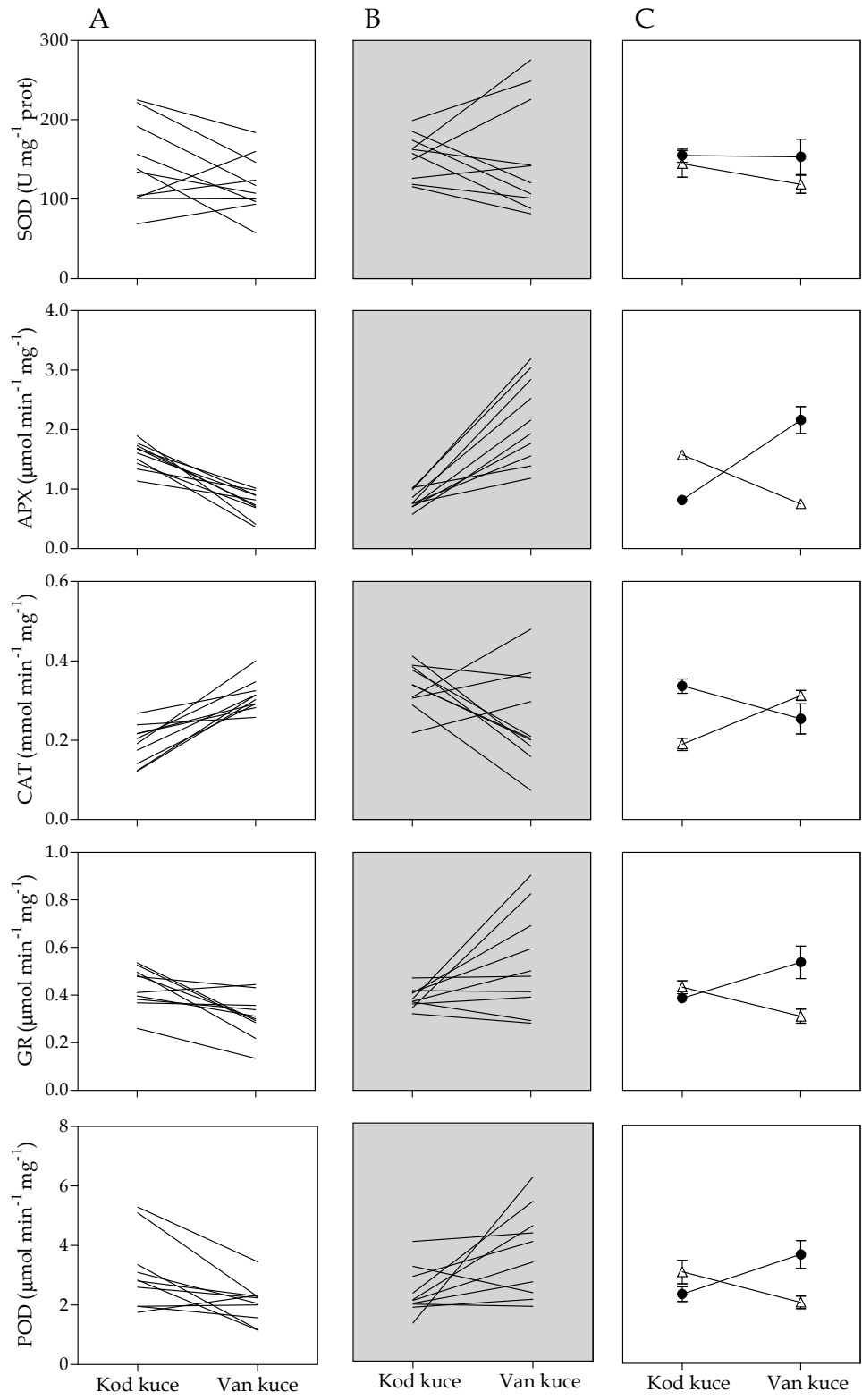
TABELA 4.2.4. Prosečne vrednosti indeksi plastičnosti (*PI*) i njihovi koeficijenti varijacije (*CV%*) procenjeni za osobine lista *I. pumila* i rezultati Wilcoxon-ovog testa (*P_V*) za utvrđivanje statističke značajnosti razlika u indeksima plastičnosti između genotipova *I. pumila* poreklom iz populacija Dina i Šuma, koji su rasli u recipročno-transplantacionom eksperimentu u prirodi. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

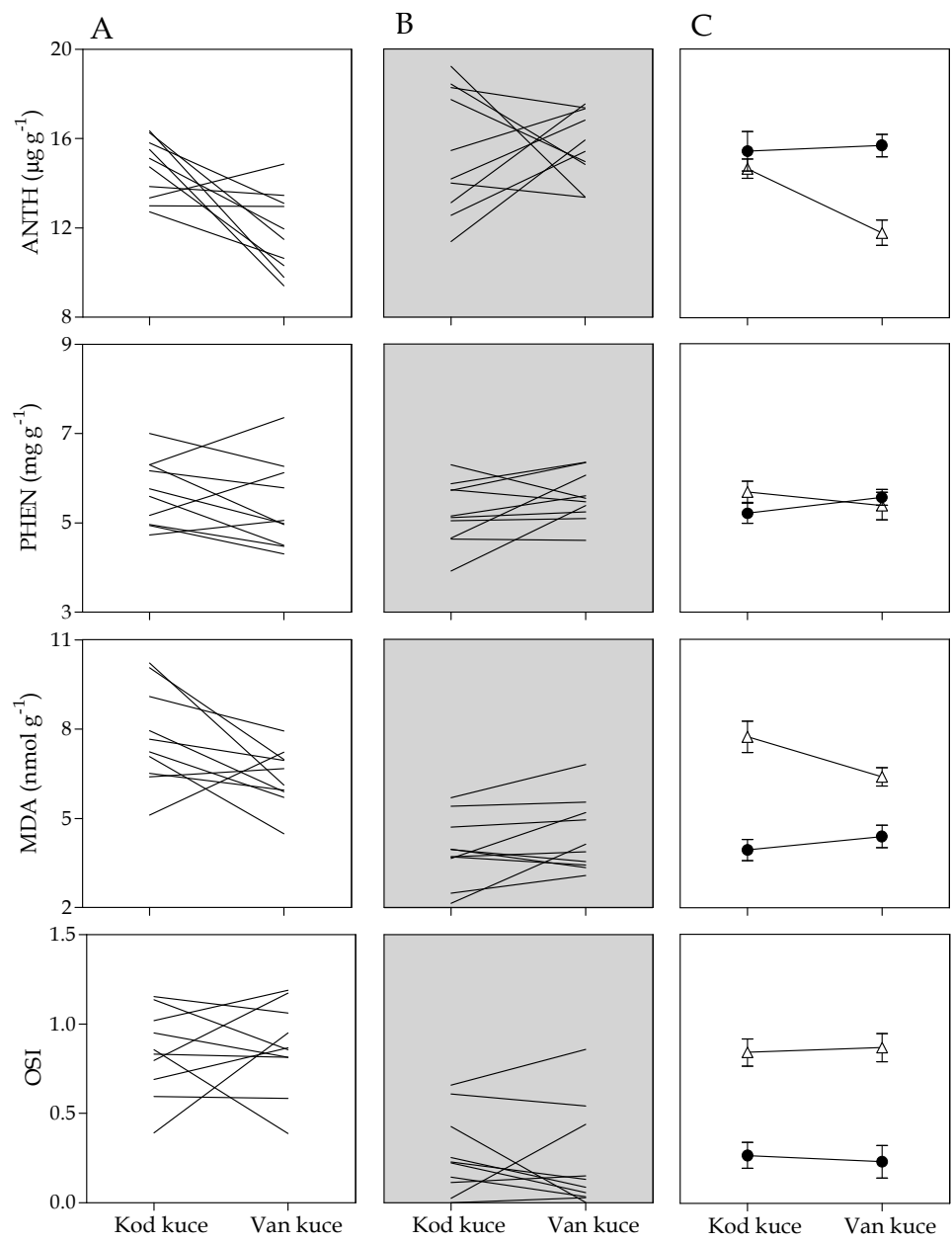
	DINA		ŠUMA		<i>P_V</i>
	<i>PI</i>	<i>CV</i>	<i>PI</i>	<i>CV</i>	
SOD	0.305	43.2	0.279	44.5	ns
APX	0.509	34.4	0.609	19.2	ns
CAT	0.402	39.6	0.420	40.7	ns
GR	0.288	62.1	0.284	68.2	ns
POD	0.324	51.3	0.348	65.9	ns
ANTH	0.216	58.8	0.180	45.4	ns
PHEN	0.125	34.1	0.066	62.6	*
OSI	0.201	73.8	0.608	54.6	ns
MDA	0.227	51.0	0.132	65.9	ns
SLA	0.236	29.9	0.275	40.6	ns
LDMC	0.077	56.8	0.148	43.5	*
SU	0.166	49.7	0.234	44.1	ns
LWC	0.019	61.4	0.035	50.9	ns
Chl a	0.326	53.2	0.352	64.9	ns
Chl b	0.290	63.0	0.282	73.2	ns
Chl ukupni	0.324	58.0	0.303	70.5	ns
Chl a:b	0.068	62.1	0.108	45.8	ns
Cars	0.251	59.2	0.296	42.7	ns

Dina, nasuprot *PI* vrednosti za LDMC u odnosu na koju su veće vrednost dostizali genotipovi iz populacije Šuma.

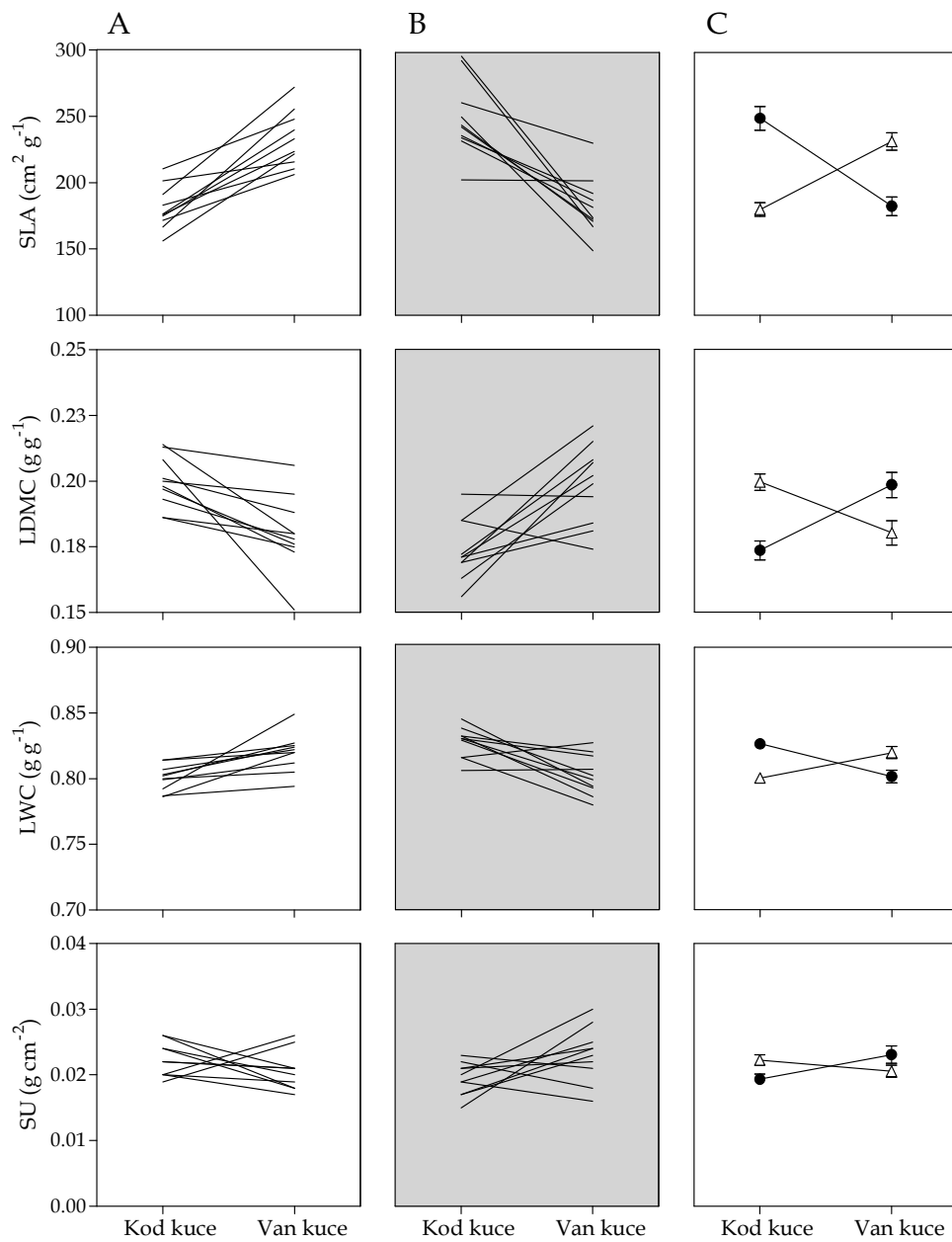
Kao mera integracije plastičnosti korišćeni su Pearson-ovi koeficijenti korelacija između indeksa plastičnosti. Ovom analizom detektovano je 9 pozitivni i 4 negativne korelacije između *PI* vrednosti genotipova iz populacije Dina, kao i 7 pozitivnih i 7 negativnih korelacija između *PI* vrednosti genotipova iz populacije Šuma.

SLIKA 4.2.8. Ispitivanje „kod kuće - van kuće“ hipoteze o lokalnim adaptacijama prirodnih populacija *I. pumila*. Norme reakcije osobina lista genotipova *I. pumila* iz populacija Dina (A) i Šuma (B) i njihove prosečne vrednosti sa standardnim greškama (C) ispoljene na otvorenom i zasenčenom staništu, u leto, u Deliblatskoj peščari. Objašnjenje simbola: Δ - populacija Dina, \bullet - populacija Šuma. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

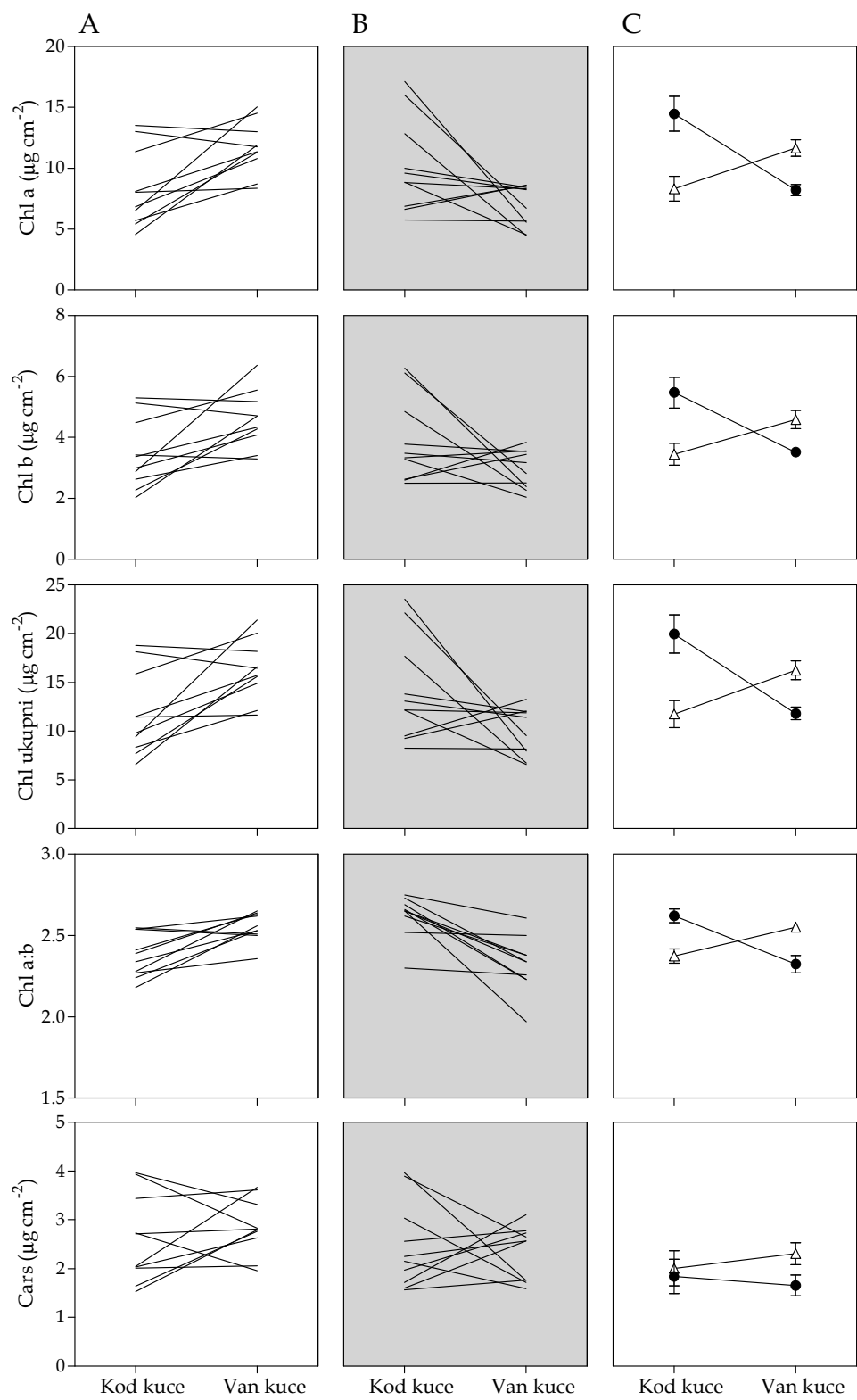




SLIKA 4.2.8. Nastavak.

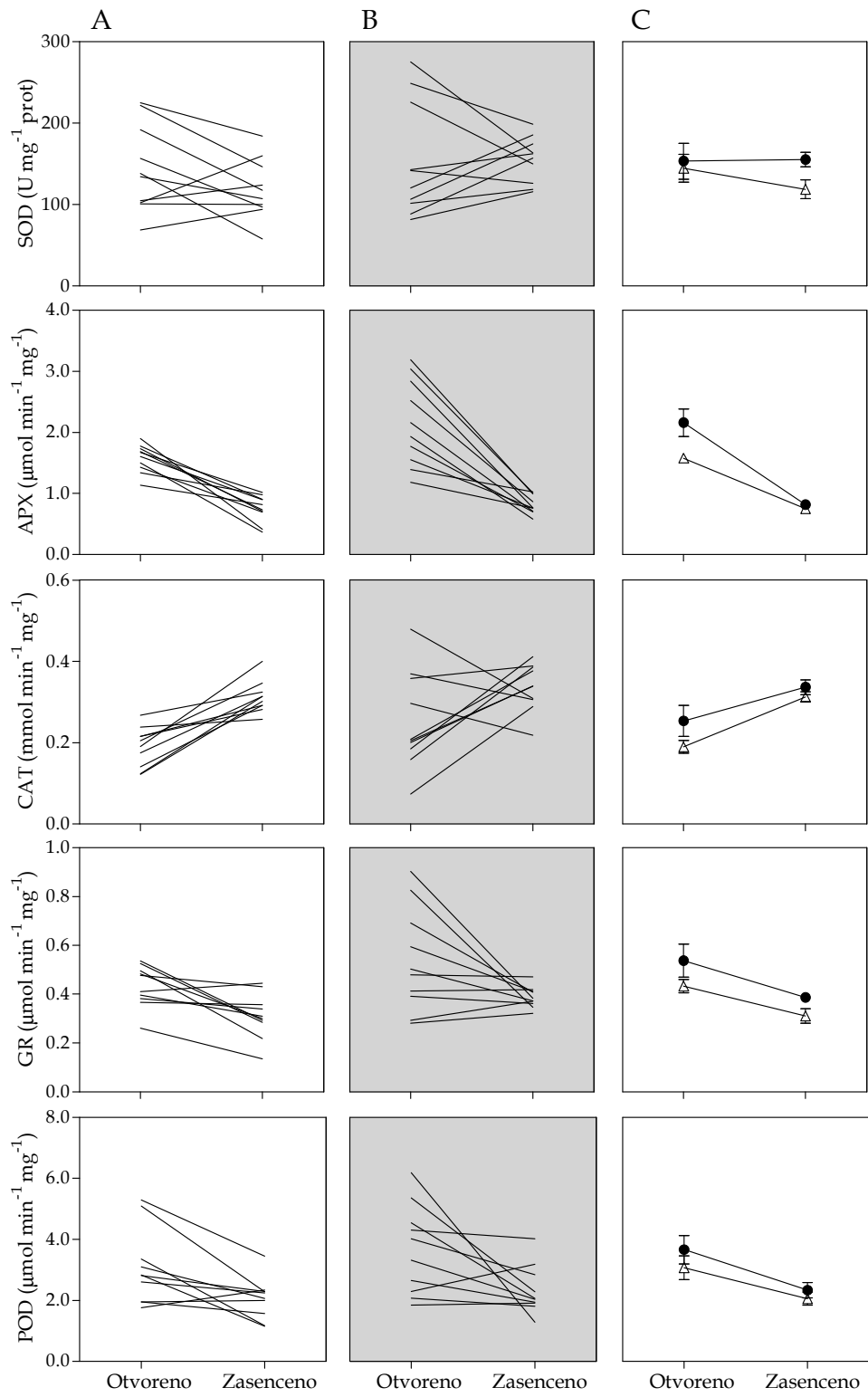


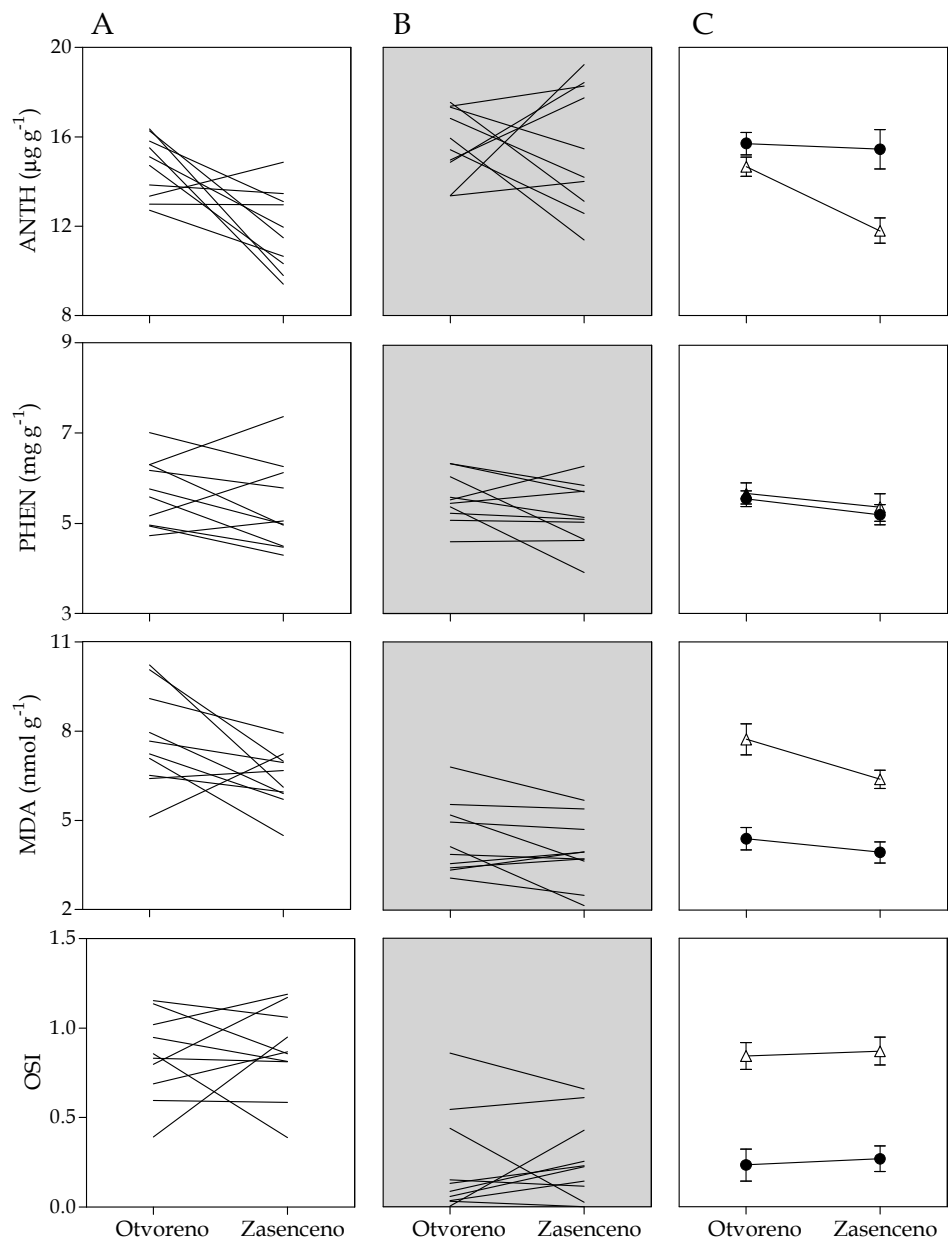
SLIKA 4.2.8. Nastavak.



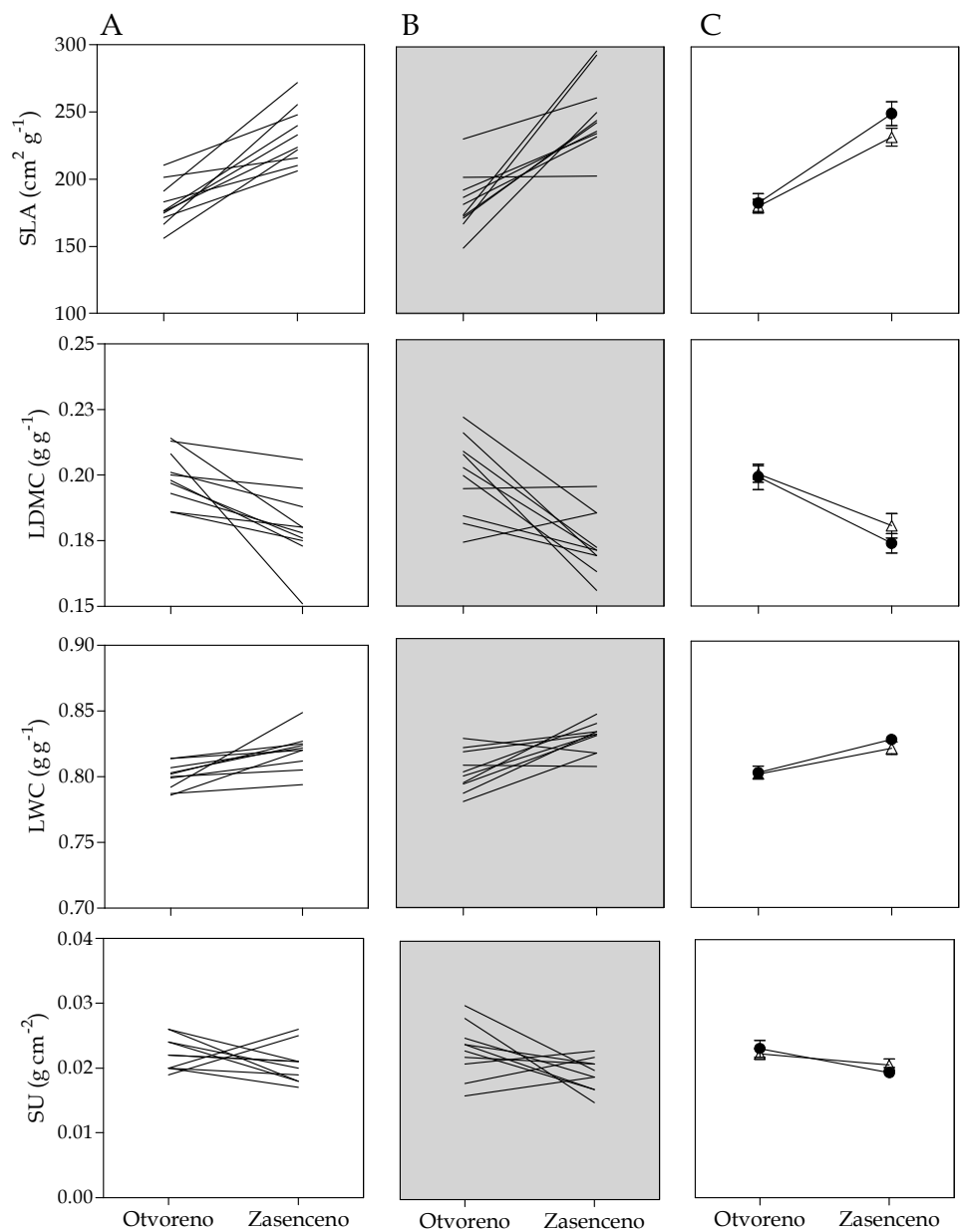
SLIKA 4.2.8. Nastavak.

SLIKA 4.2.9. Ispitivanje „domaći - strani“ hipoteze o lokalnim adaptacijama prirodnih populacija *I. pumila*. Norme reakcije osobina lista genotipova *I. pumila* iz populacija Dina (A.) i Šuma (B.) i njihove prosečne vrednosti sa standardnim greškama (C.) ispoljene na otvorenom i zasenčenom staništu, u leto, u Deliblatskoj peščari. Objašnjenje simbola: Δ - populacija Dina, \bullet - populacija Šuma. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

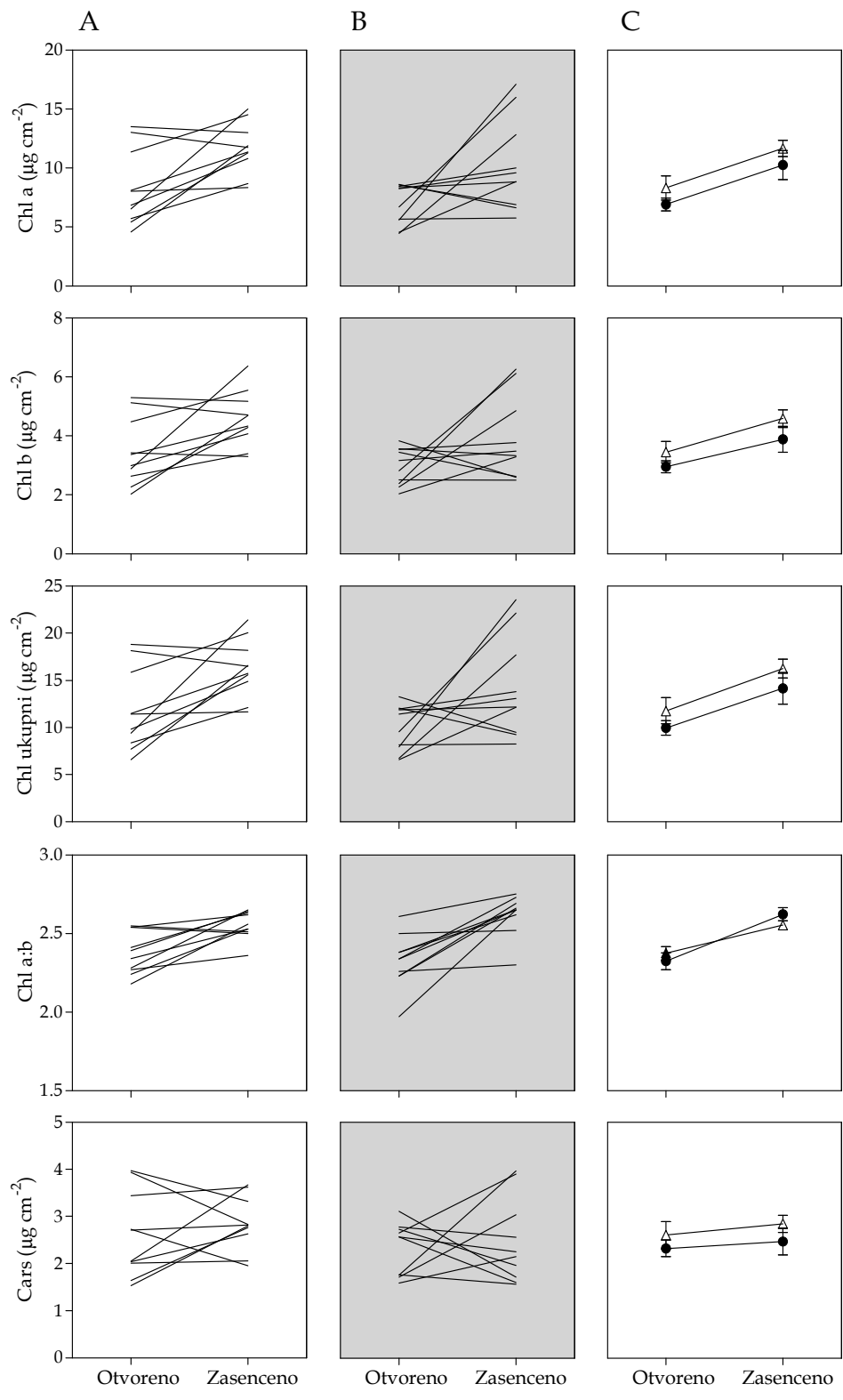




SLIKA 4.2.9. Nastavak.



SLIKA 4.2.9. Nastavak.



SLIKA 4.2.9. Nastavak.

4.2.3 Fenotipska integracija osobina lista *I. pumila* u dve prirodne populacije sa otvorenog i zasenčenog staništa

Da bi utvrdili da li odabrane funkcionalno-povezane fenotipske osobine čine integrisane celine u okviru lista *I. pumila*, urađena je analiza glavnih komponenti (PCA) i određena su opterećenja na PC osama unutar svake populacije, u odnosu na stanište (Tabele 4.2.5. A i B). Značajnije grupisanje osobina lista nije uočeno, osim za količinu fotosintetičkih pigmenata, koji su se u obe populacije na otvorenom i zasenčenom staništu nalazili na prvoj komponenti (PC1), kao i neenzimskih antioksidanata na otvorenom i APX i POD na zatvorenom staništu u populaciji Dina, takođe na PC1.

TABELA 4.2.5. A. PCA analiza funkcionalnih osobina lista kod genotipova *I. pumila* iz populacije Dina, koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu. Podvučena su opterećenja na PC osama veća od ± 0.300 . λ = sopstvena vrednost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	OTVORENO STANIŠTE				ZASENČENO STANIŠTE				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
SOD	-0.314	0.085	0.126	<u>0.415</u>	0.156	0.224	-0.386	<u>-0.440</u>	0.138
APX	-0.209	0.317	<u>0.333</u>	-0.043	0.326	-0.095	0.179	<u>-0.380</u>	0.052
CAT	-0.066	0.100	-0.687	0.236	0.293	0.202	-0.143	0.078	<u>0.489</u>
GR	-0.172	0.176	<u>0.543</u>	0.317	0.092	0.265	0.275	-0.264	<u>0.561</u>
POD	0.148	<u>-0.457</u>	0.061	0.060	<u>0.332</u>	-0.331	0.096	0.077	-0.153
ANTH	<u>0.325</u>	0.110	0.178	-0.367	0.236	0.141	-0.326	<u>0.475</u>	0.004
PHEN	<u>0.372</u>	0.029	0.015	-0.059	0.115	-0.188	<u>0.559</u>	-0.126	-0.079
SLA	-0.308	-0.055	0.016	<u>-0.501</u>	-0.163	-0.124	0.387	0.374	<u>0.428</u>
LDMC	0.033	<u>-0.504</u>	0.127	0.204	0.223	<u>-0.446</u>	-0.174	-0.145	0.073
SU	0.198	0.302	-0.108	<u>0.423</u>	0.032	<u>0.428</u>	0.202	-0.257	-0.410
LWC	-0.033	<u>0.504</u>	-0.127	-0.204	-0.223	<u>0.446</u>	0.174	0.145	-0.073
Chl a	<u>0.373</u>	0.087	0.090	0.078	<u>0.392</u>	0.163	0.133	0.172	-0.109
Chl b	<u>0.372</u>	0.101	0.078	0.093	<u>0.390</u>	0.171	0.060	0.195	-0.083
Cars	<u>0.379</u>	0.098	0.106	0.021	<u>0.403</u>	0.112	0.145	0.152	-0.122
λ	6.486	3.408	1.676	1.302	5.257	3.028	2.175	1.548	1.398
Kumulativno	0.463	0.707	0.826	0.919	0.376	0.592	0.747	0.858	0.958

Tabela 4.2.5. B. PCA analiza funkcionalnih osobina lista kod genotipova *I. pumila* iz populacije Šuma, koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu. Podvučena su opterećenja na PC osama veća od ± 0.300 . λ = sopstvena vrednost. Opis skraćenica je dat u Tabeli 3.2.1.

	OTVORENO STANIŠTE				ZASENČENO STANIŠTE				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
SOD	-0.100	<u>-0.479</u>	-0.032	-0.118	0.273	-0.276	<u>0.374</u>	-0.096	-0.073
APX	-0.047	-0.050	<u>0.617</u>	-0.207	0.098	-0.146	0.316	<u>0.517</u>	0.052
CAT	0.194	-0.178	0.121	<u>0.710</u>	0.157	0.017	0.149	0.111	<u>0.701</u>
GR	-0.078	-0.085	<u>0.617</u>	0.226	-0.176	-0.101	<u>0.455</u>	-0.420	0.212
POD	0.139	0.230	0.214	<u>0.352</u>	<u>0.301</u>	<u>-0.358</u>	0.073	0.038	0.027
ANTH	0.257	<u>0.365</u>	0.078	-0.193	0.318	0.042	0.233	<u>0.388</u>	0.136
PHEN	-0.065	<u>0.388</u>	0.346	-0.231	0.240	0.196	<u>-0.413</u>	<u>0.379</u>	-0.010
SLA	<u>-0.391</u>	0.059	0.075	-0.131	-0.315	0.193	-0.130	0.110	<u>0.412</u>
LDMC	-0.236	<u>0.370</u>	-0.138	0.240	0.040	<u>-0.541</u>	-0.309	-0.023	0.046
SU	<u>0.366</u>	-0.234	0.060	-0.073	<u>0.309</u>	0.196	0.196	-0.005	<u>-0.447</u>
LWC	0.236	<u>-0.370</u>	0.138	-0.240	-0.040	<u>0.541</u>	0.309	0.023	-0.046
Chl a	<u>0.385</u>	0.156	-0.047	0.026	<u>0.364</u>	0.141	-0.161	-0.285	0.172
Chl b	<u>0.403</u>	0.088	-0.048	-0.015	<u>0.371</u>	0.147	-0.111	-0.293	0.145
Cars	<u>0.383</u>	0.168	0.006	-0.188	<u>0.379</u>	0.144	-0.133	-0.243	0.108
λ	5.648	3.851	2.193	1.123	5.326	2.683	1.997	1.541	1.161
Kumulativno	0.403	0.679	0.835	0.915	0.380	0.572	0.715	0.825	0.908

U skladu sa ovom nalazom, indeksi integracije, rVE , analiziranih grupa osobina obe populacije, na oba staništa, imali su široke intervale poverenja, osim za količinu fotosintetičkih pigmenata (Tabela 4.2.6). Fotosintetički pigmenti su se odlikovali izrazito visokim indeksom integracije - rVE kod genotipova obe populacije, bez obzira na stanište. Genotipovi iz populacije Dina koji su rasli na domaćem, otvorenom staništu, imali su veće vrednosti rVE za antioksidante, u poređenju sa replikama koje su rasle u senci ili genotipovima iz populacije Šuma na oba staništa. Najmanje vrednosti rVE , u obe populacije, imale su morfološke osobine kod genotipova koji su rasli na domaćem u odnosu na strano stanište (Tabela 4.2.6). Genotipovi šumske populacije imali su

slične prosečne vrednosti za antioksidante i fotosintetičke pigmente između alternativnih svetlosnih staništa, dok se stepen integracije morfoloških i fizioloških osobina u obe populacije razlikovao i po pravilu bio veći u lokalnom nego u stranom staništu (Tabela 4.2.6).

TABELA 4.2.6. Relativni indeksi fenotipske integracije (rVE) i intervali poverenja (prikazani u zagradama) funkcionalno povezanih grupa osobina lista genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na otvorenom i zasenčenom staništu, u recipročno-transplantacionom eksperimentu.

	POPULACIJA DINA		POPULACIJA ŠUMA	
	OTVORENO	ZASENČENO	OTVORENO	ZASENČENO
Antioksidanti	0.298 (0.185 - 0.486)	0.226 (0.131 - 0.383)	0.232 (0.145 - 0.380)	0.235 (0.132 - 0.389)
Morfološke osobine lista	0.131 (0.002 - 0.608)	0.181 (0.001 - 0.654)	0.335 (0.004 - 0.816)	0.139 (0.001 - 0.535)
Fiziološke osobine lista	0.266 (0.001 - 0.746)	0.353 (0.004 - 0.771)	0.724 (0.386 - 0.957)	0.216 (0.001 - 0.708)
Fotosintetički pigmenti	0.984 (0.954 - 0.996)	0.966 (0.922 - 0.992)	0.891 (0.733 - 0.971)	0.988 (0.952 - 0.997)

Poreklo populacija, kao i svetlosni uslovi pod kojima su rasli klonovi *I. pumila*, imali su uticaj na veličinu, znak i broj statistički značajnih fenotipskih koeficijenata korelacija unutar i između funkcionalno povezanih grupa fenotipskih osobina (Prilog 2). U obe populacije, veći stepen integracije između analiziranih osobina utvrđen je kod klonova koji su rasli na otvorenom staništu, u odnosu na klonove istih genotipova sa zasenčenog staništa. Kod genotipova iz populacije Dina koji su rasli na domaćem, otvorenom staništu utvrđene su ukupno 23 značajne korelacije (12 pozitivnih i 11 negativne), nasuprot 11 (7 pozitivnih i 5 negativne) signifikantnih koeficijenata korelacije između osobina istih genotipova koji su rasli na stranom, zasenčenom staništu. Genotipovi iz populacije Šuma imali su, načelno, nešto manji broj značajnih korelacija u poređenju sa genotipovima iz populacije Dina: na otvorenom

staništu 19 (11 pozitivnih i 8 negativnih), a na zasenčenom 9 (4 pozitivnih i 5 negativnih). Na otvorenom staništu, najveći stepen integracije u okviru posmatranih funkcionalnih grupa osobina listova zabeležen je za enzimske i neenzimske antioksidante kod genotipova obe populacije. Takođe, genotipovi lokalne populacije imali su znatno veći stepen integracije između antioksidanata i grupe fizioloških osobina, u poređenju sa stranim genotipovima, kod kojih je bila izraženija integracija između morfoloških i fizioloških osobina (Prilog 2). Na zasenčenom staništu, lokalni i strani genotipovi pokazivali su nizak stepen integrisanosti u okviru posmatranih funkcionalno povezanih grupa osobina lista. Genotipovi populacije Dina, na zasenčenom staništu, zadržavali su integrisanost između antioksidanata i fizioloških osobina, koja u potpunosti odsustvuje kod genotipova populacije Šuma. Lokalni genotipovi na šumskom staništu ispoljavali su integrisanost između strukturnih i fizioloških osobina lista.

U zavisnosti od tipa staništa menjao se ne samo broj fenotipskih korelacija, već i obrazac korelacionih matrica. Hijerarhijsko poređenje parova korelacionih matrica antioksidanata i fotosintetičkih pigmenata vršeno je pomoću CPC analize (Tabela 4.2.7. A i B). Obrasci matrica antioksidanata u okviru svake populacije između staništa, kod genotipova iz populacije Dina imali su 5 zajedničkih PC osa ($\chi^2 = 0.675$, ACI = 33.34), dok su kod genotipova iz populacije Šuma bile zajedničke dve PC ose ($\chi^2 = 5.212$, ACI = 42.01). Obrasci korelacionih matrica fotosintetičkih pigmenata razlikovali su se u znatnoj meri ($\chi^2 = 0.017$, ACI = 8.02) kada su poređeni genotipovi iz populacije Dina sa alternativnih svetlosnih staništa, dok su matrice genotipova iz populacije Šuma pokazale znatnu podudarnost ($\chi^2 = 0.143$, ACI = 6.20). Na otvorenom staništu, poređenjem korelacionih matrica antioksidanata između genotipova iz populacija Dina i Šuma utvrđene su 4 zajedničke PC ose ($\chi^2 = 2.323$, ACI = 33.71), naspram 5 zajedničkih osa na zasenčenom staništu ($\chi^2 = 0.138$, ACI = 32.91). Korelacione matrice fotosintetičkih pigmenata različitih populacija na otvorenom i zasenčenom staništu pokazale su nizak nivo sličnosti.

TABELA 4.2.7. A. Hijerarhijsko poređenje (CPC analiza) parova korelacionih matrica antioksidanata i fotosintetičkih pigmenata genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma između različitih staništa. χ^2 = Hi kvadrat, df = stepeni slobode, *P* = verovatnoća, AIC = Akaike kriterijum.

OTVORENO VS. ZASENČENO STANIŠTE									
		POPULACIJA DINA				POPULACIJA ŠUMA			
<i>Antioksidanti</i>									
Viši model	Niži model	χ^2	df	<i>P</i>	AIC	χ^2	df	<i>P</i>	AIC
Podudarnost	Proporcionalnost	0.20	1	0.659	79.6	0.12	1	0.731	96.6
Proporcionalnost	CPC	57.59	6	0.000	81.4	64.71	6	0.000	98.5
CPC	CPC(5)	4.50	1	0.034	35.8	1.75	1	0.186	45.8
CPC(5)	CPC(4)	0.68	2	0.714	33.3	2.68	2	0.262	46.0
CPC(4)	CPC(3)	4.77	3	0.189	36.7	7.38	3	0.061	47.4
CPC(3)	CPC(2)	4.48	4	0.345	37.9	11.98	4	0.018	46.0
CPC(2)	CPC(1)	3.04	5	0.694	41.4	5.21	5	0.391	42.0
CPC(1)	Nepodudarnost	4.37	6	0.627	48.4	2.79	6	0.834	46.8
Nepodudarnost	---				56.0				56.0
<i>Fotosintetički pigmenti</i>									
Viši model	Niži model	χ^2	df	<i>P</i>	AIC	χ^2	df	<i>P</i>	AIC
Podudarnost	Proporcionalnost	1.06	1	0.304	10.6	14.8	1	0.000	24.9
Proporcionalnost	CPC	6.30	2	0.043	11.6	9.91	2	0.007	12.1
CPC	CPC(1)	3.24	1	0.072	9.3	0.14	1	0.705	6.2
CPC(1)	Nepodudarnost	0.02	2	0.992	8.0	0.05	2	0.974	8.0
Nepodudarnost	---				12.0				12.0

TABELA 4.2.7. B. Hijerarhijsko poređenje (CPC analiza) parova korelacionih matrica antioksidanata i fotosintetičkih pigmenata genotipova *I. pumila* sa različitim svetlosnih staništa, između populacija Dina i Šuma. χ^2 = Hi kvadrat, df = stepeni slobode, *P* = verovatnoća, AIC = Akaike kriterijum.

POPULACIJA DINA VS. POPULACIJA ŠUMA									
		OTVORENO STANIŠTE				ZASENČENO STANIŠTE			
<i>Antioksidanti</i>									
Viši model	Niži model	χ^2	df	<i>P</i>	AIC	χ^2	df	<i>P</i>	AIC
Podudarnost	Proporcionalnost	0.04	1	0.845	77.9	0.32	1	0.573	59.2
Proporcionalnost	CPC	56.2	6	0.000	79.9	37.73	6	0.000	60.9
CPC	CPC(5)	1.40	1	0.237	35.7	4.29	1	0.038	35.2
CPC(5)	CPC(4)	6.60	2	0.037	36.3	0.14	2	0.933	32.9
CPC(4)	CPC(3)	2.32	3	0.508	33.7	2.44	3	0.486	36.8
CPC(3)	CPC(2)	5.96	4	0.202	37.4	8.61	4	0.072	40.3
CPC(2)	CPC(1)	3.38	5	0.641	39.4	4.39	5	0.495	39.7
CPC(1)	Nepodudarnost	2.04	6	0.916	46.0	1.34	6	0.970	45.3
Nepodudarnost	---				56.0				56.0
<i>Fotosintetički pigmenti</i>									
Viši model	Niži model	χ^2	df	<i>P</i>	AIC	χ^2	df	<i>P</i>	AIC
Podudarnost	Proporcionalnost	13.24	1	0.000	23.3	0.32	1	0.570	8.2
Proporcionalnost	CPC	9.89	2	0.007	12.0	6.03	2	0.049	9.9
CPC	CPC(1)	0.10	1	0.754	6.1	1.83	1	0.176	7.8
CPC(1)	Nepodudarnost	0.04	2	0.979	8.0	0.02	2	0.990	8.0
Nepodudarnost	---				12.0				12.0

5 DISKUSIJA

5.1 Sezonska dinamika funkcionalnih osobina lista

5.1.1 Uloga antioksidanata u odgovoru na abiotički stres

Većina, ako ne i svi sredinski stresori, dovode do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika, ROS, koje utiču na redoks homeostazu biljnih ćelija (Dat i sar, 2000). Biljke koje rastu na otvorenom staništu zbog toga su češće izložene oksidativnom stresu u poređenju sa biljkama koje rastu u senci (Slooten i sar, 1995; Grace i Logan, 1996).

Sezonske promene ekoloških uslova staništa značajno su uticale na specifičnu aktivnost svih antioksidativnih enzima, kao i na količinu neenzimskih antioksidanata u listu biljaka *I. pumila*, koje su rasle u prirodi, na staništima sa različitim kvantitetom i kvalitetom svetlosti.

Izraziti porast aktivnosti antioksidativnog enzima *superoksid dismutaze* - SOD kod biljaka *I. pumila* iz obe populacije u letnjem periodu, koji se odlikuje visokim intenzitetom zračenja, visokim temperaturama i malom količinom padavina, u saglasnosti je sa brojnim istraživanjima koja su pokazala da povećana količina i/ili aktivnost ovog enzima utiče na povećanu otpornost organizma na brojne abiotičke stresore (niske i visoke temperature, visoki intenzitet svetlosti, osmotski stres) (Sen Gupta i sar, 1993; Streb i sar, 1997a; Santos i sar, 1999; Lee i Lee, 2000; Wang i sar, 2004). SOD predstavlja prvu odbrambenu liniju ćelije od superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$), a zbog nepropustljivosti membrana za $\cdot\text{O}_2^-$, ovaj enzim je zastupljen u svim ćelijskim organelama (Takahashi i Asada 1983; Bowler i sar, 1994).

Yang i sar. (2008) su pokazali da je suša u kombinaciji sa visokim intenzitetom svetlosti značajno povećala aktivnost SOD kod klijanaca *Picea asperata*. Takođe, pustinjske biljne vrste *Raetama raetam* i *Atriplex halimus* koje su bile aklimatizovane na visoke temperature, odlikovale su se znatno većom aktivnošću SOD, u poređenju sa biljkama koje nisu rasle u pustinjskim uslovima (Streb i sar, 1997a). Isto tako, utvrđeno je da su transgene biljke

Arabidopsis thaliana koje su imale povećanu ekspresiju Mn-SOD u mitohondrijama bile otpornije na stres izazvan solima, dok su transgene biljke pirinča sa povećanom ekspresijom superoksid dismutaze istog tipa ispoljavale veću otpornost na sušu (Wang i sar, 2004; Wang i sar, 2005). I transgene biljke *Nicotiana* koje su imale povećanu ekspresiju Cu/Zn-SOD u hloroplastima bile su otpornije na oksidativni stres uzrokovan visokim intenzitetom svetlosti i niskim temperaturama (Sen Gupta i sar, 1993).

Do variranja u aktivnosti antioksidativnih enzima može doći promenom aktivnosti već postojećih izoformi ili sintezom novih. U našem istraživanju, broj izoformi SOD nije se menjao tokom vegetacione sezone, i bio je isti kod biljaka iz obe analizirane populacije. Najveći procenat, odnosno oko 50% aktivnosti superoksid dismutaze činile su Cu/Zn-SOD, koje se nalaze u hloroplastima, citosolu i ekstarcelularnom prostoru, i Fe-SOD (oko 40%) karakteristične za stromu i hloroplaste. Procentualno najmanje zastupljena je bila Mn-SOD, oko 10%, lokalizovana u mitohondrijama i peroksizomima. U listu *I. pumila* iz populacije Dina uočen je porast procentualnog udela aktivnosti Cu/Zn-SOD i smanjenje udela aktivnosti Mn-SOD, dok je aktivnost Fe-SOD zadržala relativno konstantan udeo tokom cele vegetacione sezone. Nasuprot tome, tokom leta, u listovima biljaka iz populacije Šuma, došlo je do blagog porasta procentualnog udela aktivnosti Mn-SOD i Fe-SOD praćenog padom udela aktivnosti Cu/Zn-SOD. Najveći procentualni udeo aktivnosti izoformi Cu/Zn-SOD i porast njihovog procentualnog udela u ukupnoj aktivnosti superoksid dismutaze može se objasniti velikim značajem koji ima ovaj enzim u toleranciji oksidativnog stresa, što je potvrđeno u brojnim eksperimentima na transgenim biljkama (Bowler i sar, 1992; Bowler i sar, 1994; Van Breusegem i Inze, 2002; Lee i sar, 2007). Veća ukupna aktivnost SOD kod *I. pumila* koje su rasle u senci u poređenju sa biljkama sa otvorenog staništa u saglasnosti je sa rezultatima brojnih istraživanja (Lambreva i sar 2005; Jung i sar, 2000; Vuleta i sar, 2010). Tako na primer, utvrđeno je da je aktivnost SOD bila veća kod biljaka graška *Phaseolus vulgaris* L. koje su rasle na $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u poređenju sa istim

biljkama koje su rasle na $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Lambrea i sar, 2005). Takođe, kontrolne biljke krastavca gajene na niskom intenzitetu svetlosti imale su veću ukupnu aktivnost SOD od biljaka gajenih na visokom intenzitetu svetlosti (Jung i sar, 2000). Ovaj rezultat potvrđuje značaj $\cdot\text{O}_2^-$ kao signalnog molekula. Abiotički faktori, među kojima je i visok intenzitet zračenja, povećanjem ćelijskog sadržaja reaktivnih vrsta kiseonika mogu da pokrenu niz fiziološko-biohemijskih reakcija koje biljkama na otvorenom staništu omogućavaju aklimatizaciju na najstresniji period vegetacione sezone.

Regulacija koncentracije H_2O_2 važna je za biljke kako zbog zaštite ćelije od oksidativnog oštećenja, tako i zbog signalne uloge koju ova reaktivna vrsta kiseonika ima u biljnim ćelijama (Dat i sar, 2000; Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Mittler i Poulos, 2005). Biljke imaju nekoliko enzima koji efikasno i brzo uklanjaju H_2O_2 , među kojima su najznačajniji: APX, CAT i peroksidaze III klase (Mittler, 2002; Mittler i Poulos, 2005). Za održavanje stabilnog nivoa $\cdot\text{O}_2^-$ i H_2O_2 , ključna je koordinacija između aktivnosti SOD i enzima koji uklanjaju H_2O_2 . Balans između ovih reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i vezivanje jona metala, umanjuje mogućnost formiranja veoma reaktivnog $\text{HO}\cdot$ radikala, čime se sprečava nastanak oksidativnih oštećenja (Asada i Takahashi, 1987; Bowler i sar, 1992). Za razliku od drugih enzima koji uklanjaju H_2O_2 , antioksidativni enzim askorbat peroksidaza (APX) je specifičan za biljke. Odlikuje se visokim afinitetom prema askorbatu i nalazi se u svim ćelijskim odeljcima, gde učestvuje u uklanjanju H_2O_2 kao komponenta askorbat-glutation ciklusa, poznatog još kao i Asada-Halliwell-Foyer ciklus (Foyer i Halliwell, 1976; Asada i Takahashi, 1987). Analiza ukupne specifične aktivnosti APX u listu klonova *I. pumila*, koji nastanjuju različita svetlosna staništa, pokazala je porast aktivnosti tokom leta, kada su ekološki uslovi u njihovim staništima najnepovoljniji i, stoga, mogu dovesti do oksidativnog stresa. Brojna istraživanja na transgenim biljkama su potvrdila značaj koji APX ima u zaštiti od oksidativnog stresa (Wang i sar, 1999; Pnueli i sar, 2003; Yabuta i sar, 2004; Murgia i sar, 2004). Istraživanja koja su se bavila ekspresijom gena kod biljaka izloženim različitim abiotičkim i biotičkim

stresorima utvrdila su da su citosolni izoenzimi APX1 i APX2 najznačajniji za odgovor biljaka na stres (Yoshimura i sar 2000; Rizhsky i sar, 2002; Mullineaux i Karpinski, 2002; Fryer i sar, 2003) U našem istraživanju, identifikovane su dve izoforme koje su imale različite trendove tokom sezone. Izoforma veće molekulske mase (izoforma 1) je maksimalnu aktivnost dostizala u proleće, a zatim je aktivnost opadala tokom leta, dostižući najmanju vrednost u jesen. Nasuprot tome, izoforma manje molekulske mase (izoforma 2) se odlikovala povećanjem aktivnosti od proleća ka jeseni. Ovakvi obrasci aktivnosti ukazuju na različite uloge koje imaju ove izoforme kod *I. pumila*. Izoforma 1 bi mogla biti važna za procese intenzivnog vegetativnog rasta i cvetanja, dok bi izoforma 2 mogla imati primarnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti i transdukciji signala. Istraživanja na biljkama koje su imale povećanu aktivnost samo jednog antioksidativnog enzima davala su različite rezultate kada je u pitanju otpornost na uzročnike oksidativnog stresa. Eksperimentima sa transgenim biljkama koje su imale povećanu aktivnost oba antioksidativna enzima, APX i SOD, utvrđen je značaj koordinacije aktivnosti ovih enzima i složenost mehanizama koji regulišu odgovor biljke na stres. Kwon i sar (2002) su utvrdili da su transgene biljke duvana koje su imale povećanu aktivnost SOD i APX u hloroplastima ispoljavale povećanu toleranciju na oksidativni stres izazvan parakvatom, u poređenju sa netransformisanim biljkama. Lee i sar (2007) su takođe utvrdili da povećana aktivnost Cu/Zn-SOD i APX u hloroplastima transgenih linija *Festuca arundinacea* povećava otpornost na brojne stresore, uzročnike oksidativnog stresa. Faize i sar (2011) su nedavno otkrili da citosolne izoforme Cu/Zn-SOD i APX kod transgenih linija duvana predstavljaju efikasnu zaštitu od stresa izazvanog deficitom vode.

Katalaza - CAT je enzim koji učestvuje u regulaciji redoks statusa ćelije. Lokalizovana je u peroksizomima i glioksizomima, gde katalizuje dismutaciju H_2O_2 nastalog tokom procesa fotorespiracije i β -oksidacije masnih kiselina, bez korišćenja reduktanata (Willekens i sar, 1997; Gechev i sar, 2003; Feierabend 2005; Engel i sar, 2006). Za razliku od askorbat peroksidaze koja je zastupljena u

svim ćelijskim odeljcima, i koja ispoljava visoki afinitet prema H_2O_2 , vršeci finu modulaciju nivoa onih reaktivnih vrsta kiseonika koji imaju signalnu ulogu, afinitet CAT prema H_2O_2 je znatno manji, što omogućava uklanjanje povećanih količina ROS nastalih kao posledica prisustva različitih stresora (Mittler, 2002). Porast specifične aktivnosti CAT tokom letnjeg perioda u listu klonova *I. pumila* iz populacije Šuma u saglasnosti je sa dosadašnjim istraživanjima u kojima je utvrđena povećana aktivnost ovog antioksidativnog enzima kod biljaka izloženih uslovima koji dovode do povećane fotorespiracije. Nasuprot tome, kod klonova iz populacije Dina, aktivnost katalaze je dostizala najveću vrednost tokom proleća, da bi tokom leta i jeseni aktivnost ovog enzima drastično opala. Različita sezonska dinamika aktivnosti CAT kod klonova sa različitih svetlosnih staništa se može objasniti činjenicom da je katalaza protein sa visokom stopom sinteze i razgradnje i veoma osetljiv na visoke vrednosti intenziteta svetlosti i temperature (Hertwig i sar, 1992; Streb i Feierabend, 1996; Feierabend, 2005; Vuleta i sar, 2010). Abiotički stresori, kao što su ekstremne temperature, visoki intenzitet svetlosti ili suša, koji po pravili utiču na smanjenje sinteze proteina, utiču takođe i na količinu CAT-proteina, a samim tim i na njegovu aktivnost (Hertwig i sar, 1992; Willekens i sar, 1997; Feierabend, 2005). Kao što je prikazano na Slici 4.1.10., optimum aktivnosti katalaze u obe populacije *I. pumila* je bio na 30°C, dok je na višim temperaturama aktivnost CAT značajno opadala (Vuleta i Tucić, 2009). Pošto je tokom leta temperatura lista dinskih klonova *I. pumila* drastično prevazilazila temperaturni optimum aktivnost katalaze (Tabeli 1.6.2), dok je kod klonova koji rastu u šumskoj senci bila znatno niža, odnosno ispod optimuma utvrđenog za aktivnost katalaze, to bi mogao da bude jedan od razloga, pored razlika u intenzitetu ambijentalne svetlosti, za izrazito različitu dinamiku aktivnosti ovog enzima između biljaka populacije koja naseljava otvoreno stanište u odnosu na onu koja nastanjuje šumsku senku (Vuleta i Tucić, 2009; Vuleta i sar, 2010).

Iako je katalaza od velikog značaja za zaštitu C_3 biljaka od oksidativnog stresa koji se javlja usled izloženosti visokim intenzitetima svetlosti, sam enzim

je osetljiv na svetlost, naročito u prisustvu superoksida (Streb i Feierabend, 1996; Willekens i sar, 1997; Feierabend, 2005; Engel i sar, 2006). Međutim, kod biljaka koje žive u sredinama sa ekstremnim ekološkim uslovima, kao što su planinska staništa, gde se istovremeno javljaju visoki intenzitet svetlosti i niske temperature, identifikovana je katalaza otporna na fotoinaktivaciju (Streb i sar, 1997b; Feierabend, 2005; Engel i sar, 2006). Izoenzimi CAT neosetljivi na svetlost nađeni su u listu alpske biljke *Homogyne alpina* i peroksizomalnim inkluzijama kotiledona suncokreta (Engel i sar, 2006). Sekvenca amino kiselina ovih izoenzima bila je visoko podudarana sa sekvencama katalaza osetljivih na svetlost, sa izmenama u svega šest amino kiselina i to u regionu koji je kod osetljivih enzima veoma konzervativan (Engel i sar, 2006). Takođe, njihova specifična aktivnost bila je veoma niska i iznosila je svega 10% aktivnosti katalaza osetljivih na svetlost iz peroksizomalnog matriksa suncokreta (Feierabend, 2005; Engel i sar, 2006).

U našem istraživanju, kod genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na otvorenom staništu, u letnjem periodu, na nativnim gelovima detektovana je jedna izoforma katalaze (izoforma 2), koja je po svojim karakteristikama slična katalazama otpornim na fotoinaktivaciju kod *H. alpina* i suncokreta. Međutim, u šumskoj senci, kod istih genotipova iz obe populacije, uočene su dve izoforme CAT, izoforma 1 i izoforma 3. Aktivnost izoforme 2 bila je takođe daleko manja u poređenju sa izoformama 1 i 3, detektovanim u listu *I. pumila* koje su rasle u šumskoj senci. Prisustvo izoforme CAT smanjene aktivnosti i neosetljivosti na svetlost – izoforma 2, na otvorenom staništu, kao i u slučaju *H. alpina* i suncokreta (Feierabend, 2005; Engel i sar, 2006), mogla bi biti adaptacija biljaka *I. pumila* na izrazito nepovoljne ekološke uslove koji se javljaju tokom letnjeg perioda (kombinacija visokog intenziteta ambijentalne svetlosti i povišene temperature).

Peroksidaze III klase – POD su velika multigenska porodica proteina (73 gena kod *Arabidopsis-a*, 138 gena kod pirinča kodiraju ove enzime), koju čine veliki broj izoformi sa brojnim i raznovrsnim fiziološkim funkcijama

(Passardi i sar, 2004; Welinder i sar, 2002). Do sada je utvrđeno da POD učestvuju u velikom broju fizioloških procesa, kao što su: lignifikacija, suberinizacija, povezivanje strukturnih proteina ćelijskog zida, odbrana od patogena, senescencija, katabolizam auksina i zaštita od oksidativnog stresa (Amaya i sar, 1999; Chittoor i sar, 1999; Delannoy i sar, 2003; Cosio i Dunand, 2009). Za razliku od drugih antioksidativnih enzima koji pokazuju visoku specifičnost prema supstratu, ovi enzimi za redukciju H_2O_2 koriste različite molekule (fenolna jedinjenja, prekursori lignina, auksin i brojne sekundarne metabolite), a takođe mogu i da proizvedu ROS (Hiraga i sar, 2001; Passardi i sar, 2005; Mittler, 2004). Specifična aktivnost POD u listu *I. pumila* bila je veća tokom leta, u odnosu na proleće i jesen. Brojna istraživanja su pokazala da ovaj tip peroksidaza igra važnu ulogu u odgovoru biljaka na brojne abiotičke i biotičke stresore. Jansen i sar (2001) su pokazali da povećana aktivnost anijonske peroksidaze koja oksiduje fenol značajno doprinosi zaštiti od UV zračenja kod dve vrste iz porodice Lemnaceae, kao i da, učestvujući u katabolizmu auksina, ima važnu ulogu u regulaciji arhitekture lista. Kumar i sar (2012) su nedavno utvrdili da transgene biljke duvana sa povećanom ekspresijom gena za dve peroksidaze *Catharanthus roseus*, jedne lokalizovane u apoplastu i druge u vakuolama, bolje podnose oksidativni stres od kontrolnih, netransformisanih biljaka. Ovi autori su takođe utvrdili da POD lokalizovan u apoplastu doprinosi otpornosti na niske temperature, dok POD iz vakuola ublažava negativne efekte osmotskog stresa. Choi i sar (2012) su otkrili da ekstracelularna peroksidaza, kod biljke *Capsicum annuum*, doprinosi toleranciji na sušu, osmotski stres i niske temperature.

Glutation reduktaza - GR je enzim koji prevodi oksidovani glutation (GSSG) u redukovani oblik (GSH), uz korišćenje NADPH (Halliwell i Gutteridge, 2000). Kod biljaka, GR spada u enzime askorbat-glutation ciklusa, zajedno sa enzimima askorbat peroksidazom (APX), monodehidroaskorbat reduktazom (MDAR) i dehidroaskorbat reduktazom (DHR). Putem askorbat-glutation ciklusa vrši se uklanjanje H_2O_2 i regulacija koncentracija askorbata

(Asc) i glutaciona (GSH), osnovnih komponenti redoks ravnoteže ćelije (Noctor i Foyer, 1998; Halliwell i Gutteridge, 2000). Aktivnost GR je često korelisana sa stresorima koji izazivaju oksidativni stres, kao što su suša, osmotski stres, UV zračenje, visoki intenzitet svetlosti, ozon, teški metali i herbicidi (Apel i Hirt, 2004; Romero-Puertas i sar, 2006; Ding i sar, 2009).

Specifična aktivnost glutation reduktaze u listu klonova *I. pumila*, sa otvorenog i zasenčenog staništa, pokazivala je sličnu sezonsku dinamiku kao i ostali antioksidativni enzimi; maksimalne vrednosti dostizala je u letnjem periodu, koji se karakteriše najnepovoljnijim sredinskim uslovima. Ovo povećanje aktivnosti GR je u saglasnosti sa istraživanjima Romero-Puertas i sar (2006) koji su utvrdili povećanje aktivnosti GR u listu biljaka graška pod dejstvom visokih intenziteta svetlosti, mehaničkog oštećenja, kao i niskih i visokih temperatura. Značajnu ulogu GR u regulaciji redoks statusa ćelije tokom oksidativnog stresa potvrdili su i eksperimenti na transgenim biljkama duvana, koje su zbog suprimirane aktivnosti GR ispoljile povećanu osetljivost na oksidativni stres (Ding i sar, 2009).

Neenzimski antioksidanti, kao što su solubilna, nestrukturna fenolna jedinjenja i antocijani, važna su komponenta mehanizama zaštite od fotooksidativnog stresa u vegetativnim tkivima biljaka (Gould i sar, 2002; Grace, 2005; Neill i Gould, 2003; Petrini i sar, 2002; Page i sar, 2012). Antocijani su grupa u vodi rastvorljivih flavonoida koji, u zavisnosti od pH, mogu biti crvene, ljubičaste ili plave boje (Harborne, 1988). Fenolna jedinjenja i antocijani funkcionišu kao filteri koji umanjujući intenzitet sunčevog zračenja, štite hloroplaste od viška apsorbovane svetlosne energije i njenog fotoinhibitornog i fotooksidativnog efekta (Hughes i sar, 2005; Hughes i Smith, 2007; Page i sar, 2012). Sve je više literaturnih podataka koji dokazuju da se fotoprotektivna uloga antocijana zasniva na njihovoj sposobnosti da apsorbuju svetlost u plavo-zelenom i žutom delu spektra (500 – 600 nm), koje bi u protivnom apsorbovao hlorofil b. Na ovaj način, apsorbujući višak ekscitacione energije, antocijani indirektno umanjuju formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (Chalker-Scott, 1999;

Steyn i sar, 2002; Neill i Gould, 2003; Hughes i sar, 2005; Hughes i Smith, 2007; Page i sar, 2012). Eksperimenti na biljkama *Galax urceolata* koje mogu formirati crvene listove sa povećanom količinom antocijana utvrdili su da ovi listovi pokazuju znatno manji pad stope fotosinteze kada su izloženi zelenoj svetlosti koju antocijani apsorbuju, u poređenju sa zelenim, acijaničnim, listovima iste vrste. Međutim, kada su oba tipa listova *Galax urceolata* izložena crvenoj svetlosti koju antocijani ne apsorbuju razlika u stopi fotosinteze se ne uočava (Hughes i sar, 2005; Hughes i Smith, 2007). Pored uloge u smanjenju visokih intenziteta sunčevog zračenja, antocijani su i snažni antioksidanti koji direktno uklanjaju slobodne radikale i druge ROS, čak do četiri puta efikasnije od askorbata ili α -tokoferola (Gould, 2004; Grace, 2005; Hatier i Gould 2008; Tucić i sar, 2009; Vuleta i sar, 2010). Na primer, Neill i Gould (2003) su utvrdili da bezbojni citosolni antocijani efikasno uklanjaju superoksid nastao u suspenziji hloroplasta na pH 7.0. U listu *I. pumila*, na oba svetlosna staništa, količina antocijana se povećavala tokom sezone, dostižući najveće vrednosti u jesenjem periodu. Značajno veće količine fenolnih jedinjenja i antocijana tokom cele vegetativne sezone u listovima biljaka sa otvorenog staništa, u poređenju sa biljkama koje su rasle u senci, potvrđuje njihovu fotoprotektivnu ulogu.

Rezultati naših istraživanja ukazuju da su jedinke *I. pumila* koje su bile izložene nepovoljnim sredinskim uslovima, posebno tokom letnjeg perioda, aktivirale brojne fotoprotektivne mehanizme, uključujući enzimske i neenzimske antioksidante. Klonovi koji su rasli u šumskoj senci, tokom cele vegetacione sezone, imali su više aktivnosti antioksidativnih enzima i bili su manje izloženi oksidativnom stresu, što ukazuju značajno manje vrednosti količine malondialdehida (MDA), koji je pokazatelj intenziteta oksidativnih oštećenja membrana. Nasuprot tome, kod klonova sa otvorenog staništa, značajniju ulogu u zaštiti od oksidativnih oštećenja imali su neenzimski antioksidanti, naročito antocijani, čija je količina u listu, po pravilu, bila veća nego kod biljaka iz senke. Manje vrednosti aktivnosti antioksidativnih enzima kod biljaka sa otvorenog staništa mogle bi da budu posledica supresije procesa

koji dovode do formiranja ROS, što dovodi do smanjenja njihove intracelularne koncentracije. Fotosinteza se smatra glavnim izvorom reaktivnih vrsta kiseonika kod biljaka, i poznato je da se kod nekih vrsta supresija fotosintetičke aktivnosti javlja kao odgovora na nepovoljne uslove sredine (Mittler i sar, 2001; Rizhsky i sar, 2002). Jedan od pokazatelja smanjenja stope fotosintese kod biljak *I. pumila* sa otvorenog staništa, u poređenju sa biljkama koje su rasle na zasenčenom staništu, je drastično manja aktivnost CAT, koja je korelisana sa intenzitetom fotosinteze (Feierabend, 2005).

Aklimatizacija antioksidanata na sredinski stres može se posmatrati u svetlu efekata koji stresori imaju na balans između apsorpcije svetlosne energije putem fotosistema i konverzije ove energije u hemijsku energiju putem Calvin-Benson-ovog ciklusa. Drugim rečima, pošto je formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) proporcionalno višku apsorbovane energije, antioksidativni sistem se ne prilagođava intenzitetu svetlosti *per se*, već nivou viška apsorbovane energije (Logan i sar, 2006). Ovo je pokazano na primeru biljke senke *Vinca major* i biljke svetlosti *Cucurbita pepo* (Logan i sar, 1998). Gajene na istim intenzitetima svetlosti biljke senke, koje inače sporo rastu i imaju nižu stopu fotosinteze, ispoljavaju višu aktivnost antioksidanata u listu nego biljke sunca, koje odlikuje brži rast i visoka stopa fotosinteze (Logan i sar, 1998). Viši nivo aktivnosti antioksidativnih enzima uočen je i u listu biljaka *I. pumila* koje su rasle u senci, u poređenju sa biljkama adaptiranim na otvoreno stanište.

Pored variranja u aktivnosti antioksidanata, biljke mogu umanjiti apsorpciju viška svetlosne energije i smanjenjem količine hlorofila, supresijom fotosinteze, kao i povećanjem količine fenola, antocijana i karotenoida, što je takođe uočeno kod klonova *I. pumila* sa otvorenog staništa. Svi ovi mehanizmi omogućavaju efikasnu zaštitu *I. pumila* od nepovoljnih sredinskih uslova tokom letnjeg perioda koji se odlikuje izrazito visokim zračenjem, visokim temperaturama i sušom.

5.1.2 Variranje morfoloških i fizioloških osobina lista izazvano nestabilnošću svetlosnih uslova staništa

Osobine lista često odražavaju adaptivne strategije biljaka na različitu dostupnost esencijalnih resursa životne sredine, kao što su svetlost, voda, nutrijenti i temperatura (Lambers i Poorter, 1992; Vendramini i sar, 2002).

Specifična površina lista - SLA je jedna od ključnih morfoloških osobina biljaka koje su povezane sa apsorpcijom svetlosne energije (Evans i Poorter, 2001). Biljke koje rastu na otvorenim staništima i koje su izložene visokim intenzitetima svetlosti imaju niske vrednosti SLA i deblje listove, usled dodatnih slojeva ili izduženosti palisadnih ćelija (Björkman, 1981). Na ovaj način povećava se broj hloroplasta i količina fotosintetičkih enzima u odnosu na površinu lista, što dovodi do povećavanja stope fotosinteze po jedinici površine. Međutim, u staništima koja karakteriše nizak intenzitet svetlosti, od primarnog značaja je povećanje fotosintetički aktivne površine u odnosu na biomasu, čime se kompenzuje smanjenje stope fotosinteze uzrokovano smanjenim intenzitetom raspoložive svetlosti (Poorter i Nagel, 2000; Evans i Poorter, 2001; Shipley i sar, 2005). Prema Evans-Poorter-ovom modelu, ukoliko dva lista koji imaju istu biomasu i istu količinu hlorofila po jedinici površine, pri čemu jedan ima nisku vrednost SLA a drugi visoku, list sa visokom vrednošću SLA sadržaće polovinu količine Rubisco u odnosu na list sa niskim SLA, ali će apsorbovati dva puta više fotona (Evans i Porter, 2001).

Naše istraživanje je pokazalo da su biljke *I. pumila* koje su rasle na otvorenom staništu zaista imale manje vrednosti SLA u odnosu na biljke sa zasenčenog staništa, tokom cele vegetacione sezone. Takođe, od proleća do jeseni je došlo do blagog porasta SLA u obe populacije *I. pumila*. Pošto povećanje SLA predstavlja jedan od najzančajnijih faktora koji omogućava povećano usvajanja ugljenika po jedinici mase lista, naročito u uslovima senke, porast površine lista u odnosu na biomasu sa protekom vegetacione sezone u obe analizirane populacije je najverovatnije uzrokovan smanjenjem intenziteta svetlosti zbog povećanje gustine i/ili visine susednih biljaka na otvorom

staništu, odnosno razvojem gušćeg vegetacionog sklopa u zasenčenom staništu ove biljne vrste (Tucić i sar. 1999; Evans i Poorter, 2001; Shipley i sar, 2005).

Gustina stoma - SD, je jedna od anatomskih osobina lista koja je od izuzetnog funkcionalnog značaja za fiziološke procese biljke, zbog uloge koju stome imaju u regulaciji razmene gasova, količini vode i temperature lista (Casson i Gray, 2008). Poznato je da je SD lista veoma osetljiva na svetlosni režim pod kojim se odvijalo razviće i rast biljaka, i da je pozitivno korelisana sa intenzitetom svetlosti (Tucić i sar, 1999; Al Afas i sar, 2007; Poorter i sar, 2009; Loranger i Shipley i sar, 2010). Zanimljivo je da signal presudan za formiranje broja stoma po jedinici površine novoformiranog lista, pre svega, zavisi od intenziteta svetlosti koji su stariji listovi percipirali, a ne od svetlosnih uslova pod kojima se novoformirani list razvija (Thomas i sar, 2003; Coupe i sar, 2006). Provodljivost stoma je u direktnoj zavisnosti od broja, rasporeda i veličine, jer postoji uzajamno ograničavanje (eng, trade-off) između veličine stoma i njihovog broja. List sa većom gustinom sitnijih stoma može efikasnije da smanji transpiraciju i tako da ekonomičnije koristi vodu (Poulos i sar, 2007; Wang i sar, 2007).

Kod listova *I. pumila* došlo je do porasta gustine stoma tokom vegetacione sezone. Listovi biljaka sa otvorenog staništa imali su veći broj stoma po jedinici površine u letnjem i jesenjem periodu, u poređenju sa listovima senke. Međutim, zbog velikog individualnog variranja ove funkcionalne osobine, razlika se nije pokazala statistički značajnom, što ukazuje da pored intenziteta svetlosti i drugi ekološki faktori sredine imaju uticaja na gustinu stoma. Pošto stome regulišu razmenu gasova i utiču na promet vode kroz biljku, variranje broja i veličine stoma omogućava biljkama da optimizuju proces fotosinteze u skladu sa raspoloživom količinom vode (Chaerle i sar, 2005; Casson i Gray, 2008).

Sadržaj vode u listu - LWC je još jedna ekološki važna osobina lista, koja ima uticaja na fotosintetičku aktivnost biljke. Pod pretpostavkom da je sveža masa lista proporcionalna njegovom volumenu, LWC će, pre svega, zavisiti od

gustine lista. Nasuprot sadržaju vode u listu, SLA je osobina koja odražava i gustinu i debljinu lista (Witkowski i Lamont, 1991). Zbog toga će, kada se uporede dva lista slične debljine, SLA i LWC biti pozitivno korelisane (Garnier i Laurent, 1994).

Kod *I. pumila* uočena je statistički značajna pozitivna korelisanost između ove dve osobine u populaciji Dina u proleće i jesen, ali se u letnjem periodu asocijacija između LWC i SLA smanjivala, tako da koeficijent korelacije između ove dve osobine nije bio statistički značajan. U proleće i leto, kod biljaka iz populacije Šuma ova relacija nije uočena, dok je u letnjem periodu detektovana statistički značajna negativna korelacija između LWC i SLA. Kriva variranja LWC tokom vegetacione sezone imala je različit oblik kod klonova sa otvorenog i zasenčenog staništa. Vrednosti LWC su, po pravilu, bile više kod bljaka iz populacije Šuma u odnosu na populaciju Dina, što ukazuje na to da deficit vode ne samo da je izraženiji kod biljaka sa otvorenog staništa, već i da je obrazac promene sadržaja vode i suve mase u listu *I. pumila* različit tokom vegetacione sezone na otvorenom prostoru i u vegetacionoj senci.

Za održavanje vodnog balansa biljke koriste nekoliko različitih mehanizama, među kojima je i modifikacija elastičnosti ćelijskog zida. Pojačana lignifikacija i rigidnost ćelijskog zida omogućava biljkama da i u uslovima suše održe protok vode kroz listove (Niinemets i Valldares, 2004; Verslues i sar, 2006). Postoji nekoliko posrednih pokazatelja koji upućuju na promene u elastičnosti ćelijskog zida, među kojima su gustina lista i ***količina suve materije u listu*** - LDMC, koji se povećavaju i postaju pozitivno korelisani sa porastom intenziteta svetlosti (Niinemets i Valldares, 2004). U slučaju *I. pumila*, listovi klonova koji su rasli na otvorenom staništu takođe su imali veći udeo suve mase (povećana lignifikacija), u poređenju sa listovima senke, što se ogledalo i u većim vrednostima LDMC. Deblji ćelijski zidovi (veće vrednosti LDMC), manje vrednosti SLA i veća gustina sitnijih stoma dovode do smanjenja provodljivosti stoma, čime biljke povećavaju efikasnost korišćenja vode (eng. WUE - Water-Use Efficiency), kao i toleranciju na sušu (Hanba i sar, 2002; Tanaka i Shiraiwa,

2009; Niinemets i Valldares, 2004). Prosečne vrednosti LWC i RWC potvrđuju veći deficit vode u listovioma biljaka iz populacije Dina nego u listovima šumske populacije, naročito u letnjem, najsušnijem periodu. Međutim, kada se količina vode izrazi po jedinici površine lista (sukulentnost, SU) uočava se suprotan trend: listovi biljaka dinske populacije najveću efikasnost u očuvanju vode, odnosno sukulentnost, postižu u letnjem, najekstremnijem periodu. U listovima biljaka šumske populacije, prosečne vrednosti sukulentnosti održavale su se na sličnom nivou tokom cele sezone, ukazujući na manji deficit vode na zasenčenom staništu u odnosu na otvoreno stanište.

Karotenoidi – Cars su fotosintetički pigmenti koji, pored sakupljanja svetlosne energije, imaju ulogu i u zaštiti fotosintetičkog aparata od fotooksidativnih oštećenja izazvanih singletnim kiseonikom, $^1\text{O}_2$. Karotenoidi mogu direktno da deaktiviraju $^1\text{O}_2$ ili da preko ksantofilnog ciklusa omoguće rasipanje viška apsorbovane svetlosne energije u vidu toplotne energije (Demmig-Adams i Adams, 1992; Logan i sar, 1998).

U listovima *I. pumila* iz dve prirodne populacije sa različitih svetlosnih staništa, karotenoidi su imali sličnu sezonsku dinamiku kao i hlorofili. Tokom sva tri godišnja doba, znatno manje su varirali kod klonova sa zasenčenog staništa u poređenju sa klonovima sa otvorenog staništa, kod kojih je u letnjem periodu došlo do izrazitog smanjenja količine i karotenoida i hlorofila. Prosečna količina obe grupe fotosintetičkih pigmenata bila je veća u listu biljaka sa otvorenog staništa, kao što je i dokumentovano u literaturi (Moran i sar, 1994; Logan i sar, 1998; Loggini i sar, 1999). Redukcija količine pigmenata pod dejstvom svetlosti i suše omogućava biljkama smanjenje energetskog opterećenja usled apsorpcije viška svetlosne energije. Izražena sezonska dinamika, kao i značajan uticaj staništa na količinu fotosintetičkih pigmenata u listu *I. pumila* ukazuju na veliki značaj koji plastičnost ovih osobina ima na opstanak, razviće, rast, i reprodukciju u heterogenim svetlosnim uslovima životne sredine. Poređenjem odnosa između količine karotenoida i ukupnog hlorofila kod *I. pumila*, uočava se značajan porast ovog količnika u toku leta na

otvorenom staništu, dok je kod biljaka koje su rasle u senci ovaj odnos imao slične vrednosti tokom sva tri posmatrana godišnja doba. Dobijeni rezultati potvrđuju značajnu ulogu koju karotenoidi imaju u rasipanju viška apsorbovane svetlosne energije. U pogledu količine hlorofila a i hlorofila b, nije utvrđena statistički značajna razlika u njihovom odnosu u listu *I. pumila*, između populacija Dina i Šuma, iako je ovaj parametar važan pokazatelj prilagođenosti lista na svetlosni režim staništa, trebalo bi da ima izrazito manju vrednost kod listova senke (Logan i sar, 1998; Evans i Poorter, 2001). Ovaj, naizgled neuobičajen rezultat, može se objasniti činjenicom da je u slučaju *I. pumila* promena u strukturi lista, tj. značajno povećanje površine lista u odnosu na suhu masu (SLA), kod listova šumske populacije bilo dovoljno da omogući rearanžman hloroplasta i na taj način prilagodi fotosintetički aparat raspoloživoj količini svetlosne energije bez izmene odnosa u količini hlorofila a i b. Poznato je da se na niskim intenzitetima svetlosti hloroplasti u ćeliji grupišu i pozicioniraju na način koji omogućava maksimum apsorpcije (akumulacioni odgovor), dok na visokim intenzitetima svetlosti zauzimaju položaj koji maksimizira uzajamno zasenčivanje (odgovor izbegavanjem), čime se umanjuju fotooksidativna oštećenja (Sakai i sar, 2001; Kasahara i sar, 2002; Williams i sar, 2003; Wada i sar, 2003). Koji će od ovih odgovora biti realizovan zavisi od dva fotoreceptora, fototropina 1 i fototropina 2, koji takođe učestvuju i u otvaranju stomata koje izaziva svetlost (Wada i sar, 2003). Sposobnost promene mesta hloroplasta u ćeliji u zavisnosti od intenziteta svetlosti predstavlja jednu od važnih fizioloških adaptacija biljaka, koja je od izuzetne važnosti za biljke koje rastu u heterogenim svetlosnim uslovima (a takvih je u prirodi većina), jer omogućuje efikasnu zaštitu fotosintetičkog aparata od fotooksidativnih oštećenja (Wada i sar, 2003).

5.2 Lokalne adaptacije na prostorno variranje ekoloških činilaca staništa

Dinamika prostorno-vremenskog variranja abiotičkih faktora u prirodi je veoma različita, što zahteva kako kratkoročne ili ekološke tako i dugoročne ili evolucione odgovore. Kod organizama sa sedentarnim životnim stilom kao što su biljke, formiranje funkcionalno-odgovarajućih fenotipova u različitim staništima može se ostvariti na dva načina: kratkoročno, putem fenotipske plastičnosti ili dugoročno, formiranjem konstitutivnih fenotipova (Van Tienderen, 1991; Van Tienderen, 1997). U ostvarenju jednog od ovih alternativnih bioloških fenomena primarnu ulogu igra tip granulacije postojećih staništa u odnosu na način na koji ih organizmi koriste (Levins, 1963; Gillespie, 1974; Pigliucci i sar, 2003). U slučaju kada je variranje ekoloških uslova staništa *grubo granulisano* (eng. coarse-grained environmental variation) u odnosu na veličinu i disperzionu sposobnost jedinke, tj. ako jedinke provode mnogo više vremena u jednom nego u drugim staništima, teorijski se očekuje da će se evolucija populacija u takvim životnim sredinama odvijati formiranjem konstitutivnih, odnosno lokalno adaptiranih fenotipova (Galen i sar, 1991; Dudley, 1996; Santamaria i sar, 2003; Banta i sar, 2007). Suprotno tome, ako je variranje ekoloških uslova *fino granulisano* (eng. fine-grained environmental variation), odnosno ako jedinke koriste različite resurse životne sredine proporcionalno njihovoj prostorno-vremenskoj raspodeli u datom staništu, tada se očekuje evolucija adaptivne fenotipske plastičnosti kojom se postiže fino usaglašavanje fenotipova sa promenom u njihovim mikro-sredinama (Dudly 1996; Tucić i sar. 1998; Donohue i sar. 2001; Griffith i Sultan 2004; Manitašević i sar. 2007, Vuleta i sar. 2010).

Dakle, prisustvo različitih fenotipova (istih osobina) u populacijama sa različitih lokalnih staništa rezultat je ili adaptivne fenotipske plastičnosti/homeostaze, ili predstavlja lokalnu adaptaciju nastalu interakcijom između genotipova svake populacije i lokalnih sredinskih uslova, odnosno

divergentne prirodne selekcije u različitim staništima (Van Tienderen, 1997; Kawecki i Ebert, 2004).

Pošto u lokalnim populacijama divergentna prirodna selekcija može da dovede do evolucije osobina koje doprinose adaptivnoj vrednosti u domaćem staništu, tj. pod lokalnim sredinskim uslovima, očekuje se da će domaći genotipovi u lokalnim populacijama imati veću adaptivnu vrednost u odnosu na genotipove poreklom sa drugih staništa. Ovaj fenomen poznat je kao *lokalna adaptacija* (Williams, 1966; Kawecki i Ebert, 2004). Međutim, iako ekološki uslovi staništa mogu da budu različiti u različitim populacijama, homogenizujući evolucionni faktori kao što su protok gena, genetički drift i mutacije ograničiće delovanje divergentne selekcije (Lenormand, 2002; Goldberg i Lande, 2007). Drugi ograničavajući faktor evolucione diverzifikacije populacija su genetička varijansa unutar osobina i genetička kovarijansa između osobina. Sve dok postoji genetička varijansa unutar različitih osobina, niska genetička korelisanost između osobina i ograničen protok gena, očekuje se da će populacije evoluirati u pravcu optimalnog fenotipa za specifične uslove životne sredine.

Da bi utvrdili da li su lokalne populacije *I. pumila* adaptirane na svetlosni režim koji je vladao u njihovim staništima koristili smo dva eksperimentalna pristupa: „domaći vs. strani“ (eng. „local vs. foreign“) i „kod kuće vs. van kuće“ (eng. „at home vs. away“). U prvom eksperimentalnom pristupu („domaći vs. strani“) predviđa se da će na svakom staništu genotipovi iz lokalne populacije ispoljiti veću adaptivnu vrednost, u odnosu na genotipove iz strane populacije. Nasuprot tome, u drugom eksperimentalnom pristupu, tj. „kod kuće vs. van kuće“ naglasak je na razlikama u adaptivnim vrednostima istog genotipa na „svom“ u odnosu na „tuđe“ stanište, pretpostavljajući da je došlo do lokalne adaptacije ukoliko je adaptivna vrednost genotipova veća na domaćem staništu (kod kuće) nego na drugim staništima (van kuće).

Fenotipska ekspresija morfološko-anatomskih i fiziološko-biohemijskih osobine lista *I. pumila*, kod klonova poreklom iz dve prirodne populacije, Dina i

Šuma, značajno se menjala pod uticajem svetlosnih uslova staništa. Aktivnost i količina antioksidanata u listu biljaka iz populacije Dina bila je veća na otvorenom staništu, tj. kod kuće u odnosu na zasenčeno stanište, odnosno van kuće, osim u slučaju antioksidativnog enzima katalaze, koja je ispoljavala suprotan pravac promene. Prosečne vrednosti suve materije u listu i sukulenosti lista takođe su bile veće na otvorenom staništu, odnosno „kod kuće“ nego u zasenčenom staništu, dok su specifična površina lista, sadržaj vode u listu i količina fotosintetičkih pigmenata imali veće vrednosti na zasenčenom staništu, tj. „van kuće“ u odnosu na otvoreno stanište. Kod klonova iz populacije Šuma, prosečna aktivnost antioksidativnih enzima APX, GR i POD, količine antocijana i fenola, kao i prosečne vrednosti količine suve materije u listu (LDMC) i sukulenosti lista (SU) bile su veće na otvorenom staništu (van kuće) u odnosu na zasenčeno stanište (kod kuće). Nasuprot ovih osobina, specifična površina lista (SLA), sadržaj vode u listu (LWC), aktivnost CAT i količina fotosintetičkih pigmenata imali su veće srednje vrednosti na domaćem - zasenčenom staništu, nego na stranom - otvorenom staništu. Dobijeni rezultati ukazuju da se uočena promena u fenotipskoj ekspresiji analiziranih osobina može definisati kao adaptivna fenotipska plastičnost.

Testiranje adaptivnosti ispitivanih morfološko-anatomskih (SLA, LDMC, LWC i SU) i fiziološko-biohemijskih (antioksidanti i fotosintetički pigmenti) osobina lista *I. pumila* korišćenjem eksperimentalnog pristupa u kome se porede „domaći vs. strani“ genotipovi u suprotnim svetlosnim sredinama pokazalo je da se srednje vrednosti većine ovih osobina nisu statistički značajno razlikovale između genotipova iz populacija Dina i Šuma, ni na otvorenom ni na zasenčenom staništu. Odsustvo statistički značajnih razlika između klonova poreklom iz populacija Dina i Šuma u prosečnim vrednostima morfološko-fizioloških karakteristika na istom staništu ukazuje da se ove populacije nisu genetički diferencirale pod delovanjem prirodne selekcije koja je delovala u njihovim svetlosnim staništima. Rezultati eksperimentalnog pristupa „domaći vs. strani“ takođe su potvrdili da variranje testiranih osobina,

indukovano različitim intenzitetima ambijentalne svetlosti, predstavlja adaptivnu fenotipsku plastičnost, koja povećava performansu genotipa *I. pumila* pod datim sredinskim uslovima.

Indikatori oksidativnog stresa, po pravilu su dostizali statistički značajno veće srednje vrednosti kod klonova iz dinske populacije u poređenju sa šumskim u oba staništa. Aktivnost askorbat peroksidaze je bila veća kod šumskih klonova, i statistički značajno različita od dinških na otvorenom staništu, dok je to bio slučaj za superoksid dismutazu, glutation reduktazu i količinu antocijana u zasenčenom staništu. Iako nisu uočene razlike u broju izoformi SOD i APX, dobijeni rezultati su u saglasnosti, pre svega sa signalnom ulogom koju ovi antioksidativni enzimi imaju pod fiziološkim uslovima životne sredine. Dakle, na osnovu rezultata dobijenih korišćenjem oba ekperimentalna dizajna za testiranje lokalne adaptivnosti osobina lista *I. pumila* moglo bi se zaključiti da su populacije Dina i Šuma genetički diferencirane jedino za pokazatelje sredinskog stresa, dok bi obrazac promena ostalih fizioloških osobina ukazivao na adaptivnu fenotipsku plastičnost uslovljenu specifičnim uslovima staništa.

Prema Kawecki-Ebert-ovoj hipotezi, za utvrđivanje lokalnih adaptacija kriterijum „domaći vs. strani“ je validniji od kriterijuma „kod kuće vs. van kuće“ jer direktno ukazuje na divergentnu selekciju kao mehanizam adaptivne genetičke diferencijacije populacija, dok na rezultate pristupa „kod kuće vs. van kuće“ utiču ne samo razlike u intenzitetu delovanja lokalne selekcije, veći i razlike u kvalitetu staništa koje naseljavaju analizirane populacije. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa pretpostavkom da će genotipovi koji u različitim sredinama mogu da formiraju optimalne fenotipove biti selektivno favorizovani u odnosu na lokalno adaptirane genotipove koji samo u domaćoj sredini imaju visoku adaptivnu vrednost (Via i Lande, 1995; Van Tienderen, 1991; Kawecki i Ebert, 2004).

5.3 Svetlost i fenotip

5.3.1 Fenotipsko variranje osobina lista u odnosu na sezonsku i prostornu fluktuaciju intenziteta svetlosti: adaptivna ili pasivna plastičnost izazvana stresom?

Evoluciona uloga fenotipske plastičnosti je tokom istorije često bila predmet naučne debate: da li plastičnost štiti genotipove od prirodne selekcije ili stvara nove mogućnosti za njeno delovanje (Ghalambor i sar, 2007)? Prema jednom stanovištu, fenotipska plastičnost je kvantitativna osobina određenog organizma koja je kodirana delom genoma, i kao takva može da evoluiru pod delovanjem prirodne selekcije (Scheiner, 1993; de Jong, 2005). Prema drugom stanovištu, fenotipska plastičnost se smatra razvojnim mehanizmom koji olakšava evoluciju (West-Eberhard, 2003). To je inherentno svojstvo fenotipa tokom razvoja i za evolutivne procese podjednako je važna kao i selekcija. Pošto fenotipska plastičnost obuhvata raznovrsne adaptivne i neadaptivne odgovore organizama na sredinska variranja, ne postoji jedinstven konceptualni okvir koji predviđa sve moguće uloge fenotipske plastičnosti na evoluciju organizma (de Jong, 2005; Ghalambor i sar, 2007).

Fenotipska plastičnost je jedan od mehanizama kojim se sesilni organizmi usaglašavaju sa promenljivim uslovima životne sredine (de Jong, 2005; Valladares, 2007). Sposobnost promene fenotipa omogućuje različitim genotipovima da razviju isti, funkcionalno-odgovarajući fenotip (genotipska konvergencija) u odnosu na date ekološke uslove, ili da isti genotip formira različite fenotipove u različitim ekološkim sredinama (Sultan i Bazzaz, 1993; Tucić i sar, 1998; Ackerly i sar, 2000). Ako u određenoj ekološkoj sredini fenotipska vrednost neke osobine ima veću adaptivnu vrednost u odnosu na druge fenotipove, takva plastičnost se smatra adaptivnom (Sultan, 1995). Fenotipsko variranje koje isti genotip može da ispolji u različitim ekološkim sredinama može biti posledica aktivne (anticipatorne) plastičnosti, koja se javlja kao odgovor na očekivane (npr. sezonske) promene u životnoj sredini ili

pasivne plastičnosti koja je posledica razvojnih ograničenja izazvanih niskom zastupljenošću resursa (Sultan, 2000; Pigliucci, 2001).

Pošto je u prirodi svetlost jedan od prostorno i vremenski najvarijabilnijih abiotičkih faktora životne sredine i, istovremeno, jedan od najvažnijih sredinskih resursa, opravdano je očekivati da će fenotipska plastičnost izazvana fluktuacijama svetlosti obuhvati sve aspekte biljnog fenotipa, od morfologije i anatomije, do fiziologije i biohemije (Sultan i Bazzaz, 1993; Valladares i Pearcy, 1998; Valladares i sar, 2005; Evans i Poorter, 2001; Avramov i sar, 2007). Međutim, od svih funkcionalnih modula koji čine biljni organizam, najizraženija je plastičnost osobina lista – fotosintetičkog organa biljke (Sultan i Bazzaz, 1993; Nicotra i sar, 1997; Tucić i sar, 1998; Oguchi i sar, 2003). Ukoliko je indukovana različitim sredinskim uslovima, plastičnost lista može da bude posledica odgovora na fino granulisanu sredinu, odnosno male promene životne sredine, kao što je npr. sezonsko variranje abiotičkih činilaca (Winn, 1999).

U ovoj studiji ispitivana je fenotipska plastičnost morfološko-fizioloških i biohemijskih osobina lista *I. pumila* izazvana sezonskim promenama svetlosnih uslova u istom staništu (vremenska heterogenost) i/ili različitim svetlosnim uslovima koji su preovladavali na otvorenom prostoru i u vegetacionoj senci (prostorna heterogenost). Kao što se i očekivalo, najveće vrednosti indeksa plastičnosti, PI , kako za vremensku tako i za prostornu plastičnost, utvrđene su za fiziološko-biohemijske osobine, kao što su enzimski i neenzimski antioksidanti i fotostintetički pigmenti, u poređenju sa ostalim osobinama lista. Indeksi plastičnosti za morfološko-anatomske osobine i fiziološke osobine vezane za sadržaj vode u listu imali su nižu vrednost u obe populacije u odnosu na plastičnost antioksidanata i fotosintetičkih pigmentata. Poređenjem vrednosti indeksa plastičnosti između proleća i leta (PI_{P-L}) i leta i jeseni (PI_{L-J}) utvrđeno je da se veličina plastičnosti analiziranih osobina menjala kako između posmatranih sezona, tako i između populacija. Prosečna sezonske plastičnost dinskih i šumskih genotipova razlikovala se za morfološko-anatomske osobine i

fiziološke osobine vezane za sadržaj vode u listu, dok variranje veličine plastičnosti za aktivnost i količinu antioksidanata nije uočena. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima koja su pokazala da je za toleranciju ekoloških uslova senke važnija plastičnost na morfološkom nivou, dok je fiziološka plastičnost ključna za preživljavanje na otvorenim staništima (Valladares, 2003).

Fenotipska plastičnost neke osobina može da se grafički prikaže kao *norma reakcije*. Dok se fenotipska plastičnost definiše kao sposobnost određenog genotipa da promeni fenotip pri promeni uslova životne sredine - iako promena fenotipa može i da izostane, norma reakcije je opseg fenotipova koji može da ostvari određeni genotip u varijabilnoj životnoj sredini (Pigliucci, 2001). Plastičnost određene fenotipske osobine u nekoj ekološkoj sredini definišće se kao adaptivna plastičnost ukoliko su pravac i smer promene date osobine istovetni sa prvcem i smerom fenotipske selekcije koja deluje na tu osobinu pod datim ekološkim okolnostima tokom iste generacije. Razlika u nagibima normi reakcija između populacija za neku osobinu interpretira se kao genetička varijabilnost u njihovoj plastičnosti, koja omogućava populacijama da evoluiraju ka optimalnom fenotipu u svakoj ekološkoj sredini (Dudley, 2004).

Veoma je teško utvrditi da li je neka osobina adaptivna ili je njena plastičnost pasivna promena izazvana stresnim uslovima, ograničenim pristupom resursima ili korelisanošću sa osobinom na koju posmatrani faktor sredine ima uticaj. Istraživanja sezonske plastičnosti veličine, debljine lista i gustine stoma kod vrste *Dicerandra linearifolia* nisu utvrdila njen adaptivan karakter (Winn, 1999). Prisustvo neadaptivnog sezonskog variranja osobina lista moguće je usled slabog efekta na adaptivnu vrednost ili nepostojanja selekcije na individue kod kojih ove osobine variraju (Winn, 1999). U slučaju *I. pumila*, iako postoje naznake da je sezonska plastičnost strukturnih i fizioloških osobina (uključujući i fotosintetičke pigmente) adaptivna, za konačan zaključak o uticaju na adaptivnu vrednost neophodna su dalja istraživanja. Postojanje sezonske dinamike fenotipske plastičnosti potvrđuje da, iako je plastičnost svojstvo genotipa, ekspresija osobina se odvija na nivou poluautonomnih

modula i može se razlikovati između modula iste biljke (Preston i Ackerly, 2004; De Kroon i sar, 2005).

Fenotipska plastičnost genotipova *I. pumila* na svetlosne uslove staništa izmerena je i tokom letnjeg perioda, pomoću recipročno-transplantacionog eksperimenta. Plastičnost genotipova iz populacija Dina i Šuma, koja je izazvana svetlošću, pokazala je sličan obrazac kao i plastičnost izazvana sezonskom dinamikom. Vrednosti *PI*, kod genotipova obe populacije, bile su najveće za antioksidante i fotosintetičke pigmente, dok su najniže vrednosti izmerene za morfološke i fiziološke osobine. Statistički značajna međupopulaciona razlika u plastičnosti utvrđena je samo za količinu fenola i količinu suve materije lista (LDMC). Recipročno-transplantacionim eksperimentom utvrđeno je odsustvo genetičke diferencijacije za sve funkcionalne osobine lista između *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma. Ovaj rezultat se može objasniti pojavom da adaptivna fenotipska plastičnost strukturnih i fizioloških osobina lista omogućava efikasno prilagođavanje *I. pumila* uslovima alternativnih svetlosnih staništa, onemogućavajući delovanje direkcione selekcije koja bi dovela do lokalnih adaptacija ove dve populacije (Ghalambor i sar, 2007).

Do najdrastičnije promene između sezonske plastičnosti i one koja je uzrokovana staništem, kod *I. pumila*, došlo je na nivou morfološko-anatomske osobine lista, naročito za specifičnu površinu lista. Vrednosti indeksa plastičnosti za SLA, listova obe populacije, bili su tri puta veći u recipročno-transplantacionom eksperimentu, nego što su se menjali tokom sezona. To ukazuje na adaptivan karakter ove funkcionalne osobine lista na prilagođavanje *I. pumila* svetlosnim uslovima sredina, što je u saglasnosti sa rezultatima eksperimenta Avramov i sar (2007). Brojni primeri iz literature potvrđuju da adaptivni karakter neke osobine podjednako zavisi od posmatrane vrste kao i od uslova staništa. Veličina lista je bila adaptivan karakteristika biljke *Cakile edentula* na staništima sa različitim intenzitetima svetlosti (Dudley, 1996), ali ne i biljke *Impatiens capensis*, kod koje je bila samo funkcionalna osobina povezana sa veličinom biljke, posmatrano na staništima sa različitim gustinom biljaka

(Dudley i Schmitt, 1996). Biljka *Convolvulus chilensis*, u odnosu na staništa sa različitom količinom vode, adaptivnu plastičnost ispoljila je samo za gustinu trihoma lista, ali ne i za veličinu lista, SLA i oblik lista (Gianoli i Gonzales-Teuber, 2005). U slučaju *Geranium carolinianum*, plastičnost morfoloških osobina lista koje omogućavaju sakupljanje svetlosti pokazala je adaptivan karakter, u odnosu na otvoreno i šumsko stanište, dok je za plastičnost dužinu internodija utvrđeno postojanje cene plastičnosti (Bell i Galloway, 2008).

I pasivna i adaptivna fenotipska plastičnost od velikog su ekološkog značaja zbog uticaja koji imaju na uspeh i distribuciju organizama u životnoj sredini. Međutim, samo adaptivna plastičnost omogućava individualnim genotipovima da uspešno rastu i razmnožavaju se u različitim sredinama bez potrebe za lokalnim adaptacijama (Sultan, 2003). Osim u slučaju obligatnih biljaka sunca ili senke, poznato je da fenotipska plastičnost može biljkama da omogući znatno širi opseg staništa duž svetlosnog gradijenta (Sultan i sar, 1998; Valladares, 2003). *I. pumila* je biljka stepskih, otvorenih staništa. Na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da je fenotipska plastičnost, koja ovoj biljci obezbeđuje uspešno prilagođavanje sezonskim promenama uslova staništa, omogućila i naseljavanje staništa sa izmenjenim svetlosnim uslovima, kao što je šumska senka nastala antropogenim dejstvom.

5.3.2 *Integrirani fenotip - odgovor na sredinski stres*

Teorijski očekuje se da će optimalna reakcija biljke na heterogene uslove staništa biti formiranje fenotipa koji je funkcionalno najpodesniji za specifičnu kombinaciju sredinskih faktora u svakom staništu. Stoga je za uspešno funkcionisanje složenog fenotipa, koga čini veliki broj različitih osobina, neophodno da su sve osobine čvrsto međusobno povezane (genetički, ontogenetski, funkcionalno) (Schlichting, 1989b; Pigliucci i Preston, 2004; Murren, 2012).

Biljke su modularni biološki sistemi, i odgovori pojedinačnih modula (list, cvet, koren) na sredinske uslove, iako mogu da budu različiti, nisu u potpunosti nezavisni (Armbruster i sar, 2004; Klingenberg, 2008; Murren, 2012). Pojedinačne fenotipske osobine, koje čine funkcionalnu jedinicu biljke, u jednom staništu mogu ispoljiti visok stepen integracije, dok pod drugim sredinskim uslovima mogu biti slabo korelisane (Schlichting, 1989b). Fenotipska integracija je važan biološki fenomen koji proističe iz genetičkih, razvojnih i funkcionalnih odnosa između funkcionalnih osobina organizma. Pošto na stepen fenotipske integracije utiču uslovi životne sredine, kao i u slučaju fenotipske plastičnosti, njihovo poznavanje je neophodno da bi se razumela evolucija složenog fenotipa (Pigliucci i Kolodynska, 2002; Murren i sar, 2002). Fenotipska integracija se izražava kao obrazac korelacija ili kovarijacija osobina određenog organizma.

U ovoj studiji, veličina, kao i znak korelacija između analiziranih fenotipskih osobina lista *I. pumila* poreklom iz dve prirodne populacije, jedne sa otvorenog staništa a druge iz senke, ispoljavali su različite sezonske i populacione obrazace. Poznato je da razlike u veličini korelacija mogu da budu posledica različitog intenziteta selekcije na posmatrane osobine, dok razlike u njihovom znaku odražavaju promenu u smeru selekcije na ove osobine (Schlichting, 1989b). Pozitivne korelacije između para osobina ukazuju na preklapanje genetičkih osnova ovih osobina, dok negativan znak ukazuje na uzajamno genetičko ograničavanje (eng. trade-off) između para posmatranih

osobina (Falconer i Mackay, 1996, Murren, 2002). Visoke vrednosti koeficijenta korelacije, kako pozitivnih, tako i negativnih, predstavljaju genetičko ograničenje za nezavisnu evoluciju posmatranih osobina (Falconer i Mackay, 1996; Nicotra i sar, 1997; Murren, 2002). Nasuprot tome, odsustvo korelacija između osobina omogućava nezavisan odgovor osobina na fluktuacije sredinskih faktora, kao i njihovu nezavisnu evoluciju. Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da obrazac korelacija, kao i njihova veličina i znak, imaju značajnu ulogu u evoluciji pojedinačnih osobina biljke, kao i njenih modula.

Pošto plastičnost individualne osobine može da se ispolji ili kao direktan odgovor na sredinske uslove ili indirektno, usled korelisanosti neke osobine sa osobinom na koju sredinski uslovi deluju, važno je utvrditi u kojoj meri su odabrane funkcionalno povezane osobine lista *I. pumila* uzajamno korelisane, i da li se stepen integrisanosti menja u uslovima sresa. U našem istraživanju utvrdili smo da je tokom cele vegetacione sezone broj korelacija između fenotipskih osobina lista bio veći kod *I. pumila* sa otvorenog staništa nego kod biljaka koje su rasle u šumskoj senci. Isto tako, utvrđeno je postojanje sezonske dinamike obrazaca korelacija, odnosno plastičnosti integracije, pri čemu je najveći broj korelacija bio uočen u najnepovoljnijem, letnjem periodu, kod biljaka obe populacije *I. pumila*. Veći broj korelacija ukazuje na veću fenotipsku integraciju funkcionalno povezanih osobina ili modula. Analizom asocijacije između svih ispitivanih osobina lista, uočeno je da su broj i jačina korelacija bili najveći u grupi osobina koje čine antioksidanti, kao i u grupi osobina vezanih za fotosintetičke pigmente, što navodi na zaključak da bi se ove dve grupe osobina mogle tretirati kao posebni moduli unutar lista. Istraživanja plastičnosti i plastičnosti integracije na vrstama roda *Amficarpea* (Callahan i Waller, 2000) i *Brassica* (Murren i sar, 2002) pokazala su da se obrasci plastičnosti osobina i plastičnosti integracije ne mogu predvideti niti na osnovu sličnosti staništa ni na osnovu genetičke sličnosti. Rezultati ovih autora sugerišu da evolucija fenotipske integracije može da zavisi i od zajedničkih ekoloških uslova i/ili

evolucione istorije, ali da njihov efekat može biti potpuno različit kod različitih taksona.

Analiza stepena integracije u okviru funkcionalnih grupa osobina lista korišćenjem relativne varijanse sopstvene vrednosti, rVE , pokazala je slabo izraženu fenotipsku integraciju. Visoka integrisanost uočena je samo za grupu fotosintetičkih pigmenata u listu klonova iz obe populacije, tokom cele vegetacione sezone. Poređenjem korelacionih matrica fotosintetičkih pigmenata utvrđena je statistički signifikantna nepodudarnost između biljaka iz populacije Dina i biljaka iz populacije Šuma. Visok nivo integrisanosti ove grupe osobina važnih za proces fotosinteze ukazuje da *I. pumila* na promene svetlosnih uslova sredine odgovara istovremeno i plastično i veoma usklađeno.

Poređenjem broja korelacija fenotipskih osobina lista *I. pumila* u recipročno-transplantacionom eksperimentu pokazalo se da biljke iz populacije Dina i na otvorenom i na zasenčenom staništu imaju veći broj korelacija nego biljke šumske populacije. Testiranje integrisanosti plastičnosti lista (modula) pokazalo je da su se listovi *I. pumila* iz obe populacije odlikovali sličnim nivoom integracije (13 signifikantnih korelacija u populaciji Dina i 14 u populaciji Šuma), što je i potvrđeno korišćenjem Mantel-ovog testa, koji je pokazao visok stepen podudarnosti obrazaca korelacionih matrica plastičnosti osobina ($r = 0.571$, $P = 0.0001$). Stoga možemo zaključiti da je nivo integracije plastičnosti osobina lista bio sličan kod biljaka iz obe populacije. Iako se smatra da fenotipska integracija može predstavljati ograničenje fenotipske plastičnosti (Valladares i sar, 2007; Gianol i Palacio-Lopez, 2009), potpuno odsustvo korelisanosti između indeksa plastičnosti i indeksa integracije kod biljaka *I. pumila* nije potvrdilo ovu pretpostavku.

Dosadašnji literaturni podaci su veoma različiti kada je u pitanju ekspresija fenotipskih (prosečne vrednosti) osobina, njihova plastičnosti, i međusobna korelisanost u različitim ekološkim sredinama. Kod nekih biljnih vrsta je uočeno da se pod uticajem staništa menjala prosečna vrednosti osobina i njihova kovarijansa (Schlichting, 1989b; Callahan i Waller 2000; Pigliucci, 2002;

Tonsor i Scheiner 2007; Brock i Weinig 2007), dok se kod drugih vrsta menjala veličina prosečne vrednosti osobine, ali je struktura kovarijanse ostajala konstantna (Pigliucci i Kolodynska 2002; Kolodynska i Pigliucci 2003; Mallit i sar, 2010). Veza između fenotipske integracije i intenziteta sredinskog stresa uočena je u više studija (Schlichting, 1989b; Waitt i Levin, 1993; Kawano i Hara, 1995; Gianoli, 2004). Sa porastom intenziteta stresa dolazi do povećanja integrisanosti funkcionalno povezanih osobina ili modula. Međutim, iako postoje primeri da integracija doprinosi povećanju adaptivne vrednosti biljke, njen ekološki značaj do sada je potvrđen samo za morfološke osobine cveta, odnosno reproduktivni modul biljaka (Schlichting i Pigliucci, 1998; Pigliucci, 2002).

6 ZAKLJUČCI

Praćenjem sezonskog variranja morfološko-anatomske, fiziološke i biohemijske osobine lista u populacijama *I. pumila* iz različitih svetlosnih staništa, kao i fenotipske ekspresije ovih grupa osobina kod nativnih i stranih genotipova na otvorenom i zasenčenom staništu, odnosno kod istih genotipova u domaćem i stranom staništu došli smo do sledećih zaključaka:

- sezonske promene abiotičkih uslova staništa uticale su na aktivnost antioksidativnih enzima SOD, APX, CAT, GR i POD, kao i na količinu neenzimskih antioksidanata fenolnih jedinjenja i antocijana u obe prirodne populacije, Dini i Šumi;
- tokom cele vegetacione sezone (proleće, leto i jesen), nije došlo do promene u broju izoformi SOD, APX i CAT u ekstraktima lista iz populacija Dina i Šuma, već samo u njihovoj aktivnosti;
- u letnjem periodu, obrazac izoformi CAT se razlikovao između populacija sa otvorenog u odnosu na zasenčeno stanište; nasuprot tome, kod nativnih i transplantiranih genotipova na otvorenom staništu identifikovana je jedna izoforma smanjene aktivnosti, otporna na fotoinhibiciju, dok su kod biljaka sa zasenčenog staništa detektovane dve izoforme znatno veće aktivnosti, jedna veće, a druga manje molekulske mase od one sa otvorenog staništa;
- svetlosni uslovi staništa uticali su na aktivnost antioksidativnih enzima APX, CAT i GR, kao i na količinu neenzimskih antioksidanata, fenolnih jedinjenja i antocijana, u listu *I. pumila*; uticaj staništa nije utvrđen na aktivnost enzima SOD i POD;
- varijiranje morfološko-anatomske i fiziološke osobine (SLA, SD, LDMC, RWC, SU, LWC, količina fotosintetičkih pigmenata) zavisilo je od sezonskih promena abiotičkih uslova staništa u obe prirodne populacije;
- svetlosni uslovi staništa su statistički značajno uticali na variranje većine morfološko-anatomske i fiziološke osobine lista (SLA, LDMC, SU, LWC), kako

kod biljaka iz populacija Dina, tako i kod onih iz populacije Šuma, sa izuzetkom SD, RWC i količine fotosintetičkih pigmenata;

- antioksidativni enzimi su ispoljili najveću plastičnost u odnosu na sezonske promene uslova staništa kod biljaka iz obe populacije; osim u slučaju POD, prosečni indeksi plastičnosti nisu se razlikovali između populacija Dina i Šuma;

- odgovor morfološko-anatomskih i fizioloških osobina lista na sezonske promene abiotičkih uslova staništa bio je manje plastičan, u odnosu na odgovor antioksidanata, ali su se prosečne vrednosti plastičnosti ovih osobina statistički značajno razlikovale između populacija Dina i Šuma;

- tokom cele vegetacione sezone (proleća, leta i jeseni) biljke koje su rasle na otvorenom staništu ispoljile su veći stepen fenotipske integracije između funkcionalno povezanih osobina lista u poređenju sa biljkama koje su rasle u šumskoj senci;

- veličina indeksa fenotipske integracije funkcionalno povezanih osobina lista nije ispoljavala sezonsku dinamiku ni u jednoj od analiziranih populacija; najveće vrednosti indeksa integracije procenjene su između količina fotosintetičkih pigmenata kod biljaka iz obe populacije; integrisanost u okviru morfološko-anatomskih, fizioloških i biohemijskih grupa osobina lista *I. pumila* bila je niska i nije zavisila od staništa biljke;

Testiranjem hipoteza o lokalnim adaptacijama *I. pumila* na svetlosne uslove staništa korišćenjem recipročno-transplantacionog eksperimenta u prirodi utvrđeno je da:

- je kriterijum „*kod kuće vs. van kuće*“ ispunjen, odnosno, svetlosni uslovi staništa imali su značajan efekat na većinu posmatranih biohemijskih, fizioloških i morfološko-anatomskih osobina lista genotipova *I. pumila* iz populacija Dina i Šuma;

- kriterijum „*domaći vs. strani*“ nije ispunjen, jer evolucionarna istorija populacija nije imala značajan efekat na većinu posmatranih fenotipskih osobina, izuzev indikatora oksidativnog stresa, koji su uvek imali veće

vrednosti u listovima genotipova populacije Dina, nezavisno od svetlosnih uslova staništa, kao i APX, SOD i GR, čija je specifična aktivnost bila veća;

- odsustvo genetičke diferencijacije između populacije Dina i Šuma u odnosu na ispitivane osobine lista ukazuje da slične fenotipske vrednosti ispoljene kod genotipova poreklom iz različitih svetlosnih sredina predstavljaju adaptivnu fenotipsku plastičnost, koja doprinosi boljoj performansi, a time i preživljavanju kod *I. pumila* izloženih visokom intenzitetu abiotičkog stresa.

7 LITERATURA

- Ackerly DD, Dudley SA, Sultan S.E, Schmitt J, Coleman JS, Linder CR, Sandquist DR, Geber MA, Evans AS, Dawson TE, Lechowicz MJ (2000) The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *BioScience* 50, 979-995.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105, 121-126.
- Al Afas N, Marron N, Ceulemans R (2007) Variability in *Populus* leaf anatomy and morphology in relation to canopy position, biomass production, and varietal taxon. *Ann For Sci* 64, 521-532.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 372, 1331-1341.
- Amaya I, Botella MA, de la Calle M, Medina MI, Heredia A, Bressan RA, Hasegawa PM, Quesada MA, Valpuesta V (1999) Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett* 457, 80-84.
- Andersen DH, Pertoldi C, Scali V, Loeschcke V (2005) Heat stress and age induced maternal effects on wing size and shape in parthenogenetic *Drosophila mercatorum*. *J Evol Biol* 18, 884-892.
- Anderson JM, Chow WS, De Las Rivas J (2008) Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. *Photosynth Res* 98, 575-587.
- Anderson JM, Osmond CB (1987) Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. In: *Photoinhibition* (Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ, eds.), 1-38, Elsevier, Amsterdam.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-379.

- Armbruster WS, Pélabot C, Hansen TF, Mulder C (2004). Floral integration and modularity: distinguishing complex adaptation from genetic constraints. In: Phenotypic Integration, (Pigliucci M, and Preston KA, eds.), 23-42. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold SJ (1992) Constraints on phenotypic evolution. *Am Nat* 140, 85-107.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 50, 601-639.
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Photoinhibition (Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ, eds.), 227-287, Elsevier, Amsterdam.
- Avramov S, Pemac D, Tucić B (2007) Phenotypic plasticity in response to an irradiance gradient in *Iris pumila*: adaptive value and evolutionary constraints. *Plant Ecol.* 190, 275-290.
- Banta JA, Dole J, Cruzan MB, Pigliucci M (2007) Evidence of local adaptation to coarse-grained environmental variation in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* 61, 2419-2432.
- Bazzaz FA (1996) Plants in changing environments: linking physiological, population, and community ecology. Cambridge University Press.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44, 276-287.
- Bell DL, Galloway LF (2008) Population differentiation for plasticity to light in an annual herb: adaptation and cost. *Am J Bot* 95, 59-65.
- Benz BR, Rhode JM, Cruzan MB (2007) Root anatomical and physiological responses to flooding in the *Piriqueta caroliniana* complex. *Am J Bot* 94, 542-550.
- Beyer WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Ann Biochem* 161, 559-566.

- Bijlsma R, Bundgaard J, Boerema AC (2000) Does inbreeding affect the extinction risk of small populations? Predictions from *Drosophila*. *J Evol Biol* 13, 502-514.
- Bijlsma R, Bundgaard J, Boerema AC, Van Putten WF (1997) Genetic and environmental stress, and the persistence of population. In: *Environmental Stress, Adaptation and Evolution* (Bijlsma R, Loeschcke V, eds.), 193–207. Birkhäuser Verlag, Basel, CH.
- Bijlsma R, Loeschcke V (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol* 18, 744-749.
- Björkman O (1981) Responses to different quantum flux densities. In: *Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment* (Lange OL, Nobel PS, Osmond CB and Ziegler H, eds.). *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 12A*, 57–107. Springer-Verlag, Berlin.
- Boardman NK (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu Rev Plant Physiol* 28, 355–377.
- Bolker JA (2000) Modularity in development and why it matters in Evo-Devo. *Am Zool* 40, 770-776.
- Bowler C, Camp WV, Montagu MV, Inzé D (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13, 199–218.
- Bowler C, Montagu MV, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43, 83-116.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Bradshaw AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advan Genet* 13, 115-155.
- Brock MT, Weinig C (2007) Plasticity and environment-specific covariances: an investigation of floral vegetative and within flower correlations. *Evolution* 61, 2913–2924.

- Callahan HS, Waller DM (2000) Phenotypic integration and the plasticity of integration in an amphicarpic annual. *Int J Plant Sci* 161, 89-98.
- Casson S, Gray JE (2008) Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytol* 178, 9-23.
- Chaerle L, Saibo N, van der Straeten D (2005) Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends in Biotech* 23, 308-315
- Chagas RM, Silveira JA, Rafael VG, Ribeiro RV, Vitorello VA, Carrer H (2008). Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Pestic Biochem Physiol* 90, 181-188.
- Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photoch Photobiol* 70, 1-9.
- Chen XY, Jiang CD, Zou Q, Gao HY (2002) The steric structure of thylakoid and its regulation to distribution of excitation energy. *Plant Physiol Commun* 38, 307-312.
- Chew O, Whelan J, Miller AH (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defences in plants. *J Bio Chem* 278, 46869-46877.
- Chittoor JM, Leach JE, White FF (1999) Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* (Datta SK, Muthukrishnan S, eds.), 171-193. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Choi HW, Hwang BK (2012) The pepper extracellular peroxidase CaPO₂ is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. *Planta* 235, 1369-1382.
- Chow WS, Kim EH, Horton P, Anderson JM (2005) Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochem Photobiol Sci* 4, 1081-1090.

- Close DC, Beadle CL (2003) The ecophysiology of foliar anthocyanin. *Bot Rev* 69, 149-161.
- Conn S, Zhang W, Franco C (2003) Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture. *Biotechnol Lett* 25, 835-839.
- Cosio C, Dunand, C. (2009) Specific functions of individual class III peroxidases. *J Exp Bot* 60, 391-408.
- Coupe SA, Palmer BG, Lake JA, Overy SA, Oxborough K, Woodward FI, Gray JE, Quick WP (2006) Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. *J Exp Bot* 57, 329-341.
- Creissen G, Edwards EA, Enard C, Wellburn A, Mullineaux P (1995) Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant J* 2, 129-131.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57, 779-795.
- David JR, Araripe LO, Chakir M, Legout H, Lemos B, Petavy G, Rohmer C, Joly D, Moreteau B (2005) Male sterility at extreme temperatures: a significant but neglected phenomenon for understanding *Drosophila* climatic adaptations. *J Evol Biol* 18, 838-846.
- De Gara L (2004) Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochem Rev* 3, 195-205.
- de Jong G (2005) Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytol* 166, 101-118.
- de Kroon H, Huber H, Stuefer JF, van Groenendael JM (2005) A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytol* 166, 73-82.
- de Visser JAGM, Rozen DE (2005) Limits to adaptation in asexual populations. *J Evol Biol* 18, 779-788.

- Delannoy E, Jalloul A, Assigbetse K, Marmey P, Geiger JP, Lherminier J, Daniel JF, Martinez C, Nicole M (2003) Activity of class-III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol Plant-Microbe Interact* 16, 1030-1038.
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43, 599-626.
- Desikan R, Hancock J, Neill S (2005) Reactive oxygen species as signaling molecules. In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, (Smirnoff N, ed.), 169-196, Blackwell Publishing Ltd.
- DeWitt TJ, Scheiner SM (2004) *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*. Oxford University Press, USA.
- DeWitt TJ, Sih A, Wilson OS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol Evol* 13, 77-81.
- Dias MI, Barros L, Sousa MJ, Ferreira IC (2011) Comparative study of lipophilic and hydrophilic antioxidants from in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum*. *Plant Foods Hum Nutr* 66, 181-186.
- Ding S, Lu Q, Zhang Y, Yang Z, Wen X, Zhang L, Lu C (2009) Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. *Plant Mol Biol* 69, 577-592.
- Donohue K, Pyle EH, Messiqua D, Heschel MS, Schmitt J (2001) Adaptive divergence in plasticity in natural populations of *Impatiens capensis* and its consequences for performance in novel habitats. *Evolution* 55, 692-702.
- Dorman M, Sapir Y, Volis S, (2009) Local adaptation in four *Iris* species tested in a common-garden experiment. *Biol J Linn Soc* 98, 267-277
- Ducić V, Milovanović B (2004) Termičke specifičnosti Deliblatske (Banatske) peščare. *Zbornik radova Geografskog fakulteta* 51, 1-12.

- Ducić V, Radovanović M (2005) Klima Srbije. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Dudley SA (1996) The response to differing selection on plant physiological traits: evidence for local adaptation. *Evolution* 50, 103-110.
- Dudley SA (2004) The functional ecology of phenotypic plasticity in plants. In: Phenotypic plasticity. Functional and conceptual approaches. (DeWitt TJ, Scheiner SM, eds.), 151-172, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dudley SA, Schmitt J, (1996) Testing the adaptive plasticity hypothesis: density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *The Am Nat* 147, 445-465.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278-284.
- Engel N, Schmidt M, Lütz C, Feierabend J (2006) Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant Cell Environ* 29, 593-607.
- Evans GC (1972) The quantitative analysis of plant growth. University of California Press Los Angeles, CA, USA.
- Evans JR, Poorter H (2001) Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ* 24, 755-767.
- Faize M, Burgos L, Faize L, Piqueras A, Nicolas E, Barba-Espin G, Clemente-Moreno MJ, Alcobendas R, Artlip T, Hernandez JA (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *J Exp Bot* 62, 2599-2613.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) Introduction to Quantitative Genetics. Addison-Wesley-Longman, Essex, UK.

- Feierabend J (2005) Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. (Smirnoff N, ed.), 101-140, Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Flury B (1988) Common Principal Components and related multivariate models. Wiley, New York.
- Foyer CH, Halliwell B (1976) Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast; a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155, 93-100.
- Fryer M J, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR (2003) Control of ascorbate peroxidase2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *Plant J* 33, 691-705.
- Gabriel W (2005) How stress selects for reversible phenotypic plasticity. *J Evol Biol* 18, 873-883.
- Galen C, Shore JC, Deyoe H (1991) Ecotypic divergence in Alpine *Polemonium viscosum*: genetic structure, quantitative variation, and local adaptation. *Evolution* 45, 1218-1228.
- Garnier E, Laurent G (1994) Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytol* 128, 725-736.
- Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* 160, 509-515.
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28, 1091-1101.

- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol* 21, 394–407.
- Gianoli E (2004) Plasticity of traits and correlations in two populations of *Convolvulus arvensis* (Convolvulaceae) differing in environmental heterogeneity. *Int J Plant Sci* 165, 825-832.
- Gianoli E, Gonzales-Teuber M (2005) Environmental heterogeneity and population differentiation in plasticity to drought in *Convolvulus chilensis* (Convolvulaceae). *Evol Ecol* 19, 603-613.
- Gianoli E, Palacio-López K (2009) Phenotypic integration may constrain phenotypic plasticity in plants. *Oikos* 118, 1924-1928.
- Gillespie J (1974) Polymorphism in patchy environments. *Am Nat* 108, 145-151.
- Givnish TJ (1988) Adaptation to sun and shade: a whole plant perspective. *Aust J Plant Physiol* 15, 63-92.
- Goldberg EE, Lande R (2007) Species' borders and dispersal barriers. *Am Natur* 170, 297–304.
- Gómez S, Latzel V, Verhulst YM, Stuefer JF (2007) Costs and benefits of induced resistance in a clonal plant network. *Oecologia* 153, 921–930.
- Gould KS (2004). Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J Biomed Biotechnol* 5, 314–320.
- Gould KS, Vogelmann TC, Han T, Clearwater MJ (2002) Profiles of photosynthesis within red and green leaves of *Quintinia serrata*. *Physiol Plantarum* 116, 127-133.
- Grace SC, Logan BA (1996). Acclimation of foliar antioxidant system to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol* 112, 1631-1640.
- Grace SC (2005) Phenolics as antioxidants. In: *Reactive Oxygen Species in Plants*. (Smirnoff N, ed.), 141–168, Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

- Grace SC, Logan BA, Adams WWI (1998) Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell Environ* 21, 513–521.
- Griffith TM, Sultan SE (2004) Shade tolerance plasticity in response to neutral *vs* green shade cues in *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *New Phytol* 166, 141–148.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2000) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hanba YT, Kogami H, Terashima I (2002). The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell Environ* 25, 1021–1030.
- Harborne JR (1988) The flavonoids: recent advances. In: *Plant Pigments* (Goodwin TW, ed.), 299–343, Academic Press, London.
- Hatier JH, Gould KS (2008) Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *J Theor Biol* 253, 625–627.
- Hertwig B, Streb P, Feierabend J (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol* 100, 1547–1553.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42, 462–468.
- Hochachka PW, Somero GN (2002) *Biochemical Adaptations: Mechanism and Process in Physiological Evolution*, Oxford University Press, New York, USA
- Hodges DM, De Long JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- Hoffmann AA, Parsons PA (1991) *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Hu YQ, Liu S, Yuan HM, Li J, Yan DW, Zhang JF, Lu YT (2010) Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H₂O₂ using promoter- and 3'-untranslated region exchange experiments in the *Arabidopsis* cat2 photorespiratory mutant. *Plant Cell Environ* 33, 1656-1670.
- Hughes NM, Neufeld HS, Burkey KO (2005) Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytol* 168, 575-583.
- Hughes NM, Smith WK (2007) Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *Am J Bot* 94, 784-790.
- Hull MR, Long SP, Jahnke L (1997) Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species. *Austral J Plant Physiol* 24, 337-343.
- Jansen MAK, van den Noort RE, Tan MY, Prinsen E, Lagrimini LM, Thorneley RN (2001) Phenoloxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol* 126,1012-23.
- Jaspers P, Kangasjärvi J (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling, *Physiol Plantarum* 138, 405-413.
- Jung SY, Kim JS, Cho KY, Tae GS, Kang BG (2000) Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs *Plant Science* 153, 145-154.
- Kanematsu S, Asada K (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of Cu/Zn superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol* 31, 99-112.
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420, 829-832.

- Kassen R (2002) The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J Evol Biol* 15, 173-190.
- Kawano S, Hara T (1995) Optimal balance between propagule output, propagule size, and cost of propagule production in plants with special reference to its evolutionary ecological implications. *Plant Species Biol* 10, 119-125.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Letters* 7, 1225-1241.
- Klingerberg CP (2008) Morphological integration and developmental modularity. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39, 115-132.
- Kolodynska A, Pigliucci M (2003) Multivariate response to flooding in *Arabidopsis*: an experimental evolutionary investigation. *Funct Ecol* 17, 131-140.
- Kotliar NB, Wiens JA (1990) Multiple scales of patchiness and patch structure: a hierarchical framework for the study of heterogeneity. *Oikos* 59, 253-260.
- Kumar S, Jaggi M, Sinha AK (2012): Ectopic overexpression of vacuolar and apoplastic *Catharanthus roseus* peroxidases confers differential tolerance to salt and dehydration stress in transgenic tobacco. *Protoplasma* 249, 423-432.
- Kwon SY, Joeng YJ, Lee HS, Kim S, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25, 873-882.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL (2008). *Plant physiological ecology*. Springer, New York, USA.

- Lambers H, Poorter H (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants: A search for physiological causes and ecological consequences. *Adv Ecol Res* 23, 187-261.
- Lambreva M., Stoyanova-Koleva D, Baldjiev G, Tsonev T (2005) Early acclimation changes in the photosynthetic apparatus of bean plants during short term exposure to elevated CO₂ concentration under high temperature and light intensity. *Agri Ecosys Environ* 106, 29-232.
- Lande R, Arnold SJ (1983) The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37, 1210-1226.
- Larcher W (1995) *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lascano HR, Melchiorre MN, Luna CM, Trippi VS (2003) Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. *Plant Sci* 164, 841-848.
- Lee DH, Lee CB (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci* 159, 75-85.
- Lee SH, Ahsan N, Lee KW, Kim DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SY, Kim TH, Lee BH (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J Plant Physiol* 164, 1626-1638.
- Lehninger AL (1981) *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., New York.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends Ecol Evol* 17, 183-189.
- Levins R (1963) Theory of fitness in a heterogeneous environment. II. Developmental flexibility and niche selection. *Am Nat* 47, 75-90.

- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S (2006) Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem* 96, 254-260.
- Lichtenthaler H (1998) The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 187-198.
- Logan BA, Demmig-Adams B, Adams WW III (1998) Antioxidation and xanthophyll cycle dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* and *Vinca major* during a transfer from low to high irradiance in the field. *J Exp Bot* 49, 1881-1888.
- Logan BA, Korniyev D, Hardison J, Holaday S (2006) The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynth Res* 88,119-132.
- Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F (1999) Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. *Plant Physiol* 119, 1091-1099.
- Loranger J, Shipley B (2010) Interspecific covariation between stomatal density and other functional leaf traits in a local flora. *Botany* 88, 30-38.
- Magwene PM (2006) Integration and modularity in biological systems: a review. *Acta Zool Sinica* 52, 490-493.
- Mallitt KL, Bonser SP, Hunt J (2010) The plasticity of phenotypic integration in response to light and water availability in the pepper grass, *Lepidium bonariense*. *Evol Ecol* 24, 1321-1337.
- Mancinelli AL, Huang-Yang CP, Lindquist P, Anderson OR, Rabino I (1975) Photocontrol of anthocyanin synthesis. III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiol* 55, 251-257.
- Manitašević S, Dunderski J, Matic G, Tucić B (2007) Seasonal variation in heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 expression in an exposed and a shaded habitat of *Iris pumila*. *Plant Cell Environ* 30, 1-11.
- McDonald, M (2003) *Photobiology of higher plants*. Wiley.

- McMurry J, Fay C (2003) Chemistry (4th edition). Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Merzlyak MN, Chivkunova OB, Solovchenko AE, Naqvi KR (2008) Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed and senescing leaves. *J Exp Bot* 59, 3903-3911.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalases in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61, 4197-4220.
- Mitteroecker P, Bookstein FL (2007) The Conceptual and Statistical Relationship between Modularity and Morphological Integration. *Syst Biol* 56, 818-836.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 9, 405-410.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11, 15-19.
- Mittler R, Merquiol E, Hallak-Herr E, Kaplan A, Cohen M (2001) Living under a "dormant" canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *Plant J* 25, 407-416.
- Mittler R, Poulos TL (2005) Ascorbate peroxidase. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants (Smirnoff N, ed.), 87-100, Oxford, Blackwell Publishing.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9, 490-498.
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* 212, 540-546.

- Miyake C, Asada K. (1992) Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in the thylakoids. *Plant Cell Physiol* 33, 541-553.
- Miyazawa SI, Livingstone NJ, Turpin DH (2006) Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*). *J Exp Bot* 57, 373-380.
- Mooney HA, Ehleringer J, Björkman O (1977) The energy balance of leaves of the evergreen desert shrub *Atriplex hymenelytra*. *Oecol* 29, 301-310.
- Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetel I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194, 346-352.
- Mullineaux P, Karpinski S (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr Opin Plant Biol* 5, 43-48.
- Murchie EH, Horton P (1997) Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell Environ* 20, 438-448.
- Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J* 38, 940-53.
- Murray JR, Hackett WP (1991) Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase in *Hedera helix* L. *Plant Physiol* 97, 343-351.
- Murren CJ (2002) Phenotypic integration in plants. *Plant Spec Biol* 17, 89-99.
- Murren CJ (2012) The integrated phenotype. *Integr Comp Biol* 52, 64-76.

- Neill SO, Gould KS (2003) Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Funct Plant Biol* 39, 865–73.
- Nicotra AB, Chazdon RL, Schlichting CD (1997). Patterns of genotypic variation and phenotypic plasticity of light response in two tropical *Piper* species. *Am J Bot* 84, 1542–1552.
- Niinemets U, Valladares F (2004) Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: optimality and constraints. *Plant Biol* 6, 254–268.
- Niklas KJ (2009) Functional adaptation and phenotypic plasticity at the cellular and whole plant level. *J Biosci* 34, 613–630.
- Nilsen ET, Orcutt DM (1996) *The Physiology of Plants Under Stress*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 249–279.
- Oborny B (1994) Growth rules in clonal plants and predictability of the environment: a simulation study. *J Ecol* 82, 341–352.
- Oguchi R, Hikosaka K, Hirose T (2003) Does the photosynthetic light acclimation need change in leaf anatomy? *Plant Cell Environ* 26, 505–512.
- Osmond B, Förster B (2006) Photoinhibition: Then and now. In: *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment: Advances in Photosynthesis and Respiration Vol 21* (Demmig-Adams B, Adams III WW, Mattoo AK, eds.), 11–22, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Osmond CB, Austin MP, Berry JA, Billings WD, Boyer JS, Dacey JWH, Nobel PS, Smith SD, Winner WE (1987) Stress physiology and the distribution of plants. *BioSci* 37, 38–48.

- Otter T, Polle A (1997) Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway spruce (*Picea abies*, L., Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol* 38, 595-602.
- Page M, Sultana N, Paszkiewicz K, Florance H, Smirnoff N (2012) The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant Cell Environ* 35, 388-404.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-265.
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochem* 65, 1879-1893.
- Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet L, Dunand C (2007) PeroxiDase: the peroxidase database. *Phytochem* 68, 1605-1611.
- Pavlicev M, Cheverud JM, Wagner GP (2009) Measuring morphological integration using eigenvalue variance. *Evol Biol* 36, 157-170.
- Pazourek J (1970) The effect of light intensity on stomatal frequency in leaves of *Iris holandica* hort., var. Wedgwood. *Biol Plantarum* 12, 208-215.
- Pearcy RW (1999) Responses of plants to heterogeneous light environments. In: *Handbook of functional plant ecology* (Pugnaire F, Valladares F, eds.), 269-314, Marcel Dekker, New York.
- Peltzer D, Dreyer E, Polle A (2002) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiol Biochem* 40, 141-150.
- Pemac D, Tucić B (1998) Reaction norms of juvenile traits to light intensity in *Iris pumila* (Iridaceae): a comparison of populations from exposed and shaded habitats. *Pl Syst Evol* 209, 159-176.

- Petrini F, Iannelli MA, Massacci A (2002) Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell Environ* 25, 1251-1259.
- Phillips PC (1998) CPC: common principal components analysis. Univ. Texas at Arlington.
- Phillips PC, Arnold SJ (1999) Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices. I. Using the Flury hierarchy. *Evolution* 53, 1506-1515.
- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. John Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Pigliucci M (2002) Touchy and bushy: phenotypic plasticity and integration in response to wind stimulation in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Plant Sci* 163, 399-408.
- Pigliucci M (2003) Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecol Lett* 6, 265- 272.
- Pigliucci M, Kolodynska A (2002) Phenotypic plasticity to light intensity in *Arabidopsis thaliana*: invariance of reaction norms and phenotypic integration. *Evol Ecol* 16, 27-47.
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209, 2362-2367.
- Pigliucci M, Preston K (2004) Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. Oxford University Press, Oxford.
- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J* 34, 187-203

- Pokora W, Dettlaff-Pokora A, Tukaj Z (2011) Expression of superoxide dismutase isoforms in *Desmodemus subspicatus* cells exposed to anthropogenic contaminants. *Pol J Environ Stud* 20, 605-610.
- Poorter H, Nagel OW (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Austral J Plant Physiol* 27, 595-607.
- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright I J, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol* 182, 565-588.
- Poulos HM, Goodale UM, Berlyn GP (2007) Drought response of two Mexican oak species, *Quercus laceyi* and *Q. sideroxylla* (Fagaceae), in relation to elevational position. *Am J Bot* 94, 809-818.
- Preston KA, Ackerly DD (2004) Allometry and evolution in modular organisms. In: *Modularity and Phenotypic Complexity* (Pigliucci M, Preston KA, eds.), 80-106, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Ramírez-Valiente JA, Sánchez-Gómez D, Aranda I, Valladares F (2010) Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiol* 30, 618-627.
- Rizhsky L, Hongjian L, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130, 1143-1151.
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA, Palma JM (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol* 170: 43-52.

- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swarty TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K (2001) *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: blue light photoreceptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6969-6974.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67-80.
- Sánchez-Gómez D, Valladares F, Zavala MA (2006) Functional traits and plasticity underlying shade tolerance in seedlings of four Iberian forest tree species. *Tree Physiol* 26, 1425-1433.
- Santamaria L, Figuerola J, Pilon J, Mjelde M, Green AJ, Boer TD, King RA, Gornall RJ (2003) Plant performance across latitude: the role of plasticity and local adaptation in an aquatic plant. *Ecology* 84, 2454-2461.
- Santos I, Almeida J, Salema R (1999) The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum and wheat leaves. *Can J Bot* 77, 70-76.
- SAS Institute, Inc. (2012) *SAS/STAT User's Guide*, SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101, 7-12.
- Scheiner SM (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu Rev Ecol Syst* 24, 35-68.
- Schlichting CD (1989a) Phenotypic plasticity in *Phlox* II. Plasticity of character correlations. *Oecol* 78, 496-501.
- Schlichting CD (1989b) Phenotypic integration and environmental change. *Biosci* 39, 460-464.
- Schlichting CD, Pigliucci M (1998) *Phenotypic evolution. A reaction norm perspective*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.

- Schmalhausen II (1949) *Factors of Evolution*. Blakiston. Philadelphia, PA.
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1629-1633.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53, 1305-1319.
- Shipley B, Vile D, Garnier E, Wright IJ, Poorter H (2005) Functional linkages between leaf traits and net photosynthetic rate: reconciling empirical and mechanistic models. *Funct Ecol* 19, 602-615.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16, 144-158.
- Slooten L, Capiou K, Van Camp W, Van Montagu M, Sybesma C, Inzé D (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol* 107, 737-750.
- Sørensen JG, Norry FM, Scannapieco AC, Loeschcke V (2005) Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J Evol Biol* 18, 829-837.
- Steinger T, Roy BA, Stanton ML (2003) Evolution in stressful environments II: Adaptive value and costs of plasticity in response to low light in *Sinapis arvensis*. *J Evol Biol* 16, 313-323.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol* 155, 349-361.
- Stojković B, Tucić N (2012) *Od molekula do organizma: molekularna i fenotipska evolucija*. Službeni Glasnik, Beograd.

- Streb P, Feierabend J (1996) Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Botanica Acta* 109, 125-132
- Streb P, Feierabend J, Bligny R (1997b) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant Cell Environ* 20, 1030-1040.
- Streb P, Tel-Or E, Feierabend J (1997a) Light stress effects and antioxidative protection in two desert plants. *Funct Ecol* 11, 416-424.
- Stuefer JF (1996) Potential and limitations of current concepts regarding the response of clonal plants to environmental heterogeneity. *Vegetatio* 127, 55-70.
- Stuefer JF, Gómez S, Van Mólken T (2004) Clonal integration beyond resource sharing: implications for defence signalling and disease transmission in clonal plant networks. *Evol Ecol* 18, 647-667.
- Stuefer JF, Huber H (1998) Differential effects of light quantity and spectral light quality on growth, morphology and development of two stoloniferous *Potentilla* species. *Oecologia* 117, 1-8.
- Sultan SE (1987) Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evol Biol* 21, 127-176.
- Sultan SE (1995) Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Bot Neerl* 44, 363- 383.
- Sultan SE (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci* 5, 537-542.
- Sultan SE (2003) Phenotypic plasticity in plants: a case in ecological development. *Evol Devel* 5, 25-33.
- Sultan SE (2007) Development in context: the timely emergence of eco-devo. *Trends Ecol Evol* 22, 575-582.

- Sultan SE, Bazzaz FA (1993) Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. I. Diversity and uniformity in genotypic norms of reaction to light. *Evolution* 47, 1009–1031.
- Sultan SE, Spencer HG (2002) Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *Am Nat* 160, 271–283.
- Sultan SE, Wilczek AM, Bell DL, Hand G (1998) Physiological response to complex environments in annual *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Oecologia* 115, 564–578.
- Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plant* 126, 45–51.
- Takahama U, Egashira T (1991) Peroxidase in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochemistry* 30, 73–77.
- Takahama U, Oniki T (1997) A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiol Plantarum* 101, 845–852.
- Takahashi MA, Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 226, 558–66.
- Tanaka Y, Shiraiwa T (2009) Stem growth habit affects leaf morphology and gas exchange traits in soybean. *Ann Bot-London* 104, 1293–1299.
- Terashima I, Hikosaka K (1995) Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant Cell Environ* 18, 1111–1128.
- Thomas PW, Woodward FI, Quick PW (2003) Systemic irradiance signalling in tobacco. *New Phytol* 161, 193–198.
- Tonsor SJ, Scheiner SM (2007) Plastic trait integration across a CO₂ gradient in *Arabidopsis thaliana*. *Am Nat* 169, 119–140.

- Trasar-Cepeda C, Gil-Sotres F, Leirós MC (2007) Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biol Biochem* 39, 311-319.
- Tucić B, Manitašević Jovanović S, Vuleta A (2011) Does environmentally contingent variation in the level of molecular chaperones mirror a biochemical adaptation to abiotic stress? In: *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives* (Arun Shanker and B. Venkateswarlu, eds.), 323-346, InTech, Rijeka, Croatia.
- Tucić B, Milojković S, Tarasjev A, Vujčić S (1989) The influence of climatic factors on clonal diversity in a population of *Iris pumila*. *Oikos* 56, 115-120.
- Tucić B, Milojković S, Vujčić S, Tarasjev A (1988) Clonal diversity and dispersion in *Iris pumila*. *Acta Oecol Oecol Plant* 9, 211-219.
- Tucić B, Pemac D, Stojković B, Avramov S (1999) Coping with environmental changes in *Iris pumila*: A pilot experiment. *Arch Biol Sci* 51, 137-148.
- Tucić B, Tomić V, Avramov S, Pemac D (1998) Testing the adaptive plasticity of *Iris pumila* leaf traits to natural light conditions using phenotypic selection analysis. *Acta Oecol* 19, 473-481.
- Tucić B, Vuleta A, Manitašević Jovanović S (2009) Protective function of foliar anthocyanins: in situ experiments on a sun-exposed population of *Iris pumila* L. (Iridaceae). *Pol J Ecol* 57, 779-783.
- Valladares F (2003) Light heterogeneity and plants: from ecophysiology to species coexistence and biodiversity. *Prog Bot* 64, 439-471.
- Valladares F, Arrieta S, Aranda I, Lorenzo D, Sánchez-Gómez D, Tena D, Suárez F, Pardos JA (2005) Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental-Mediterranean sites. *Tree Physiol* 25, 1041-1052.
- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytol* 176, 749-763.

- Valladares F, Pearcy RW (1998) The functional ecology of shoot architecture in sun and shade plants of *Heteromeles arbutifolia* M. Roem., a Californian chaparral shrub. *Oecologia* 114, 1-10.
- Valladares F, Sanchez-Gómez D, Zavala MA (2006) Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *J Ecol* 94, 1103-1116.
- Van Breusegem F, Inzé D (2002) Transgenic plants expressing tolerance towards oxidative stress. In: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* (Oksman-Caldentey S, Barz W, eds.), 497-516, Marcel Dekker, New York.
- van Kleunen M, Fischer M (2005) Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytol* 166, 49-60.
- Van Tienderen PH (1991) Evolution of generalists and specialist in spatially heterogeneous environments. *Evolution* 45, 1317-1331.
- Van Tienderen PH (1997) Generalists, specialists, and the evolution of phenotypic plasticity in sympatric populations of distinct species. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 51, 1372 - 1380.
- Vendramini F, Díaz S, Gurvich DE, Wilson P J, Thompson K, Hodgson JG (2002) Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species. *New Phytol* 154, 147-157.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45, 523-539.
- Via S, Lande R (1985) Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39, 505-522.
- von Ende CN (2001) Repeated-measures analysis: growth and other time-dependent measures. In: *Design and Analysis of Ecological Experiments* (Scheiner SM, Gurevich J, eds), 134-157, Oxford University Press, New York, USA.

- Vuleta A, Manitašević Jovanović S, Šešija D, Tucić B (2010) Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumila* L. *J Plant Ecol-UK* 3, 59-69.
- Vuleta A, Manitašević Jovanović S, Tucić B (2011) Pattern of plasticity to irradiance levels and genotypic correlations between structural and physiological leaf traits in *Iris pumila*. *Arch Biol Sci* 63, 655-660.
- Vuleta A, Tucić B (2009) Thermal dependence of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in foliage of *Iris pumila* L. *Arch Biol Sci* 61, 441-446.
- Wada M, Kagawa T, Sato Y (2003) Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* 54, 455-468.
- Wagner GP (2001) The character concept in evolutionary biology. Academic press, San Diego.
- Waitt DE, Levin DA (1993) Phenotypic integration and plastic correlations in *Phlox drummondii* (Polemoniaceae). *Am J Bot* 80, 1224-1233.
- Wang FZ, Wang QB, Kwon SY, Kwak SS, Su WA (2005) Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol* 162, 465-472.
- Wang J, Zhang H, Allen RD (1999) Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal APX gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 40, 725-732.
- Wang Y, Chen X, Xiang C (2007) Stomatal density and bio-water saving. *J Integr Plant Biol* 49, 1435-1444.
- Wang Y, Ying Y, Chen J, Wang X (2004) Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Sci* 167, 671-677.
- Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgård IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM, Duroux L (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269, 6063-6081.

- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. *J Plant Physiol* 144, 307-313.
- West-Eberhard MJ (2003) Developmental plasticity and evolution. Oxford University Press, New York, USA.
- Wiens JA 1976. Population responses to patchy environments. *Annu Rev Ecol Syst* 7, 81-120.
- Wijesinghe DK, Hutchings MJ (1997) The effects of spatial scale of environmental heterogeneity on the growth of a clonal plant: an experimental study with *Glechoma hederacea*. *J Ecol* 85, 17-28.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO J* 16, 4806-4816.
- Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Mol Breed* 1, 207-228.
- Williams GC (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Williams WE, Gorton HL and Witiak SM (2003) Chloroplast movements in the field. *Plant Cell Environ* 26, 2005-2014.
- Winn AA (1999) Is seasonal variation in leaf traits adaptive for the annual plant *Dicerandra linearifolia*? *J Evolution Biol* 12, 306-313.
- Witkowski ETF, Lamont BB (1991) Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia* 88, 486-493.
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44, 301-305.
- Yabuta Y, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2004) Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* 45, 1586-1594.

- Yang Y, Han C, Liu Q, Lin B, Wang J (2008) Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiol Plant* 30, 433–440.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stress. *Plant Physiol* 123, 223–233.

8 PRILOZI

PRILOG 1. Pearson-ovi koeficijenti korelacija i P vrednosti osobina lista *I. pumila* tokom proleća (A), leta (B) i jeseni (C). U gornjoj polovini tabela su prikazane vrednosti koeficijenata korelacija za osobine biljaka iz populacije Dina, a u donjoj polovini su prikazane vrednosti koeficijenata korelacija za osobine biljaka iz populacije Šuma. Vrednosti statistički značajnih koeficijenata korelacije ($P < 0.05$) označeni su masnim slovima, dok su vrednosti koeficijenata korelacija marginalne značajnosti ($0.05 < P < 0.10$) označene kurzivom. Opis skraćenica naziva osobina je dat u Tabeli 3.2.1.

A	SOD	APX	CAT	GR	POD	PHEN	ANTH	MDA	SLA	SD	LDMC	LWC	SU	RWC	Chl a	Chl b	Cars
SOD		0.446 0.073	0.072 0.784	0.429 0.086	0.022 0.934	0.319 0.212	0.143 0.584	0.209 0.420	-0.170 0.514	0.332 0.193	0.031 0.905	-0.031 0.905	-0.258 0.318	-0.259 0.316	0.164 0.529	0.231 0.373	0.274 0.288
APX	0.569 0.110		0.339 0.184	0.437 0.079	0.091 0.729	0.144 0.581	0.075 0.774	0.445 0.074	-0.160 0.540	0.039 0.882	-0.176 0.499	0.176 0.499	0.008 0.977	-0.551 0.022	0.017 0.948	-0.097 0.711	0.053 0.841
CAT	-0.616 0.077	-0.037 0.925		-0.268 0.298	0.343 0.177	0.419 0.094	0.237 0.360	0.515 0.034	0.376 0.137	0.241 0.352	-0.048 0.855	0.048 0.855	-0.220 0.396	-0.015 0.955	-0.200 0.441	-0.175 0.503	-0.158 0.546
GR	0.280 0.466	-0.178 0.647	-0.581 0.101		-0.236 0.362	-0.345 0.175	0.058 0.824	-0.154 0.554	-0.102 0.698	-0.007 0.978	-0.149 0.569	0.149 0.569	-0.139 0.595	-0.442 0.076	-0.033 0.901	-0.078 0.767	-0.077 0.768
POD	-0.677 0.045	-0.467 0.205	0.585 0.098	-0.400 0.287		0.493 0.044	0.615 0.009	0.530 0.029	-0.325 0.203	-0.013 0.960	0.099 0.705	-0.099 0.705	0.176 0.500	-0.247 0.340	0.019 0.941	0.089 0.734	0.121 0.644
PHEN	-0.399 0.288	0.162 0.676	0.726 0.027	-0.376 0.319	-0.024 0.951		-0.069 0.793	0.754 0.001	-0.081 0.757	0.233 0.367	0.040 0.878	-0.040 0.878	0.092 0.724	-0.255 0.323	-0.121 0.643	0.050 0.849	0.014 0.957
ANTH	-0.381 0.312	-0.006 0.988	0.403 0.283	-0.439 0.238	0.436 0.240	0.325 0.393		0.103 0.694	-0.179 0.493	0.220 0.395	0.218 0.400	-0.218 0.400	0.000 0.999	0.010 0.969	0.039 0.881	-0.051 0.845	0.077 0.768
MDA	-0.720 0.029	-0.014 0.973	0.570 0.109	-0.092 0.814	0.448 0.227	0.425 0.255	0.465 0.207		0.055 0.834	-0.004 0.987	-0.333 0.191	0.333 0.191	0.346 0.174	-0.513 0.035	0.098 0.708	0.080 0.760	0.173 0.506
SLA	0.393 0.295	0.001 0.999	-0.333 0.381	0.214 0.581	-0.455 0.219	-0.049 0.900	-0.206 0.595	-0.280 0.465		0.125 0.633	-0.508 0.037	0.508 0.037	-0.034 0.898	0.085 0.744	0.005 0.985	0.062 0.813	-0.089 0.734
SD	0.020 0.960	0.256 0.506	0.204 0.599	0.104 0.790	-0.270 0.483	0.596 0.090	0.207 0.593	0.044 0.910	-0.375 0.320		-0.035 0.895	0.035 0.895	0.076 0.772	-0.173 0.508	-0.237 0.359	-0.129 0.621	-0.196 0.451
LDMC	0.131 0.737	0.275 0.474	-0.150 0.700	-0.060 0.878	-0.230 0.552	-0.210 0.588	-0.656 0.055	-0.182 0.639	-0.389 0.301	-0.113 0.772		-1.000 0.0001	-0.439 0.078	0.488 0.047	-0.252 0.330	-0.251 0.331	-0.163 0.532
LWC	-0.131 0.737	-0.275 0.474	0.150 0.700	0.060 0.878	0.230 0.552	0.210 0.588	0.656 0.055	0.182 0.639	0.389 0.301	0.113 0.772	-1.000 0.0001		0.439 0.078	-0.488 0.047	0.252 0.330	0.251 0.331	0.163 0.532
SU	-0.180 0.642	-0.081 0.836	-0.050 0.899	-0.191 0.623	0.346 0.362	-0.041 0.917	0.744 0.022	0.113 0.772	-0.320 0.401	0.293 0.445	-0.512 0.159	0.512 0.159		-0.306 0.233	0.548 0.023	0.462 0.062	0.515 0.034
RWC	0.526 0.146	0.180 0.643	-0.706 0.034	0.024 0.952	-0.468 0.204	-0.605 0.085	-0.597 0.089	-0.621 0.074	0.280 0.465	-0.499 0.171	0.594 0.092	-0.594 0.092	-0.295 0.441		0.073 0.782	0.064 0.809	0.050 0.849
Chl a	0.042 0.915	0.462 0.210	0.009 0.982	-0.207 0.594	0.311 0.416	-0.200 0.606	0.411 0.271	0.245 0.525	-0.608 0.082	0.175 0.652	0.082 0.833	-0.082 0.833	0.627 0.071	-0.091 0.815		0.924 0.0001	0.980 0.0001
Chl b	0.083 0.831	0.407 0.277	-0.096 0.805	-0.133 0.733	0.296 0.440	-0.295 0.442	0.484 0.187	0.228 0.555	-0.492 0.178	0.098 0.801	-0.058 0.882	0.058 0.882	0.698 0.037	-0.083 0.833	0.977 0.0001		0.924 0.0001
Cars	0.125 0.748	0.517 0.154	-0.077 0.844	-0.127 0.745	0.190 0.625	-0.229 0.554	0.310 0.416	0.180 0.643	-0.626 0.072	0.229 0.553	0.183 0.637	-0.183 0.637	0.566 0.112	-0.019 0.962	0.988 0.0001	0.956 0.0001	

B	SOD	APX	CAT	GR	POD	PHEN	ANTH	MDA	SLA	SD	LDMC	LWC	SU	RWC	Chl a	Chl b	Cars
SOD		0.157 0.547	0.208 0.423	0.449 0.070	0.056 0.832	-0.114 0.664	0.319 0.212	-0.332 0.192	0.150 0.566	0.155 0.551	0.212 0.414	-0.212 0.414	-0.309 0.228	-0.320 0.211	0.119 0.650	0.052 0.842	-0.061 0.815
APX	0.137 0.627		0.346 0.173	0.554 0.021	0.391 0.121	-0.337 0.186	0.360 0.156	-0.252 0.329	0.568 0.017	0.220 0.396	0.100 0.703	-0.100 0.703	-0.534 0.027	-0.039 0.881	-0.227 0.381	-0.260 0.314	-0.243 0.347
CAT	0.219 0.433	0.609 0.016		0.389 0.123	0.497 0.042	0.200 0.442	0.412 0.101	-0.002 0.993	-0.132 0.614	0.320 0.211	0.447 0.072	-0.447 0.072	-0.292 0.256	0.148 0.571	0.309 0.228	0.241 0.351	0.308 0.229
GR	0.083 0.769	0.571 0.026	0.761 0.001		0.244 0.346	-0.259 0.316	0.570 0.017	-0.292 0.255	0.620 0.008	0.418 0.095	0.079 0.762	-0.079 0.762	-0.524 0.031	-0.349 0.170	-0.311 0.225	-0.349 0.169	-0.376 0.137
POD	0.142 0.613	0.745 0.001	0.707 0.003	0.862 <.0001		0.240 0.354	0.283 0.271	0.129 0.620	-0.048 0.856	0.436 0.080	0.107 0.684	-0.107 0.684	-0.017 0.949	0.395 0.117	0.279 0.279	0.269 0.296	0.253 0.328
PHEN	0.262 0.345	0.678 0.006	0.361 0.186	0.429 0.111	0.414 0.125		0.210 0.419	0.747 0.001	-0.359 0.157	0.144 0.582	-0.106 0.685	0.106 0.685	0.165 0.527	-0.031 0.907	0.473 0.055	0.507 0.038	0.643 0.005
ANTH	-0.051 0.858	-0.131 0.641	-0.039 0.891	-0.121 0.668	-0.106 0.707	-0.262 0.345		-0.029 0.911	0.360 0.156	-0.029 0.911	0.232 0.371	-0.232 0.371	-0.376 0.137	-0.310 0.226	-0.099 0.706	-0.115 0.659	-0.020 0.940
MDA	0.298 0.280	-0.193 0.491	-0.133 0.637	-0.161 0.568	-0.167 0.552	0.029 0.917	-0.002 0.995		-0.298 0.246	0.237 0.360	-0.016 0.952	0.016 0.952	0.053 0.839	-0.017 0.949	0.121 0.642	0.148 0.572	0.292 0.256
SLA	-0.112 0.692	-0.445 0.097	-0.208 0.457	-0.576 0.025	-0.556 0.031	-0.378 0.165	0.008 0.976	0.284 0.305		-0.008 0.975	-0.057 0.828	0.057 0.828	-0.633 0.006	-0.333 0.191	-0.614 0.009	-0.621 0.008	-0.606 0.010
SD	-0.064 0.822	-0.548 0.035	-0.080 0.776	-0.406 0.134	-0.599 0.018	-0.342 0.212	-0.280 0.312	-0.103 0.715	0.671 0.006		-0.321 0.209	0.321 0.209	0.068 0.795	-0.180 0.489	0.079 0.763	0.074 0.777	-0.009 0.972
LDMC	-0.029 0.919	-0.243 0.383	0.004 0.989	0.031 0.913	-0.247 0.375	-0.063 0.823	-0.127 0.652	0.502 0.057	0.168 0.549	0.170 0.546		-1.000 0.0001	-0.568 0.018	0.075 0.775	-0.103 0.694	-0.181 0.488	-0.061 0.816
LWC	0.029 0.919	0.243 0.383	-0.004 0.989	-0.031 0.913	0.247 0.375	0.063 0.823	0.127 0.652	-0.502 0.057	-0.168 0.549	-0.170 0.546	-1.000 0.0001		0.568 0.018	-0.075 0.775	0.103 0.694	0.181 0.488	0.061 0.816
SU	0.344 0.209	0.179 0.524	0.076 0.787	0.216 0.440	0.223 0.425	0.260 0.350	-0.085 0.764	-0.263 0.344	-0.504 0.056	-0.275 0.321	-0.484 0.068	0.484 0.068		0.325 0.203	0.484 0.049	0.554 0.021	0.416 0.097
RWC	-0.234 0.402	0.167 0.553	0.073 0.795	-0.077 0.786	-0.090 0.749	0.076 0.787	-0.239 0.390	0.387 0.154	0.425 0.114	0.106 0.708	0.376 0.168	-0.376 0.168	-0.319 0.247		0.513 0.035	0.489 0.046	0.452 0.068
Chl a	0.038 0.892	0.215 0.443	0.278 0.316	0.491 0.063	0.622 0.013	0.152 0.588	-0.304 0.271	0.072 0.799	-0.254 0.361	-0.247 0.375	-0.435 0.105	0.435 0.105	0.219 0.432	-0.033 0.907		0.992 0.0001	0.926 0.0001
Chl b	-0.003 0.993	0.207 0.459	0.203 0.468	0.435 0.105	0.612 0.015	0.106 0.706	-0.327 0.234	0.125 0.658	-0.192 0.493	-0.274 0.323	-0.375 0.168	0.375 0.168	0.164 0.559	0.028 0.920	0.973 0.0001		0.942 0.0001
Cars	0.151 0.591	0.251 0.366	0.351 0.200	0.515 0.049	0.621 0.014	0.196 0.484	-0.278 0.316	0.210 0.453	-0.181 0.519	-0.241 0.388	-0.298 0.281	0.298 0.281	0.192 0.492	0.073 0.797	0.975 0.0001	0.956 0.0001	

C	SOD	APX	CAT	GR	POD	PHEN	ANTH	MDA	SLA	SD	LDMC	LWC	SU	RWC	Chl a	Chl b	Cars
SOD		-0.218 0.329	-0.054 0.811	0.610 0.003	0.292 0.187	-0.210 0.348	-0.007 0.976	-0.428 0.047	0.318 0.149	-0.116 0.608	-0.280 0.207	0.280 0.207	-0.128 0.569	-0.356 0.104	-0.287 0.208	-0.373 0.096	-0.296 0.193
APX	0.278 0.316		0.271 0.223	0.098 0.665	0.221 0.324	-0.311 0.159	-0.221 0.323	-0.063 0.780	0.294 0.184	-0.066 0.770	-0.241 0.280	0.241 0.280	0.034 0.882	0.106 0.639	0.201 0.382	0.178 0.440	0.141 0.543
CAT	-0.430 0.110	-0.069 0.808		-0.036 0.874	0.048 0.834	-0.374 0.086	0.177 0.430	-0.224 0.315	-0.226 0.313	-0.217 0.333	0.337 0.126	-0.337 0.126	-0.141 0.532	-0.023 0.920	-0.085 0.713	-0.048 0.837	-0.056 0.808
GR	-0.232 0.406	0.224 0.423	-0.102 0.716		0.274 0.217	-0.002 0.994	0.079 0.728	-0.279 0.209	0.309 0.162	-0.181 0.421	-0.148 0.512	0.148 0.512	-0.166 0.461	0.023 0.919	-0.376 0.093	-0.449 0.041	-0.413 0.063
POD	-0.317 0.250	0.519 0.047	-0.006 0.984	0.715 0.003		-0.009 0.967	0.126 0.575	-0.198 0.376	0.069 0.760	-0.058 0.799	<i>-0.400</i> <i>0.065</i>	<i>0.400</i> <i>0.065</i>	0.338 0.124	-0.189 0.400	-0.029 0.900	-0.095 0.683	-0.047 0.841
PHEN	0.014 0.959	0.083 0.768	-0.188 0.502	0.185 0.510	0.082 0.772		0.328 0.136	0.579 0.005	0.065 0.773	0.186 0.407	-0.039 0.863	0.039 0.863	-0.012 0.959	0.182 0.417	-0.186 0.421	-0.180 0.435	-0.158 0.495
ANTH	-0.061 0.830	-0.023 0.934	0.218 0.434	-0.328 0.233	-0.305 0.269	-0.107 0.703		0.191 0.395	-0.061 0.787	-0.225 0.315	0.230 0.303	-0.230 0.303	-0.050 0.826	0.215 0.338	-0.125 0.588	-0.142 0.540	-0.136 0.557
MDA	-0.041 0.885	0.755 0.001	0.075 0.790	0.309 0.263	0.574 0.025	0.542 0.037	-0.111 0.694		-0.192 0.392	0.174 0.438	-0.092 0.683	0.092 0.683	0.356 0.104	0.202 0.367	0.266 0.245	0.296 0.193	0.251 0.272
SLA	0.342 0.212	-0.078 0.781	0.144 0.608	-0.539 0.038	<i>-0.453</i> <i>0.090</i>	-0.042 0.882	0.350 0.201	-0.186 0.508		-0.123 0.585	-0.545 0.009	0.545 0.009	-0.320 0.147	0.166 0.459	-0.204 0.376	-0.275 0.228	-0.234 0.308
SD	0.170 0.544	-0.044 0.875	0.042 0.882	0.146 0.604	-0.164 0.560	<i>0.500</i> <i>0.058</i>	0.207 0.459	0.104 0.713	-0.125 0.656		-0.006 0.980	0.006 0.980	-0.151 0.503	-0.271 0.222	-0.112 0.627	-0.153 0.508	-0.147 0.524
LDMC	-0.043 0.878	0.176 0.531	-0.276 0.319	0.335 0.222	0.072 0.798	-0.149 0.596	0.135 0.631	-0.088 0.755	-0.189 0.501	0.326 0.235		-1.000 0.0001	-0.489 0.021	0.229 0.306	-0.064 0.782	0.050 0.830	-0.063 0.787
LWC	0.043 0.878	-0.176 0.531	0.276 0.319	-0.335 0.222	-0.072 0.798	0.149 0.596	-0.135 0.631	0.088 0.755	0.189 0.501	-0.326 0.235	-1.000 0.0001		0.489 0.021	-0.229 0.306	0.064 0.782	-0.050 0.830	0.063 0.787
SU	-0.413 0.126	-0.051 0.857	0.327 0.234	0.301 0.276	0.437 0.103	0.108 0.703	-0.305 0.270	0.364 0.182	<i>-0.486</i> <i>0.066</i>	-0.230 0.409	<i>-0.459</i> <i>0.085</i>	<i>0.459</i> <i>0.085</i>		0.059 0.795	0.559 0.008	0.495 0.022	0.581 0.006
RWC	-0.202 0.469	-0.466 0.080	0.306 0.268	-0.359 0.188	-0.387 0.154	0.313 0.256	0.437 0.103	-0.181 0.519	0.530 0.042	0.381 0.161	-0.071 0.801	0.071 0.801	-0.296 0.284		<i>0.416</i> <i>0.061</i>	<i>0.418</i> <i>0.059</i>	<i>0.373</i> <i>0.096</i>
Chl a	-0.298 0.281	0.125 0.658	0.225 0.419	-0.100 0.724	0.222 0.426	0.247 0.375	0.038 0.893	<i>0.471</i> <i>0.077</i>	0.088 0.756	0.004 0.990	0.004 0.990	-0.004 0.990	0.293 0.290	0.294 0.288		0.913 0.0001	0.646 0.001
Chl b	-0.360 0.188	0.093 0.742	0.273 0.324	0.014 0.961	0.264 0.342	0.280 0.313	0.142 0.614	<i>0.464</i> <i>0.082</i>	0.015 0.957	0.192 0.492	0.125 0.657	-0.125 0.657	0.283 0.308	0.376 0.167	0.959 0.0001		0.743 0.0001
Cars	-0.306 0.268	0.047 0.869	0.344 0.210	-0.165 0.556	0.141 0.617	0.135 0.631	0.212 0.448	0.387 0.154	0.116 0.682	0.086 0.761	0.015 0.958	-0.015 0.958	0.309 0.262	0.388 0.153	0.951 0.0001	0.960 0.0001	

PRILOG 2. Pearson-ovi koeficijenti korelacija i P vrednosti osobina lista genotipova *I. pumila* poreklom iz populacija Dina i Šuma koji su rasli na otvorenom (A) i zasenčenom (B) staništu, u prirodi. U gornjoj polovini tabele su prikazane vrednosti koeficijenata korelacija za osobine genotipova iz populacije Dina, a u donjoj su prikazane vrednosti koeficijenata korelacija za osobine genotipova iz populacije Šuma. Vrednosti statistički značajnih koeficijenata korelacije ($P < 0.05$) označeni su masnim slovima, a vrednosti koeficijenata korelacija marginalne značajnosti ($0.05 < P < 0.10$) označene su kurzivom. Opis skraćenica naziva osobina je dat u Tabeli 3.2.1.

A	SOD	APX	CAT	GR	POD	PHEN	ANTH	MDA	SLA	LDMC	LWC	SU	Chl a	Chl b	Cars
SOD		0.588 0.074	0.150 0.678	0.640 0.046	-0.401 0.251	-0.746 0.013	-0.821 0.004	-0.529 0.116	0.361 0.305	-0.077 0.832	0.077 0.832	-0.176 0.628	-0.630 0.051	-0.621 0.056	-0.690 0.027
APX	0.091 0.804		-0.145 0.689	0.621 0.056	-0.711 0.021	-0.362 0.304	-0.176 0.627	-0.291 0.414	0.366 0.298	-0.459 0.182	0.459 0.182	-0.049 0.892	-0.375 0.286	-0.366 0.299	-0.359 0.308
CAT	0.096 0.793	-0.024 0.947		-0.389 0.267	-0.340 0.337	-0.190 0.600	-0.379 0.280	-0.563 0.090	-0.057 0.876	-0.218 0.545	0.218 0.545	0.216 0.548	-0.191 0.597	-0.159 0.660	-0.223 0.536
GR	0.120 0.742	0.808 0.005	0.358 0.310		-0.352 0.319	-0.481 0.159	-0.262 0.464	-0.038 0.916	0.135 0.710	-0.154 0.670	0.154 0.670	0.059 0.872	-0.258 0.472	-0.247 0.492	-0.252 0.483
POD	-0.512 0.130	0.071 0.845	0.188 0.602	0.118 0.746		0.301 0.399	0.119 0.744	0.471 0.169	-0.202 0.576	0.788 0.007	-0.788 0.007	-0.120 0.741	0.192 0.596	0.175 0.630	0.197 0.585
PHEN	-0.650 0.042	0.386 0.270	-0.422 0.225	0.332 0.349	0.386 0.270		0.812 0.004	0.203 0.574	-0.738 0.015	0.037 0.920	0.150 0.679	0.464 0.177	0.794 0.006	0.796 0.006	0.860 0.001
ANTH	-0.829 0.003	0.061 0.867	-0.072 0.844	-0.178 0.623	0.410 0.239	0.510 0.132		0.552 0.098	-0.415 0.233	-0.150 0.679	-0.037 0.920	0.316 0.374	0.891 0.001	0.886 0.001	0.907 0.000
MDA	-0.456 0.186	-0.423 0.224	0.002 0.995	-0.577 0.081	-0.188 0.602	-0.248 0.489	0.465 0.176		0.206 0.567	0.086 0.813	-0.086 0.813	-0.065 0.858	0.187 0.604	0.197 0.586	0.284 0.427
SLA	0.124 0.733	0.149 0.682	-0.513 0.129	0.249 0.487	-0.300 0.400	0.378 0.281	-0.462 0.178	-0.363 0.303		-0.116 0.750	0.116 0.750	-0.699 0.025	-0.805 0.005	-0.808 0.005	-0.775 0.009
LDMC	-0.570 0.085	-0.195 0.589	-0.343 0.331	-0.124 0.733	0.073 0.841	0.438 0.206	0.126 0.728	0.241 0.503	0.512 0.131		-1.000 0.0001	-0.427 0.218	-0.022 0.952	-0.043 0.907	-0.051 0.888
LWC	0.570 0.085	0.195 0.589	0.343 0.331	0.124 0.733	-0.073 0.841	-0.126 0.728	-0.438 0.206	-0.241 0.503	-0.512 0.131	-1.000 0.0001		0.427 0.218	0.022 0.952	0.043 0.907	0.051 0.888
SU	0.222 0.538	0.082 0.823	0.507 0.135	-0.023 0.950	0.064 0.861	-0.446 0.197	0.236 0.513	0.124 0.734	-0.872 0.001	-0.837 0.003	0.837 0.003		0.518 0.126	0.550 0.099	0.540 0.107
Chl a	-0.498 0.143	-0.207 0.565	0.341 0.335	-0.232 0.518	0.328 0.355	0.740 0.014	0.075 0.837	0.376 0.284	-0.818 0.004	-0.240 0.504	0.240 0.504	0.654 0.040		0.997 0.0001	0.982 0.0001
Chl b	-0.377 0.283	-0.223 0.535	0.391 0.264	-0.236 0.512	0.296 0.407	0.683 0.029	-0.009 0.981	0.317 0.373	-0.819 0.004	-0.400 0.252	0.400 0.252	0.733 0.016	0.944 0.0001		0.987 0.0001
Cars	-0.489 0.151	-0.092 0.800	0.178 0.622	-0.256 0.475	0.360 0.307	0.838 0.003	0.174 0.630	0.313 0.379	-0.752 0.012	-0.322 0.364	0.322 0.364	0.642 0.046	0.852 0.002	0.898 0.000	

B	SOD	APX	CAT	GR	POD	PHEN	ANTH	MDA	SLA	LDMC	LWC	SU	Chl a	Chl b	Cars
SOD		0.327 0.356	0.524 0.120	0.295 0.408	-0.087 0.812	-0.369 0.295	0.299 0.401	-0.109 0.764	-0.692 0.027	0.118 0.746	-0.118 0.746	0.233 0.517	0.162 0.656	0.210 0.560	0.147 0.685
APX	0.420 0.228		0.372 0.290	0.351 0.320	0.685 0.029	0.501 0.141	-0.019 0.958	-0.230 0.523	-0.263 0.464	0.483 0.157	-0.483 0.157	0.103 0.777	0.555 0.096	0.493 0.147	0.603 0.065
CAT	0.176 0.627	0.179 0.620		0.551 0.099	0.164 0.651	-0.169 0.641	0.604 0.064	0.029 0.936	-0.116 0.750	0.166 0.647	-0.166 0.647	-0.049 0.894	0.613 0.059	0.638 0.047	0.583 0.077
GR	0.163 0.652	-0.067 0.854	0.038 0.918		-0.209 0.563	0.212 0.557	-0.179 0.621	-0.418 0.229	0.223 0.535	-0.220 0.542	0.220 0.542	0.266 0.458	0.250 0.486	0.248 0.489	0.215 0.551
POD	0.771 0.009	0.210 0.561	0.284 0.426	-0.163 0.652		0.510 0.132	0.285 0.424	-0.147 0.686	-0.110 0.762	0.742 0.014	-0.742 0.014	-0.290 0.416	0.581 0.078	0.551 0.099	0.656 0.039
PHEN	-0.166 0.646	0.051 0.888	0.134 0.712	-0.868 0.001	0.169 0.642		-0.361 0.306	-0.630 0.051	0.327 0.357	0.191 0.598	-0.075 0.837	0.121 0.739	0.564 0.089	0.628 0.052	0.539 0.108
ANTH	0.536 0.110	0.542 0.106	0.449 0.193	-0.265 0.460	0.598 0.068	0.504 0.138		0.242 0.500	-0.240 0.505	0.075 0.837	-0.191 0.598	-0.127 0.726	0.264 0.462	0.153 0.673	0.328 0.355
MDA	-0.348 0.325	-0.079 0.828	-0.285 0.426	-0.622 0.055	-0.068 0.851	0.502 0.140	-0.214 0.552		0.036 0.921	-0.026 0.944	0.026 0.944	-0.429 0.217	-0.277 0.438	-0.259 0.469	-0.304 0.392
SLA	-0.654 0.040	-0.180 0.618	-0.075 0.838	0.139 0.702	-0.643 0.045	-0.140 0.699	-0.412 0.237	0.388 0.268		-0.223 0.535	0.223 0.535	-0.416 0.231	-0.256 0.475	-0.298 0.403	-0.249 0.488
LDMC	0.209 0.562	0.051 0.888	-0.037 0.920	-0.132 0.716	0.500 0.141	0.008 0.983	-0.155 0.668	0.432 0.213	-0.274 0.443		-1.000 0.0001	-0.584 0.076	0.153 0.672	0.172 0.635	0.230 0.522
LWC	-0.209 0.562	-0.051 0.888	0.037 0.920	0.132 0.716	-0.500 0.141	0.155 0.668	-0.008 0.983	-0.432 0.213	0.274 0.443	-1.000 0.0001		0.584 0.076	-0.153 0.672	-0.172 0.635	-0.230 0.522
SU	0.439 0.205	0.114 0.754	0.098 0.788	-0.292 0.413	0.310 0.384	0.335 0.343	0.525 0.119	-0.468 0.172	-0.767 0.010	-0.354 0.316	0.354 0.316		0.338 0.339	0.288 0.420	0.294 0.409
Chl a	0.345 0.329	-0.098 0.788	0.288 0.420	-0.287 0.421	0.376 0.284	0.407 0.243	0.494 0.147	0.107 0.769	-0.434 0.210	-0.004 0.992	0.004 0.992	0.484 0.156		0.983 0.0001	0.995 0.000
Chl b	0.397 0.257	-0.076 0.834	0.287 0.421	-0.251 0.484	0.383 0.274	0.434 0.210	0.464 0.177	0.042 0.907	-0.468 0.173	-0.042 0.907	0.042 0.907	0.533 0.113	0.996 0.0001		0.971 0.000
Cars	0.395 0.259	-0.028 0.939	0.258 0.472	-0.324 0.360	0.390 0.265	0.453 0.189	0.515 0.128	0.093 0.799	-0.482 0.159	-0.026 0.943	0.026 0.943	0.551 0.099	0.991 0.0001	0.992 0.0001	

BIOGRAFIJA AUTORA

Ana Vuleta je rođena 03.05.1979. godine u Beogradu. Završila je X gimnaziju „Mihajlo Pupin“ 1998. godine u Beogradu, nakon koje se, školske 1998/99 godine, upisala na Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu. U toku studija odslušala je izbornu grupu predmeta u okviru smera Fiziologija biljaka. Diplomirala je 2005. godine sa prosečnom ocenom 9.2. Doktorske studije upisala je školske 2006/07 na Biološkom fakultetu u Beogradu, smer Primenjena i eksperimentalna botanika, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

Od 01.05.2005. godine zaposlena je u Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, gde radi u zvanju istraživač saradnik. Učestvovala je u sledećim nacionalnim projektima:

2005-2006 „Adaptacije u prirodnim i laboratorijskim populacijama“ (Program osnovnih istraživanja MNZŽS Ev. br.1570, rukovodilac dr Branka Tucić);

2006-2010 „Fiziološki i evolucionni aspekti stresnog odgovora u prirodnim laboratorijskim populacijama“ (Program osnovnih istraživanja MNTR Ev. br. 143033, rukovodilac dr Jelica Lazarević);

2011- „Evolucija u laboratoriji i adaptacije u prirodi“ (Program osnovnih istraživanja MNP Ev. br.173007, rukovodilac dr Branka Tucić).

Dosadašnja naučno-istraživačka aktivnost Ane Vulete odvijala se u oblasti evolucione ekologije biljaka. Rezultate svojih istraživanja prikazala je u šest naučnih radova publikovanih u časopisima od međunarodnog značaja i tri kongresna saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Вулета

број уписа EA060009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Еволуциона екофизиологија стреса: улога ензимских и неензимских антиоксиданата у природним популацијама *Iris pumila* L. (Iridaceae)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена 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 интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 14.3.2013.

Ана Вулета

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Вулета

Број уписа ЕА060009

Студијски програм Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада Еволуциона екофизиологија стреса: улога ензимских и неензимских
антиоксиданата у природним популацијама *Iris pumila* L. (Iridaceae)

Ментор др Бранка Туцић и доц. др Анета Сабовљевић

Потписани Ана Вулета

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла 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 докторанда

У Београду, 14.3.2013.

Ана Вулета

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Еволуциона екофизиологија стреса: улога ензимских и неензимских антиоксиданата у природним популацијама *Iris pumila* L. (Iridaceae)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла 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 одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 14.3.2013.

Ана Вулешиа

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 – делити под истим условима. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 - делити под истим условима. Дозвољавање 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.